



ESPE

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO
DE
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE
CONTAMINANTES, PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y
CONTENIDO LIPÍDICO, ALCANZADOS MEDIANTE EL CULTIVO
DE UN CONSORCIO MICROALGAL UTILIZANDO AGUA CON
NUTRIENTES DEL RESERVORIO DE GUANGOPOLO DE LA
EMPRESA ELÉCTRICA QUITO, PICHINCHA**

AUTOR: MENESES CORAL MAGALY MARICELA

DIRECTOR: DR. GAVILANES, PETRONIO

SANGOLQUÍ

2015



Departamento de Ciencias de la Vida y la
Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

CERTIFICACIÓN

Dr. Petronio

Certifica:

Que el presente trabajo titulado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES, PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y CONTENIDO LIPÍDICO, ALCANZADOS MEDIANTE EL CULTIVO DE UN CONSORCIO MICROALGAL UTILIZANDO AGUA CON NUTRIENTES DEL RESERVORIO DE GUANGOPOLO DE LA EMPRESA ELÉCTRICA QUITO, PICHINCHA.” realizado por la Srta. MAGALY MARICELA MENESES CORAL, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita MENESES CORAL MAGALY MARICELA para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Diciembre de 2015

Dr. Petronio Gavilanes

DIRECTOR



Departamento de Ciencias de la Vida y la
Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Magaly Maricela Meneses Coral

Declaro que:

El trabajo de titulación denominado “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES, PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y CONTENIDO LIPÍDICO, ALCANZADOS MEDIANTE EL CULTIVO DE UN CONSORCIO MICROALGAL UTILIZANDO AGUA CON NUTRIENTES DEL RESERVOIRIO DE GUANGOPOLO DE LA EMPRESA ELÉCTRICA QUITO, PICHINCHA” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, y así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, Diciembre de 2015

Magaly Maricela Meneses Coral



Departamento de Ciencias de la Vida y la
Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

AUTORIZACIÓN

Yo, Magaly Maricela Meneses Coral

Autorizo a la Universidad de la Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca virtual de la Institución el presente trabajo de titulación “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CONTAMINANTES, PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA Y CONTENIDO LIPÍDICO, ALCANZADOS MEDIANTE EL CULTIVO DE UN CONSORCIO MICROALGAL UTILIZANDO AGUA CON NUTRIENTES DEL RESERVORIO DE GUANGOPOLO DE LA EMPRESA ELÉCTRICA QUITO, PICHINCHA.”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad

Sangolquí, Diciembre de 2015

Magaly Maricela Meneses Coral

DEDICATORIA

A mis queridos padres, quienes me han impulsado a perseverar hasta cumplir mis metas.

A mis incomparables hermanos, por su constante apoyo.

A toda mi familia por su confianza en mí

Magaly Maricela Meneses Coral

AGRADECIMIENTO

A Dios por bendecirme con una lindísima familiar, salud, sabiduría y por su infinito amor.

A mis padres por su amor, sacrificio, paciencia y apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A mi hermana Erika y mi hermano Cristofer por estar siempre junto a mí.

A mis abuelitos, tíos y primos por su confianza en mí.

A mi director de proyecto el Dr. Petronio Gavilanes y a mi codirector de proyecto el Ing. Marco Taipe por compartir sus conocimientos, orientar y guiar el desarrollo de mi investigación.

A la Corporación para la Investigación Energética (CIE), al Laboratorio de Biotecnología Energética BIOTEC y al Ing. Alfredo Mena por su confianza y apoyo.

Magaly Maricela Meneses Coral

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD	iii
AUTORIZACIÓN	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS	xvii
RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Formulación del problema	2
1.3 Justificación del problema	3
1.4 Objetivos de la investigación	4
1.5 Marco Teórico.....	5
1.5.1 Características generales de las microalgas.....	5
1.5.2 Género <i>Scenedesmus</i> (Meyen, 1829)	7
1.5.3 Género <i>Chlorococcum</i> (Meneghini, 1842)	9
1.5.4 Fases de crecimiento	10
1.5.5 Factores que influyen el crecimiento celular	12
1.5.6 Sistemas de cultivo	15
1.5.7 Recuperación de la biomasa obtenida a partir de microalgas.....	16
1.5.8 Tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas.....	17
1.5.9 Agua residual del reservorio de regulación de EEQ.....	23
1.6 Hipótesis.....	24

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....	25
2.1 Participantes.....	25
2.2 Área de estudio	25
2.3 Periodo de Investigación	25
2.4 Diseño experimental.....	25
2.4.1 Fase 1: Aislamiento e identificación del consorcio microalgal nativo	26
2.4.2 Fase 2: Evaluación de la adaptabilidad del consorcio microalgal al agua residual de reservorio	29
2.4.3 Fase 3: Selección de la concentración óptima de Nitrofoska® foliar para suplementar al medio de cultivo	35
2.4.4 Fase 4: Evaluación de la productividad de la biomasa, contenido lipídico y capacidad de remoción de contaminantes alcanzados por el consorcio microalgal.....	38
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	43
3.1 Fase 1: Aislamiento e identificación del consorcio microalgal nativo	43
3.2 Fase 2: Evaluación de la adaptación del consorcio microalgal al agua residual del reservorio	45
3.2.1 Densidad celular alcanzada con el uso de agua residual esteriliza y no esterilizada.....	51
3.2.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación alcanzados con el uso de agua residual esteriliza y no esterilizada.....	54
3.3 Fase 3: Evaluación de la concentración óptima de Nitrofoska® foliar para suplementar al medio de cultivo	57
3.3.1 Densidad celular alcanzada con las diferentes concentraciones de NPK.....	59
3.3.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación alcanzados con las diferentes concentraciones de NPK	64
3.3.3 Peso seco de la biomasa obtenida con las diferentes concentraciones de NPK.....	67

3.4 Fase 4: Evaluación de la productividad de la biomasa, contenido lipídico y capacidad de remoción de contaminantes alcanzados por el consorcio microalgal <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp.....	69
3.4.1 Productividad de la biomasa procedente del cultivo del consorcio microalgal en fotobiorreactores	70
3.4.2 Contenido lipídico de la biomasa procedente del cultivo del consorcio microalgal en fotobiorreactores.....	72
3.4.3 Remoción de contaminantes.....	73
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....	78
4.1 Fase 1: Aislamiento e identificación de consorcio microalgal nativo	78
4.2 Fase 2: Evaluación de la adaptabilidad del consorcio microalgal al agua residual del reservorio	81
4.3 Fase 3: Evaluación de la concentración óptima de Nitrofoska para suplementar al medio de cultivo	83
4.4 Fase 4: Evaluación de la productividad de la biomasa, contenido lipídico y capacidad de remoción de contaminantes alcanzados por el consorcio microalgal <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp.....	86
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....	93
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	95
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....	97
CAPÍTULO 8: ANEXOS	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	
<i>Scenedesmus</i> sp., fotografía tomada a través del microscopio vista 100x	7
Figura 2	
<i>Chlorococcum</i> sp., fotografía tomada a través del microscopio vista 100x.....	9
Figura 3	
Etapas de crecimiento de las microalgas.....	11
Figura 4	
Asimilación del N por las microalgas.....	21
Figura 5	
Simbiosis entre microalgas y bacterias	22
Figura 6	
Reservorio de Guangopolo de la Empresa Eléctrica Quito	23
Figura 7	
Ubicación espacial del Reservorio de la Empresa Eléctrica	23
Figura 8	
Tubos de ensayos inoculados con agua de la represa de la EEQ	26
Figura 9	
Colonias microalgales aisladas en medio de cultivo BG ₁₁	27
Figura 10	
Esquema general para el proceso de aislamiento: Diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y estriamiento en placa	28
Figura 11	
Escalamiento del consorcio microalgal de trabajo	29
Figura 12	
Sitio de colecta del agua residual, laguna del reservorio de Guangopolo.....	30
Figura 13	
Cultivo del consorcio para evaluar su adaptabilidad sobre agua residual esterilizada y no esterilizada	31

Figura 14	
Cultivo del consorcio microalgal con concentraciones de NPK.....	34
Figura 15	
Proceso de cosecha por centrifugación en la fase 3.....	36
Figura 16	
Secado de la biomasa procedente de los cultivo en la fase 3.....	36
Figura 17	
Cultivo en fotobiorreactores.T1: agua residual suplementada con NPK. T2 agua potable suplementada con NPK.....	38
Figura 18	
Cosecha de biomasa mediante floculación	39
Figura 19	
Disrupción mecánica de la biomasa.....	40
Figura 20	
Consortio de trabajo constituido por <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp. .	44
Figura 21	
Curvas de crecimiento celular para <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorococcum</i> sp. cultivadas en agua de reservorio esterilizada	45
Figura 22	
Curvas de crecimiento celular para <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Chlorococcum</i> sp. cultivadas en agua de reservorio sin esterilizar.....	47
Figura 23	
Curvas de crecimiento para el consorcio <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp. cultivado sobre agua del reservorio esterilizada y no esterilizada.....	49
Figura 24	
Curvas de crecimiento para el tratamiento control y las tres concentraciones de NPK evaluadas	57
Figura 25	
Peso seco de la biomasa obtenida con la adición de concentraciones de NPK.....	67
Figura 26	
Peso seco de la biomasa en la fase 4.....	69

Figura 27

Porcentaje lipídico de la biomasa..... 71

Figura 28Valores de la DBO₅ antes y después de cultivo del consorcio microalgal..... 73**Figura 29**

Valores de la DQO antes y después del cultivo del consorcio 74

Figura 30Cantidad de sulfatos presentes en los fotobiorreactores
antes y después del cultivo del consorcio 75**Figura 31**Cantidad de nitrógeno presente en los fotobiorreactores
antes y después del cultivo del consorcio 76**Figura 32**Cantidad de fósforo presentes en los fotobiorreactores
antes y después del cultivo del consorcio 77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	
Clasificación taxonómica del género <i>Scenedesmus</i>	8
Tabla 2	
Clasificación taxonómica para el género <i>Chlorococcum</i>	10
Tabla 3	
Medios de cultivo para microalgas	15
Tabla 4	
Límites máximos permisibles para los parámetros físico-químicos.....	18
Tabla 5	
Capacidad de remoción de contaminantes a través del cultivo de microalgas reportado por diferentes autores.....	20
Tabla 6	
Tratamientos establecidos en la fase 2.....	31
Tabla 7	
Tratamientos establecidos para la fase 3.....	35
Tabla 8	
Aleatorización de las unidades experimentales en la fase 3.....	35
Tabla 9	
Tratamientos planteados en la fase 4	37
Tabla 10	
Características morfológicas para <i>Scenedesmus</i> y <i>Chlorococcum</i>	43
Tabla 11	
Densidad celular alcanzada con el agua residual esterilizada.	46
Tabla 12	

Densidad celular alcanzada con el agua residual no esterilizada 48

Tabla 13

Densidades celulares alcanzadas con el consorcio de trabajo 50

Tabla 14

Resumen del análisis de varianza para la densidad celular 51

Tabla 15

Prueba de Tukey para la comparación de las medias reales y modificadas para la variable densidad celular 52

Tabla 16

Parámetros cinéticos..... 53

Tabla 17

Análisis de varianza para la variable velocidad de crecimiento 54

Tabla 18

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable velocidad de crecimiento 54

Tabla 19

Análisis de varianza para la variable tiempo de duplicación 55

Tabla 20

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable tiempo de duplicación 55

Tabla 21

Densidad celular obtenida con las concentraciones de NPK 58

Tabla 22

Análisis de varianza para la variable densidad celular 60

Tabla 23

Prueba de Tukey para la comparación de medias reales para la variable densidad celular 61

Tabla 24

Prueba de Tukey para la comparación de medias transformadas para la variable densidad celular 62

Tabla 25

Parámetros cinéticos para el crecimiento en diferentes concentraciones de NPK..... 63

Tabla 26

Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para la variable velocidad de crecimiento con diferentes concentraciones de NPK 64

Tabla 27

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable velocidad de crecimiento..... 64

Tabla 28

Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para la variable tiempo de duplicación con diferentes concentraciones de NPK 65

Tabla 29

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable tiempo de duplicación 66

Tabla 30

Resumen del análisis de varianza para la variable peso seco de biomasa con las diferentes concentraciones de NPK 67

Tabla 31

Prueba de Tukey para la comparación de las medias para la variable peso seco de biomasa 68

Tabla 32

Prueba t de Student para la variable de peso seco de biomasa 70

Tabla 33

Productividad de la Biomasa..... 70

Tabla 34

Prueba t de Student para el porcentaje lipídico..... 72

Tabla 35

Porcentajes de reducción de contaminantes..... 77

LISTADO DE SIGLAS Y ABREVIATURAS

EEQ	Empresa Eléctrica Quito
NPK	Nitrofoska
DBO₅	Demanda Biológica de Oxígeno
DQO	Demanda Química de Oxígeno
N	Nitrógeno
P	Fósforo
CO₂	Dióxido de Carbono
ATP	Adenosín Trifosfato
DC	Densidad Celular

RESUMEN

En la presente investigación, se evaluaron la capacidad de remoción de contaminantes, la productividad de biomasa y el contenido lipídico alcanzados mediante el cultivo de un consorcio microalgal nativo, usando para su crecimiento agua residual del reservorio de la Empresa Eléctrica, estableciéndose cuatro fases de estudio. En la primera fase, se aisló e identificó el consorcio conformado por las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp. En la segunda fase, se evaluó la adaptación del consorcio al uso del agua residual esterilizada y no esterilizada; se constató una mejor adaptación al agua residual sin esterilizar con una producción celular de 14.10×10^6 cél.mL⁻¹. En la tercera fase, se evaluaron tres concentraciones de fertilizante Nitrofoska (NPK) (0.5., 1.5, 3.0 mL.L⁻¹) para suplementar al agua residual con el fin de potencializar una mayor productividad de biomasa. Se estableció que con la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK se alcanzó una mayor producción celular (37.40×10^6 cél.mL⁻¹), una mayor velocidad de crecimiento ($\mu=0.52$), menor tiempo de duplicación ($td= 1.33$ días). En la cuarta fase, se evaluaron dos tratamientos: T1 (consorcio + agua del reservorio + 1.5 mL.L⁻¹ de NPK) y T2 (consorcio + agua potable + 3.0 mL.L⁻¹). En T1 se obtuvo una mayor productividad de biomasa sin embargo el contenido lipídico no presentó diferencias significativas entre T1 y T2. Para evidenciar la remoción de contaminantes se compararon los parámetros de DBO₅, DQO, sulfatos, nitrógeno y fósforo total, antes y después del cultivo; con lo que se determinó la remoción del 41.46%, 28.31%, 90.96%, 54.72% y 75.02% respectivamente.

PALABRAS CLAVES:

- **CONSORCIO MICROALGAL**
- **PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA**
- **NITROFOSKA**
- **REDUCCIÓN DE CONTAMINANTES**

ABSTRACT

In the present investigation, the capacity to remove contaminants, biomass productivity and the lipid content of a native microalgal consortium cultivated on waste water reservoir of the Electric Company were evaluated, established four phases of study. In the first phase, was isolated and identified the consortium of microalgae *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. In the second phase, the adjustment of the consortium with the use of sterilized and unsterilized wastewater was evaluated; it was found better adaptation to the wastewater unsterilized with a cell production of 14.10×10^6 cell.mL⁻¹. In the third phase, three concentrations of Nitrofoska fertilizer (NPK) (0.5., 1.5, 3.0 mL.L⁻¹) were evaluated to supplement the wastewater in order to potentiate greater biomass productivity. It was established that with the addition of 1.5 mL.L⁻¹ of NPK increased cell production (37.40×10^6 cell.mL⁻¹). In the fourth phase, two treatments were evaluated:T1 (consortium + water reservoir + 1.5 mL.L⁻¹ of NPK) and T2 (consortium + water + 3.0 mL.L⁻¹). In T1 greater biomass productivity (25.65 g and 0.06 g L⁻¹d⁻¹) but the lipid content was not significantly different between T1 and T2. To demonstrate contaminant removal parameters BOD₅, COD, sulphates, nitrogen and total phosphorus before and after cultivation were compared; whereby was determined the removal of 41.46%, 28.31%, 90.96%, 54.72% and 75.02% respectively.

KEYWORDS:

- MICROALGAE CONSORTIUM
- BIOMASS PRODUCTIVITY
- NITROFOSKA
- REMOVAL OF CONTAMINANTS

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Las microalgas son microorganismos unicelulares capaces de realizar fotosíntesis, por su gran adaptación ecológica y su notable plasticidad bioquímica son consideradas como fuente de varios productos tales como polisacáridos, lípidos, proteínas, pigmentos, entre otros; lo que ha permitido su utilización en diversos campos de la biotecnología durante años (Albarracín, 2007).

Pensando en estas favorables características, diferentes líneas de investigación surgen a partir de la década de los cuarenta, donde se inicia el desarrollo de cultivos algales con el fin de encontrar nuevas fuentes de proteínas, pero es durante la II Guerra Mundial que científicos alemanes abordaron el cultivo de microalgas masivamente bajo sistemas controlados de crecimiento, con el objetivo de obtener un suplemento alimenticio rico en lípidos y proteínas (Venkataraman & Becker, 1985).

Estudios iniciales sobre el uso de microalgas como microorganismos depuradores de aguas residuales fueron reportados por Caldwell (1940), quien determinó la capacidad de las microalgas para asimilar contaminantes presentes en los cuerpos de agua utilizándolos como nutrientes que beneficiaban su crecimiento. Pero no es hasta fines de los cincuenta donde se retoma las investigaciones en ésta área debido la preocupación por deterioro creciente del medio ambiente, proponiendo así el cultivo de microalgas a gran escala sobre aguas residuales para su depuración y la obtención masiva de biomasa simultáneamente (Oswald, 1988).

1.2 Formulación del problema

En nuestro país, es notable el deterioro de las cuencas hidrográficas principalmente de los ríos que atraviesan por las grandes ciudades. El incremento de la tasa poblacional, el desarrollo industrial, la actividad agrícola y otros, generan preocupantes volúmenes de aguas residuales que en la mayoría de ocasiones son descargadas en los ríos cercanos sin un tratamiento depurador provocando una afectación al medio ambiente y al ecosistema.

A pesar del control y las regularizaciones para preservar los recursos hídricos, la Secretaría de Nacional del Agua (SENAGUA) indica que en la práctica todavía se vierten en los afluentes una gran cantidad de aguas negras provenientes de los drenajes municipales, las cuales aportan con contaminantes como: detergentes, materia orgánica, grasa y aceites; de igual forma, existe un importante aporte de aguas residuales agrícolas ricas en fosfatos y nitratos, derivados del uso desmedido de fertilizantes y agroquímicos.

En la actualidad existen diversas tecnologías aplicadas para la depuración de las aguas residuales sean estas domésticas, municipales, agrícolas o industriales; el objetivo principal es reducir la mayor parte de la materia orgánica utilizando una variedad de microorganismos degradadores localizados en lagunas de oxidación, lagunas facultativas, lodos activados, reactores de contrato, entre otros sistemas; además, se busca eliminar compuestos tóxicos y nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, para la recuperación y reutilización del agua (Castillo, 2013).

La remoción de los nutrientes es primordial y relevante, ya que su presencia en los efluentes desencadena un gran impacto sobre los cuerpos de agua receptores; su acumulación genera eutrofización, aumento de la acidez, toxicidad e inestabilidad en los ecosistemas acuáticos, amenazando comunidades biológicas vulnerables y la salud del ser humano (Cárdenas & Sánchez, 2013).

Existen limitaciones en los procesos de tratamiento principalmente, involucrados con costos de inversión y eficacia, por lo que es necesario el acoplamiento de nuevos sistemas biológicos que refuercen e incorporen nuevas perspectivas en la remoción de contaminantes. El cultivo de microalgas se ha convertido en una alternativa para la depuración de efluentes, debido a su capacidad de asimilación de contaminantes y su interacción simbiótica con bacterias que degradan la materia orgánica; consiguiendo una eficiente bioconversión de la energía solar, mediante su metabolismo hacia la producción de biomasa rica en carbohidratos, lípidos y proteínas (De Bashan & Bashan, 2003).

De esta forma, se contempla el cultivo de un consorcio microalgal como un promisorio sistema para la remoción de contaminantes del agua del reservorio de la Empresa Eléctrica Quito (EEQ), ubicado en el sector de Guangopolo, con el beneficio adicional de generación de biomasa que puede ser aprovechada como suplemento alimenticio en la acuicultura o como biofertilizante en la agricultura.

1.3 Justificación del problema

El potencial biotecnológico de las microalgas ha venido ganado gran interés a través del tiempo; gracias a la amplia diversidad y capacidad de adaptación, estos microorganismos fotosintéticos son una excelente fuente de pigmentos, proteínas, polisacáridos y lípidos; además, debido a sus altas tasas de crecimiento los cultivos microalgales permiten la obtención de biomasa con composición bioquímica variada, pudiendo ser aprovechada tanto en el área comercial, industrial o energética (Bianchini, Ohse, Villela, Matos de Carvalho, & Fett, 2006). La preocupación por el daño ambiental y la contaminación de los cuerpos de agua ha impulsado del desarrollo de alternativas sustentables orientadas a atenuar el deterioro de los ecosistemas; sobresaliendo el cultivo de microalgas como una opción altamente favorable para el tratamiento de aguas residuales a bajos costos y media complejidad operacional.

Las aplicaciones ambientales de las microalgas se centran en su alta eficiencia en la fijación del CO₂ y la remoción de nutrientes considerando así también, la simultánea producción de biomasa (Schmitz, Dal Magro, & Colla, 2012). En el Ecuador, el 80% del recurso hídrico es destinado al uso consuntivo por parte del sector agrícola; con el incremento de los cultivos no tradicionales y la aplicación en exceso de fertilizantes y plaguicidas, diariamente se vierten en las cuencas de los ríos residuos líquidos con alta carga de nitrógeno, fósforo, potasio, sulfatos y sustancias no biodegradables que afecta críticamente este recurso natural (SENAGUA, 2012).

A través del cultivo de microalgas se puede mitigar el impacto negativo de esta actividad, removiendo los nutrientes para incorporarlos en la producción de biomasa, la misma que puede ser utilizada posteriormente como biofertilizantes. Investigaciones realizadas en el país, identifican a las microalgas *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Oocystis*, *Odeogonium* como especies eficaces para la remoción de la DBO₅, DQO, nitratos, nitritos, amonio y ortofosfatos en aguas residuales municipales (Cabrera & Pulla, 2014), (Acuario & Arciniegas, 2015).

Al obtener un consorcio microalgal nativo se podrá evaluar el crecimiento, la capacidad de producción de biomasa y porcentaje de remoción de contaminantes presentes en agua del reservorio de Guangopolo de la EEQ, proporcionando nuevos criterios de implementación para la recuperación y reutilización de aguas residuales.

