

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título en: INGENIERAS
EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE NITRITOS Y NITRATOS EN
MUESTRAS DE AGUA DEL RÍO SAN PEDRO CANTÓN RUMIÑAHUI POR
MICROALGAS CLOROFITAS.**

AUTORAS:

**SHEYLLA PAOLA ACURIO MÉNDEZ
KERLY NATALY ARCINIEGAS SOLARTE**

DIRECTORA:

LAURA ELIZABETH HUACHI ESPIN

Quito, mayo del 2015

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Nosotras autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro. Además, declaramos que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, mayo del 2015

(f) _____

Sheylla Paola Acurio Méndez
CI: 1717677015

(f) _____

Kerly Nataly Arciniegas Solarte
CI: 1720897402

DEDICATORIA

A Dios por haberme otorgado la fuerza, inteligencia y perseverancia para alcanzar un objetivo más en mi vida.

A mi padre, Pablo Acurio y madre Lourdes Méndez que a pesar de la distancia han sido un pilar fundamental en mi vida, quienes con sus concejos y amor incondicional me han formado con buenos sentimientos, hábitos y valores, permitiéndome ser una gran mujer, madre, amiga y profesional.

A mis hermanas Eliana, Estefanía y Britanie que siempre ha estado junto a mí brindándome su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de padres, gracias a ustedes he logrado superar los obstáculos en mi camino alcanzando este triunfo en mi vida, y anhelo de todo corazón contar siempre con su valioso e incondicional apoyo y amor.

Sheylla Paola Acurio Méndez

Esta tesis se la dedico a Dios por llenarme de bendiciones, demostrándome que con esfuerzo y valentía se pueden vencer todos los obstáculos, a mi hermano Iván Arciniegas por ser el mejor hermano del mundo y ser mi gran apoyo en todos los sentidos de mi vida, a mi madre Elena Solarte, a mi padre Rogelio Arciniegas, a mi hermano Daniel Arciniegas, a mi hermana Lesly Arciniegas a mi sobrina Jhanela Bravo y a mi gran amiga Isabel Novillo a ustedes que han estado conmigo en las buenas y en las malas.

Kerly Nataly Arciniegas Solarte

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento especial a la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos realizar esta investigación. Al Dr. Ever Morales y la Msc. Laura Huachi por su paciencia, amor y consejos que han sido de gran ayuda para permitirnos un crecimiento profesional y personal.

A mi amado esposo Carlos Cantuña y mi adorada hija Rafaela Cantuña que con sus detalles han sabido llenarme de alegría en mis momentos de tristeza y con su amor me han convertido en una triunfadora, por lo que son lo más importante en mi vida y por quienes hoy he culminado mi carrera para ser un ejemplo de superación.

Agradezco a todas aquellas personas y amigos Gabriel Salazar, Carina Hidalgo, Edison Osorio y Kerly Arciniegas que compartieron junto a mí sus alegrías y me brindaron su apoyo en cada momento.

Sheylla Paola Acurio Méndez

Al Dr. Ever Morales y Msc. Laura Huachi mi directora de tesis, por su esfuerzo y dedicación, quien con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación, me han ayudado a culminar una etapa de mi vida, por su profesionalismo, por sus consejos, y por ser tan grandes personas gracias a eso me han ayudado a formarme como persona e investigadora.

A mi querido amigo Gabriel Salazar por su apoyo durante todo este proceso de investigación, de igual manera a mis queridos amigos que me apoyaron Sheylla Acurio, Carlos Vélez, Carina Hidalgo, Edison Osorio, Isabel Novillo, Pablo Muñoz, Lisa Ibarra, Fernando Paredes, Irving Echeverría y también un especial agradecimiento a Ivonne Coronel, Cristina Chasipanta, Mily Vizcaíno, Lilian Godoy, Belén Granja, y Alexandra Tapia.

Y por último agradezco a la música en general por existir y ser parte de mi inspiración

Kerly Nataly Arciniegas Solarte

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Aguas residuales	7
1.1.1. Tipos de aguas residuales	7
1.2. Parámetros físico químicos para la calidad de aguas.....	8
1.3. Límites permisibles de descarga a un cuerpo de agua dulce	8
1.4 Tratamiento de aguas residuales	10
1.5. Tecnologías de tratamiento	11
1.5.1. Tratamientos Biológicos.....	11
1.6. El nitrógeno.....	12
1.6.1 El ciclo del nitrógeno	13
1.7 Nitritos y nitratos	15
1.8. Fitorremediación	16
1.8.1 Ventajas de la fitorremediación	18
1.9 Microalgas	19
1.9.1. Microalgas clorofitas	20
1.9.2. Reproducción de las microalgas	21
1.9.3. Parámetros de cultivo de las microalgas	22
1.9.4. Nutrientes	24
1.9.5. Sistemas de cultivo	26
1.9.6. Medios de cultivo	28
1.9.7. Recuento celular en microalgas	28
1.9.8. Fases de crecimiento de las microalgas.....	29
1.9.9. Microalga <i>Chlorella</i>	31

1.9.9.1 Reproducción <i>Chlorella</i>	33
1.9.9.2. Asimilación de nitrógeno en <i>Chlorella</i>	33
1.9.9.3. Usos y aplicaciones de <i>Chlorella</i>	36
1.9.10. Microalga <i>Scenedesmus</i>	38
1.9.10.1. Ciclo celular de <i>Scenedesmus</i>	40
1.9.10.2. Asimilación de Nitrógeno a las células de <i>Scenedesmus</i>	42
1.9.10.3. Usos y aplicaciones de <i>Scenedesmus</i>	42

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización del estudio	44
2.2 Fase de campo.....	45
2.2.1 Georeferenciación de los puntos de muestreo	45
2.2.2 Primer muestreo: recolección de agua con microalgas del río San Pedro	45
2.2.3 Segundo muestreo: recolección de agua para implementación del ensayo	46
2.3 Fase de laboratorio.....	47
2.3.1 Etapa I. Identificación y producción de biomasa microalgal mediante escalamientos.....	47
2.3.1.1 Preparación del medio de cultivo	47
2.3.1.2 Identificación de microalgas Clorofitas	48
2.3.1.3 Recuento celular mediante cámara de Neubauer	49
2.3.1.4. Curva de crecimiento del consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	51
2.3.1.5. Parámetros de cultivo del consorcio <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	51
2.3.1.6. Producción de biomasa microalgal mediante fases de escalamientos	51
2.3.2. Etapa II: tratabilidad.....	52
2.3.2.1 Diseño e implementación del sistema de tratamientos	52
2.3.2.2 Esquema de tratamientos	53
2.3.2.3 Caracterización cualitativa y cuantitativa de las muestras de agua del río San Pedro	54