1.4 Objetivos de la investigación

1.4.1 Objetivo General

Evaluar la capacidad de remoción de contaminantes, productividad de biomasa y contenido lipídico, alcanzados mediante el cultivo de un consorcio microalgal utilizando agua con nutrientes del reservorio de Guangopolo de la Empresa Eléctrica Quito.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Obtener un consorcio microalgal a partir del agua de la represa de la EEQ ubicada en la parroquia de Cumbayá.
- Comparar la eficiencia en producción de biomasa obtenida al cultivar el consorcio microalgal con el agua del reservorio suplementada con diferentes concentraciones de fertilizante foliar Nitrofoska.
- Establecer la productividad y el porcentaje lipídico de la biomasa microalgal producida con el agua del reservorio suplementada con la concentración del fertilizante foliar Nitrofoska antes seleccionada.
- Determinar la eficiencia de remoción de DQO, DBO₅, Sulfatos, N y P total en el agua del reservorio de Guangopolo.

1.5 Marco Teórico

1.5.1 Características generales de las microalgas

Las microalgas constituyen un amplio y heterogéneo grupo de organismos fotosintéticos que incluye tanto microalgas eucariotas como a las cianobacterias; ecológicamente son los productores primarios de las cadenas tróficas acuáticas por ser el principal componente del plancton (Márquez & Beccaría, 2006). Las microalgas se caracterizan por su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, logrando habitar incluso en cuerpos de agua que presenten mínimas condiciones adecuadas para su desarrollo, por lo que se observa una gran diversidad microalgal pudiéndose identificar aproximadamente 40000 especies aunque se estima que existen más de 100000 (Garibay, Vázquez, Sánchez, Serrano, & Martínez, 2009). Estos microorganismos son principalmente fotoautótrofos siendo la luz su primordial fuente de energía y el dióxido de carbono su fuente de carbono, el cual es metabolizado durante proceso de fotosíntesis (Fung, 2010).

Su estructura simple les otorga una gran eficiencia fotosintética con una capacidad de fijar el CO₂ mayor que las plantas. Algunas especies de microalgas pueden crecer con fuentes orgánicas de carbono y en ausencia de una fuente lumínica, por lo que su cultivo bajo estas condiciones se denomina heterótrofo, otras especies son capaces de crecer bajo regímenes mixotróficos, donde utilizan la energía solar y diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono (Romo, 2002).

La composición bioquímica de las microalgas está relacionada directamente con la especie y la influencia de las condiciones de cultivo parámetros como la temperatura, iluminación, disponibilidad de nutrientes y fase del cultivo inciden en el metabolismo celular modificando la composición de la célula. De forma general, se puede hablar que la biomasa seca procedente de microalgas está compuestas por un 20 al 30% de lípidos, 40 al 50% de proteínas y el resto se subdivide entre carbohidratos y otros compuestos (Chisti, 2007).

La diversidad de especies de microalgas es muy extensa ya que habitan en todo tipo de sistema acuífero y superficies sólidas, así también presentan una variada morfología estableciéndose de forma unicelular o formando cenobios o colonias. Entre las especies de microalgas más cultivadas alrededor del mundo están las Bacilariofitas como *Chaetoceros* sp., *Navicula* sp., Cianobacterias como *Arthrospira* sp., *Spirulina* sp. Anabaena sp., Criptofitas: *Rhodomonas* sp. y mayoritariamente por su abundancia las Chlorofitas como *Chlorella* sp., *Desmodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., *Dunaliella* sp., *Chloococcum* sp., entre otras (Barsanti & Gualtieri, 2006).

1.5.2 Género *Scenedesmus* (Meyen, 1829)

Scenedesmus se caracterizan por su distribución en hileras cortas de 4, 8 o 16 células, raramente forman un imperceptible zigzag. Son muy abundantes en los ecosistemas de agua dulce como lagos, ríos, estanques; y se ha podido identificado más de cien especies (Monthieu, 2010). Poseen una morfología extremadamente variable, presentan forma elíptica aunque pueden desarrollarse como células independientes generalmente, forman colonias o agrupaciones (cenobios), con o sin la presencia de apéndices largos como espinas o zetas (figura 1).



Figura 1 *Scenedesmus* sp., fotografía tomada a través del microscopio vista 100x

Esta especie de microalga exhibe cambios morfológicos tanto en el tamaño, número de células del cenobio y la distribución de las espinas como resultado de las condiciones ambientales o factores inducidos como: temperatura y luz (Acevedo & Ramírez, 2003). La morfología celular se ve inducida por la plasticidad fenotípica propia del género, *Scenedesmus* tiene la capacidad de que a partir de un solo genotipo se pueda producir una o más estructuras morfológicas diferentes en respuesta a las condiciones ambientales, pudiendo observar dentro de un cultivo unialgal células elípticas independientes que con la edad del cultivo tienden a formar cenobios (Lürling, 2010).

A través del análisis molecular y morfológico se ha establecido la clasificación taxonómica mostrada en el tabla 1 (Ferreira, Leite, & Tucci, 2013).

Tabla 1

Clasificación taxonómica del género *Scenedesmus*

Dominio	Eukaryta
Reino	Plantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales
Familia	Scenedesmaceae
Género	<i>Scenedesmus</i>

Fuente: (Ferreira, Leite, & Tucci, 2001)

El género *Scenedesmus* resiste y se adapta eficientemente a distintos contaminantes, se ha comprobado su papel como agente descontaminante para aguas residuales con iones metálicos en disolución, específicamente se ha observado su afinidad para la remoción de metales polivalentes; de igual forma, se ha evidenciado niveles altos de remoción de nitritos y sulfatos de efluentes a través del cultivo de *Scenedesmus* sp. (Pellón, 2011), (Roa & Cañizares, 2012). Las altas tasas de crecimiento de *Scenedesmus* en aguas residuales proporciona la conversión de nutrientes como el nitrógeno y fósforo, en biomasa microalgal la cual puede ser utilizada como materia prima en el área agrícola para la producción de biofertilizantes, o en el área energética para la producción de biodiesel, considerando que el porcentaje de lípidos en la biomasa va desde un 15% a un 35% ($\frac{\text{g lípidos}}{\text{g peso-seco}} \times 100$) (Hernández, Vázquez, Sánchez, Serreno, & Martínez, 2009).

1.5.3 Género *Chlorococcum* (Meneghini, 1842)

Chlorococcum se caracterizan por estar presentes de forma unicelular aunque suelen formar colonias de distintos tamaños, poseen cloroplastos que revisten aproximadamente toda la membrana celular y presentan uno o más pirenoides (organelas asociada a los plastos en las microalgas), cuya función está relacionada con la producción de biomoléculas de reserva (Tapia, 2002).

Morfológicamente se describe a *Chlorococcum* como células esféricas de tamaños variados, inmóviles, de color verde (figura 2), están recubiertas por una pared gelatinosa delgada que se engruesa durante el crecimiento celular, sin embargo en muchos casos no es fácilmente visible (Xin-Min, 2001).

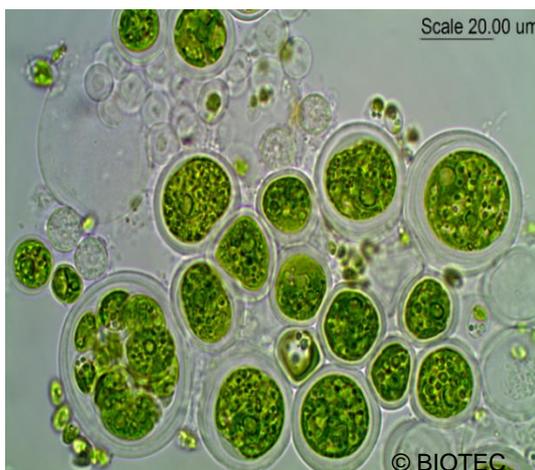


Figura 1 *Chlorococcum* sp., fotografía tomada a través del microscopio vista 100x

A pesar de las dificultades para la identificación y agrupación de las distintas especies de *Chlorococcum*, las técnicas moleculares han permitido establecer una taxonomía más acertada, complementándose con los métodos tradicionales basados en las características morfológicas. La clasificación taxonómica para el género *Chlorococcum* se muestra en la tabla 2 (Bold & Parker, 1961).

Tabla 1**Clasificación taxonómica para el género *Chlorococcum***

Dominio	Eukaryta
Reino	Plantae
Filo	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Chlamydomonales
Familia	Chlorococcaceae
Género	<i>Chlorococcum</i>

Fuente: (Bold & Parker, 1961)

Chlorococcum presenta una amplia capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales extremas, pudiendo sobrevivir en aguas de alta salinidad, además son capaces de ajustarse a la polución, por lo que su cultivo en aguas residuales ha presentado excelentes resultados en la depuración del agua y la simultánea producción de biomasa con altos porcentajes lipídicos que van desde el 19.3 % al 25.6% (Ruiz M., 2013).

1.5.4 Fases de crecimiento

Una característica distintiva de las microalgas es su crecimiento rápido, al poseer una estructura simple su eficiencia fotosintética es mayor, pudiendo duplicar su población en tan solo horas (Mata, Martins, & Caetano, 2009). Durante el cultivo de las microalgas el crecimiento celular se manifiesta de forma exponencial mostrando cinco fases marcadas (figura 3), las mismas que están en dependencia al estado nutricional administrado. El intervalo de duración para cada etapa está relacionado con la especie de microalga, su adaptabilidad y la disponibilidad de nutrientes (Fuiks & Main, 1991).

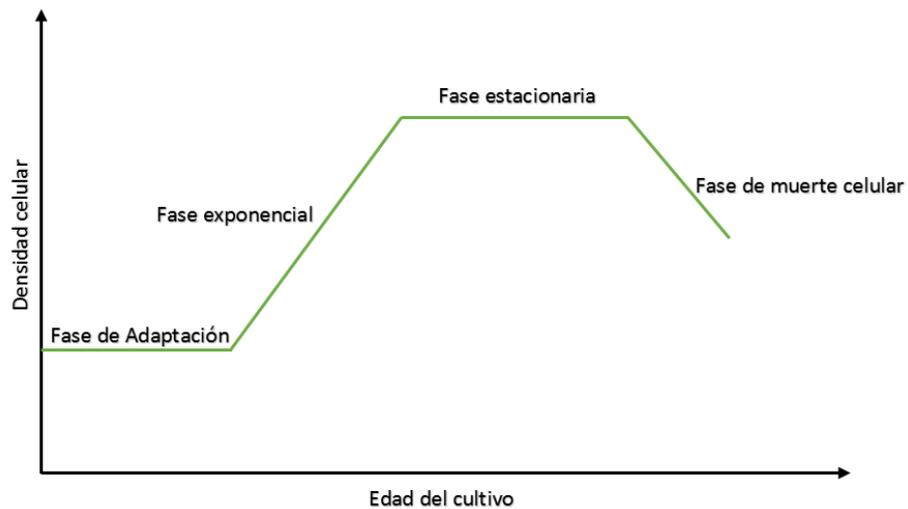


Figura 2 Etapas de crecimiento de las microalgas

Fase de latencia o fase inicial

Es la etapa de adaptación de las células al medio de cultivo y a las condiciones de crecimiento expuestas, en esta etapa se observa poco o nulo incremento de densidad celular debido a que las células viables no pueden dividirse inmediatamente por la necesidad de un ajuste bioquímico. Durante el metabolismo celular algunas enzimas involucradas en el desarrollo alcanzan estados inactivos ocasionando una caída en la concentración celular hasta alcanzar una aclimatación que toma un corto período de tiempo (Uribe, 1992).

Fase exponencial o desarrollo logarítmico

Durante esta fase las microalgas se reproducen sucesivamente en intervalos iguales de tiempo, la división celular es considerablemente rápida ya que las células están metabolizando los nutrientes del medio, dando lugar a un crecimiento poblacional de forma exponencial (Richmond, 2004).

Fase estacionaria

No existe un incremento neto de la población celular, se observa el equilibrio entre la tasa de crecimiento con la tasa de mortalidad celular. Las células han metabolizado los nutrientes asimilables del medio hasta su agotamiento (Richmond, 2004).

Fase de declinación o muerte

Se inicia un aumento en la tasa de mortalidad celular a causa del completo agotamiento de los nutrientes presentes en el medio y las condiciones desfavorables para el crecimiento, por lo que prevalece la presencia de células muertas derivando en un aumento de espuma, producto de la destrucción celular (Foog & Thake, 1987).

1.5.5 Factores que influyen el crecimiento celular

La luz

Incluye tanto la irradiancia (flujo de luz por unidad de área) como el fotoperiodo que inciden en el cultivo, las microalgas se desarrollan distintivamente de acuerdo con la cantidad y longitud de onda a las que son sometidas (Barsanti & Gualtieri 2006). El crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz receptada, una inadecuada exposición provoca cambios a nivel celular, la iluminación por debajo de un valor máximo (foto-limitación) causa la síntesis de productos de reserva, al sobre pasar el valor máximo se produce una fotoinhibición ocasionado el daño de los componentes del sistema fotosintético, el espectro de luz utilizado para la fotosíntesis va desde los 350 a los 700 nm (González, 2000), la respuesta en el crecimiento de la microalga varía muchas veces en relación a la longitud de onda aplicada. La iluminación en el proceso de cultivo es un factor importante ligado a producción de biomasa, generalmente en los sistemas abiertos se alcanzan una conversión de luz-biomasa del 1% al 4%, y en sistemas de fotobiorreactores este porcentaje aumenta (Ruiz, 2013).

Temperatura

La temperatura óptima para el crecimiento en la mayoría de especies microalgales oscila entre los 16 °C y los 27 °C, la temperatura máxima al que el cultivo puede estar sometido está alrededor de los 35 °C, por encima de este valor no es posible el crecimiento, ya que algunas enzimas pueden sufrir daños irreversibles con consecuencias letales para el cultivo; temperaturas por debajo de los 16 °C ocasiona tasas de crecimiento bajas (Madigan, 2004). Las reacciones celulares pueden verse alteradas por la temperatura a la cual crece la célula, conduciendo a modificaciones en el metabolismo y en la composición de la biomasa (González, 2000).

pH

El control del pH para el desarrollo de las microalgas es muy importante, considerando que cada microorganismo crece en un intervalo específico y adecuado para el desarrollo celular; en el cultivo de microalgas se procura mantener un pH neutro, un descenso suele ser letal, ya que las microalgas son más tolerantes a los incrementos de pH (Abalde, Cid, Fidalgo, Torres, & Herrero, 1995).

Agitación

La agitación proporciona una distribución homogénea tanto de las células y nutrientes como del calor y la transferencia de gases dentro de la interfase gas-líquido (Eriksen, 2008). A través de la agitación se consigue mantener las células en suspensión permitiendo que todas estén expuestas a la luz, de esta forma se reduce el tiempo de ausencia de luz en el seno del cultivo que se vuelve más denso mientras la edad aumenta; conjuntamente, con una correcta agitación se puede facilitar la eficiencia en la disponibilidad de los nutrientes y se impide la sedimentación y adherencia a las paredes del sistema de cultivo (Ruiz A. , 2011).

Nutrientes

Nitrógeno: Considerando que la biomasa microalgal está compuesta del 1% al 10 % de nitrógeno en dependencia de la disponibilidad y la fuente; dichos porcentajes reflejan su importancia en el medio de cultivo, ya que el nitrógeno es utilizado durante el crecimiento celular para la síntesis de ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas; sin embargo su deficiencia favorece la producción y acumulación de lípidos. Las fuentes más comunes de nitrógeno son el nitrato, nitrito, urea y amoníaco; las dos últimas son mayoritariamente seleccionadas en cultivos masivos por su bajo costo (Kaplan, Richmond, Dubinsky, & Aaronson, 1986).

Fósforo: Es indispensable para el crecimiento de las células porque forma parte de numerosas biomoléculas como la glucosa, ATP, ácido nucleicos, fosfolípidos y ciertas coenzimas. En los entornos ácidos sus precipitados mantienen el equilibrio de especies metálicas disueltas, generalmente es asimilado del medio en forma de ortofosfato, su requerimiento es menor al del nitrógeno (Gross, 2000).

Azufre: Las microalgas precisan de fuentes de azufre ya que este elemento está incorporado dentro de diversos compuestos orgánicos que incluyen aminoácidos, proteínas, coenzima A; además, este nutriente está presente en estructuras químicas implicadas en funciones de diversa naturaleza, como procesos redox y procesos antioxidantes (Aslan & Kapdan, 2006).

Entre otros macronutriente que las microalgas precisan para su desarrollo están el sodio, el magnesio y calcio; además es indispensable la presencia de micronutrientes como el molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro; todos ellos importantes en diferentes reacciones propias de las células. Diversas especies de microalgas requieren la presencia de vitaminas como la tiamina y la cobalamina, en el medio de cultivo para su óptimo crecimiento (González A. , 2000).

En la investigación sobre el crecimiento de las microalgas a nivel de laboratorio se emplean medios de cultivo convencionales, donde se conoce la concentración exacta de cada nutriente, pudiendo verificarse los requerimientos nutricionales para cada especie microalgal. En la tabla 3 se muestran los medios de cultivo más utilizados para el crecimiento microalgal.

Tabla 2
Medios de cultivo para microalgas

Microalgas	Medio de cultivo
De agua dulce	Allen's Blue-Green
	BG ₁₁ y BG ₁₁ modificado
	Bold Basal
	Chu # 10
	Bristol
Marinas	Aquil
	ASP-2
	f/2 (Guillard and Ryther 1962)

Fuente: (Andersen R., 2005)

1.5.6 Sistemas de cultivo

Sistemas Abiertos: Los sistemas abiertos generalmente, consisten en estanques o piscinas de poca profundidad, el cultivo de las microalgas empleando estos sistemas resulta menos costoso por la facilidad de construcción y operación. La desventaja de aplicar un sistema abierto se centra en la susceptibilidad a la contaminación, la evaporación del agua, además no se pueden controlar factores como temperatura e iluminación (Brennan & Owende, 2010). Otro problema que deriva de los sistemas abiertos es en la etapa de cosecha de la biomasa, considerando el volumen del cultivo y las características de la biomasa es difícil su separación del medio líquido.

Sistemas cerrados: También conocidos como fotobiorreactores (PBR, por sus siglas en inglés), son sistemas donde se puede controlar y optimizar factores involucrados en el crecimiento de las microalgas, proporcionando los requerimientos biológicos y fisiológicos específicos para cada especie (Palomino, Estrada, & López, 2010). En el estudio de las aplicaciones biotecnológicas de las microalgas y muchas veces en el cultivo en una escala mayor se emplea los fotobiorreactores, obteniendo valores hasta sobre 1.5 g.L^{-1} de biomasa (Hernández & Labbé, 2014), gracias a que se puede controlar el pH, la iluminación, temperatura, aireación, nivel de oxígeno disuelto, y otros parámetros. La desventaja de estos sistemas es su costo para la implementación y también el volumen del cultivo está limitado al tamaño del sistema.

1.5.7 Recuperación de la biomasa obtenida a partir de microalgas

Los métodos de cosecha son variados y se puede realizar una combinación de ellos para garantizar una mayor recuperación de la biomasa, se debe tomar en cuenta la especie microalgal y el sistema de cultivo utilizado para su selección. Sin embargo, la elección del sistema de cosecha es decisivo al momento de evaluar costos operacionales y beneficios. Entre los métodos de cosecha más empleados se describen los siguientes:

Floculación: La separación de la biomasa tiene lugar mediante la adición de productos químicos denominados floculantes, utilizando comúnmente sales metálicas (sulfato de aluminio, cloruro férrico, sulfato férrico) para generar una dispersión de cargas para la formación de agregados; a pesar de ser una técnica con costos relativamente bajos, no puede ser empleado cuando se requiere cierta pureza en la biomasa (Mendoza, Valido, & Portillo, 2011).

Sedimentación por gravedad: Método más utilizado por presentar efectividad y bajos costos representativos, sin embargo, es un método demasiado lento (0.1 a 2.6 m/h), lo que puede dar lugar a la descomposición de la biomasa si se trabaja a temperaturas ambientales altas; para su aplicación se debe considerar la densidad del cultivo y el tamaño de las microalgas, se recomienda su aplicación para células con diámetros superiores a los 5 μm (Hernández, Vázquez, Sánchez, Serreno, & Martínez, 2009).

Centrifugación: Método eficaz y rápido para la separación de biomasa por medio de la fuerza rotativa, esta técnica se puede emplear en cultivos con bajos volúmenes, ya que a gran escala su uso representa altos costos energéticos y el requerimiento de equipos especializados, por lo que su aplicación solo queda justificada cuando los productos finales reflejan alto valor agregado (Bermeo, 2011).

Filtración: Su aplicación está dirigida a la recuperación de biomasa procedente del cultivo de microalgas filamentosas o especies microalgales que tiende a formar colonias, para aplicar el proceso de filtración las células deben presentar tamaños superiores a los 70 μm , con células menores a los 30 μm se habla de microfiltración o ultrafiltración a través de membranas; su empleo puede obtener mejores resultados cuando el cultivo no supera los dos metros cúbicos por día, a una escala mayor presenta inconvenientes de obstrucción de filtros, resultando costoso por el mantenimiento del sistemas (Hernández, Vázquez, Sánchez, Serreno, & Martínez, 2009).

1.5.8 Tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas

El cultivo de microalgas ha mostrado ser eficaz para el tratamiento de diferentes tipos de efluentes (domésticos, agrícolas, industriales), debido a la tolerancia que presentan estos microorganismos a las concentraciones elevadas de materia orgánica y componentes inorgánicos del medio (Salazar, 2009). A través del crecimiento de las microalgas en aguas residuales se alcanza la reducción de la DBO_5 (demanda bioquímica de

oxígeno), de la DQO (demanda química de oxígeno), de elementos inorgánicos como el nitrógeno, fósforo, azufre, y elementos traza como el cobre, hierro, cromo, molibdeno, entre otros. La concentración de estos contaminantes convierten a las aguas residuales en excelentes medios de cultivo, ya que impulsan un rápido crecimiento celular, permitiendo la obtención de una abundante cantidad de biomasa (Bermeo, 2011).

El tratamiento de las aguas residuales es necesario ya que antes de su disposición en los cuerpos de agua deben presentar niveles de contaminación que no excedan los límites máximo permisibles a fin de asegurar la autodepuración sin desestabilizar los ambientes acuáticos. En el Ecuador, la normativa de calidad ambiental y descargas de efluentes a un cuerpo de agua dulce expone los límites máximos permisibles para los parámetros físico-químicos mostrados en la tabla 4.

Tabla 3

Límites máximos permisibles para los parámetros físico-químicos

Parámetro	Unidad	Límite máximo permisible
DBO ₅	mg/l	100
DQO	mg/l	250
SO ₄ ⁻	mg/l	1000
N	mg/l	15
P	mg/l	10

Fuente: (TULAS, 2002)

Reducción de la DBO₅ y DQO

La calidad del agua ésta principalmente afectada por la concentración de materia orgánica, una alta demanda biológica y química de oxígeno indican una rápida reducción del oxígeno disuelto en el medio, lo que genera un ambiente anaerobio perjudicial para los organismos. La DBO₅ y la DQO son parámetros que sirven para medir la contaminación en relación al

requerimiento de oxígeno para la descomposición de la materia orgánica, la DBO_5 refleja la cantidad de materia biodegradable mientras que la DQO indica la cantidad materia biodegradable y no biodegradable.

El cultivo de microalgas permite la reducción de la DBO_5 y la DQO en porcentajes que van desde el 80% hasta el 90%, sea utilizando consorcios o cultivos monoespecíficos; esta reducción es el resultado de la rápida asimilación de los diferentes compuestos orgánicos por parte de las microalgas que los utilizan como fuente de carbono bajo un régimen mixotrófico (Hernández & Labbé, 2014). El porcentaje de remoción varía en correspondencia a factores ambientales, tipo de agua residual, sistema de cultivo y especie de microalga así como la adaptabilidad del organismo fotosintético es primordial para un metabolismo óptimo.

Remoción de Nitrógeno y Fósforo

Altas concentraciones de nitrógeno y fósforo contribuyen a la contaminación de los recursos hídricos, su acumulación provoca afectación de la calidad del agua a causa del agotamiento del oxígeno y una acelerada eutrofización de aguas superficiales, además compuestos como el nitrógeno amoniacal resultan ser tóxicos y perjudiciales para el desarrollo de la vida acuática. El tratamiento de aguas residuales antiguamente se enfocaba únicamente a la reducción de la DBO_5 y la DQO, la materia orgánica y microorganismos patógenos, es durante los años setenta donde se aborda la importancia de la eliminación del nitrógeno y el fósforo en la última parte del tratamiento con el fin de evitar que la descarga sea nociva para el cuerpo de agua receptor (Mayo, 2010).

La eliminación del nitrógeno y el fósforo puede llevarse a cabo por el cultivo de microalgas al ser fácilmente asimilados; estos nutrientes son esenciales por estar involucrados en el crecimiento microalgal y la producción de biomasa. En las aguas residuales se encuentra generalmente al nitrógeno en forma de NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , y el fósforo como PO_4^{3-} , permitiendo su remoción por adsorción directa (Hernández & Labbé, 2014).

Cuando existe una mayor densidad celular, es decir en cultivos hiperconcentrados (biomasa > 1.5 g.L⁻¹) la reducción de estos parámetros es altamente significativa, mostrando la incorporación acelerada para las reacciones intracelulares propias del crecimiento celular (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stranier, 1979). Existen estudios donde se comprueba la eficacia del uso de las microalgas para la depuración de diversos tipos de aguas residuales (tabla 5).

Tabla 4

Capacidad de remoción de contaminantes a través del cultivo de microalgas

Parámetro	Remoción (%)	Especie	Fuente
NH₄	96.6-100	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Ruiz-Marin et al., 2011
	Hasta 100	Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	Hammouda, et al., 1995
NO₂	96.23-100	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Synechocystis salina</i> y <i>Gloeocapsa genatinosa</i>	Dominic, et al., 2009
		<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Synechocystis salina</i> y <i>Gloeocapsa genatinosa</i>	Dominic, et al., 2010
PO₄	64.52-75	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Synechocystis salina</i> y <i>Gloeocapsa genatinosa</i>	Dominic, et al., 2010
	99	Cultivo mixto	Woertz, et al., 2009
DBO₅	84	Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	Hammouda, et al., 1995
	87	Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Nitzchia</i>	Mc Griff & Mc Kinney, 1972
	95-98	Cultivo mixto, <i>Micractinium</i>	Nurdogan & Oswald, 1995
DQO	81 -91.7	Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	Hammouda, et al., 1995
	92	Cultivo mixto, <i>Chlorella</i> y <i>Nitzchia</i>	Mc Griff & Mc Kinney, 1972

Fuente: (Hernández & Labbé, 2014)

Vías de asimilación del nitrógeno

El nitrógeno inorgánico en sus formas de nitrito y amonio son asimilados por absorción directa por la célula microalgal; en cambio, los nitratos son reducidos a nitritos para su incorporación intracelular mediante la enzima nitrato reductasa, una vez en forma de nitrito es reducido a amonio por la enzima nitrito reductasa. Cuando el amonio se encuentra en la célula su asimilación se direcciona por diversas vías; al estar presente en altas concentraciones se produce una aminación reductiva del alfa-cetoglutarato catalizada por la enzima glutamato deshidrogenasa para la síntesis de aminoácidos o bien puede ser almacenado en las vacuolas como moléculas de reserva. Cuando existe una baja concentración de amonio en la célula, tiene lugar la formación de glutamina a partir del glutamato con el amonio mediante la acción de la enzima glutamina sintetasa, posteriormente la glutamato sintasa cataliza la transformación del grupo amino hacia alfa-cetoglutarato formando dos moléculas de glutamato, para la síntesis de aminoácidos (figura 4) (Collos & Berges, 1990).

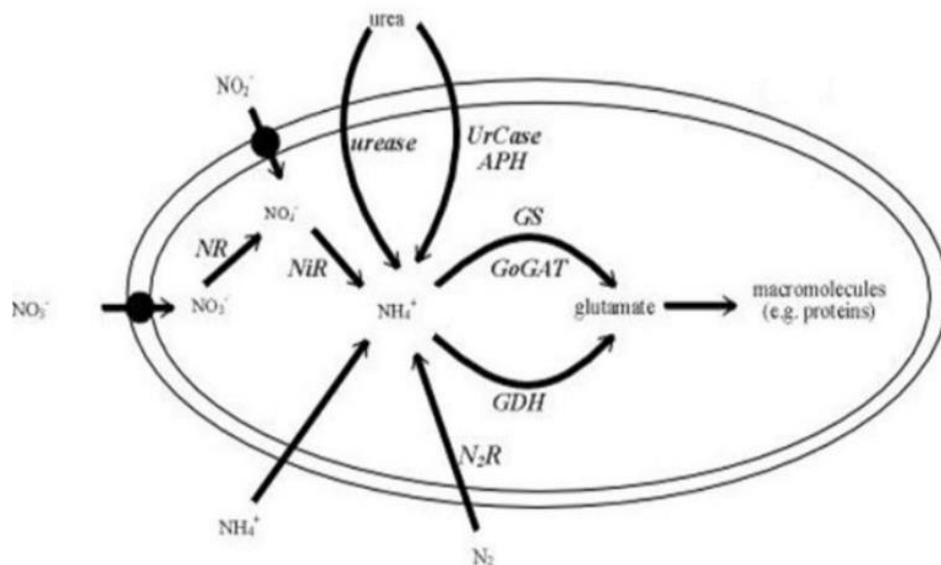


Figura 3 Asimilación del N por las microalgas
Fuente: (Collos & Berges, 1990)

Simbiosis Microalga-Bacteria

La eficacia del tratamiento de aguas residuales con microalgas radica en la capacidad de estas para metabolizar los compuestos presentes en los efluentes, sin embargo se ha reportado una ventajosa interacción entre las microalgas y las bacterias en la depuración de los efluentes que ha sumado efectividad al proceso (Gómez, 2007). La simbiosis microalga-bacteria se da cuando las bacterias aerobias, mediante reacciones de oxidación descomponen los contaminantes orgánicos, convirtiendo al oxígeno un factor limitante, y es cuando el crecimiento microalgal juega un papel importante al suministrar al sistema el oxígeno necesario completar la biodegradación (figura 5), reflejando de forma global un descenso considerable de la DBO₅ (Durán, 2012).

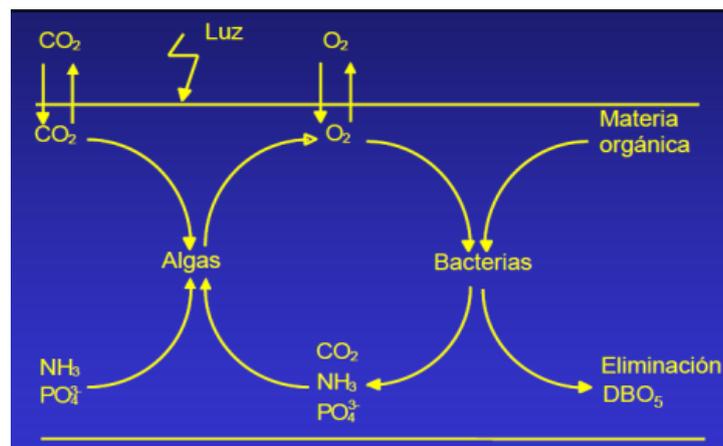


Figura 5 Simbiosis entre microalga y bacterias

Fuente: (Durán, 2012)

1.5.9 Agua residual del reservorio de regulación de EEQ

El reservorio de la Empresa Eléctrica Quito, ubicado en el sector de Guangopolo, junto a la Termoeléctrica Gualberto Hernández, es empleado para canalizar el agua proveniente del río San Pedro y Pita hacia la Casa de Máquina para la generación de electricidad (figuras 6 y 7).



Figura 6 Reservorio de Guangopolo de la Empresa Eléctrica Quito

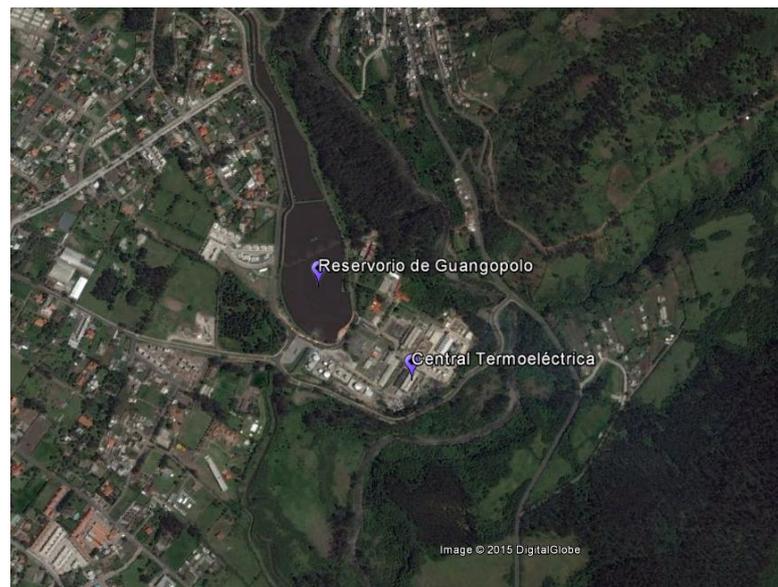


Figura 7 Ubicación espacial del Reservorio de la Empresa Eléctrica

Fuente: (Google earth, 2015)

Coordenadas geográficas

Altitud: 78°27'10.27"O

Latitud: 0°16'11.60"S

El reservorio se abastece del agua proveniente del río San Pedro, el mismo que tiene como ríos afluentes el Pita y Santa Clara; la trayectoria del río atraviesa los sectores poblados de Sangolqui, San Pedro de Taboada, Capelo y La Armenia. La contaminación de estas aguas se produce por las descargas desmedidas de efluentes a lo largo de la cuenca del río (Rosero, 2009), provocando que la condición del agua sea totalmente desfavorable para el desarrollo de la vida acuática, y por la acumulación de lodos, además la materia orgánica en descomposición produce desagradables olores afectando en entorno.

González (2011), indica dentro del estudio de modelamiento del oxígeno y materia orgánica, que el río San Pedro posee una alta carga de materia orgánica debido a la descarga de aguas residuales producto de las actividades agrícolas e industriales propias del sector, también que existe una excesiva disposición de efluentes domésticos debido a la creciente urbanización. Los resultados obtenidos en el estudio muestran una DBO_5 de 11.99 mg.L^{-1} en el tramo de Guangopolo, el parámetro tiende a aumentar considerablemente cuando el río atraviesa centros poblados. Al considerar al reservorio de Guangopolo como un lugar de acople de todas estas aguas, su contaminación es evidente.

1.6 Hipótesis

El cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. puede alcanzar una alta productividad de biomasa con alto contenido lipídico y una simultánea remoción de contaminantes al utilizar el agua residual del reservorio de la Empresa Eléctrica Quito como medio de cultivo.

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

2.1 Participantes

La presente investigación titulada “Evaluación de la capacidad de remoción de contaminantes, productividad de biomasa y contenido lipídico, alcanzados mediante el cultivo de un consorcio microalgal utilizando agua con nutrientes del reservorio de Guangopolo de la empresa eléctrica Quito, Pichincha, fue dirigida por el Laboratorio de Biotecnología Energética-BIOTEC y financiado por la Corporación para la Investigación Energética (CIE). La dirección académica fue apoyada por el Doctor Petronio Gavilanes como director del proyecto y por el Ingeniero Marco Taipe como codirector. De igual forma, la dirección técnica fue apoyada por la Magister María Cristina Guamán y la Magister Nori Gonzáles.

2.2 Área de estudio

La investigación experimental fue desarrollada en el Laboratorio de Biotecnología Energética BIOTEC, ubicado en el Centro de Capacitación de la EEQ, sector de Cumbayá.

2.3 Periodo de Investigación

La investigación se llevó a cabo desde el mes de febrero de 2014 hasta enero de 2015.

2.4 Diseño experimental

Para la presente investigación se establecieron cuatro fases de estudio, a continuación se detalla el diseño experimental para cada una:

2.4.1 Fase 1: Aislamiento e identificación del consorcio microalgal nativo

2.4.1.1 Colecta y procesamiento de muestras

Para el aislamiento del consorcio microalgal nativo se colectaron muestras de agua de la represa de la Empresa Eléctrica Quito (EEQ), ubicada en la parroquia de Cumbayá. El agua fue colectada en envases plásticos y transportados inmediatamente para su procesamiento, en el laboratorio las muestras fueron filtradas para la eliminación de residuos sólidos. Con el fin de promover un crecimiento microalgal diferencial se emplearon los medios de cultivo: BG₁₁, Bold Basal, CHU # 10 y fertilizante foliar Nitrofoska al 3% (anexo A) (Quevedo, Morales, & Acosta, 2008).

En tubos de ensayo con 10 mL de cada medio de cultivo antes mencionados, se inocularon 5 mL de la muestra de agua. Los tubos se mantuvieron con iluminación constante a una intensidad lumínica de $34.5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, expuestos a un fotoperiodo de 24:0 (horas de iluminación: horas de oscuridad), bajo una temperatura ambiente de $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ (figura 8).



Figura 8 Tubos de ensayos inoculados con agua de la represa de la EEQ

2.4.1.2 Técnicas de aislamiento

El aislamiento se realizó mediante la combinación de dos técnicas: diluciones seriadas y estriamiento sobre agar sólido (Barreto & Velasco, 2014), primero se seleccionaron los tubos que presentaron coloración en el medio de cultivo como indicador de crecimiento celular, se excluyeron las muestras donde solo se visualizó transparencia.

A partir de los tubos seleccionados se procedió a realizar diluciones seriadas de: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , con el respectivo medio de cultivo. Los tubos fueron mantenidos a temperatura ambiente de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ e iluminación constante, hasta la observación de crecimiento celular. A continuación se realizó la siembra en cajas Petri con medio de cultivo sólido, para lo cual se utilizó un asa bacteriológica y se sembró por estriamiento en zig-zag (Andersen & Kawachi, 2005).

Las cajas Petri inoculadas fueron conservadas a una temperatura ambiente de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ con una intensidad de iluminación de $14.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, por medio de lámparas fluorescentes. Cuando se identificó colonias separadas (figura 9) se verificó bajo el microscopio la conformación microalgal.



Figura 9 Colonias microalgales aisladas en medio de cultivo BG₁₁

El proceso de aislamiento del consorcio microalgal se resume gráficamente en la figura 10

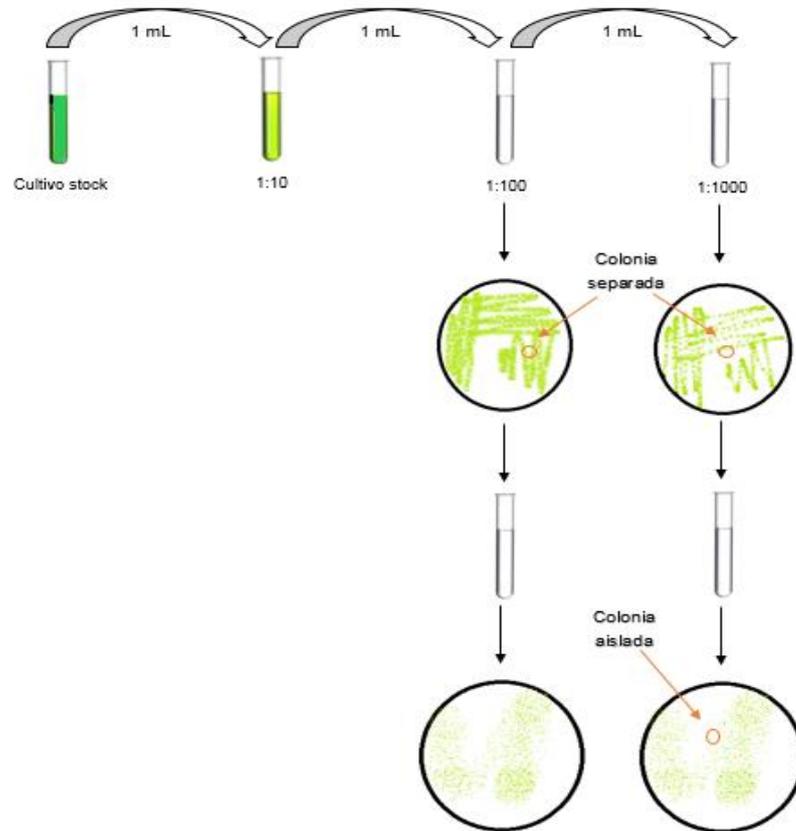


Figura 10 Esquema general para el proceso de aislamiento: Diluciones seriadas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y estriamiento en placa

El seguimiento del proceso de aislamiento se realizó por observación microscópica utilizando un microscopio BOECO, a través de la preparación de placas en portaobjetos. La identificación fue llevada a cabo por claves taxonómicas de Bourrelly (1981) y Eaton (1995) con respaldos bibliográficos.

2.4.1.3 Escalamiento y mantenimiento del consorcio microalgal

Una vez identificado el consorcio de trabajo se llevó a cabo el escalamiento con el medio de cultivo con el cual se realizó el aislamiento y así se obtuvo un volumen adecuado de inóculo (cultivo stock) para los ensayos posteriores. El consorcio se mantuvo con iluminación constante a una intensidad lumínica de $36.6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, a temperatura ambiente de $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$, donde se suministró agitación mediante una bomba de aire (figura 11).



Figura 11 Escalamiento del consorcio microalgal de trabajo

2.4.2 Fase 2: Evaluación de la adaptabilidad del consorcio microalgal al agua residual de reservorio

2.4.2.1 Procesamiento del agua residual y establecimiento de los cultivos

El agua residual empleada para el crecimiento del consorcio microalgal fue colectada de la primera laguna del reservorio de regulación de la EEQ, ubicado en el sector de Guangopolo (figura 12), la colecta se realizó en baldes y bidones plásticos.



Figura 12 Sitio de colecta del agua residual, laguna del reservorio de Guangopolo

En el laboratorio el agua residual fue sometida a privación de aireación durante dos días para provocar la reducción de bacterias posteriormente, se procedió a filtrar para la eliminación de basura y partículas sedimentables. Adicionalmente se tomó una muestra del agua residual para la determinación inicial de los parámetros de DBO_5 , DQO, Sulfatos, N total y P total, los análisis fueron realizados en el laboratorio OSP de la Universidad Central de Ecuador.

Para evaluar la adaptabilidad se establecieron los tratamientos T1 y T2. En T1, se utilizó agua de reservorio esterilizada, para lo cual se procedió a autoclavar el agua a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 45 min., en T2, se utilizó agua residual sin esterilizar. Para el establecimiento de los cultivos se calculó el volumen del inóculo inicial, considerando 200 mL de agua residual como volumen total del ensayo. Los cultivos se mantuvieron a iluminación constante con una intensidad lumínica de $70.32\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y agitación manual (figura 13). Se efectuó conteo celular en cámara de Neubauer pasando un día para determinar la densidad celular hasta alcanzar la fase estacionaria.

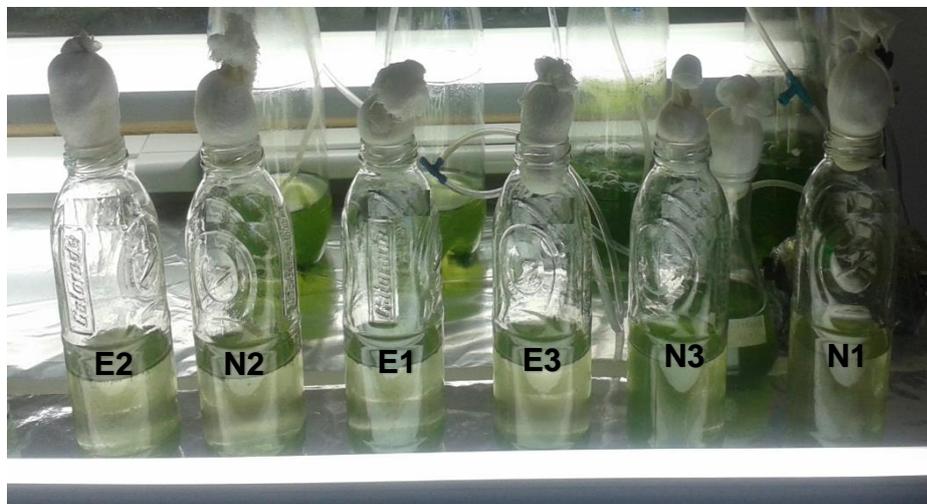


Figura 13 Cultivo del consorcio para evaluar su adaptabilidad sobre agua residual esterilizada y no esterilizada

Los dos tratamientos fueron evaluados por triplicado, estableciéndose 6 unidades experimentales, cuya identificación y acomodamiento aleatorio se muestran en la tabla 6.