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Croquis de los puntos de muestreo en el río San Pedro.....	56
3.1.1. Puntos de muestreo.....	56
3.2 Evidencia de microalgas en el río San Pedro.....	57
3.2.1. Identificación macroscópica del consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en muestras de agua del río San Pedro.....	57
3.2.2. Identificación microscópica del consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en muestras de agua del río San Pedro.....	58
3.2.3 Producción de biomasa y cinética de crecimiento en los consorcios de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en cada muestra.....	61
3.2.4 Porcentaje de crecimiento de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en las muestras de agua del río San Pedro.....	63
3.2.4 Parámetros físico-químicos evaluados en el cultivo de microalgas.....	63
3.3 Caracterización cualitativa y cuantitativa de la calidad físico-química de las muestras de agua contaminada del río San Pedro.....	65
3.4 Crecimiento del consorcio microalgal <i>Chlorella- Scenedesmus</i> en los tratamientos inoculados y no inoculados con estas microalgas.....	67
3.5 Determinación de la remoción de nitritos y nitratos en el agua del río enriquecida con estos nutrientes por el consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	69
3.5.1 Evaluación de otros parámetros (DBO y DQO).....	71
3.6 Evaluación de la remoción de nitritos y nitratos en muestras de agua del río San Pedro con microalgas clorofitas (Consortio <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>).....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros y límites permisibles para la calidad de agua.....	8
Tabla 2. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce.	9
Tabla 3. Microalgas que contribuyen a la degradación de contaminantes ambientales.	18
Tabla 4. Valores óptimos para el cultivo de microalgas	26
Tabla 5. Taxonomía de la microalga <i>Chlorella</i>	32
Tabla 6. Taxonomía de la microalga <i>Scenedesmus</i>	39
Tabla 7. Localización del Río San Pedro	44
Tabla 8. Dosificación de los medios de cultivo	48
Tabla 9. Descripción de la dosificación en cada tratamiento.....	54
Tabla 10. Parámetros analizados en el laboratorio Labiotec y su metodología.....	54
Tabla 11. Coordenadas geográficas convertidas a partir de UTM.....	56
Tabla 12: Características macroscópicas del consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en muestras de agua del río San Pedro.....	58
Tabla 13: Comparación e identificación morfológica microscópica de <i>Chlorella</i> con el lente 40X	59
Tabla 14. Comparación e identificación morfológica microscópica de <i>Scenedesmus</i> con el lente 40X	60
Tabla 15. Densidades celulares (cel/mL) alcanzadas en los consorcios de las muestras 1, 2, 3 y 4 durante los 61 días de cultivo.	61
Tabla 16. Valores promedio obtenidos en el control de los parámetros físico químicos del consorcio <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> , y valores óptimos de crecimiento de un cultivo microalgal.....	64
Tabla 17. Caracterización cualitativa y cuantitativa de las muestras de agua del río San Pedro	65
Tabla 18. Densidad celular del consorcio microalgal <i>Chlorella</i> - <i>Scenedesmus</i> aplicados en los tratamientos	67
Tabla 19. Porcentajes de remoción de nitratos por el consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	69
Tabla 20. Porcentajes de remoción de nitritos por el consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>	70
Tabla 21. Porcentajes de remoción de DBO por el consorcio de <i>Chlorella</i> y	

<i>Scenedesmus</i>	72
Tabla 22. Porcentajes de remoción de DQO por el consorcio de <i>Chlorella</i> y	
<i>Scenedesmus</i>	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del ciclo del nitrógeno y sus fases que son: Fijación del nitrógeno, amonificación, nitrificación y desnitrificación.	13
Figura 2. Diferentes usos y aplicaciones de las microalgas en diferentes campos, ya sea para el tratamiento de ríos gracias a su capacidad de remoción, su biomasa sirve para la producción de biocombustibles, y como suplementos nutritivos gracias a su contenido de proteínas, y carbohidratos.....	20
Figura 3. Diferentes fases de crecimiento desde la adaptación, fase exponencial o multiplicación, fase estacionaria y de muerte donde se han consumido todos los nutrientes	31
Figura 4. <i>Chlorella</i> vista al microscopio lente 40X.....	32
Figura 5. A y B células jóvenes y adultas con su plasto parietal. C formación de 4 autosporas; D Liberación de las autosporas	33
Figura 6. Vista al microscopio de <i>Scenedesmus</i> lente 40X.....	39
Figura 7. Fases del ciclo celular de <i>Scenedesmus</i>	41
Figura 8: Vista del río San Pedro desde el satélite.....	45
Figura 9. Nitrofoska Foliar líquida 10-4-7-0,2 MgO para la preparación del medio de cultivo de las microalgas.	47
Figura 10. Se muestra los 4 cuadrantes A, B, C y D donde se realiza los conteos en el recuento celular con la cámara Neubauer, para determinar la densidad celular.	50
Figura 11. Fase 1 escalamientos dosis 1mL/L a partir de un inóculo de 1.0×10^6 hasta un volumen de 1.5L. Fase 2 Escalamiento dosis 3mL/L a partir de un volumen de 1.5L a 15L, para la producción de biomasa microalgal.	52
Figura 12. Distribución de los diferentes tratamientos con sus repeticiones y la dosificación respectiva de 20mg/L nitritos , 40mg/L nitratos y 8mg /L de fosfatos	53
Figura 13. Croquis de los puntos muestreados con el GPS en el mapa visto desde el satélite. El Pto 1 y 2 se recolectaron en la Parroquia de San Pedro, mientras que el Pto 3 y 4 se recolectaron en la parroquia de Fajardo.	56
Figura 14. Microalgas adheridas a las rocas del río San Pedro.....	57
Figura 15. Microalgas desprendidas con un cepillo en el río San Pedro	57
Figura 16. Imagen que muestra las características macroscópicas de microalgas en	

muestras de agua del río San Pedro para su identificación.	58
Figura 17. Foto microscópica de <i>Chlorella</i> lente 40X.....	59
Figura 18. Foto bibliográfica de <i>Chlorella</i>	59
Figura 19. Foto microscópica de <i>Scenedesmus</i> con el lente 40X	60
Figura 20: Foto bibliográfica de <i>Scenedesmus</i>	60
Figura 21. Curva de crecimiento de la densidad celular (cel/mL) de los consorcios durante los 61 días de producción de biomasa y sus diferentes fases de crecimiento.....	62
Figura 22. Porcentajes de crecimiento de <i>Chlorella</i> con un valor superior del 78% y de <i>Scenedesmus</i> un 9%.....	63
Figura 23: Densidad celular (cel/mL) de los consorcios en los tratamientos durante la fase de tratabilidad	67
Figura 24. Esta figura muestra el porcentaje de remoción de NO ₃ en cada tratamiento. T0= (Agua + microalgas), T1= (Agua + microalgas + nitratos), T2= (Agua + nitratos), T3= (Agua + nitritos + microalgas), T4= (Agua + Nitrito).....	69
Figura 25. Esta figura muestra el porcentaje de remoción de NO ₂ en cada tratamiento.....	71
Figura 26. Esta figura muestra el porcentaje de remoción de DBO en cada tratamiento.T0= (Agua + microalgas), T1= (Agua + microalgas + nitratos), T2= (Agua + nitratos), T3= (Agua + nitritos + microalgas), T4= (Agua + Nitrito).....	72
Figura 27. Esta figura muestra el porcentaje de remoción de DBO en cada tratamiento.....	73

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Puntos de muestreo.....	83
Anexo 2. Observación de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en el microscopio	84
Anexo 3. Recolección de muestras de agua	85
Anexo 4. Medio de cultivo.....	86
Anexo 5. Escalamientos en la producción de biomasa microalgal	87
Anexo 6. Conteo celular en cámara Neubauer.....	88
Anexo 7. Tratabilidad de las muestras de agua día 0.....	89
Anexo 8. Tratabilidad de las muestras de agua día 6.....	90
Anexo 9. Tratabilidad de las muestras de agua día 12.....	91
Anexo 10. Tratabilidad de las muestras de agua día 18.....	92
Anexo 11. Centrifugación de muestras para análisis de parámetros en los laboratorios Labiotec.....	93
Anexo 12. Valores de densidad celular del consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> durante los 61 de cultivo en cada una de las muestras.....	94
Anexo 13: Informe de análisis de agua del río San Pedro al día 0.....	95

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana. En la primera fase del estudio se identificó un consorcio conformado por las microalgas clorofitas *Chlorella* y *Scenedesmus*, a partir de muestras recolectadas en el río San Pedro-Ecuador, de las cuales se obtuvo biomasa en condiciones adecuadas de pH, temperatura, aireación y luz, hasta obtener una densidad celular de 34.0×10^6 cel/mL en cultivos discontinuos alimentados. En la segunda fase, el proceso de tratabilidad, tuvo una duración de 18 días, el diseño experimental constó de los siguientes tratamientos con tres repeticiones: T0 (Agua + microalgas), T1 (Agua + Nitratos + Microalgas + fosfatos), T2 (Agua + Nitratos + fosfatos), T3 (Agua + Nitritos + Microalgas + fosfatos) y T4 (Agua + Nitritos + fosfatos).

El porcentaje de remoción de los cinco parámetros de interés al finalizar el ensayo fueron: NO_3 entre 95-100%, NO_2 entre 95-100%, DBO entre 9-42%, DQO entre 10-31%. Por lo tanto se pudo determinar la eficiente remoción de estos parámetros sobre todo en NO_3 y NO_2 , con el uso del consorcio, no obstante no hubo diferencias significativas entre tratamientos. Con este estudio se pudo determinar la gran importancia que tienen las microalgas en el tratamiento de aguas residuales ya que en asociación con la flora bacteriana pueden aumentar su capacidad de remoción de contaminantes como: nitritos, nitratos entre otros, convirtiéndose en una alternativa de bajo costo y alta eficiencia en procesos de biorremediación, además la biomasa obtenida, puede ser utilizada para otros fines biotecnológicos.

ABSTRACT

This research was conducted in CIVABI laboratories, in the Salesian Polytechnic University. In the first phase of this study, a consortium of the Chlorophyta microalgae *Chlorella* and *Scenedesmus*, from samples collected from San Pedro-Ecuador river was identified, of which the biomass was obtained under appropriate conditions until to get a cell density of 34.0×10^6 cel/mL, in batch culture. In the second phase, the process of treatability lasted 18 days and the experimental design consisted of the following treatments with three replicates: T0 (Water + microalgae), T1 (Water + Nitrate + Microalgae + phosphate), T2 (Water + Nitrates + phosphate), T3 (Water + Nitrite + Microalgae + phosphate) and T4 (Water + Nitrite + phosphate).

The percentage removals of the five parameters studied after the treatment were: between 95-100% NO_3 , NO_2 between 95-100%, between 9-42% BOD, COD between 10- 31%. Therefore, the removal efficiency was determined especially in NO_3 , NO_2 , using the consortium, however there were not significant differences between treatments. With this study it was determined the great importance of microalgae in wastewater treatment and in association with the bacterial flora can increase their capacity to remove contaminants such as nitrites, nitrates among others, becoming a low-cost alternative with a high efficiency in bioremediation processes, besides the biomass obtained can be used for other biotechnological purposes.

INTRODUCCIÓN

El agua es uno de los recursos más importantes y de mayor valor para la humanidad; constituyendo uno de los elementos más indispensables para el desarrollo de la vida en la Tierra, por lo que día a día se busca mecanismos que ayuden a mantener, cuidar, y preservar este recurso. Las diferentes actividades que el hombre realiza con ella la ponen como una de las principales fuentes de materia prima no solo para su supervivencia, sino también para el crecimiento y avance de grandes industrias (Rincón, 2011, pág. 92).

El crecimiento de las poblaciones, el incremento de industrias y la producción de contaminantes han causado gran impacto ambiental dentro de los cuerpos de agua, esto se debe a que existe una falta de control en el momento de descargar los desechos líquidos sin un previo tratamiento, lo que representa un importante desequilibrio en la cadena trófica, dejando como consecuencia la contaminación de aguas subterráneas, generación de malos olores por el uso inadecuado de los procedimientos en las industrias, presencia de vectores de enfermedades y el deterioro del suelo por salinización y saturación del agua (FAO, 2007. pág. 23).

La presencia y acumulación de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas dentro del agua altera su proceso biológico natural, provocando una acelerada eutrofización debido al exceso de fosfatos y nitratos dentro de los sistemas acuáticos, alterando la demanda de oxígeno (DO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO), con fuertes procesos de anoxia causando afectaciones en las poblaciones acuáticas y en la salud humana (García, 2002, pág. 87).

Entre las tecnologías aplicadas en los procesos de depuración de efluentes se encuentran los tratamientos físicos, químicos y biológicos, que son utilizados dependiendo de la carga orgánica y los componentes que están presentes en el agua, dentro de las técnicas de tratamiento biológico se ha propuesto la ficorremediación, este tipo de tratamiento consiste en la utilización de cultivos mono-específicos o consorcios de microalgas para la remoción, biotransformación y reutilización de contaminantes dentro del agua.