Tabla 6

Tratamientos establecidos en la fase 2

T1			T2		
Consortio + agua de reservorio esterilizada			Consortio + agua de reservorio sin esterilizar		
E1	E2	E3	N1	N2	N3
Aleatorización de las unidades experimentales					
E2	N2	E1	E3	N3	N1

2.4.2.2 Cálculo del volumen para el inóculo inicial

La cantidad volumétrica requerida para cada cultivo en la investigación fue calculada mediante el conteo celular del cultivo stock del consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. y la aplicación de la siguiente fórmula:

$$V_2 = \frac{V_1 \times DC_{inicial}}{DC_{inóculo}}$$

Donde:

V₁: Volumen total del ensayo

V₂: Volumen del inóculo para el ensayo

DC_{inicial}: 1×10^6 cél.mL⁻¹

DC_{inóculo}: Densidad celular establecida mediante conteo en cámara de Neubauer

2.4.2.3 Determinación de la densidad celular

La densidad celular fue determina a través del recuento celular en cámara de Neubauer para cuantificar el número de células presentes en el cultivo y posteriormente se utilizó la siguiente fórmula (Morales, y otros, 2013):

$$DC = N \times 10^4 (Fd)$$

Donde:

DC: Densidad celular del inóculo (cél.mL⁻¹)

N: Promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 μL) por número de cuadrantes contados en la cámara de Neubauer.

10⁴: Factor de conversión de 0.1 μL a 1 mL

Fd: Factor de dilución

2.4.2.4 Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento celular

La cinética de crecimiento se determinó por medio del cálculo de la velocidad de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d), aplicando las siguientes fórmulas (Lobban, Chapman, & Klemer, 1998):

$$\mu = \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0} \qquad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Donde:

μ : Velocidad de crecimiento

X_1 : Densidad celular final

X_0 : Densidad celular inicial

t_1 , Tiempo final

t_0 : Tiempo inicial

t_d : Tiempo de duplicación

2.4.2.5 Variables evaluadas en la Fase 2

- **Densidad Celular:** Representa la cantidad de células por mililitro de medio cultivo. Se obtiene aplicando la fórmula: $DC = N \times 10^4 \times (F.d.)$, una vez que se haya realizado el conteo celular en cámara de Neubauer en la fase estacionaria.
- **Velocidad de crecimiento (μ):** Se define como la velocidad específica de crecimiento y representa la afinidad de la microalga por el sustrato.
- **Tiempo de duplicación (t_d):** Representa el tiempo necesario para que las microalgas doblen su población.

2.4.3 Fase 3: Selección de la concentración óptima de Nitrofoska® foliar para suplementar al medio de cultivo

2.4.3.1 Establecimiento de los cultivos para la Fase 3

Se evaluaron las concentraciones de fertilizante Nitrofoska® foliar (NPK) de: 0.5, 1.5, 3.0 mL.L⁻¹ y un testigo control. Las unidades experimentales consistieron en envases plásticos con un litro de agua residual no esterilizada inoculada con el consorcio de trabajo. Los cultivos se mantuvieron a una temperatura ambiente de $22 \pm 2^\circ \text{C}$, con iluminación de $45.5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y un fotoperiodo de 16:8. Se suministró agitación por burbujeo mediante una bomba de aireación (figura 14).



Figura 14 Cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. con diferentes concentraciones de NPK

Para los tres tratamientos y el control se establecieron 5 repeticiones trabajando con un total de 20 unidades experimentales, en la tabla 7 se detalla la identificación de los tratamientos empleados en esta fase, la aleatorización del diseño experimental se muestra en la tabla 8.

Tabla 7

Tratamientos establecidos para la fase 3

Tratamientos	Descripción	Repeticiones
Control	consorcio + agua de reservorio	C1 C2 C3 C4 C5
T1	consorcio + agua de reservorio + 0.5 mL.L ⁻¹ de NPK	T1a T1b T1cT1d T1e
T2	consorcio + agua de reservorio + 1.5 mL.L ⁻¹ de NPK	T2a T2b T2c T2d T2e
T3	consorcio + agua de reservorio + 3.0 mL.L ⁻¹ de NPK	T3a T3b T3c T3d T3e

Tabla 8

Aleatorización de las unidades experimentales en la fase 3

Aleatorización									
T3a	T1e	T3d	T2c	T3b	C2	T1b	T2a	T3e	T2e
C1	T2b	C4	T1a	C5	T1c	T2d	T3c	C3	T1d

2.4.3.2 Cosecha y secado de la biomasa en la Fase 3

Una vez alcanzada la fase estacionaria en los cultivos se procedió a realizar la cosecha de la biomasa mediante centrifugación a 1000 rpm durante 8 minutos, utilizando una centrifuga marca BOECO C-28^a, , el sobrenadante se desechó y con la ayuda de una espátula se retiró la biomasa concentrada (figura 15).



Figura 15 Proceso de cosecha por centrifugación en la fase 3

El secado de la biomasa se lo realizó en cajas Petri, al ambiente ($23 \pm 2^{\circ}$ C) (figura 16).

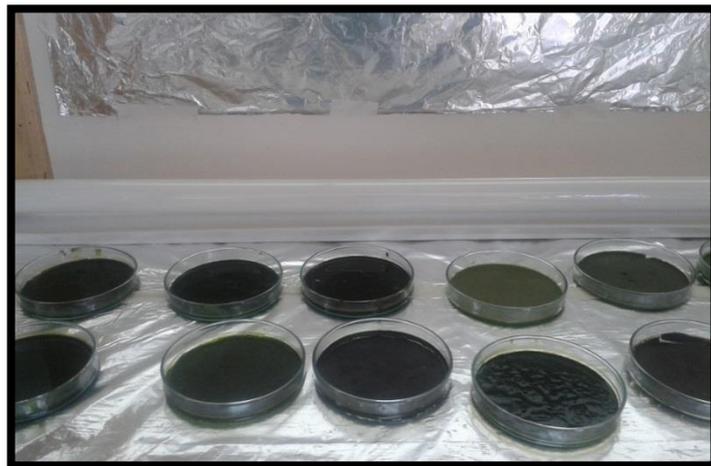


Figura 16 Secado de la biomasa procedente de los cultivo en la fase 3

2.4.3.3 Variables evaluadas en la fase tres

- **Peso seco:** Evaluación cuantitativa del contenido de biomasa expresada en miligramos de biomasa seca alcanzada en cada unidad experimental.
- **Densidad celular**
- **Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación**

2.4.3.4 Análisis de datos

En la fase dos y tres de la investigación, se realizó un diseño experimental completamente aleatorizado (DCA). Para las variables evaluadas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor, con un nivel de significancia de $\alpha = 5\%$. Las medias de las variables fueron comparadas mediante la prueba de Tukey; para el caso especial de la variable densidad celular, los datos fueron transformados a raíz cuadrada para cumplir con la hipótesis de normalidad. Los datos fueron analizados empleando el software estadístico InfoStat.

2.4.4 Fase 4: Evaluación de la productividad de la biomasa, contenido lipídico y capacidad de remoción de contaminantes alcanzados por el consorcio microalgal

2.4.4.1 Establecimiento del sistema de cultivo

En esta fase experimental, el consorcio microalgal fue cultivado en fotobiorreactores diseñados en el Laboratorio de Biotecnología Energética-BIOTEC. Se establecieron los tratamientos T1 y T2, el detalle y la identificación se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

Tratamientos planteados en la fase 4

Tratamiento	Descripción	Repeticiones
T1	agua del reservorio + 1.5 mL.L ⁻¹ de NPK	FBR 1
		FBR 2
		FBR 3
T2	agua potable + 3.0 mL.L ⁻¹ de NPK	FBN 1
		FBN 2
		FBN 3

En los fotobiorreactor implementados se colocaron 12 litros del medio de cultivo y se inoculó con tres litros del consorcio microalgal para un volumen total de cultivo de 15 litros (figura 17).

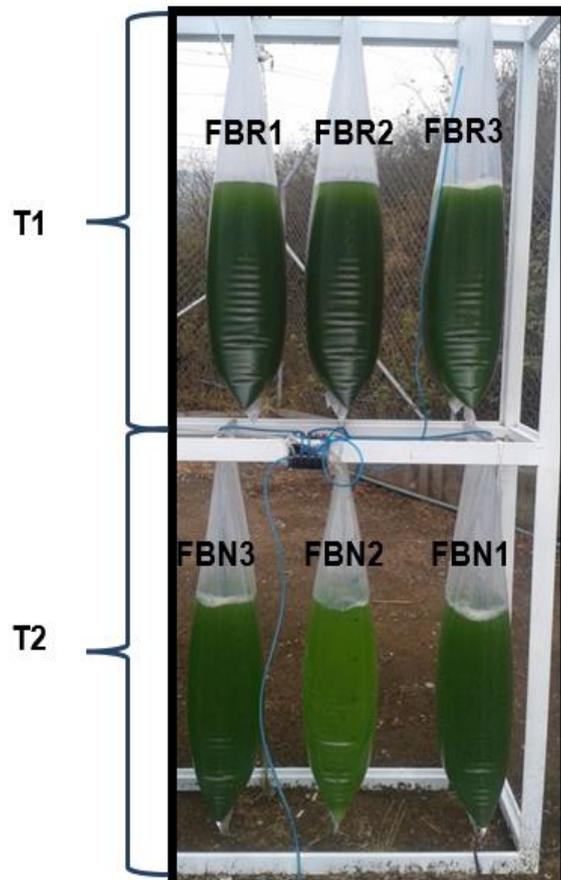


Figura 17 Cultivo en fotobiorreactores. T1 agua residual suplementada con NPK.
T2: agua potable suplementada con NPK

Al sistema se suministró diariamente CO_2 durante 10 minutos para mantener el pH en 8 y para evitar la sedimentación se aplicó agitación mediante un compresor. Los cultivos se mantuvieron por 28 días y posteriormente se procedió a cosechar la biomasa.

2.4.4.2 Cosecha y secado de la biomasa en la fase 4

La biomasa fue cosechada mediante floculación con sulfato de aluminio utilizando una concentración de 1g.L^{-1} (Palomino, Estrada, & López, 2010)(figura 18).



Figura 18 Cosecha de biomasa mediante floculación

Una vez realizada la cosecha, la biomasa fue secada al ambiente y posteriormente se realizó su pesaje con ayuda de una balanza analítica BOECO finalmente, para asegurar una mejor extracción de los lípidos se procedió a realizar disrupción mecánica empleando un mortero (figura 19)



Figura 19 Disrupción mecánica de la biomasa

2.4.4.3 Determinación de la productividad de la biomasa

La productividad de la biomasa fue determinada mediante la determinación del peso seco de la biomasa antes y después del cultivo, y se relacionó con el tiempo y volumen total del cultivo utilizando la siguiente fórmula: (Serrano, 2012).

$$P \text{ biomasa} = \frac{\text{Peso seco final} - \text{Peso seco inicial}}{\text{Tiempo del cultivo} \times \text{Volumen del cultivo}}$$

2.4.4.4 Evaluación del contenido lipídico

Para la evaluación de contenido lipídico se enviaron las muestras de biomasa seca al laboratorio OSP de la Universidad Central del Ecuador para el respectivo análisis del porcentaje de grasa mediante el método Soxhlet MAL-03/ AOAC 991.36

2.4.4.5 Evaluación de la capacidad de remoción de contaminantes

La reducción de contaminantes presentes en el agua residual del reservorio de Guangopolo mediante el tratamiento biológico con el consorcio microalgal fue evaluada a través de los valores en los parámetros de DBO₅, DQO, sulfatos, nitrógeno y fósforo total antes y después del cultivo.

Finalizado el periodo de cultivo, se tomó una muestra de 3 litros del agua residual de los tres fotobiorreactor procedentes de T1; la recuperación de la biomasa se realizó por filtración para evitar interferencias por el uso de floculante. Las muestras de agua fueron enviadas al laboratorio OSP de la Universidad Central del Ecuador para los siguientes análisis:

- DBO₅: Mediante el método APHA-5210 modificado
- DQO: Mediante el método Colorimétrico MERCK modificado,
- Sulfatos: Mediante el método MAM-65/HACH 680
- Nitrógeno Total: Mediante el método MAN-45/ Colorimétrico MERCK
- Fósforo Total: Mediante el método MAM-17/APHA 4500-PB

2.4.4.6 Variables evaluadas en la fase 4

- **Peso seco:** Evaluación cuantitativa del contenido de biomasa expresada en gramos de biomasa seca.
- **Porcentaje lipídico:** Se define como el contenido de ácidos grasos en la biomasa seca representado en porcentaje. Se determinó por medio de la técnica Soxhlet.
- **Productividad de biomasa:** Relación entre la diferencia del peso seco de la biomasa al inicio y final del cultivo y el producto entre el tiempo y volumen de los fotobiorreactores.

- **DBO₅**: Corresponde a la cantidad de oxígeno que los microorganismos consumen durante la degradación de los compuestos orgánicos presentes en la muestra expresado en mg de oxígeno por litro.
- **DQO**: Determina la cantidad requerida de oxígeno para oxidar la materia orgánica presente en la muestra expresado en mg de oxígeno por litro.
- **Nitrógeno, Fósforo, Sulfatos**: Indica la cantidad de estos elementos en la muestra expresado en mg por litro.

2.4.5 Análisis de datos

Los datos obtenidos para la variable productividad de biomasa y contenido lipídico fueron interpretados mediante la aplicación de la prueba t de Student. El análisis de datos para las variables correspondientes a la evaluación de remoción de contaminantes se realizó gráficamente el porcentaje de reducción.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Fase 1: Aislamiento e identificación del consorcio microalgal nativo

A través de la aplicación sucesiva de la técnica de diluciones seriadas y estriamiento en agar sólido se aisló el consorcio microalgal conformado por las especies *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp., las mismas que fueron identificadas mediante las claves taxonómicas de Bourrelly (1981) y Eaton (1995), siguiendo las características mostradas en la tabla 10.

Tabla 10

Características morfológicas para *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp.

	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.
Forma	Células ovoides, fusiformes alargadas, con apéndices en forma de setas sólidas	Células esféricas, aparenta tener un halo al su alrededor
Tamaño	3-5 μ m de diámetro, 11-16 μ m de largo	4.5-17 μ m de diámetro, marcada diferencia entre las mismas
Color	Verde	Verde
Cloroplasto parietal	Único	En forma de esfera hueca
Pirinoide	Único	Único
Hábitat	Agua dulce	Agua dulce

Fuente: (López, 2006)

El medio BG₁₁ resultó ser el más exitoso para el establecimiento del consorcio microalgal, ya que en los medios Bold Basal, Chu # 10 y en el medio a base de fertilizante NPK existió una predominancia de la microalga *Chlorella* sp. Se observó para *Scenedesmus* sp. células con forma ovoide alargada, de color verde, dispuesta en cenobios de cuatro células con prolongaciones en los extremos, también se observó su disposición morfológica unicelular, para *Chlorococcum* sp. se observó células con forma esférica de color verde, rodeadas con una aparente membrana (figura 20).

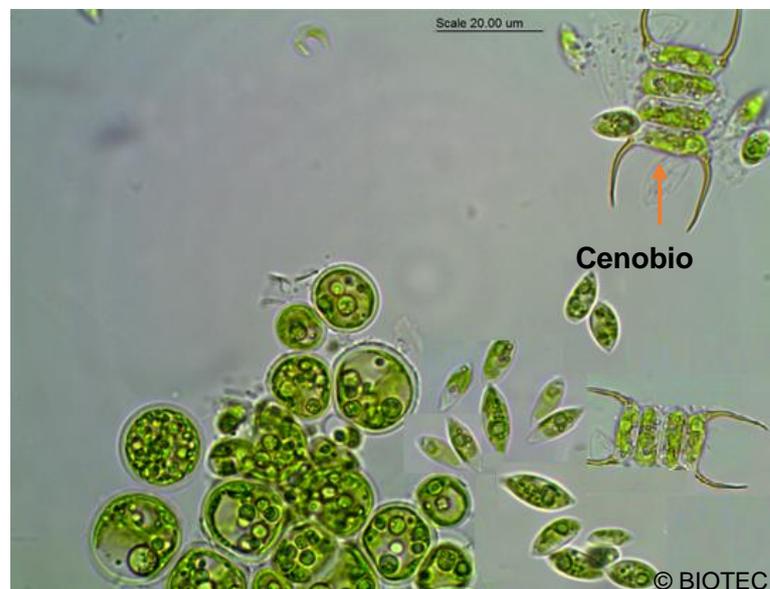


Figura 20 Consorcio de trabajo constituido por *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp.

3.2 Fase 2: Evaluación de la adaptación del consorcio microalgal al agua residual del reservorio

Al cultivar el consorcio microalgal sobre agua residual esterilizada y no esterilizada se observó un crecimiento diferencial entre las dos especies de microalgas que conformaron el consorcio.

Las curvas de crecimiento microalgal en el agua residual esterilizada, muestran una mayor producción celular de *Scenedesmus* sp. con una fase exponencial que inició en el día 2 y finalizó en el día 6 del cultivo; *Chlorococcum* sp. presento un crecimiento lento sin fase exponencial, observándose un descenso de la densidad celular en el día 2, con un paulatino incremento hasta el día 12 del cultivo (figura 21)

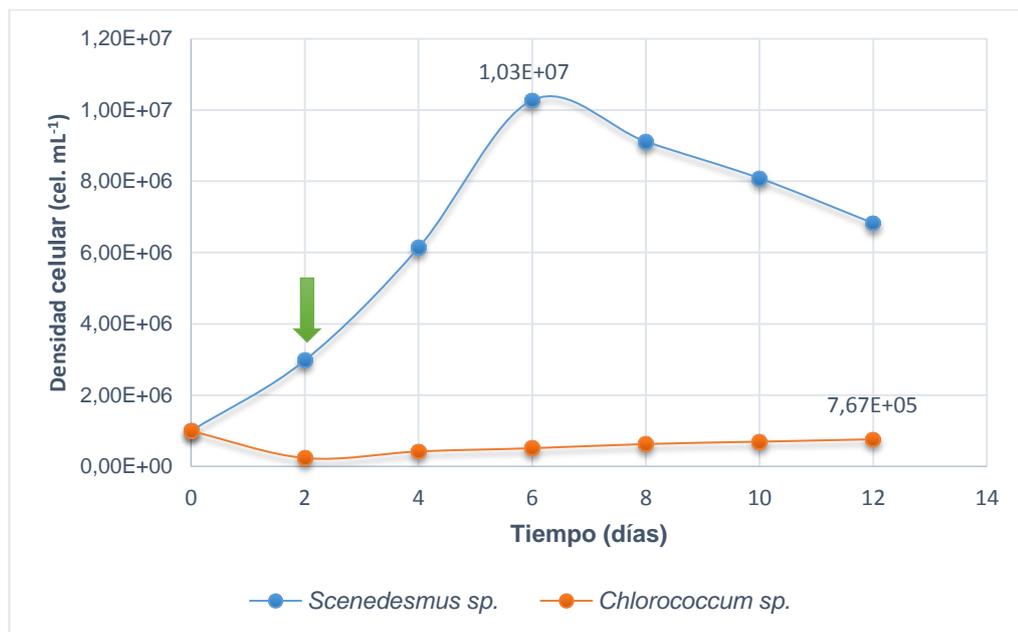


Figura 21 Curvas de crecimiento celular para *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp. cultivadas en agua de reservorio esterilizada

La densidad celular máxima alcanzada para *Scenedesmus* sp. fue de 10.30×10^6 cél.mL⁻¹ en el día 6, para *Chlorococcum* sp. no hubo un notable incremento en la densidad celular alcanzando una densidad celular máxima de 0.77×10^6 cél.mL⁻¹ en el día 12; las densidades celulares para cada día de monitoreo se muestran en la tabla 11

Tabla 11

Densidad celular alcanzada con el agua residual esterilizada

Tiempo (días)	Densidad Celular (cél.mL ⁻¹)	
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.
0	1.00 x10 ⁶	1.00x10 ⁶
2	2.98 x10 ⁶	0.24 x10 ⁶
4	6.14 x10 ⁶	0.43 x10 ⁶
6	10.30 x10⁶	0.52 x10 ⁶
8	9.12 x10 ⁶	0.63 x10 ⁶
10	8.09 x10 ⁶	0.70 x10 ⁶
12	6.83 x10 ⁶	0.77 x10⁶

Las curvas para el crecimiento microalgal en el agua residual no esterilizada, mostraron igualmente un mayor crecimiento de *Scenedesmus* sp., con una fase exponencial que inició en el día 2 que se prolongó hasta el día 6, presentando una fase estacionaria hasta el día 12 donde se finalizó el cultivo; en el caso de *Chlorococcum* sp. se observó un lento crecimiento en todo el periodo de cultivo (figura 22).

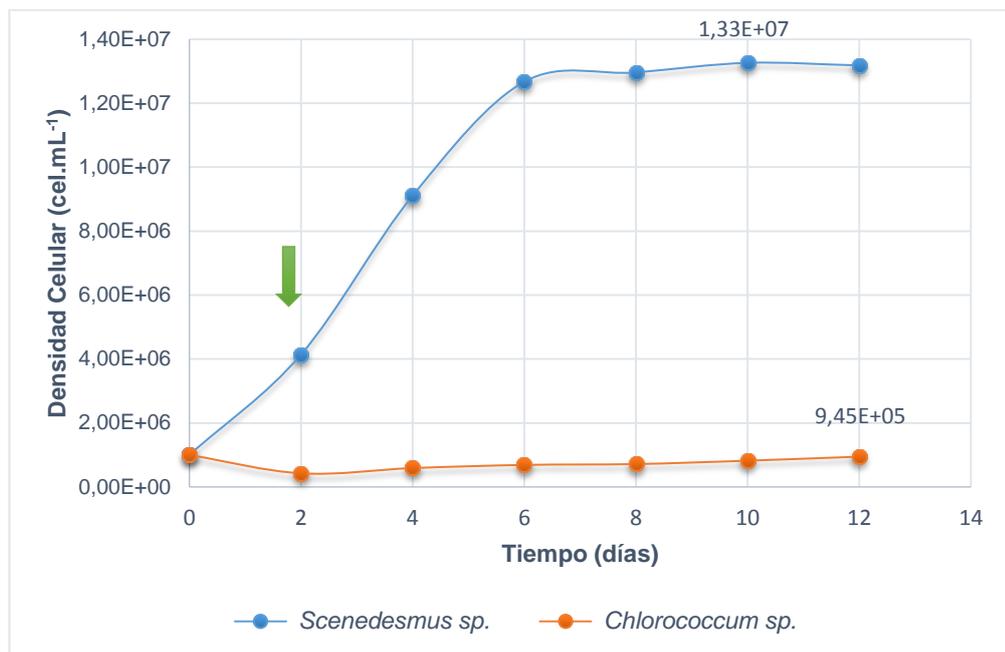


Figura 22 Curvas de crecimiento celular para *Scenedesmus sp.* y *Chlorococcum sp.* cultivadas en agua de reservorio sin esterilizar

La densidad celular máxima que presentó *Scenedesmus sp.* fue de 13.33×10^6 cél.mL⁻¹ en el día 10 del cultivo; para *Chlorococcum sp.* no hubo un notable incremento en la densidad celular, alcanzando una densidad celular máxima de 0.95×10^6 cél.mL⁻¹ en el día 12. Las densidades celulares para *Scenedesmus* y *Chlorococcum* a lo largo del cultivo se muestran en la tabla 12.