Las microalgas clorofitas debido a su gran capacidad de adaptación, resistencia y utilización de nitritos y nitratos como fuente alimenticia, se han convertido una de las mejores alternativas en el tratamiento de agua (Alcarraz, 2012, pág. 33).

Entre los géneros de microalgas utilizadas en estudios de biorremediación de aguas residuales, se han evaluado, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Oocystis*, *Oedogonium*, y varias *Cianophytas*. De tal forma, que puedan ser inoculadas como cultivos mono-específicos o mezcladas conformando consorcios microalgas-bacterias asociadas. Se han descrito, consorcios de *Scenedesmus* y *Chlorella* que son microalgas muy resistentes a cambios bruscos de pH, se ha comprobado su adaptación en efluentes a diferentes concentraciones, convirtiéndose en un factor clave en técnicas de ficorremediación, y remoción de nitritos y nitratos (Hanumantha, 2011, pág. 78).

Una de las problemáticas ambientales que mayor impacto tiene sobre los ecosistemas, es la falta de control en el manejo del recurso agua, que debido a su contaminación y el deterioro continuo de su calidad, poco a poco ha ido perjudicando a los seres vivos, que utilizan este recurso en todo tipo de actividades, obligándolos a concientizar sobre su importancia, conservación y manejo, de tal manera que se puedan generar nuevas alternativas que sean más amigables con el ambiente y ayuden a mejorar sus características.

Debido a que existe información deficiente sobre el nivel de contaminación presente en el río San Pedro (UCE-FIGEMPA, 2012. pág. 7), ubicado en el cantón Rumiñahui, se ha prestado un mayor interés para realizar una investigación que ayude a caracterizarlo física y químicamente, determinando el nivel de nitritos y nitratos presentes.

Este río representa una amenaza ambiental por la contaminación originada debido a un mal manejo y falta de control de desechos sólidos y líquidos, generados tanto por los habitantes, como las industrias ubicadas a sus alrededores, estos problemas conllevan a buscar nuevas estrategias que permitan una mejor utilización y control de ciertos contaminantes que son perjudiciales (Cabrera, Hernández, Gómez, y Cañizares, 2003, pág. 237).

Este estudio se llevó a cabo en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana y en el río San Pedro de donde se tomaron las muestras. Dentro de los diferentes contaminantes presentes en el río se encuentran los nitritos y nitratos, generados principalmente por residuos industriales o por el uso de abonos nitrogenados en la agricultura que con su posterior arrastre por las aguas de lluvia o riegos contaminan las aguas naturales. Estos compuestos son un indicador importante de la calidad del agua, se encuentran relacionados con el ciclo natural del nitrógeno, cuando existen ciertas alteraciones puede generarse un aumento significativo en su concentración, por lo que los efectos nocivos de los nitratos son mayores, cuando se reducen a nitritos los cuales son compuestos incluso cancerígenos, que pueden llegar a afectar la flora y fauna cercana generando una menor autodepuración del mismo, por lo cual es de suma importancia su disminución para mejorar este recurso (Cabrera, Hernández, Gómez, y Cañizares, 2003, pág. 102).

En los procesos de tratamiento de aguas residuales, el tratamiento secundario trae como consecuencia la generación de efluentes con elevadas concentraciones de nutrientes, nitrógeno y fósforo, por lo que es necesario aplicar un tratamiento terciario, pero la mayoría son procesos fisicoquímicos, altamente costosos por lo que se vuelven poco usados. El uso de microalgas como tratamiento terciario presenta ventajas importantes como: mejorar la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético así como el aprovechamiento de nutrientes que están siendo desechados, al ser incorporados a la biomasa produciendo (Salazar, 2006, pág. 406).

Las microalgas clorofitas se han estudiado desde hace mucho tiempo, demostrando su capacidad de remoción de nitritos y nitratos en efluentes (Mendoza, 2003). Su mecanismo consiste en incorporar el nitrógeno a las moléculas orgánicas mediante la reducción de los nitritos y nitratos a amonio. Esto ocurre en dos pasos catalizados por la nitrito reductasa (N_{iR}) y la nitrato reductasa (N_R). Por lo que es una opción viable ya que su sistema de tratamiento de aguas requiere poca energía, una fuente de carbono, luz solar, nitrógeno y pequeñas cantidades de otros nutrientes del medio para generar biomasa. De esta manera, se podrá disminuir la eutrofización en cuerpos de agua receptores, mejorando la calidad de agua (Abalde, Cid, Fidalgo, Torres, y Herrero, 2012, pág. 354).

Las microalgas a más de remover nitritos y nitratos en el agua ayudan a mejorar ciertos parámetros como: DBO, DQO, Oxígeno disuelto, pH entre otros beneficios, a fin de mejorar la calidad físico química del agua residual, contribuyendo a disminuir riesgos a la salud, convirtiéndose en una buena alternativa convencional de bajo costo para el tratamiento de efluentes, y sobre todo más amigable con el ambiente (León, Andrea, Sanchez, y Vaness, 2012, pág. 379).

Estas microalgas son de reconocido valor científico, ya que han sido ampliamente estudiadas y utilizadas en procesos de biorremediación, bioindicación y como productoras de metabolitos secundarios. El conocimiento básico generado en esta investigación es de gran utilidad y brinda información importante para continuar con estudios relacionados, ya que en nuestro país su investigación es relativamente reciente, así también expandir su uso como alternativas de tratamiento terciario de aguas residuales, aumentar sus aplicaciones y beneficios en campos que busquen el cuidado y preservación del medio ambiente, tal como lo promueve el Art. 89 Sección Segunda del medio ambiente y el Art. 14 y 15 de la constitución Capítulo segundo Derechos del buen vivir Sección primera Agua y alimentación, además que se genera un aporte investigativo que posteriormente podría conllevar a un plan de recuperación de la cuenca del río San Pedro.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el comportamiento en la remoción de nitritos y nitratos en muestras de agua del río San Pedro cantón Rumiñahui por microalgas clorofitas.

Objetivos específicos:

- Evidenciar la presencia de la microalga clorofitas en muestras de agua del río San Pedro, para su posterior aislamiento y cultivo.
- Caracterizar cualitativa y cuantitativamente la calidad físico-química de las muestras de agua contaminada del río San Pedro.
- Determinar la remoción de nitritos y nitratos con agua del río enriquecida con estos nutrientes.
- Evaluar los niveles de remoción de nitritos y nitratos con el uso de las microalgas clorofitas bajo condiciones de laboratorio.

Hipótesis

Hipótesis nula (H₀):

Las microalgas clorofitas son eficientes removiendo nitritos y nitratos en muestras de agua contaminada del Río San Pedro.

Hipótesis alternativa (H_a):

Las microalgas clorofitas no son eficientes removiendo nitritos y nitratos en muestras de agua contaminada del Río San Pedro.

Variables e indicadores

Variable independiente: microalgas clorofitas y evaluación de su eficiencia en la remoción de nitritos y nitratos

Variable dependiente: producción de densidad celular para remover nitritos y nitratos en muestras de agua contaminada del río San Pedro

Variabes intervinientes

- Medio de cultivo líquido con fertilizante comercial Nitro Foska
- Tiempo de crecimiento de las microalgas
- Eficacia en la remoción de nitritos y nitratos

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1. Aguas residuales

Son aquellas aguas cuyas características originales han sido alteradas por ciertas actividades, ya sean industriales, domésticas o urbanas reduciendo su calidad. Este tipo de aguas muestran diferentes tipos de contaminantes como metales, compuestos orgánicos e inorgánicos, sólidos, grasas entre otros, que generan un alto índice de contaminación en los depósitos hídricos como ríos, y mares afectando la salud humana y el ambiente en general, por lo que demandan un tratamiento previo, antes de ser reusadas o vertidas a un cuerpo natural de agua (Rincón, 2011. pág. 16).

1.1.1. Tipos de aguas residuales

Aguas residuales industriales: son las aguas que ha sido manipuladas en procesos industriales y que han recibido subproductos contaminantes como efecto de ese uso. Su calidad es intensamente variable y prácticamente se requiere un estudio particular para cada industria, dentro de éstas se envuelven las provenientes de la actividad minera, agrícola, energética, agroindustrial, entre otras (Rubens, 2003, pág. 38).

Aguas residuales domésticas: Son las aguas residuales originadas por las actividades humanas relacionadas con el dispendio de agua potable: lavado de platos, duchas, lavatorios, servicios sanitarios y similares. Su calidad es muy semejante y conocida y varía un poco con respecto al nivel socioeconómico y cultural de las poblaciones (Rubens, 2003, pág. 38).

Aguas residuales urbanas: Son aguas residuales domésticas que pueden estar combinadas con aguas de drenaje pluvial o con aguas residuales de origen industrial previamente tratadas, para ser aceptadas en los sistemas de alcantarillado de tipo combinado (Rubens, 2003, pág. 38).

1.2. Parámetros físico químicos para la calidad de aguas

Tabla 1. Parámetros y límites permisibles para la calidad de agua

Parámetros	Límites permisibles
Olor	Inodoro
Color	Incoloro
Turbidez	NR
Temperatura	25°C – 35°C
pH	6.5 - 8.5
Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO)	100mg/L
Demanda Química de oxígeno (DQO)	200mg/L
Nitritos y nitratos	10mg/L

Nota: (Quito-Ambiente, Ordenanza 404, 2012)

1.3. Límites permisibles de descarga a un cuerpo de agua dulce

“Toda descarga a un cuerpo de agua dulce, deberá cumplir con los valores establecidos a continuación” (Alcarráz, 2012, pág. 16).

Tabla 2. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce.

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y Grasas	Sustancias solubles en hexano	mg/L	0,3
Aldehídos		mg/L	2
Aluminio	Al	mg/L	5
Arsénico total	As	mg/L	0,1
Bario	Ba	mg/L	2
Boro total	Ba	mg/L	2
Cadmio	Cd	mg/L	0,02
Cianuro total	CN	mg/L	0,2
Cloro activo	Cl	mg/L	0,5
Cloroformo	Extracto de carbón cloroformo ECC	mg/L	0,1
Cloruros	Cl	mg/L	1000
Cobre	Cu	mg/L	1
Cobalto	Co	mg/L	0,5
Coliformes fecales	Nmp/100ml		remoción > al 99,9%
Color real	color real	unidad de color	Inapreciable en dilución: 1/20
Compuestos fenólicos	Fenol	mg/L	0,2
Cromo hexavalente	Cr ⁺⁶	mg/L	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno	D.B.O ₅	mg/L	100
Demanda Química de Oxígeno	D.Q.O.	mg/L	250
Dicloroetileno	Dicloroetileno	mg/L	1
Estaño	Sn	mg/L	5
Fluoruros	F	mg/l	5
Fósforo total	P	mg/L	10

Nitrógeno Total Kjeldahl	N	mg/L	15
Organoclorados totales	Concentración de organoclorados totales	mg/L	0,05
Organofosforados totales	Concentración de organofosforados totales.	mg/L	0,1
Plata	Ag	mg/L	0,1
Plomo	Pb	mg/L	0,2
Potencial de Hidrógeno	Ph	mg/L	5,0 -9,0
Selenio	Se	mg/L	0,1
Sólidos sedimentados		mg/L	1
Sólidos suspendidos totales		mg/L	100
Sólidos totales		mg/L	1600

Nota: (TULSMA, 2009)

1.4 Tratamiento de aguas residuales

El objetivo de realizar un tratamiento es reducir la cantidad de agentes contaminantes en el agua dependiendo no solo del tipo de contaminante presente sino el uso que se le dará una vez que se haya cumplido con el tratamiento adecuado (Rubens, 2003, pág. 47).

- **Procesos naturales:** utilizan procesos naturales físicos y bioquímicos: sedimentación, adsorción flujo por gravedad, fotosíntesis con descomposición aeróbica, descomposición anaeróbica con producción de metano. Los procesos naturales no demandan energía externa y pueden producir energía, tienen una huella de carbono pequeña, son estables, tienen efluentes y lodos apropiados para reúso en agricultura, son más rentables y sostenibles para las municipalidades, o comunidades (Rubens, 2003, pág. 47).

- **Procesos que usan energía:** Los sistemas mecanizados solicitan energía eléctrica de tiempo completo para su adecuada operación, lo que incluye:

Aireación mecánica para lodos activados y lagunas aireadas.

Bombeo para la recirculación del efluente en filtros de medio granular.

Estaciones de bombeo cuando el afluente no puede llegar por gravedad a la planta (Rubens, 2003, pág. 47).

1.5. Tecnologías de tratamiento

Los tratamientos se llevan a cabo mediante distintos métodos, todos estos se establecen en fenómenos: físicos, químicos y biológicos. A continuación se detallan los fundamentos de cada tecnología.

1.5.1. Tratamientos Biológicos

Estos tratamientos se basan en el uso de microorganismos que descomponen y asimilan las sustancias presentes en el efluente. Los dos tratamientos más importantes son lodos activados y sistemas de película fija (Rubens, 2003, pág. 82).