Tabla 12

Densidad celular alcanzada con el agua residual no esterilizada

Tiempo (días)	Densidad Celular (cél.mL ⁻¹)	
	<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Chlorococcum</i> sp.
0	1.00 x10 ⁶	1.00x10 ⁶
2	4.14 x10 ⁶	0.42 x10 ⁶
4	9.11 x10 ⁶	0.59 x10 ⁶
6	12.70 x10 ⁶	0.69 x10 ⁶
8	13.00 x10 ⁶	0.71 x10 ⁶
10	13.33 x10⁶	0.82 x10 ⁶
12	13.32 x10 ⁶	0.95 x10⁶

La evaluación de la adaptabilidad se realizó considerando la dinámica de crecimiento global del consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp., durante los 12 días de monitoreo. Las curvas de crecimiento para el consorcio mostraron una mayor producción celular con el uso de agua residual no esterilizada, presentando una fase exponencial a partir del día 2 hasta el día 6, con una posterior fase estacionaria hasta el día 12 donde finalizó el cultivo; con el agua residual esterilizada, el consorcio entró en fase exponencial a partir del día 2 hasta el día 6, entrando seguidamente a una fase de muerte celular hasta el fin del monitoreo (figura 23).

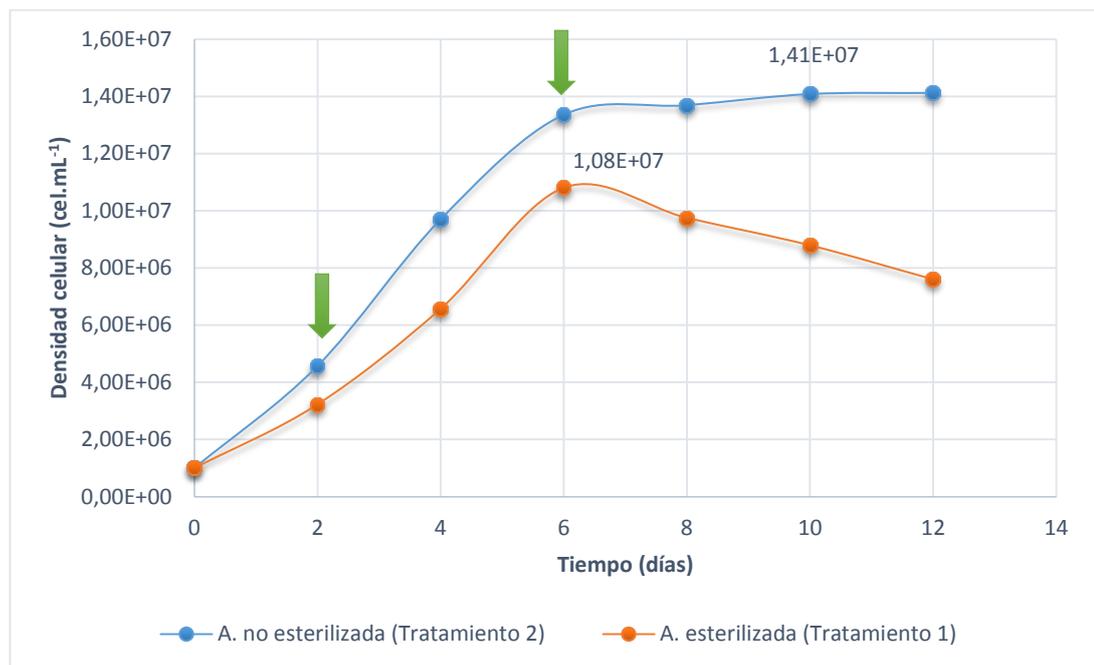


Figura 23 Curvas de crecimiento para el consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. cultivado sobre agua del reservorio esterilizada y no esterilizada

Mediante el uso del agua del reservorio no esterilizada se obtuvo una densidad celular máxima de 14.1×10^6 cél.mL⁻¹ en el día 10 del cultivo y con el agua esterilizada se alcanzó una densidad celular máxima de 10.8×10^6 cél.mL⁻¹ en el día 6. Las densidades celulares para los 12 días de cultivo se muestran en la tabla 13

Tabla 13

Densidad celular alcanza con el consorcio de trabajo

Densidad Celular (cél.mL ⁻¹) del consorcio microalgal <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp.		
Tiempo (días)	agua residual esterilizada	agua residual no esterilizada
0	1.00 x10 ⁶	1.00 x10 ⁶
2	3.23 x10 ⁶	4.57 x10 ⁶
4	6.57 x10 ⁶	9.70 x10 ⁶
6	10.80 x10⁶	13.40 x10 ⁶
8	9.75 x10 ⁶	13.70 x10 ⁶
10	8.79 x10 ⁶	14.10 x10⁶
12	7.60 x10 ⁶	14.10 x10 ⁶

3.2.1 Densidad celular alcanzada con el uso de agua residual esteriliza y no esterilizada

Se consideró a la densidad celular como un parámetro para evaluar la adaptabilidad del consorcio microalgal ya que representa cuantitativamente la producción celular durante el periodo de cultivo. Mediante el análisis de varianza (ANOVA), se determinó que existió una diferencia estadísticamente significativa entre el uso del agua residual esterilizada y el agua residual no esterilizada, con valores de $p < 0.05$ en todos los días de monitoreo, observando una diferencia altamente significativa ($p = 0.0015$) en el día 10 del cultivo (tabla 14)

Tabla 14**Resumen del análisis de varianza para la variable densidad celular**

		Día 2		Día 4		Día 6	
F.V	GL	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor
Condición del agua	1	174863.80	0.0343	463605.66	0.0468	200440.54	0.0339
Error	4	17533.93		57448.05		19948.62	
TOTAL	5						
		Día 8		Día 10		Día 12	
F.V.	GL	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor
Condición del agua	1	508969.21	0.0387	931993.68	0.0015	1427896.15	0.0428
Error	4	55387.81		15792.95		166377.19	
Total	5						

Las medias reales y modificadas para la densidad celular alcanzadas tanto con el agua residual esterilizada como con el agua no esterilizada fueron comparadas mediante la aplicación de la prueba de Tukey, y se determinó que el uso de agua residual no esterilizada presentó medias más altas en todos los días de cultivo (tabla 15)

Tabla 15

Prueba de Tukey para la comparación de las medias reales y modificadas para la densidad celular

Condición del agua	Día 2			Día 4			Día 6		
	Media real	Media transformada	Subconj.	Media real	Media transformada	Subconj.	Media real	Media transformada	Subconj.
T2	4570000.00	2135.19	A	9703333.33	3110.13	A	13333333.33	3650.96	A
T1	3230000.00	1793.76	B	6570000.00	2554.18	B	10816666.67	3285.41	B
Condición del agua	Día 8			Día 10			Día 12		
	Media real	Media transformada	Subconj.	Media real	Media transformada	Subconj.	Media real	Media transformada	Subconj.
T2	13700000.00	3697.85	A	14100000.00	3753.06	A	14100000.00	3728.89	A
T1	9753333.33	3115.35	B		2964.82	B	7606666.67	2753.22	B

3.2.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación alcanzados con el uso de agua residual esteriliza y no esterilizada

El cultivo del consorcio microalgal sobre agua residual no esterilizada presentó una velocidad de crecimiento de 0.38 generaciones al día y con un tiempo de duplicación de 1.84 días, con el agua residual esterilizada la velocidad de crecimiento fue de 0.30 generaciones al día y el tiempo de duplicación fue de 2.30 días (tabla 16)

Tabla 16

Parámetros cinéticos

Parámetros cinéticos	Consortio microalga <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp.	
	T1 agua residual esterilizada	T2 agua residual no esterilizada
μ (generaciones.d ⁻¹)	0.30	0.38
<i>td</i> (d)	2.30	1.84

La velocidad de crecimiento y el tiempo de duplicación fueron evaluados para determinar la capacidad de adaptación del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. al agua residual esterilizada y no esterilizada. Se determinó que no existió una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.3985$) entre el uso del agua residual esteriliza y el uso del agua no esterilizada a través del análisis de varianza (ANOVA) (tabla 17)

Tabla 17

Análisis de varianza para la variable velocidad de crecimiento

F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Condición del agua	0.01	1	0.01	0.89	0.3985
Error	0.03	4	0.01		
Total	0.04	5			

La media alcanzada con el uso del agua residual esterilizada (T1) fue similar a la media alcanzada con el agua residual no esterilizada (T2), por lo que los dos tratamientos fueron similares; la comparación fue realizada mediante la aplicación de la prueba de Tukey (tabla 18)

Tabla 18

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable velocidad de crecimiento

Condición del agua	Medias
T2	0.38
T1	0.37

Otro parámetro cinético analizado para determinar la adaptabilidad del consorcio microalga, fue el tiempo de duplicación. Donde se determinó que no existió una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0.6029$) entre el uso del agua residual esterilizada y el uso del agua residual no esterilizada mediante el análisis de la varianza (ANOVA) (tabla 19).

Tabla 19**Análisis de varianza para la variable tiempo de duplicación**

F.V	SC	GL	CM	F	p-valor
Condición del agua	0.10	1	0.01	0.32	0.6029
Error	1.21	4	0.30		
Total	1.30	5			

Las medias para T1 y T2 fueron estadísticamente similares, por lo que no se determinó un mejor tratamiento con dependencia el tiempo de duplicación, la comparación se realizó a través de la aplicación de la prueba de Tukey (tabla 20).

Tabla 20**Prueba de Tukey para la comparación de las medias para la variable tiempo de duplicación**

Condición del agua	Media
T2	2.26
T1	2.01

3.3 Fase 3: Selección de la concentración óptima de Nitrofoska® foliar para suplementar al medio de cultivo

En esta fase del estudio, se evaluó la adición de tres diferentes concentraciones de Nitrofoska® foliar (NPK) al agua residual procedente del reservorio de la EEQ, utilizada como medio de cultivo para el consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp.

Las curvas de crecimiento mostraron para las tres concentraciones evaluadas y el control, una fase exponencial que inició a partir del día 4; con la adición de 3.0 mL.L⁻¹ de NPK la fase exponencial concluyó en el día 14, entrando inmediatamente a una fase de muerte celular hasta el día 20; con la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK, la fase exponencial finalizó en el día 10, sin embargo, existió un descenso en la densidad celular en el día 12, seguido por un notable aumento en el día 14, entrando a una fase estacionaria a partir del día 16; con la adición de 0.5 mL.L⁻¹ de NPK, la fase exponencial finalizó en el día 10, presentando una fase de muerte celular a partir de día 12; en el control la fase exponencial no fue pronunciada, observándose una fase de muerte celular a partir del día 14 (figura 24)

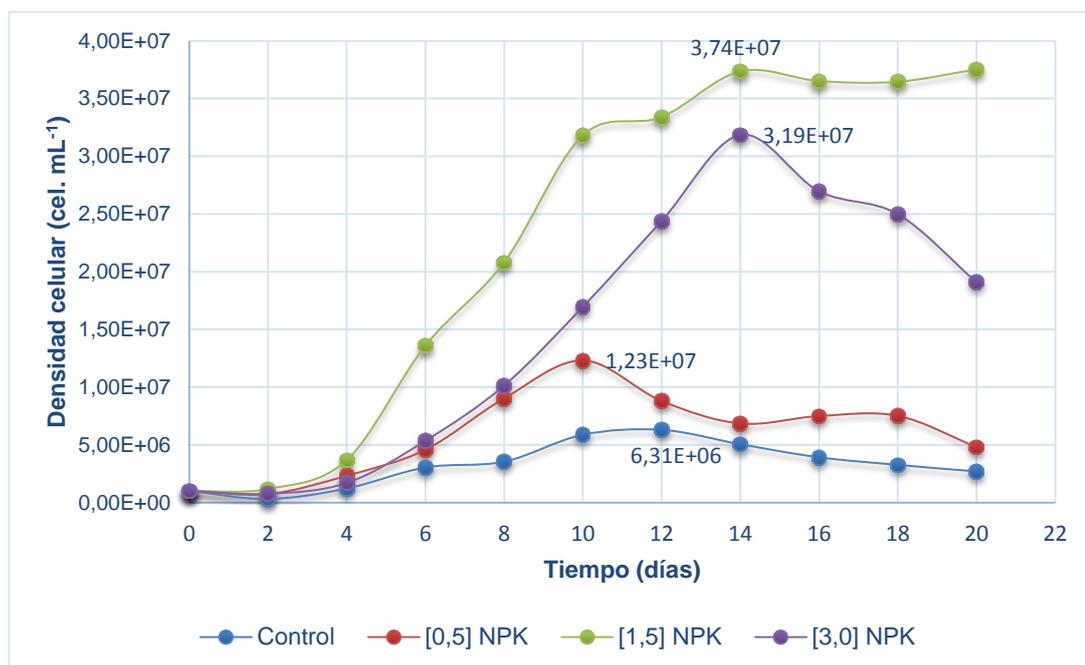


Figura 24 Curvas de crecimiento para el tratamiento control y las tres concentraciones de NPK evaluadas

La densidad celular máxima que se alcanzó con la adición de 3.0 mL.L⁻¹ de NPK fue de 31.90 x10⁶ cél.mL⁻¹ en el día 14 del cultivo, mientras que con 1.5 mL.L⁻¹ de NPK se alcanzó una densidad celular máxima de 34.70 x10⁶ cél.mL⁻¹ en el día 14; con la adición de 0.5 mL.L⁻¹ de NPK, la densidad celular máxima fue de 12.3 x10⁶ cél.mL⁻¹ en el día 10; con el tratamiento control se alcanzó una densidad celular máxima de 6.31 x10⁶ cél.mL⁻¹ en el día 12 (figura 3.5). Las densidades celulares para cada día de monitoreo se muestran en la tabla 21.

Tabla 21

Densidad celular obtenida con las concentraciones de NPK

Densidad Celular (cél.mL ⁻¹) del consorcio microalgal <i>Scenedesmus</i> sp. & <i>Chlorococcum</i> sp.				
Tiempo	Control	0.5 mL.L ⁻¹ NPK	1.5 mL.L ⁻¹ NPK	3.0 mL.L ⁻¹ NPK
0	1.00 x 10 ⁶	1.00 x 10 ⁶	1.00 x 10 ⁶	1.00 x 10 ⁶
2	0.32 x 10 ⁶	0.74 x 10 ⁶	1.18 x 10 ⁶	0.77 x 10 ⁶
4	1.22 x 10 ⁶	2.33 x 10 ⁶	3.68 x 10 ⁶	1.71 x 10 ⁶
6	3.05 x 10 ⁶	4.58 x 10 ⁶	13.60 x 10 ⁶	5.35 x 10 ⁶
8	3.55 x 10 ⁶	9.03 x 10 ⁶	20.80 x 10 ⁶	10.10 x 10 ⁶
10	5.88 x 10 ⁶	12.30 x 10⁶	31.80 x 10 ⁶	17.00 x 10 ⁶
12	6.31 x 10⁶	8.81 x 10 ⁶	33.40 x 10 ⁶	24.40 x 10 ⁶
14	5.06 x 10 ⁶	6.86 x 10 ⁶	37.40 x 10⁶	31.90 x 10⁶
16	3.93 x 10 ⁶	7.50 x 10 ⁶	36.50 x 10 ⁶	27.00 x 10 ⁶
18	3.27 x 10 ⁶	7.52 x 10 ⁶	36.50 x 10 ⁶	25.00 x 10 ⁶
20	2.70 x 10 ⁶	4.82 x 10 ⁶	37.50 x 10 ⁶	19.10 x 10 ⁶

3.3.1 Densidad celular alcanzada con las diferentes concentraciones de NPK

La densidad celular fue un parámetro de selección para establecer la concentración adecuada de NPK que permita suplementar con nutrientes al agua residual de reservorio para su uso como medio de cultivo. Se determinó que hubo una diferencia altamente significativa ($p < 0,001$) en todos los días de monitoreo, entre las tres diferentes concentraciones de NPK y el control, determinado a través del análisis de varianza (ANOVA) (tabla 22)

Al comparar las medias reales y modificadas, se determinó que la adición de 1.5 mL.L^{-1} de NPK al agua residual fue el mejor tratamiento por presentar las medias más altas en todos los días que fue monitoreado el cultivo, ubicándose en el subconjunto A; con el control se obtuvo medias inferiores a las presentadas con las diferentes concentraciones de NPK, estas comparaciones fueron realizadas mediante la aplicación de la prueba de Tukey (tabla 23 y 24).

Tabla 22

Análisis de varianza para la variable densidad celular

		Día 2		Día 4		Día 6		Día 8	
F.V.	GL	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor
[] NKP	3	233585.74	< 0.0001	608805.08	< 0,0001	3596782.45	< 0.0001	5980696.09	< 0.0001
Error	16	2334.95		15932.80		46396.54		11204.21	
Total	19								
		Día 10		Día 12		Día 14		Día 16	
F.V.	GL	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor	CM	p-valor
[] NKP	3	9013580.75	< 0.0001	12132571.60	< 0.0001	19929604.32	< 0.0001	18986618.17	< 0.0001
Error	16	29771.57		47238.87		80940.02		6602.29	
Total	19								
		Día 18		Día 20					
F.V.	GL	CM	p-valor	CM	p-valor				
[] NKP	3	19325001.13	< 0.0001	21388670.61	< 0.0001				
Error	16	19299.04		6845.79					
Total	19								

Tabla 23

Prueba de Tukey para la comparación de medias reales para la variable densidad celular

	Día 2		Día 4		Día 6		Día 8		Día 10	
[] NPK	Media real	Subconj.								
1.5	1178000	A	3678000	A	13600000	A	20800000	A	31820000	A
3.0	764600	B	2328000	B	5356000	B	10148000	B	16980000	B
0.5	738400	B	1706000	B	4584000	B	9030000	B	12340000	C
Control	314400	C	1220000	C	3060000	C	3590000	C	5872000	D
	Día 12		Día 14		Día 16		Día 18		Día 20	
[] NPK	Media real	Subconj.								
1.5	33400000	A	37340000	A	36540000	A	36460000	A	37520000	A
3.0	24400000	B	31860000	A	26980000	B	24980000	B	19120000	B
0.5	8810000	C	6856000	B	7500000	C	7520000	C	4820000	C
Control	6346000	D	5074000	B	3808000	D	3172000	D	2654000	D

Tabla 24

Prueba de Tukey para la comparación de las medias transformadas para la variable densidad celular

	Día 2		Día 4		Día 6		Día 8		Día 10	
[] NPK	Media transf.	Subconj.								
1.5	1084.93	A	1917.47	A	3086.7	A	4560.6	A	5640.83	A
3.0	871.91	B	1515.77	B	2312.28	B	3182.71	B	4110.61	B
0.5	859.02	B	1299.81	B C	2114.2	B C	3003.36	B	3512.11	C
Control	559.22	C	1103.3	C	1744.5	C	1894.54	C	2421.94	D
	Día 12		Día 14		Día 16		Día 18		Día 20	
[] NPK	Media transf.	Subconj.								
1.5	5779.12	A	6095.05	A	6043.89	A	6036.85	A	6125.07	A
3.0	4926.02	B	5639.53	A	5193.77	B	4993.75	B	4371.28	B
0.5	2967.62	C	2617.53	B	2737.89	C	2742.11	C	2195.06	C
Control	2516.78	D	2250.67	B	1951.14	D	1780.46	D	1627.65	D

3.3.2 Velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación alcanzados con las diferentes concentraciones de NPK

Los parámetros cinéticos fueron evaluados con el fin de determinar la concentración de NPK que proporcione una mayor velocidad de crecimiento con un tiempo de duplicación corto. La adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK al agua residual promovió una mayor velocidad de crecimiento y un tiempo de duplicación menor para el consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp., en la tabla 25 se muestra los parámetros cinéticos obtenidos correspondientes a cada tratamiento.

Tabla 25

Parámetros cinéticos para el crecimiento en diferentes concentraciones de NPK

Concentración de NPK mL.L⁻¹	Velocidad de crecimiento μ (generaciones.d⁻¹)	Tiempo de duplicación <i>td</i> (d⁻¹)
Control	0.17	4.08
0.5	0.19	3.65
1.5	0.52	1.33
3.0	0.36	1.93

Se determinó que existió una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.0001$) entre las diferentes concentraciones de NPK evaluado a través de del análisis de varianza (ANOVA) para la variable velocidad de crecimiento (Tabla 26).

Tabla 26

Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para la variable velocidad de crecimiento con diferentes concentraciones de NPK

F.V	SC	GL	CM	F	p- valor
Concentración de NPK	0.41	3	0.14	44.69	< 0.0001
Error	0.05	16	0.0031		
Total	0.46	19			

Mediante la comparación de las medias con la aplicación de la prueba de Tukey, se estableció como mejor tratamiento la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK, el cual se ubicó en el subconjunto A; con 0.5 mL.L⁻¹ de NPK y el control se obtuvieron medias inferiores, ubicándose en el subconjunto C (tabla 27).

Tabla 27

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable velocidad de crecimiento

Concentración de NPK	Medias	Subconjunto
1.5 mL.L ⁻¹	0.52	A
3.0 mL.L ⁻¹	0.28	B
0.5 mL.L ⁻¹	0.19	C
Control	0.16	C

El tiempo de duplicación también presentó una diferencia estadística altamente significativa entre las concentraciones de NPK evaluadas, con un valor de $p < 0.0001$, determinado mediante el análisis de varianza (ANOVA) (tabla 28).

Tabla 28

Resumen del análisis de varianza (ANOVA) para la variable tiempo de duplicación con diferentes concentraciones de NPK

F.V	SC	GL	CM	F	p- valor
Concentración de NPK	30.77	3	10.26	58.60	< 0.0001
Error	2.80	16	0.0031		
Total	33.58	19			

Las medias para el tiempo de duplicación con 1.5 y 3.0 mL.L⁻¹ de NPK fueron similares, identificándolos como los mejores tratamientos en el subconjunto A, con la concentración de 0.5 mL.L⁻¹ de NPK y el control las medias fueron superiores, ubicándose en el subconjunto B; las comparaciones se realizaron mediante la aplicación de la prueba de Tukey (tabla 29)

Tabla 29

Prueba de Tukey para la comparación de medias para la variable tiempo de duplicación

Concentración de NPK	Medias	Subconjunto
1.5 mL.L ⁻¹	1.37	A
3.0 mL.L ⁻¹	2.05	A
0.5 mL.L ⁻¹	3.75	B
Control	4.44	B

3.3.3 Peso seco de la biomasa obtenida con las diferentes concentraciones de NPK

El análisis de las frecuencias para el peso seco de la biomasa obtenida durante el cultivo del consorcio microalgal sobre agua residual adicionada con diferentes concentraciones de nitrofoska (NPK) muestra gráficamente que se obtuvo mayor cantidad de biomasa (645.16 mg) con la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK, mientras que con una concentración de 3.0 y 0.5 de mL.L⁻¹ de NPK se obtuvieron 490.12 mg y 341.80 mg de biomasa respectivamente. Cuando no se adicionó ninguna concentración de NPK (control) se alcanzó una baja cantidad de biomasa (279.42 mg) (figura 25).

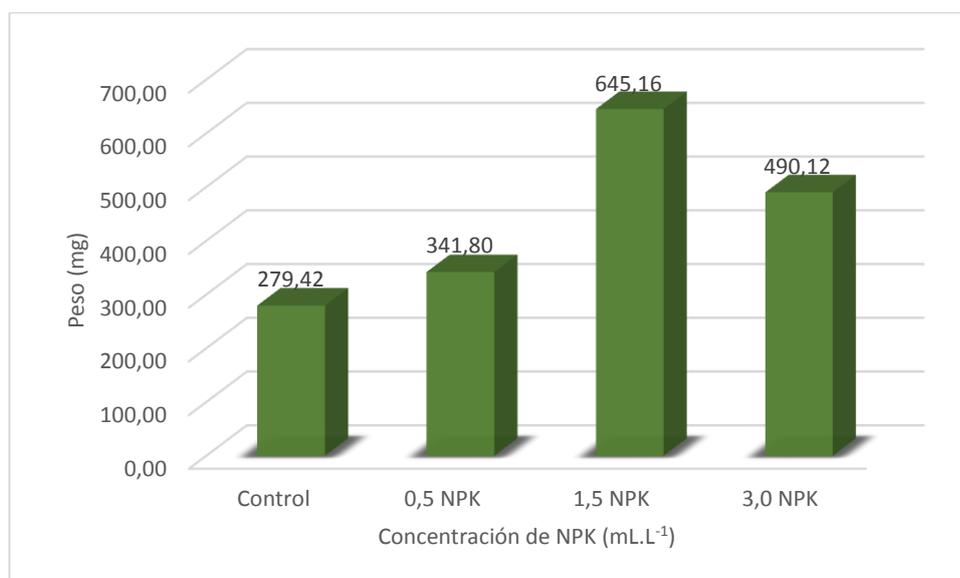


Figura 25 Peso seco de la biomasa obtenida con la adición de concentraciones de NPK

El peso seco de la biomasa presentó una diferencia estadística altamente significativa con un valor de $p < 0,0001$, entre las diferentes concentraciones de NPK, datos evaluados mediante el análisis de la varianza (ANOVA) (tabla 30)

Tabla 30

Resumen del análisis de varianza para la variable peso seco de biomasa con las diferentes concentraciones de NPK

F.V	SC	GL	CM	F	p- valor
Concentración de NPK	400143.77	3	133381.26	20.58	<0.0001
Error	103717.31	16	6482.63		
Total	503861.08	19			

La comparación de las medias mediante la aplicación de la prueba de Tukey, mostró que el mejor tratamiento fue con la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK, ubicándose en el subconjunto A; cuando no se adicionó ninguna concentración de NPK (control) se observó la media más baja; con la adición de 0.5 y 3.0 mL.L⁻¹ de NPK las medias fueron muy similares, ubicándose ambos tratamientos en el subconjunto B (tabla 31).

Tabla 31

Prueba de Tukey para la comparación de las medias para la variable peso seco de biomasa

Concentración de NPK	Medias	Subconjunto
1.5 mL.L ⁻¹	645.16	A
3.0 mL.L ⁻¹	490.12	B
0.5 mL.L ⁻¹	341.80	B
Control	279.42	C

3.4 Fase 4: Evaluación de la productividad de la biomasa, contenido lipídico y capacidad de remoción de contaminantes alcanzados por el consorcio microalgal *Scenedesmus sp.* & *Chlorococcum sp.*

En esta fase del estudio, se evaluaron los tratamientos: T1, donde se utilizó agua residual de reservorio no esterilizada suplementada con 1.5 mL.L⁻¹ de NPK para el cultivo del consorcio microalgal (fotobiorreactores FBR1, FBR2 y FBR3) y T2, donde se utilizó para el cultivo del consorcio agua potable adicionada con 3.0 mL.L⁻¹ de NPK (fotobiorreactores FBN1, FBN2 y FBN3).

3.4.1 Productividad de la biomasa procedente del cultivo del consorcio microalgal en fotobiorreactores

Se obtuvo una mayor producción de biomasa en los fotobiorreactores FBR1, FBR2 y FBR3, donde se alcanzó valores de peso seco de 27.75 g, 22.36 g, 26.84 g respectivamente, en los fotobiorreactores FBN1, FBN2 y FBN3 la producción de biomasa fue menor, mostrando valores de peso seco de 7.83 g, 7.10 g y 6.59 g respectivamente (figura 26).

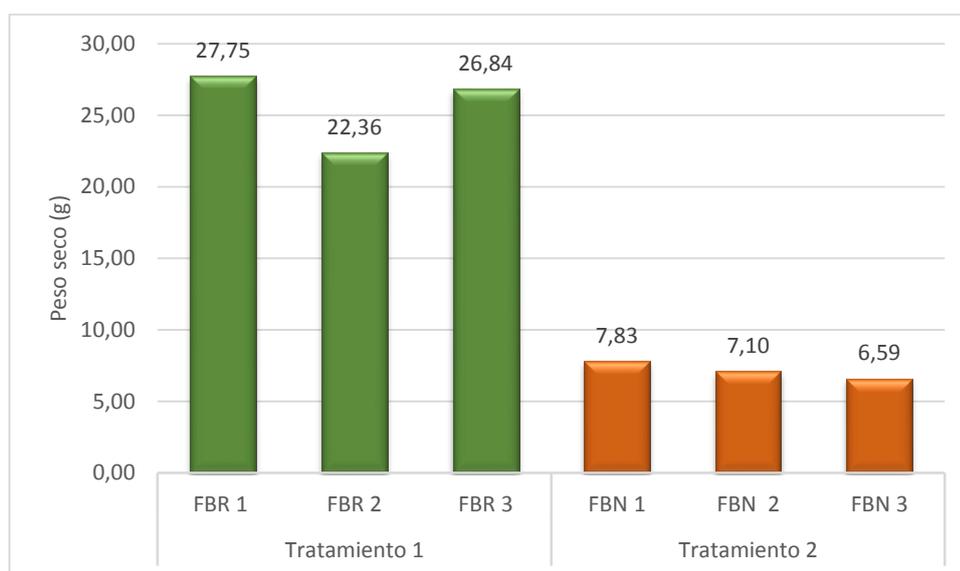


Figura 26 Peso seco de la biomasa en la fase 4

La prueba t de Student aplicada para el peso seco de biomasa mostró una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.0004$) entre el uso del agua residual frente al uso de agua potable enriquecida; con el uso de agua residual se alcanzó una media más alta (tabla 32).

Tabla 32**Prueba t de Student para la variable de peso seco de biomasa**

Grupo	Tratamiento	n	Media	pHomVar	p-valor
1	T1	3	25.65	0.0885	0.0004
2	T2	3	7.17		

La productividad de la biomasa (P_{biomasa}) fue más alta cuando se utilizó agua residual como medio de cultivo (T1), presentando una productividad promedio de $0.06 \text{ g.L}^{-1}\text{d}^{-1}$; cuando se empleó agua potable adicionada con 3.0 mL.L^{-1} de NPK la productividad de biomasa fue inferior, con un valor promedio de $0.01 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$. La productividad de biomasa en los seis fotobiorreactores se muestra en la tabla 33.

Tabla 33**Productividad de la Biomasa**

Tratamiento	Fotobiorreactor	$P_{\text{biomasa}} (\text{g.L}^{-1}\text{d}^{-1})$
T1	FBR1	0.064
	FBR2	0.051
	FBR3	0.061
T2	FBN1	0.016
	FBN2	0.014
	FBN3	0.013

3.4.2 Contenido lipídico de la biomasa procedente del cultivo del consorcio microalgal en fotobiorreactores

Los fotobiorreactores FBR1, FBR2 y FBR3 procedentes de T1 presentaron porcentajes lipídicos de 4.45%, 2.03% y 4.90 %, respectivamente, mientras que los fotobiorreactores FBN1, FBN2 y FBN3 procedentes de T2 presentaron porcentajes lipídicos de 3.09; 2.42 y 2.32%, respectivamente (figura 27) (anexo B)

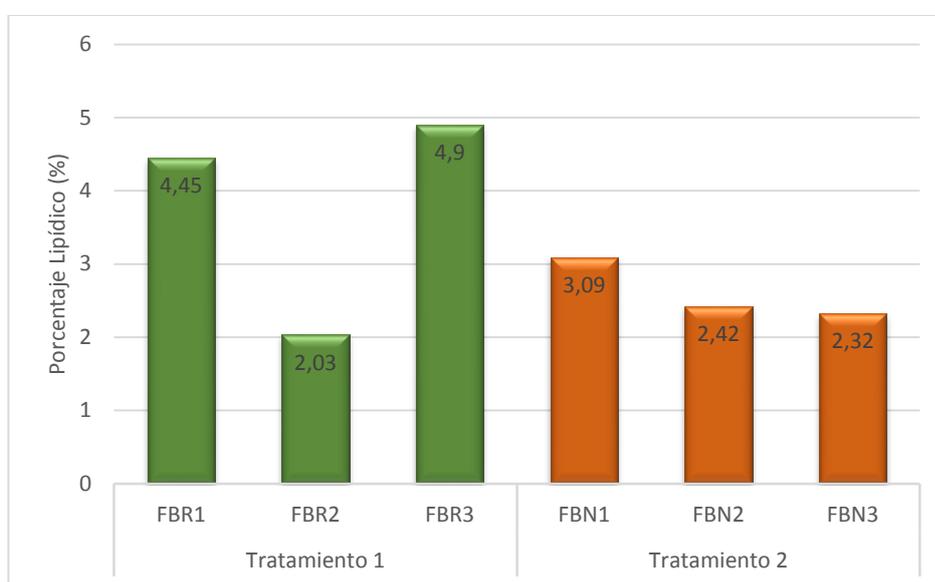


Figura 27 Porcentaje lipídico de la biomasa

La prueba t de Student realizada para la variable de porcentaje lipídico mostró que no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tratamientos evaluados, obteniendo un valor de significancia de $p = 0.2693$, además se observó medias similares entre T1 y T2, los datos fueron evaluados mediante un análisis bilateral (tabla 34).

Tabla 34**Prueba t de Student para el porcentaje lipídico**

Grupo	Tratamiento	n	Media	pHomVar	p-valor
1	T1	3	3.79	0.1371	0.2693
2	T2	3	2.61		

3.4.3 Remoción de contaminantes

La capacidad de remoción de contaminantes presentes en el agua residual del reservorio fue establecida mediante el análisis de los valores en los parámetros de DBO₅, DQO, sulfatos, nitrógeno y fósforo total, antes y después del tratamiento biológico con el consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. (anexo C)

Demanda Bilógica de Oxígeno

El agua residual de reservorio inicialmente presentó un valor de DBO₅ de 82 mg de O₂.L⁻¹. En la figura 28 se muestra los valores obtenidos para este parámetro después de los 28 días de cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. en fotobiorreactores expuestos al ambiente y suministrados diariamente con CO₂.

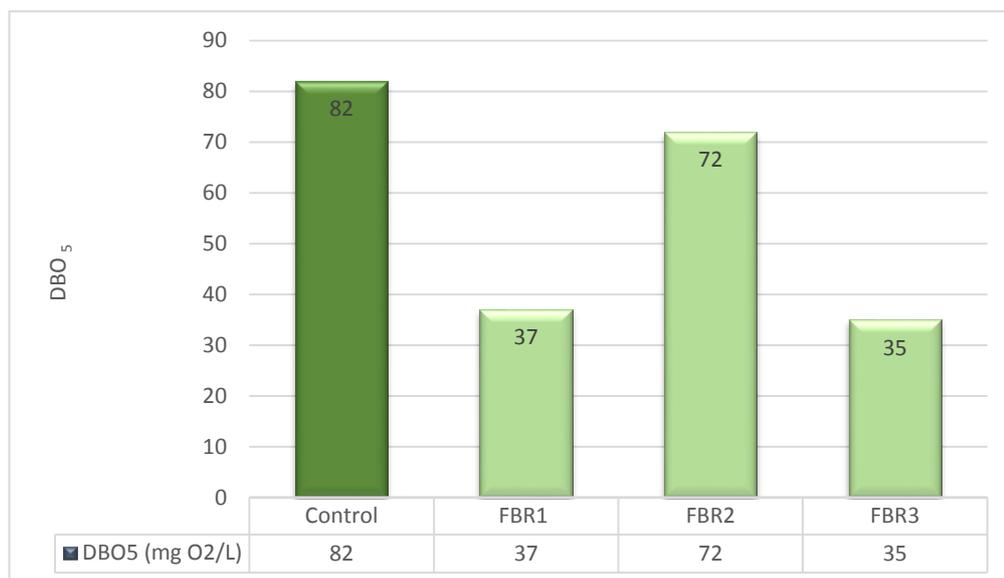


Figura 28 Valores de la DBO_5 antes y después de cultivo del consorcio microalgal

En el fotobiorreactor FBR1 se obtuvo un valor de $37 \text{ mg de O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, mostrando una reducción del 54.8% de la DBO_5 , en el fotobiorreactor FBR2 el valor de la DBO_5 fue de $72 \text{ mg de O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, presentando una reducción de apenas el 12.20 %. Para el fotobiorreactor FBR3 se obtuvo un valor de $35 \text{ mg de O}_2\cdot\text{L}^{-1}$, exponiendo una mayor reducción de la DBO_5 con el 57.32%. En promedio entre los tres fotobiorreactores se obtuvo una reducción del 41.46% de la DBO_5 .

Demanda Química de Oxígeno

La DQO inicial en el agua residual de reservorio fue de $186 \text{ mg de O}_2\cdot\text{L}^{-1}$. En la figura 29 se muestra los valores obtenidos para la DQO después de los 28 días de cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp.

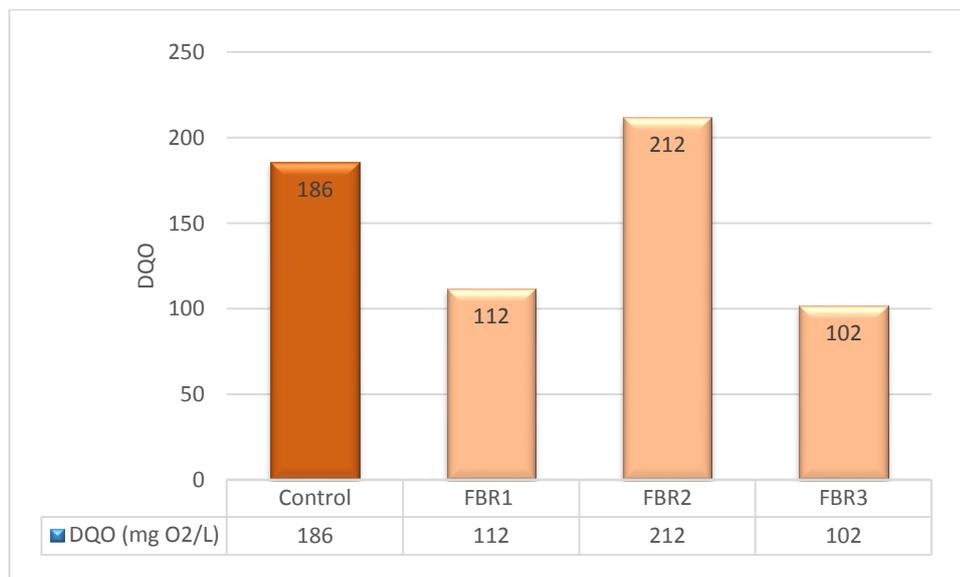


Figura 29 Valores de la DQO antes y después del cultivo del consorcio

En el fotobiorreactor FBR1 se obtuvo después del cultivo un valor de 112 mg de O₂.L⁻¹, mostrando una reducción del 39.78%, en el fotobiorreactor FBR2 el valor de la DQO fue de 212 mg de O₂.L⁻¹, presentando un aumento de un 13.99%, en el fotobiorreactor FBR3 se obtuvo un valor de 102 mg de O₂.L⁻¹, exponiendo una mayor reducción de la DQO con el 45.16%. En promedio se obtuvo una reducción del 28.31%.

Sulfatos

El agua residual de reservorio presentó inicialmente un valor de 952 mg.L⁻¹ de sulfatos. En la figura 30 se muestra los valores pertenecientes a la cantidad de sulfatos después de los 28 días de cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp.

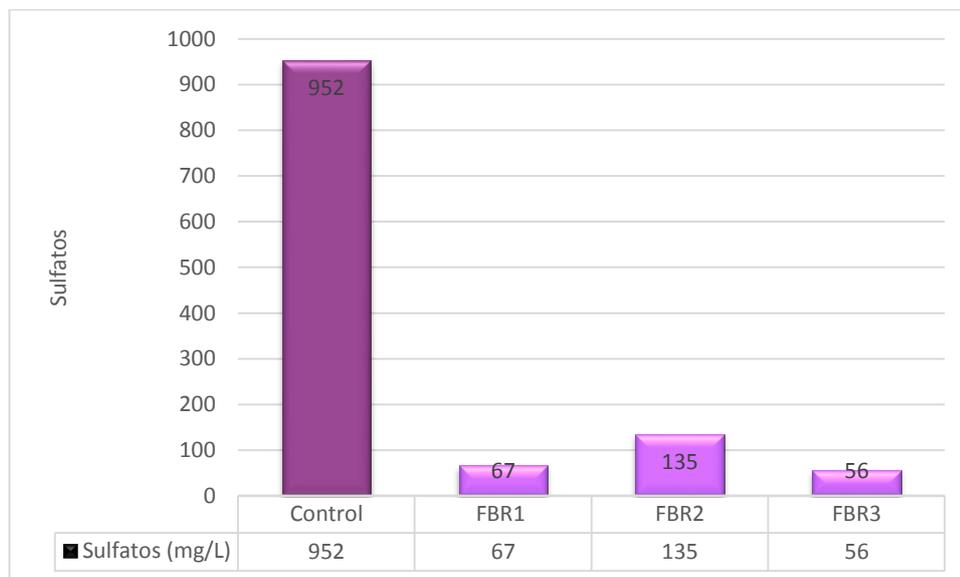


Figura 30 Cantidad de sulfatos presentes en los diferentes fotobiorreactores antes y después del cultivo del consorcio

El fotobiorreactor FBR1 presentó un valor de 67 mg.L^{-1} de sulfatos, mostrando una reducción del 92.96 %, en el fotobiorreactor FBR2 se obtuvo un valor de 135 mg.L^{-1} , presentando una reducción del 85.82% y en el fotobiorreactor FBR3 se obtuvo un valor de 56 mg.L^{-1} , exponiendo una mayor reducción de los sulfatos con el 94.12%. En promedio se obtuvo una reducción del 90.96% de los sulfatos.

Nitrógeno Total

El agua residual de reservorio inicialmente presentó 416 mg.L^{-1} de nitrógeno total. En la figura 31 se muestra los valores de nitrógeno alcanzados después de los 28 días de cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus sp.* & *Chlorococcum sp.*

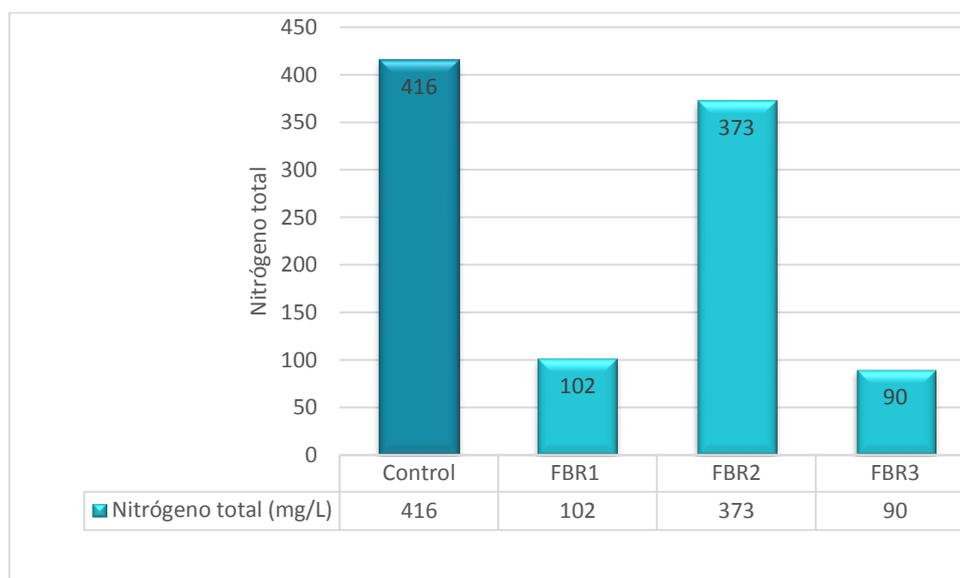


Figura 31 Cantidad de nitrógeno presente en los diferentes fotobiorreactores antes y después del cultivo del consorcio

El fotobiorreactor FBR1 se obtuvo un valor de 102 mg.L^{-1} de nitrógeno, mostrando una reducción del 75.48%, el fotobiorreactor FBR2 presentó un valor de 373 mg.L^{-1} , presentando una reducción del 10.34% del nitrógeno inicial, en el fotobiorreactor FBR3 se obtuvo un valor de 90 mg.L^{-1} , exponiendo un porcentaje de reducción del 78.36%. En promedio se obtuvo una reducción del 54.72% de nitrógeno.

Fósforo Total

El agua residual de reservorio inicialmente presentó una cantidad de 158.4 mg.L^{-1} de fósforo total. En la figura 32 se muestra los valores de fósforo alcanzados después de los 28 días de cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp.