Lodos activados: estos tratamientos se efectúan estanques con una suspensión de microorganismos que forman un barro o lodo activado. Se agrega el agua contaminada y los microorganismos van descomponiendo los contaminantes en sustancias simples, o asimilando otras sustancias en su interior. Posteriormente se efectúa una decantación para separar los lodos, se obtiene agua tratada y parte de los lodos se envía de nuevo al estanque. Los lodos a reusar son estabilizados previo contacto con el agua residual.

Para que el sistema funcione, debe contar con agitación y aireación adecuada. También se suelen agregar nutrientes para promover la actividad de los lodos.

El sistema tiene muchas variantes, que tienen distintos sistemas de aireación, concentración de lodos, y caudal de ingreso de aguas residuales. Los más avanzados

utilizan oxígeno puro en un sistema hermético y con una campana se extraen los gases producidos (Rubens, 2003, pág. 82).

Sistemas de película fija: en este sistema, las partículas activas forman una película que está adherida en paredes o en rellenos de distinto tipo. Al pasar el agua residual por estas paredes o rellenos, entra en contacto con las películas microbianas y se va depurando (Emilio, 2003, pág 8).

Los tratamientos de tipo biológico son adecuados para aguas residuales con alto contenido de materias orgánicas, pero no están limitados a ellas. Se conocen bacterias capaces de asimilar metales pesados y fosfatos. De hecho, casi cualquier residuo puede ser descompuesto mediante algas o bacterias adecuadas, ya sean naturales u obtenidas artificialmente por ingeniería genética (Rubens, 2003, pág. 82).

1.6. El nitrógeno

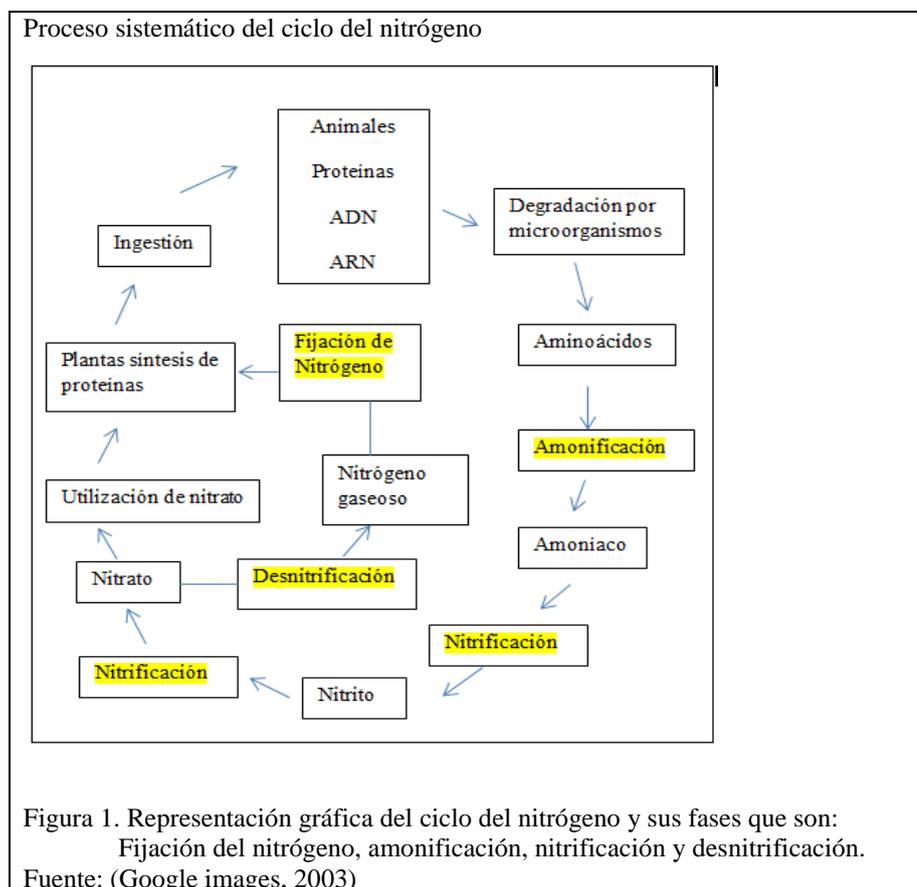
El nitrógeno es un elemento biogénico que se encuentra asociado en moléculas orgánicas y desempeña funciones vitales para toda célula. Este elemento es un constituyente básico de aminoácidos, ácidos nucleicos, azúcares aminadas y los polímeros que estas moléculas forman, de número atómico 7, símbolo N y que en condiciones normales forma un gas diatómico (nitrógeno diatómico o molecular) que constituye del orden del 78% del aire atmosférico (Cervantes, 2009, pág. 34).

Es un componente esencial del ADN, del ARN y de las proteínas. Todos los organismos requieren nitrógeno para vivir y crecer. A pesar que la mayoría del aire que se respira es N_2 , la mayoría del nitrógeno en la atmósfera no está al alcance para el uso de los organismos, debido al fuerte enlace triple entre los átomos N en las moléculas de N_2 , el nitrógeno es relativamente inerte. En realidad, para que las plantas y los animales puedan usar nitrógeno, el gas N_2 tiene primero que ser convertido a una forma química disponible como el amonio (NH_4^+) el nitrato (NO_3^-), o el nitrógeno orgánico. La naturaleza inerte del N_2 significa que el nitrógeno biológico disponible es, a menudo, escaso en los ecosistemas naturales. Esto limita el crecimiento de las plantas y la acumulación de biomasa (Hellings, 1998, pág. 67).

En el agua los compuestos nitrogenados provienen fundamentalmente de la degradación de la materia orgánica muerta, que a su vez ha sido absorbida de la atmósfera para su metabolismo (Pozo, 2008, pág. 56).

En condiciones del medio alteradas, los aportes adicionales de nitrógeno proceden mayoritariamente de los vertidos urbanos y de ciertas instalaciones industriales, así como del uso creciente de fertilizantes y pesticidas en la agricultura (Miller, Pardo y Mejía, 2000, pág. 26). El nitrógeno presente en el medio acuático puede existir en cuatro formas diferentes: nitrógeno orgánico, nitrógeno amoniacal, compuesto en forma de nitritos, compuesto en forma de nitratos (Pozo, 2008, pág. 56).