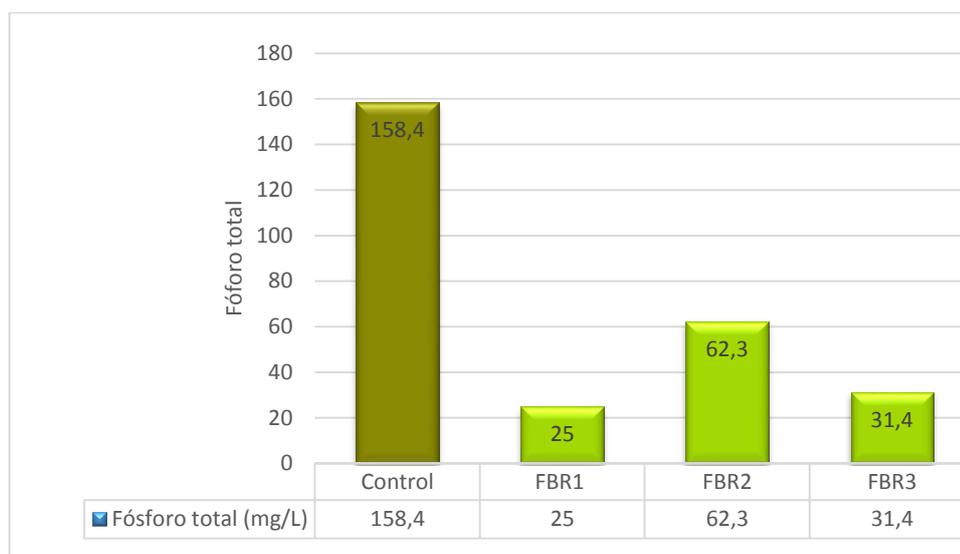


Figura 32 Cantidad de fósforo en los fotobiorreactores antes y después del cultivo del consorcio

El fotobiorreactor FBR1 mostró un valor de $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de fósforo, mostrando una reducción del 84.22%, el fotobiorreactor FBR2 presentó un valor de $62.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, presentando una reducción del 60.67% del fósforo inicial, en el fotobiorreactor FBR3 se obtuvo un valor de $31.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, exponiendo una reducción de fósforo del 80.18%. En promedio se obtuvo una reducción del 75.02%. Los porcentajes de reducción alcanzados mediante el cultivo del consorcio se resumen en la tabla 35.

Tabla 35

Porcentajes de reducción de contaminantes

Parámetro	Antes del cultivo	Después de cultivo			Porcentaje de reducción		
		FBR1	FBR2	FBR3	FBR1	FBR2	FBR3
DBO ₅ ($\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$)	82	37	72	35	54.87	12.20	57.32
DQO ($\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$)	186	112	212	102	39.78	+13.33	45.16
Sulfatos (mgL^{-1})	952	67	135	56	92.96	85.81	94.12
Nitrógeno (mgL^{-1})	416	102	373	90	75.48	10.35	78.36
Fósforo (mgL^{-1})	158.4	25	62.3	31.4	84.22	60.67	80.18

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Fase 1: Aislamiento e identificación de consorcio microalgal nativo

Las microalgas exhiben una gran adaptabilidad ecológica, pudiendo observar una amplia variedad de especies capaces de ajustarse a una gama de condiciones ambientales. La composición bioquímica y la alta eficiencia para fijar el CO₂ de este microorganismo han impulsado el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas dentro del campo industrial, nutricional, energético y ambiental (González, Aguado, & Álvarez, 2000). En la presente investigación, se exploró un hábitat local para el aislamiento de un consorcio microalgal nativo con el fin de evaluar su potencial como sistema depurador de aguas residuales. A partir de muestras de agua procedente de la represa de la Empresa Eléctrica Quito, se estableció el consorcio de trabajo conformado por las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp., ambas especies pertenecientes al filo Chlorophyta.

La conformación del consorcio se consiguió utilizando el medio de cultivo BG₁₁. A pesar de que, Case, Sommerfeld, & Hu (2004), indican que el medio de cultivo BG₁₁ favorece el crecimiento principalmente de *Chlorella* sp., durante el proceso de aislamiento no se evidenció el desarrollo de esta microalga dentro del consorcio establecido.

La identificación de *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp. fue realizada a nivel de género siguiendo las claves taxonómicas de Bourrelly (1981) y Eaton (1995). Para la identificación de *Scenedesmus* se tomó en cuenta su plasticidad fenotípica, ya que dependiendo de las condiciones físicas de crecimiento esta especie puede presentarse de forma unicelular como también puede formar cenobios de 4, 8 o 16 células.

Según Acevedo & Ramírez (2003), condiciones fluctuantes de luz y temperatura generan cambios morfológicos en la longitud y diámetro de *Scenedesmus* sp., y en muchos de los casos estos cambios pueden interferir en las implicaciones taxonómicas utilizadas para describir al género microalgal.

En la identificación morfológica bajo el microscopio óptico, se observaron células ovoides alargadas fusiformes de color verde, con una conformación individual (forma unicelular) y visualizándose también cenobios de cuatro células con ápices en forma de setas, estas características permitieron identificar a la microalga *Scenedesmus* sp., similares características reportan Acuario & Arciniegas (2015) para *Scenedesmus* aislada a partir del agua del Río San Pedro, ubicado en el cantón de Sangolquí.

Conjuntamente, se observaron células de forma esférica con diferentes tamaños, coloración verdosa y un aparente halo al su alrededor, características que definen al género *Chlorococcum*. De Quieroz, y otros (2012), en su estudio sobre la colección de microalgas procedentes de ambientes dulceacuícolas naturales, describen las mismas características para *Chlorococcum*, identificadas en este estudio; asimismo, Silva & Starr (1953) describieron al género *Chlorococcum* como agregados de células normalmente cubiertas con una muy delgada membrana casi indistinguible.

Tanto *Scenedesmus* como *Chlorococcum* presentan capacidad de crecimiento en aguas residual, produciendo biomasa con alto contenido lipídico, según lo reportado por Aravantinou, Theodorakopoulos, & Manariotis, (2013) en el estudio con agua residual sintética para el crecimiento de 10 especies de microalgas.

4.2 Fase 2: Evaluación de la adaptabilidad del consorcio microalgal al agua residual del reservorio

Se evaluó la adaptabilidad del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. al agua residual proveniente del reservorio de regulación de la EEQ, con el fin de establecer la condición óptima para su uso como medio de cultivo. El consorcio microalgal fue cultivado bajo dos escenarios: con agua residual de esterilizada y con agua residual no esterilizada.

Mediante la cinética de crecimiento se pudo observar un claro desarrollo diferencial entre las dos microalgas. *Scenedesmus* sp. mostró predominancia respecto a *Chlorococcum* sp., tanto al usar agua residual esterilizada como al utilizar agua residual no esterilizada como medio de cultivo. Según Oliviera (2013), el proceso de esterilización del agua residual provoca la reducción de la carga bacteriana y también una disminución de los nutrientes originales, causando un efecto negativo al crecimiento de ciertas especies de microalgas.

La densidad celular para *Chlorococcum* sp., durante los 12 días de cultivo se mantuvo baja en ambos escenarios, alcanzando una densidad máxima de 0.77×10^6 cél.mL⁻¹ con el agua residual esterilizada y una densidad máxima de 0.95×10^6 cél.mL⁻¹ con el agua residual no esterilizada. La tendencia de crecimiento para *Chlorococcum* sp. en este estudio no coinciden con lo reportado por Silva de Jesús (2014), quien expone en términos de porcentaje de sobrevivencia (número de células/número de células totales), una alta capacidad de adaptación para *Chlorococcum* sp. (40.3 % de sobrevivencia) al cultivo sobre agua residual sin esterilización en comparación con otras especies de microalgas. Harwati (2013), menciona que *Chlorococcum* sp. tiende a presentar bajo crecimiento celular y largo tiempo de cultivo cuando es sometida a un ambiente fotoautótrofo sin embargo, en condiciones heterotróficas o mixotróficas su crecimiento es más rápido con alta producción celular.

Por otra parte, *Scenedesmus* sp. exhibió una mejor adaptación al agua residual no esterilizada, donde se produjo una mayor producción celular de 13.33×10^6 cél.mL⁻¹, frente al uso de agua residual esterilizada, donde se obtuvo 10.33×10^6 cél.mL⁻¹, esto se debe a que *Scenedesmus* sp. presenta una gran adaptabilidad y su crecimiento no se ve afectado por microorganismos depredadores propios del agua residual, por lo que puede ser utilizada en el tratamiento de aguas residuales crudas (Chacón, Andrede, Cádenas, Ismenia, & Morales, 2004).

A pesar de, existir un crecimiento diferencial entre *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp., se evaluó la adaptación global del consorcio tanto para el agua residual esterilizada como para el agua no esterilizada. La cinética de crecimiento indica que el consorcio presentó una mejor adaptación al agua residual no esterilizada, tomando en cuenta la densidad celular alcanzada durante toda la fase exponencial se obtuvo una mayor producción de células (14.10×10^6 cél.mL⁻¹) la misma que fue superior a la obtenida con el agua residual sometida al proceso de esterilización (10.80 cél.mL⁻¹). Sin embargo, los parámetros cinéticos evaluados no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas, tanto en la velocidad de crecimiento ($p = 0.3985$), como en el tiempo de duplicación ($p = 0.6029$), esto se puede deber a que se constató anteriormente un crecimiento lento por parte de *Chlorococcum* sp.

El consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. cultivado sobre agua residual no esterilizada presentó desde el inicio un crecimiento exponencial, indicando la rápida adaptación a las condiciones del medio de cultivo a pesar de obtener una velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación similar en los dos tratamientos, se considera ventajoso el uso del agua residual no esterilizada por proporcionar altas concentración celulares con bajo costo energético. Ferero (2011), resalta la importancia de conseguir una alta producción celular en los cultivos, porque la densidad poblacional controla directa o indirectamente la eficacia con relación a la asimilación de nutrientes. La ventaja de utilizar como medio de cultivo agua residual sin

esterilizar se ve reflejada no sólo en el ahorro de costos energéticos, sino que principalmente nos ratifica el uso de las microalgas para el tratamiento de efluentes, ya que estas no presentan una vulnerabilidad o posibles limitaciones relacionadas con la presencia de bacterias (Chacón, Andrede, Cádenas, Ismenia, & Morales, 2004).

4.3 Fase 3: Selección de la concentración óptima de Nitrofoska para suplementar al medio de cultivo

El agua residual sin esterilizar presenta buenas características para su uso como medio de cultivo sin embargo, presenta una limitación con relación a la producción de biomasa a gran escala, ya que los nutrientes sólo se mantienen disponibles por poco tiempo (12 días), limitando el crecimiento celular y consecuentemente la productibilidad de la biomasa, por eso fue necesario adicionar una concentración de fertilizante foliar Nitrofoska ® que suplemente al agua residual para inducir un mayor crecimiento celular. Con este objetivo se evaluó el crecimiento microalgal frente a la adición de tres diferentes concentraciones de Nitrofoska ® foliar (fertilizante complejo 10-4-7-0.2 MgO). Se evaluaron las concentraciones de: 0.5 mL.L⁻¹, 1.5 mL.L⁻¹ y 3.0 mL.L⁻¹, conjuntamente se utilizó un testigo control, donde solo se utilizó el agua residual sin esterilizar.

Después de 20 días de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}$ C) e iluminación de $45.5 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ con fotoperiodo de 16:8, se establecieron las curvas de crecimiento para los tres tratamientos y el control (figura 24), donde se encontró que con T2 (1.5 mL.L⁻¹ de NPK) se obtuvo una densidad celular de 37.4×10^6 cél.mL⁻¹, alcanzando una mayor producción frente a las otras concentraciones evaluadas. En los tratamientos T1 (0.5 mL.L⁻¹ de NPK), T3 (3.0 mL.L⁻¹ de NPK) y el control la densidad fue inferior e incluso se observó muerte celular antes de finalizar el cultivo.

De igual forma con la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento ($\mu = 0.52$) y un tiempo de duplicación menor ($td=1.33$), con relación a los parámetros cinéticos obtenidos con los otros tratamientos. Por lo que se determinó que la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK al agua residual ayuda en gran medida a la producción de biomasa. Estos resultados difieren a los mencionados por Maldonado (2014), quien reporta para la microalga *Chorella emersonii* una densidad celular de 57.02×10^6 cél.mL⁻¹ con el uso de una concentración de 3.0 mL.L⁻¹ de NPK, sugiriendo que entre mayor es la concentración adicionada mayor es el crecimiento celular; para el consocio microalgal estudiado se observa limitación del crecimiento a una alta concentración de NPK.

Díaz y otros (2012), reportan en su estudio con *Chlorococcum* sp. aislada de una fosa petrolera, la obtención de una densidad celular de $8.19 \pm 6.24 \times 10^6$ cél.mL⁻¹ usando una concentración de Nitrofoska® foliar de 1.0 mL.L⁻¹ y una densidad celular de $5.61 \pm 2.92 \times 10^6$ cél mL⁻¹ con la adición de una concentración de 3.0 mL.L⁻¹ de este fertilizante comercial. Estos resultados exponen que una mayor concentración del suplemento nutricional no garantiza una mayor producción de biomasa. De la misma forma, González & Terán (2013), reportan que una mayor producción celular de *Scenedesmus* spp. se produjo cuando se empleó una concentración de Nitrofoska Verde® al 0.01%, y que concentraciones más altas (0.05% y 0.1%) provocaron densidades celulares inferiores con fases exponenciales tardías, percibiendo que la utilización de concentraciones altas dificultan el acondicionamiento de las microalgas al medio de cultivo.

La producción de biomasa con la adición de 1.5 mL.L⁻¹ de NPK al agua residual también fue superior, alcanzando un valor de 645.16 mg (peso seco) en un litro de cultivo; con T1, T3 y el control se obtuvo una menor producción de biomasa, con valores de peso seco de 341.80 mg, 490.12 mg y 279.42 mg respectivamente. Andrade y otros (2009) reportan en su investigación, la obtención de una cantidad de biomasa seca procedente del cultivo de *Scenedesmus* sp. sobre agua residual de pescadería, de 390.00

mg.L⁻¹ durante un periodo de cultivo 15 días. En este estudio se alcanzó una producción considerablemente mayor con el uso de agua residual adicionada con 1.5 mL.L⁻¹ de NPK. En las microalgas, la disposición genética direcciona la capacidad intracelular de absorción y asimilación de nutrientes de forma individual para cada especie microalgal, describiendo grados de tolerancia a las concentraciones aplicadas de fertilizante comercial en dependencia a la especie microalgal (Brito, Milani, Pereira, Gonzáles, & Morán, 2006).

La adición de una correcta concentración de Nitrofoska® foliar proporciona al medio de cultivo una fuente extra de nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio, cobre, molibdeno, hierro y boro, garantizando su consumo total en el agua residual. Según las especificaciones presentadas por BASF (2010), el fertilizante comercial Nitrofoska ® foliar posee macro y micro nutrientes de alta eficiencia de asimilación y acción, que se encuentran de forma quelatizada que favorece su transporte. De acuerdo con Nieves y otros (1994), los fertilizantes agrícolas proporcionan al medio de cultivo los nutrientes necesarios para el crecimiento de microalgas a un bajo costo, pudiendo observar tasas de crecimiento celular superiores con este tipo de fertilizantes y tasas de crecimiento inferiores con el uso de medios de cultivos tradicionales de laboratorio. Una de las principales características que brinda efectividad de uso al fertilizante Nitrofoska ® foliar es su conveniente proporción de nitrógeno y fósforo(N:P) de 6-10:1, la cual suministra proporción idónea de nutrientes para el metabolismo celular de las microalgas (Portilla, 2010).

4.4 Fase 4: Evaluación de la productividad de la biomasa, contenido lipídico y capacidad de remoción de contaminantes alcanzados por el consorcio microalgal

Con el fin de alcanzar una mayor productividad de biomasa procedente de los cultivos microalgales, el Laboratorio de Biotecnología Energética-BIOTEC impulsa el sistema de cultivo en fotobiorreactores. En la presente investigación se establecieron los tratamientos T1 y T2 para evaluar la productividad de la biomasa y el contenido lipídico alcanzados con el consorcio microalgal nativo *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp., después de 28 días de cultivo.

Productividad de biomasa

En los fotobiorreactores FBR1, FBR2 y FBR3; donde se empleó agua residual del reservorio de la EEQ sin esterilizar suplementada con 1.5 mL L⁻¹ de Nitrofoska ® foliar (T1), se obtuvo una mayor cantidad de biomasa microalgal seca (27.75 g, 22.36 g y 26.88 g respectivamente); en los fotobiorreactores FBN1, FBN2 y FBN3 procedentes del tratamiento T2 (agua potable enriquecida con 3.0 mL L⁻¹ de Nitrofoska ® foliar) la cantidad de biomasa seca fue significativamente menor a la cuantificada para T1. Acorde a estos resultados, la productividad de la biomasa microalgal fue significativamente mayor en los tres fotobiorreactores FBR1, FBR2, FBR3, evidenciando una baja productividad en los fotobiorreactores FBN1, FBN2 y FBN3 (tabla 3.18).

En promedio, se obtuvo una productividad de biomasa microalgal de 0.06 g L⁻¹ d⁻¹, con el cultivo del consorcio nativo *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. sobre agua residual suplementada con NPK. Al utilizar un medio enriquecido (agua potable + NPK) el promedio de la productividad de la biomasa microalgal fue de 0.01 g L⁻¹ d⁻¹.

Estos resultados son similares a los obtenidos por Sacristán y otros (2014), donde se reporta una mayor productividad de biomasa ($0.0615 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$) para el cultivo de *Scenedesmus acutus* sobre agua residual cruda y una productividad de biomasa inferior al cultivar *S. acutus* sobre agua destilada enriquecida con 1.5 g L^{-1} de fertilizante Nitrofoska® (NPK 20-20-20).

Beltrán (2014), reporta una productividad de biomasa que va de 0.013 a $0.027 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ con el cultivo de un consorcio microalgal nativo sobre efluente eutrófico procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales, bajo condiciones de intemperie y con temperaturas adversas. Al contraste, en la investigación realizada por Montero y otros (2012), se determinaron valores de productividad de biomasa de $0.020 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ y $0.015 \text{ g L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ para *Scenedesmus acuminatus* y *Chlorella vulgaris* respectivamente, en condiciones óptimas de cultivo, utilizando como medio de crecimiento Bristol. Los resultados anteriormente mencionados apuntan la ventaja en el uso de agua residual para la obtención de una alta productividad de biomasa, pero se establece como punto crítico las mejoras en relación a los factores operacionales con el fin de establecer cultivos rentables a gran escala para la valorización de la biomasa microalgal como un subproducto potencialmente valioso (García, 2014).

Sacristán y otros (2014), explican que la alta productividad de la biomasa microalgal obtenida utilizando agua residual como medio de cultivo se debe principalmente a la presencia de diferentes fuentes de carbono propias de la calidad de agua empleada, por lo que las microalgas pueden crecer bajo un régimen mixotrófico, presentando tasas superiores de crecimiento, lo que ocasiona una mayor producción de biomasa. Situación diferente ocurre cuando se utiliza medios de cultivo con nutrientes inorgánicos impulsando únicamente un crecimiento autótrofo, donde se emplea sólo el CO_2 como fuente de carbono (Canedo, Ruiz, & Zavala, 2013).

La producción masiva de biomasa microalgal se ha enfrentado a muchos desafíos técnicos y económicos sin embargo, las constantes investigaciones en el área demuestran la factibilidad del sistema de cultivo de microalgas utilizando efluentes para la producción masificada de biomasa y una simultánea depuración de aguas contaminadas (Montero, y otros, 2012), (Salazar, 2005). La biomasa microalgal procedente del tratamiento de aguas residuales puede ser utilizada en el área agrícola y energética, ya que generalmente, estar constituida por proteína (30 al 60%), carbohidratos (20-30 %), lípidos (10-30%) y cenizas (5 al 10%), permitiendo su empleo como suplemento alimenticio para animales, o como biofertilizantes e incluso su aprovechamiento como materia prima para la obtención de biocombustibles es prometedor (García, Jawiarczyk, González, Fernández, & Acién, 2012).

Contenido Lipídico

El contenido lipídico expresado en porcentaje de grasa presente en la biomasa seca, muestra que la proporción lipídica no difiere significativamente entre los tratamientos T1 y T2 (tabla 3.19). El promedio del porcentaje lipídico de la biomasa procedente de los fotobiorreactores FBR1, FBR2 y FBR3 fue de 3.79 % y para la biomasa obtenida de los fotobiorreactores FBN1, FBN2 y FBN3 el porcentaje promedio fue de 2.61%.

En la investigación realiza por González & Polo (2013), se obtuvieron porcentajes lipídicos de 26.73%, 23.39% y 23.18% con efluentes de bodegas de embarcaciones diluidos al 1%, 2% y al 5% respectivamente, para el cultivo de *Tretraselmis suecica*, donde aplicaron un pre tratamiento ácido (ácido sulfúrico concentrado al 98%) a la biomasa seca antes de la extracción de los lípidos. De igual forma, Sacristán y otros (2014), reportan porcentajes de lípidos de 28.34% y 22.38% para la biomasa derivada del cultivo de *Scenedesmus acutus* y *Chlorella vulgaris* respectivamente, donde utilizaron agua residual cruda; y un 21.83 % y 16.55% para *S. acutus* y *C. vulgaris* respectivamente, cuando fueron cultivadas sobre un medio enriquecido con fertilizante comercial; utilizando sonicación a 25 W por 1 min como pre tratamiento para la extracción de los lípidos.

Montero y otros (2012), alcanzaron porcentajes lipídicos de 15.3% y 27.8% para *Scenedesmus acuminatus* y *Chlorella vulgaris* respectivamente, cultivadas en medio Bristol bajo condiciones controladas; utilizando para la determinación de los lípidos un pre tratamiento térmico (85 °C por 1 h). Los porcentajes de lípidos obtenidos en este estudio fueron inferiores a los reportados en las anteriores investigaciones mencionadas, donde se utilizaron diferentes pre-tratamientos antes de la extracción de lípidos.

Según la revisión bibliográfica, la biomasa procedente de *Scenedesmus* sp. presenta un contenido lipídico del 7 al 53% y la biomasa procedente de *Chlorococcum* sp. presenta un contenido lipídico del 19 al 44%, estos porcentajes reflejan el bajo contenido lipídico que se obtuvo con el consorcio microalgal de trabajo, resultado poco eficiente el pretratamiento por disrupción mecánica utilizado en este estudio, cabe recalcar que el contenido oleaginoso en las microalgas es considerado propio de la especie y no del género (Hernández, Vázquez, Sánchez, Serreno, & Martínez, 2009).

Las microalgas poseen una gran capacidad de adaptación frente a las condiciones ambientales, pudiendo expresar una excepcional variedad de patrones lipídicos; en condiciones normales de cultivo el contenido lipídico de estos microorganismos fotosintéticos varía entre el 20 al 50% del peso seco de la biomasa, pudiendo alterar este porcentaje al someter al cultivo a condiciones de estrés (Arias, Martínez, & Cañizares, 2013). Ugalde (2011) sugiere que, entre las estrategias más eficientes para aumentar la proporción lipídica de la biomasa microalgal están: el estrés fisiológico con la limitación de nitrógeno y fósforo y variación en la intensidad lumínica.

A pesar de, no conseguir altos porcentajes lipídicos a partir del cultivo del consorcio microalgal sobre el agua residual del reservorio de la EEQ, su uso como medio de cultivo resulta ser eficiente para la producción de biomasa de forma económica.

Remoción de contaminantes

La capacidad de remoción de contaminantes presentes en el agua residual del reservorio de la EEQ a través del cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. fue analizada a partir de los cultivo en los fotobiorreactores FBR1, FBR2 y FBR3, donde se utilizó como medio de cultivo el agua residual.

La reducción en el parámetro DBO_5 fue evidente en los tres fotobiorreactores con una disminución del 54.8% para FBR1, del 12.20% para FBR2 y del 57.32% para FBR3. En promedio se evidenció una eliminación del 41.44 % de la DBO_5 , tomando en cuenta que en el fotobiorreactor FBR2 se contempló un porcentaje de reducción inferior comparado a los otros dos. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Romero & Ferrán (2001), donde alcanzaron una reducción del 45 al 60% de la DBO_5 con el cultivo de *Chlorella* sp. sobre agua residual de una empresa industrial de alimentos.

Así también, Acuario & Arciniegas (2015), reportan en su estudio con el consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorella* sp., aislado a partir del agua del Rio San Pedro, en el cantón Sangolquí, porcentajes de remoción para la DBO_5 del 9% cuando el consorcio microalgal fue cultivado usando agua cruda del río y una reducción del 38% cuando el consorcio fue cultivado usando agua del río adicionada con nitratos y una eliminación del 42% cuando se adicionó nitritos, mostrando que la adición de otras fuentes de nitrógeno aumentan la capacidad de eliminación de contaminantes. A partir de estos estudios se puede decir que el consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. alcanza prometedores porcentajes de reducción de DBO_5 para su consideración dentro del tratamiento de aguas residuales.

Los resultados referentes a la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DQO) muestran diferencias entre los fotobiorreactor evaluados. Se obtuvo una reducción del 39.78% en FBR1 y del 45.16% en FBR3; sin embargo en FBR2 no existió reducción, sino por lo contrario se dio lugar un

aumento de este parámetro, y relacionando los otros parámetros evaluados también se evidenció bajos porcentajes de reducción tanto para la DBO₅, como para los sulfatos, el nitrógeno y el fósforo total, esto puede deberse a la baja concentración celular observada en este fotobiorreactor.

En la investigación realizada por Lucero (2015), se determinó la reducción para la DQO de efluentes urbanos pre tratados, a través del cultivo del consorcio *Chlorella & Scenedesmus*, obteniendo una remoción del 51.8% de la DQO al usar el efluente adicionado con 100mL de medio Bold Basal Modificado (BBM) y una reducción del 40.74% de DQO al usar el efluente sin la adición de BBM. Por otro lado, Zhang y otros (2014) reportan una disminución del 88% de la DQO del agua residual derivada del tratamiento por lodos activados, después del cultivo con *Chlorella kessleri*. En el estudio realizado por Reascos (2015), se obtuvo una disminución del 97% de la DQO de efluentes de exportación porcina artesanal después del cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. *Desmodesmus* sp. *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp.; estos resultados muestran que existe un rango muy amplio dentro de la eficiencia en la reducción de la DQO a partir del cultivo de microalgas.

La reducción de la DQO y de la DBO₅ es versátil porque estos parámetros están en dependencia de factores tanto ambientales como condiciones de cultivo (Hernández & Labbé, 2014). A través del cultivo de *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp. sobre agua residual procedente del reservorio de la EEQ, se consiguió un alto porcentaje de remoción de los sulfatos, ya que se obtuvo una reducción del 90.96%. La eficacia de remoción se debe a que las microalgas incorporan el azufre principalmente en su estado de sulfatos que posteriormente es reducido y utilizado para la síntesis de diversos productos como proteínas, aminoácidos entre otros (García, Jawiarczyk, González, Fernández, & Acién, 2012).

Con respecto a la reducción del nitrógeno y fósforo total, se obtuvo una remoción promedio del 54.72% y 75.02% respectivamente. Estos resultados fueron superiores a los reportados por Escorihuela y otros (2007), que evidenciaron una remoción de apenas el 31.5% para el nitrógeno total y un 7.64% para el fósforo total, en una laguna de pulimento de efluentes tratada con una población microalgal donde predominaron especies de las divisiones Cyanophyta y Chlorophyta, bajo condiciones de intemperie.

Sin embargo, Xu y otros (2014), muestran porcentajes para la remoción de nitrógeno y fósforo total del 88.16% y del 73.98 % respectivamente, durante el cultivo de *Scenedesmus dimorphus* en agua residual de estiércol, bajo condiciones controladas. Al igual forma, Andrade y otros (2009), reportan valores de remoción del nitrógeno amoniacal y nitrógeno total del 100% y del 94.44% respectivamente, a partir del cultivo de *Scenedesmus* sp. en agua residual de pescadería, bajo condiciones óptimas de cultivo. Estos resultados fueron superiores a los obtenidos con el consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. estudiado, lo que sugiere que la capacidad de remoción de contaminantes mediante el cultivo de microalgas depende principalmente de la especie microalgal, la calidad de agua y las condiciones de cultivo para alcanzar resultados eficaces.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- A través de la aplicación combinada de técnicas de aislamiento y con el uso del medio de cultivo BG₁₁ se consiguió aislar el consorcio microalgal conformado por las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp., ambas pertenecientes al filo Chlorophyta a partir del agua de la represa de la Empresa Eléctrica Quito (EEQ) utilizando para su identificación claves taxonómicas.
- Se determinó que al suplementar con 1.5 mL.L⁻¹ de fertilizante Nitrofoska® foliar al agua residual procedente del reservorio de regulación de la EEQ, se aumenta la eficiencia en la producción celular, ya que se obtuvo una mayor densidad celular (37.40×10^6 cél.mL⁻¹) y una mayor producción de biomasa (645.16 mg) con una alta velocidad de crecimiento ($\mu = 0.52$) y tiempo de duplicación menor ($td=1.33$).
- El cultivo del consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. sobre agua residual del reservorio de la EEQ suplementada con 1.5 mL.L⁻¹ de Nitrofoska ® foliar alcanzó una productividad de biomasa de 0.06 g L⁻¹ d⁻¹ y un contenido lipídico de 3.79%.
- Mediante el cultivo del consorcio *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. se alcanzó la remoción del 41.46% de la DBO₅, 28.31% de la DQO, 90.96% de los sulfatos, 54.72% del nitrógeno total y el 75.02% del fósforo total, presentes en el agua residual del reservorio de regulación de la EEQ, después de 28 días.

- Se determinó que el agua residual del reservorio de la EEQ puede ser empleado como medio de cultivo para la obtención de una alta productividad de biomasa microalgal a una bajo costo, la cual puede ser aprovechada como biofertilizante o como suplemento alimenticio en la acuicultura.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Apoyar al método de identificación con el uso de técnicas moleculares para establecer diferencias morfológicas y fisiológicas a nivel de especie, tanto para *Scenedesmus* sp. como para *Chlorococcum* sp., con el fin de proporcionar características metabólicas más específicas.
- Evaluar el crecimiento de las diferentes especies microalgales propias del agua residual que puedan desarrollarse como parte del consorcio microalgal nativo.
- Se recomienda para el cultivo de *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp., el uso del agua residual sin un tratamiento de esterilización, debido a que representará bajos costos energéticos en la producción de biomasa microalgal.
- Se recomienda la adición de 1.5 mL.L^{-1} de Nitrofoska ® foliar al agua residual para inducir un mayor crecimiento de *Scenedesmus* sp. y *Chlorococcum* sp., ya que de esta forma se proporciona una fuente extra de nutrientes hasta alcanzar una adaptación total de las microalgas al agua residual.
- Se recomienda trabajar con otra combinación de concentraciones de NPK tanto al usar el agua residual como al usar agua potable para el crecimiento del consorcio microalgal con el fin de establecer un mayor aumento en la producción de biomasa.

- Se recomienda el cultivo del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. aplicando un sistema discontinuo con un periodo de retención de acuerdo a la cinética de crecimiento que permita consumir todos los nutrientes presentes en el agua residual.
- Realizar el análisis del perfil lipídico y composición bioquímica de la biomasa obtenida al usar agua residual del reservorio de la EEQ, con el fin de concretar su aprovechamiento como producto de valor agregado.
- Comprobar la capacidad de remoción de contaminantes del consorcio microalgal *Scenedesmus* sp. & *Chlorococcum* sp. sobre otros tipos de aguas residuales y efluentes.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J., Torres, E., & Herrero, C. (1995). Microalgas cultivo y aplicaciones. La Coruña, España: Universidad de la Coruña.

Acevedo, J., & Ramírez, J. (2003). Influencia de un gradiente cruzado de luz y temperatura en la morfología de *Scenedesmus acutus* Meyen var. *globosus* Hortobágyi y sus implicaciones taxonómicas. *Actual Biol* 25.

Acuario, S., & Arciniegas, K. (2015). Evaluación de la remoción de nitritos y nitratos en muestras de agua del río San Pedro cantón Rumiñahui por microalgas clorofitas. Quito, Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana.

Albarracín, I. (2007). La producción de Biocombustibles. XV Simposio Electrónico Internacional.

Andersen, R., & Kawachi, M. (2005). Traditional Microalgae Isolation Techniques. Elsevier Academic Press. E.U.A.

Andrade, C., Vera, A., Cárdenas, C., & Morales, E. (2009). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia, Facultad de Experimental de Ciencias.

Aravantinou, A., Theodorakopoulos, M., & Manariotis, I. (2013). Selection of microalgae for wastewater treatment and potencial lipids production. Grecia: Universidad de Patras.

Arias, M., Martínez, A., & Cañizares, R. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: Parámetros del cultivo que afectan la producción

de lípidos. México: Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del I.P.N.

Aslan, S., Kapdan, I. (2006) Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28.

Barreto, A., & Velasco, L. (2014). Aislamiento y cultivo de microalgas bentónicas del Caribe Colombiano bajo diferentes condiciones de temperatura. Santa Marta, Colombia: Universidad del Magdalena.

Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae Anatomy Biochemistry and Biotechnology*. New York.

Beltrán, J. (2014). Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de Nueva León, México cultivadas en un nuevo fotobiorreactor. Universidad Autónoma de Nueva León. Facultad de Ciencias Químicas.

Bermeo, L. (2011). Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual. Cádiz, España: Universidad de Cádiz.

Bianchini, R., Ohse, S., Villela, M., Matos de Carvalho, S., & Fett, R. (2006). Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*, 3(6), 1959-1967.

Bold, H., & Parker, B. (1961). Some Supplementary Attributes in the Classification. U.S.A. : University of Texas.

Brennan, L., Owende P. (2010). Biofuels from microalgae: a review of technologies for production processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. Sust. Energ.* 14(2): 557–577.

- Brito, D., Milani, N., Pereira, G., Gonzáles, M., & Morán, R. (2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. Maracaibo, Venezuela: Universidad de Zulia.
- Cabrera, M., & Pulla, M. (2014). Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamientos de agua residual. Ecuador: Universidad de Cuenca.
- Cadwell, D. (1946): Sewage oxidation ponds performance, operation and design. *Sewage Works J.*, 18: 433-458
- Canedo, Y., Ruiz, A., & Zavala, J. (2013). Producción de biomasa algal y obtención de biodiesel. Universidad Autónoma del Carmen.
- Cárdenas, G., & Sánchez, I. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad y Salud*, 15(1).
- Case, N., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2004). A search for high performance microalgae to remediate nitrate-contaminated groundwater. Arizona: Midwestern University.
- Castillo, Y. (2013). Tratamiento de aguas residuales. Venezuela: Universidad de los Andes. Departamento de Operaciones Unitarias y Proyectos.
- Chacón, C., Andrede, C., Cárdenas, C., Ismenia, A., & Morales, E. (2004). Uso de *Chlorrella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Maracaibo, Venezuela: Centro de Investigación del Agua (CIA).

Chisti, Y. (2007): Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25: 294-306.

Collos, Y., Berges, J. (1990). Nitrogen metabolism in phytoplankton.

De Bashan, L., & Bashan, Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 85-90.

De Queiroz, M. C., Comas, A., Mariangela, M., De Castro, J., Pedreira, S., & Andrade, I. (2012). Coleção de microalgas de ambientes dulciaquícolas naturais da Bahia, Brasil, como potencial fonte para a produção de biocombustíveis: uma abordagem taxonômica. Bahia, Brasil

Díaz, L., Vera, A., Marín, J., Aillo-Mazzarri, C., Briceño, B., & Morales, E. (2012). Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de una cultivo misto de microalgas (Chlorophyta). *Ciencias Exactas, Naturales y de la Salud*, 102-117.

Durán, O. (2012). Producción de biomasa algal en un fotobiorreactor para la depuración de aguas residuales. España: Universidad Politécnica de Catalunya.

Eriksen, N. (2008). The technology of microalgal culturing. *Biotechnology Letters*, 30(9), 1525-1536.

Escorihuela, A., Núñez, M., Rosales, N., Mora, R., & Morales, E. (2007). Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales. Venezuela: Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería.

- Ferero, P. (2011). Fundamento teórico sobre tratamiento de aguas residuales por fitorremediación. Bogotá, Colombia: Universidad Militar de Nueva Granada.
- Ferreira, E., Leite, C., & Tucci, A. (2013). Scenedesmaceae (Chlorococcales, Chlorophyceae) de pesqueiros da Região Metropolitana de São Paulo, SP, Brasil: levantamento florístico. *Hoehnea*, 40(4), 661-678.
- Fogg, G, Thake B., (1987) Algal cultures and phytoplankton ecology. University of Wisconsin Press, Madison
- Fuiks, W., Main, K., (1991). Rotifer and microalgae culture systems. Proceedings of a U. S. - Asia Workshop
- Fung, M., (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore
- García, C. (2014). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. España: Universidad de Cádiz.
- García, F., Jawiarczyk, N., González, C., Fernández, J., & Acién, F. (2012). Valorización de biomasa de microalgas: Aprovechamiento de proteínas, carbohidratos y lípidos. Departamento de Ingeniería Química.
- Garibay A., Vázquez R., Sánchez M., Serrano L., Martínez A. (2009). Biodiesel a partir de microalgas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gómez, L. (2007). Microalgas: Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*.

- González, A. (2000). Alternativas en el cultivo de microalgas. Guayaquil, Ecuador: Escuela Superior Politécnica del Litoral .
- González, J., & Terán, A. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas *Scenedesmus* spp. en fotobiorreactores tanque agitado. *Pueblo*, 24(2), 379-391.
- González, E., Aguado, J., & Álvarez, B. (2000). Las microalgas:¿una potencial alternativa de producción? Departamento de Producción Animal.
- González, J., & Polo, L. (2013). Rendimiento de biomasa y contenido de lípido de *Tetraselmis suecica* utilizando diferentes concentraciones de efluentes de bodegas de embarcaciones anchoveteras industriales en condiciones de laboratorio. Perú: Universidad Nacional del Santa.
- Gross, W. (2000). Ecophysiology of algae living in highly acidic environments. *Hydrobiology*, 433, 31-37
- Hernández, A., & Labbé, J. (2014). Microalgal, cultivo y beneficios. *Biología Marina y Oceanografía*, 157-173.
- Hernández, A., Vázquez, R., Sánchez, M., Serreno, L., & Martínez, A. (2009). Biodiesel a partir de microalgal. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hu, Q., Kurano, N., Iwasaki, I., Kawachi, M., & Miyachi, S. (1996). Ultrahigh cell density culture of a marine green alga, *Chlorococcum littorale* in a flat plate photobioreactor. *Appl. Microbiol Biotechnol* 49, 655-662.
- Kaplan, D., Richmond, A., Dubinsky, Z. & Aaronson, S. (1986). Algal nutrition, Handbook for Microalgal Mass Culture. FL, USA.

- Lobban, C., Chapman, D., & Klemer, B. (1998). *Experimental Phycology: A laboratory manual*. New York, EEUU: Cambridge University Press.
- López, M. (2006). *Guía de microalgas de aguas dulces de la división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Chlorococcales, encontradas en Jalisco*. México: Universidad de Guadalajara.
- Lucero, A. (2015). *Cultivo de consorcio microalgal autótono y biorremediación de efluentes urbanos*. Universidad Nacional de Cuyo.
- Lürling, M. (2010). Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Ann. Limnol*, 2, 85-101.
- Maldonado, E. (2014). *Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga Graesiella emersonii (Chlorella emersoni) con sustratos amiláceos*. Pichincha, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.
- Márquez, V., Beccaría A., (2006). *Evaluación de Factores involucrados en el desencadenamiento de la apoptosis en Chlamydomonas sp.*, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina.
- Mata, T., Martins, A., & Caetano, N. (2009). *Microalgae for biodiesel production and other applications: A review*. Portugal: Faculty of Engineering, University of Porto (FEUP).
- Mayo, R. (2010). *Optimización de la estación depuradora de aguas residuales Denia-Ondara-Pedreguer, mediante el uso de herramientas de simulación*. Universida Politècnica de Valencia .
- Mendoza, H., Valido, A. d., & Portillo, E. (2011). *Planta piloto de cultivo de microalgas*. División de Investigaciones y Desarrollo Tecnológico.

- Montero, Y., Gallo, A., Gómez, L., Álvarez, I., Sabina, L., Támbara, Y., Ramírez, L. (2012). Productividad de lípidos y composición de ácidos grasos de cinco especies de microalgas. Habana, Cuba: Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la Caña de Azúcar.
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2013). Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras. Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Narayanna, S. (2012). Isolation and identification of microalgal strains and evaluation of their fatty acid. India: Annamalai University.
- Nieves, M., Cortés, R., Gutiérrez, C., & Pacheco, M. (1994). Producción de fitoplancton a bajo costo. Aislamiento y cultivo de *Monoraphidium* sp. (Chlorophyceae) en un sistema estático en medio F y cuatro a base de fertilizantes agrícolas. México: Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología.
- Oliviera, A. (2013). Produção de biomassa de microalgas *Scenedesmus* sp. em efluente de bovinocultura biodigerido. Brasil: Dissertação apresentada ao Programa de PósGraduação em Engenharia e Ciência dos Materiais.
- Oswald, W. (1988). Microalgae and waste water treatment in microalgae biotechnology. Cambridge University press.
- Palomino, A., Estrada, C., & López, J. (2010). Microalgas: Potencial para la producción de biodiesel. Cali, Colombia: Universidad del Valle.
- Pellón, A. (2011). Remoción de cromo mediante el uso de un bioreactor utilizando *Scenedesmus obliquus* inmovilizado. *Ingeniería Hidráulica y ambiental*, 13-20.

- Pérez, R. (2009). Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en el crecimiento autotrófico, heterotrófo y mixotrófico. La Paz, Bolivia.
- Portilla, A. (2010). Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de luminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio. Sangolquí, Ecuador: Facultad de Ingeniería en Biotecnología. ESPE.
- Quevedo, C., Morales, S., & Acosta, A. (2008). Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Reascos, D., Romero, P., Gonzales, A., & Morales, E. (2015). Estudio de tratabilidad de un efluente de explotación porcina artesanal con un consorcio microalgal, y obtención de biomasa con alto contenido de proteínas y carotenoides. Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE. Programa de becas Prometeo.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J., Herdman, M., & Stranier, R. (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacterias. *Gen. Microbiol* 111.
- Roa, A., & Cañizares, R. (2012). Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua*, 10(1), 71-79.
- Romero, L., & Ferrán, C. (2001). Flocculación de *Chlorella* sp. con la utilización de quitosana. *Rev. Invest.Mar.*, 57-62.

- Romo, A., (2002). Manual para el cultivo de microalgas. Universidad Autónoma de Baja California del Sur. Departamento de Biología Marina. La Paz, México.
- Rosero, D. (2009). Restauración hidráulica y ecológica de un tramo del río San Pedro, cuenca del río Guayllabamba. Quito, Ecuador.
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia.
- Ruiz, M. (2013). Evaluación del enriquecimiento en lípidos de valor energético en microalgas. Huelva, España : Universidad de Huelva, Departamento de Química y Ciencia de los Materiales.
- Sacristán, M., Luna, V., Cadena, E., & Alva, A. (2014). Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia*, 271-284.
- Salazar, M. (2009). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales.
- Santos, A., González, Y., & Sastre, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de mecánica y electricidad*.
- Schmitz, R., Dal Magro, C., & Colla, L. (2012). Aplicações ambientais de microalgas. *CIATEC-UPF*, 4(1), 48-60.
- SENAGUA, S. N. (2012). Diagnóstico de las aguas en el Ecuador. Quito.

- Serrano, L. (2012). Estudio de cuatro cepas nativas de microalgas para evaluar su potencial uso en la producción de biodiesel. (D. d. Química, Ed.) Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Silva de Jesús, H. (2014). Isolamento, sobrevivência e caracterização da biomassa de microalgas cultivadas em efluente de tratamento de esgoto sanitário visando a produção de biocombustíveis. Brasil: Instituição Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia .
- Tapia, L. (2002). *Guía de Biodiversidad, Macrofauna y algas marinas*. Chile: Centro Regional de Estudios y Educación Ambiental, Universidad Antofagasta.
- Texto Unificado de Legislación Ambiental (2002). Libro IV, Anexo 1 Recurso Agua. Ecuador
- Ugalde, P. (2011). Efectos del estrés abiótico en la producción de lípidos en *Chlorella* sp. y *Tetraselmis chii*, importantes para elaboración de biodiesel. Portugal: Facultad de Ciencias y Tecnologías.
- Uribe, E., (1992). Tecnología de Cultivo de Microalgas. Universidad Católica del Norte. Coquimbo, Chile.
- Venkataraman, L. Becker, E. (1985). Biotechnology and utilization of algae. The Indian Experience. Department of Science and Technology, New Delhi. India.
- Xin-Min, M. (2001). Physiological responses of *Chlorococcum* sp. to external. Hong Kong: University of Hong Kong.
- Xu, X., Shen, Y., & Chen, J. (2014). Cultivation of *Scenedesmus dimorphus* for C/N/P removal and lipid production. China: Fuzhou University.

Zepka, L., Jacob, E., & Queiroz, M. (2007). Efecto del procesamiento térmico sobre el perfil de ácidos grasos de la microalga *Aphanothece microscopica*. Brasil: Laboratorio de Biotecnología. Departamento de Química.

Zhang, Y., Ma, N., Zhou, Y., Fu, T., Meng, J., & Zhou, W. (2014). Treatment of nutrient-rich municipal wastewater using mixotrophic strain *Chlorella kessleri* GXLB-9. China: Guangxi University.