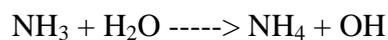
1.6.1 El ciclo del nitrógeno



El ciclo del nitrógeno involucra la conversión enzimática de compuestos nitrogenados encontrados en el suelo, y del nitrógeno gaseoso de la atmósfera, en

compuestos inorgánicos de nitrógeno que son utilizados por las plantas para la síntesis de estas macromoléculas. El ciclo posee cuatro fases distintas:

- Fijación de nitrógeno: combinación química de nitrógeno libre (N₂) con otros elementos para formar nitrógeno fijado (compuestos conteniendo nitrógeno).
- Amonificación: Degradación secuencial de compuestos orgánicos nitrogenados como por ejemplo los aminoácidos y la liberación de amonio.



- Nitrificación: es la oxidación del amonio a nitrito (NO₂⁻) y luego a nitrato (NO₃⁻), una forma nutricional de nitrógeno que puede ser asimilada por las plantas.
- Denitrificación: la denitrificación es un proceso de respiración anaerobia, donde el nitrato es utilizado como aceptador alternativo de electrones en lugar de oxígeno, reduciéndose a óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N₂O) o nitrógeno molecular (N₂). Dado que estos compuestos nitrogenados son gases poco solubles, los mismos no se incorporan al material celular, sino que escapan a la atmósfera. Este proceso, también conocido como trayecto disimilativo de nitrato, es llevado a cabo exclusivamente por eubacterias. Los siguientes géneros bacterianos contienen especies que demuestran la habilidad de llevar a cabo el proceso de denitrificación: *Bacillus*, *Chromobacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Hypomicrobium*, *Achromobacter*, *Moraxella*, *Paracoccus*, *Alcaligenes* y *Aquifex*. Este último género corresponde a bacterias hipertermofílicas y quimiolitotróficas obligadas (Muñoz A. , 2008, pág. 12).

1.7 Nitritos y nitratos

El nitrato y el nitrito son iones que forman parte del ciclo del nitrógeno. Son compuestos solubles que contienen nitrógeno y oxígeno.

“El nitrito es el radical univalente NO_2 o un compuesto que lo contenga, tal como una sal o un éster de ácido nitroso.” (Gijzen y Mulder, 2001, pág. 215).

La cantidad de nitritos depende de si el medio es oxidante o reductor y de la presencia de los organismos capaces de provocar la transformación en uno u otro compuesto. En aguas superficiales, bien oxigenadas, el nivel de nitritos no suele superar 0.1 mg/L (Stumm y Morgan, 1981, pág. 86). El nitrito se halla en un estado de oxidación intermedio entre el amoníaco y el nitrato (Wolfe y Patz, 2002, pág. 123).

Esto ocurre por la intervención de bacterias del género *Nitrosomonas*, que oxidan el NH_3 a NO_2^- . Los nitritos son oxidados a nitratos NO_3^- mediante bacterias del género *Nitrobacter* (Birge, 2000, pág. 24), como ya se explicó en el ciclo del nitrógeno

En general la concentración de nitritos en el agua superficial es muy baja, pero puede aparecer ocasionalmente en concentraciones inesperadamente altas debido a la contaminación de fuentes naturales: Procesos de mineralización y nitrificación de la materia orgánica por las bacterias del género de las *Nitrosomonas*. Procesos de denitrificación, y fuentes antropogénicos: Aguas residuales de industrias alimentarias (utiliza como conservante de productos cárnicos como el nitritos de sodio y potasio), aguas residuales de industrias metalúrgica (utilizan sales de nitrito), aguas residuales domésticas ya que forman parte de las proteínas y la urea., Utilización de fertilizantes y pesticidas en la agricultura (Albert, 1990, pág. 68).

La presencia de nitritos en el agua es indicativa de contaminación de carácter fecal (Metcalf, 1998, pág. 94).

“Los niveles de nitrito superiores a 0,75mg/L en el agua pueden provocar estrés en peces y mayores de 5 mg/L pueden ser tóxicos, y para la segura preservación de flora y la fauna no se debe sobrepasar los 60 g/L” (Birge, 2000, pág. 79).

El nitrato es un compuesto inorgánico compuesto por un átomo de nitrógeno (N) y tres átomos de oxígeno (O); el símbolo químico del nitrato es NO_3 . El nitrato en

general no es considerado tóxico a menos que llegue a altas concentraciones más de 100 mg/L, es más peligroso cuando es reducido a nitrito (NO_2). Los niveles naturales de nitratos en aguas superficiales y subterráneas son generalmente de menos de 4 miligramos por litro (OMS, 2009, pág. 24).

El nitrato, como se menciona en el ciclo del nitrógeno, es consecuencia de la oxidación (por microorganismos de tipo nitrobacter,) del amoníaco y fuentes similares. Otra fuente de formación es a través de los óxidos de nitrógeno que se generan en las descargas eléctricas de las tormentas a partir del nitrógeno y del oxígeno del aire, el nitrato es altamente soluble y es transportado fácilmente cuando fuentes contaminantes entran en contacto con el agua. Fuentes comunes de contaminación por nitrato incluyen sistemas sépticos, basureros, fertilizantes, estiércol, y material vegetal en descomposición. La precipitación o la irrigación percolan el nitrato de éstas fuentes. Cuando el agua se infiltra en la tierra y corre en la superficie, el nitrato es llevado a las aguas subterráneas y/o a las aguas superficiales. El nitrato alcanza niveles de toxicidad sobre los 100 mg/L En algunos casos de contaminación las concentraciones pueden alcanzar varios cientos de miligramos por litro (Birge, 2000, pág. 98).

Porque el nitrato es fácilmente movilizado en el agua, es considerado a menudo un indicador temprano de que una fuente de contaminación está llegando al efluente (Wolfe y Patz, 2002, pág. 37).

Niveles de nitrato de entre 0 y 40 mg/L son generalmente seguros para los peces. Cualquier valor superior a 80 mg/L puede ser tóxico (OMS, 2009, pág. 5).

1.8. Fitorremediación

Es una tecnología empleada eficientemente en la remoción de nutrientes y metales pesados, implica el uso de microalgas y macroalgas. Radica en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso. Estos compuestos son captados por la biomasa microalgal y pueden ser recuperados mediante su cosecha. Esta capacidad resulta en un sistema de cultivo con dos propósitos: eliminación de contaminantes y producción de biomasa diferentes fines biotecnológicos (Mulbry y Kondrad, 2008, pág. 45), lo cual lo convierte en una técnica interesante en la relación costo-eficiencia.

Contribuye en la remoción de nutrientes de aguas contaminadas por microalgas que asimilan y metabolizan una significativa cantidad de N y P para la síntesis proteica, de ácidos nucleicos y fosfolípidos.

Favorece la remoción de metales pesados, varias especies de microalgas han sido conocidas y estudiadas por su capacidad de retirar metales disueltos (Srivastava y Majumder, 2008, pág. 7). Esto se debe a su carga superficial negativa poseen una alta afinidad por los iones de metales pesados (Voltolina, 1998, pág. 76), introduciéndolos por adsorción, absorción y por formación de fitoquelatinas. Así, la utilización de microalgas en la remoción de metales pesados, se considera un método económico con el resultado de un efluente de agua de alta calidad (Wilde y Beneman, 1993, pág. 108).

La fotosíntesis llevada a cabo por las microalgas durante el día en sistemas de cultivo aumenta los niveles de oxígeno disuelto en el agua. El uso de microalgas ha demostrado ser eficiente en la reducción de DBO y DQO (Liang, 2011, pág. 86), suministrando además de oxígeno a las bacterias aeróbicas que ayudan a la biotransformación (Abdel y Raouf, 2012, pág. 120).

Tabla 3. Microalgas que contribuyen a la degradación de contaminantes ambientales.

Microalga	Microalgas – Agua	Tipos de aguas residuales
<i>Prototheca zopfii</i>	Agua dulce	Degrada hidrocarburos de petróleo
<i>Especies chlamydomonas</i>	Agua dulce	Escisión en aguas residuales
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Agua dulce y salobre	Degradación de colorantes azoicos en aguas residuales
<i>Chlorella</i>	Agua dulce y marina	Digestión anaerobia de residuos lácteos
<i>Ankistrodesmus y Scenedesmus Quadricauda</i>	Agua dulce	Aguas residuales de industrias aceite de oliva y aguas residuales de industrias de papel
<i>Spirulina platensis</i>	Agua dulce y salobre	Tratamiento de aguas residuales domesticas
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Agua dulce	Tratamiento de aguas residuales bajo, obscuras, heterotróficas, y aeróbicas condiciones
<i>Botryococcus braunii</i>	Agua dulce	Tratamiento secundario de aguas residuales en cultivos continuos y discontinuos
<i>Scenedesmus</i>	Agua dulce	Remueve amonio de la digestión anaerobia efluentes que contienen niveles altos de amonio y alcalinidad

Notas: (Rewat, Kumar, y Mutanda, 2011)

1.8.1 Ventajas de la ficorremediación

Son capaces de crecer durante todo el año, por lo que puede ser usado en cualquier momento, es decir poseen alta eficiencia biológica, ya que las microalgas se duplican diariamente. Requieren de energía solar y un medio líquido para crecer. No compiten con tierras cultivables. Permiten atenuar los efectos del calentamiento global al combinar el cultivo con la capacidad de capturar CO₂. El propósito fundamental de aplicar microalgas en el tratamiento de aguas residuales es utilizar y transformar de los nutrientes a biomasa, la captura de CO₂ también trae como consecuencia la producción de oxígeno disuelto, para mejorar la calidad del efluente así como la disponibilidad de éste para oxidación bacteriana de la materia orgánica en sistemas integrales, por medio del ciclo de oxigenación fotosintética de aguas residuales (Oswald, 1998, pág. 167). Cadwell, en 1940 reportó los primero estudios sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos depuradores de aguas

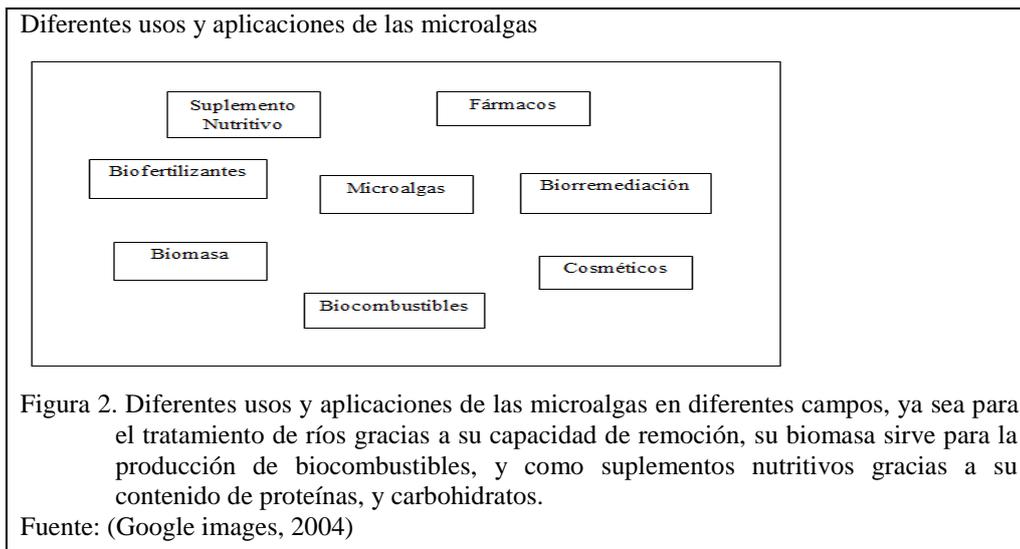
residuales, debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos contenidos en estas aguas, para favorecer el crecimiento de las microalgas, funcionando este como medio de cultivo (Méndez, Albarracín, Cravero, y Salomón, 2010, pág. 230).

Este tipo de microalgas tienen la capacidad de remover contaminantes de tres formas: por transporte difusivo del medio a la superficie celular, por el transporte advectivo debido al movimiento del agua en el microambiente de la célula y por reacciones químicas, de esta manera incorporan nitrógeno de preferencia en forma de amonio, incorporándolo directamente en sus células para formar aminoácidos por medio de transaminación. No obstante también tienen la capacidad de incorporarlo en forma de nitrato y nitrito (Contreras, 1994, pág. 56).

1.9 Microalgas

En biotecnología se puede referir a las microalgas como microorganismos que contienen clorofila a y otros pigmentos fotosintéticos, capaces de realizar fotosíntesis oxigénica (Abalde, 1995, pág. 12). Son organismos autótrofos unicelulares, de muy variada morfología y fisiología que habitan diversos ambientes acuáticos en todos los ecosistemas del planeta. Son fuentes de biomoléculas y metabolitos secundarios de gran importancia económica, también constituyen una fuente directa de alimento, medicamentos, forraje, fertilizantes y combustible, e inclusive, como indicadoras de contaminación (Liang, 2011, pág. 38).

Las microalgas representan un sistema muy eficiente para la bioconversión de la energía luminosa, unido a la utilización de los elementos nutritivos (nitrógeno, potasio y fósforo), el aporte de oxígeno y una producción de biomasa que puede ser utilizable en diferentes áreas en la industria. Las microalgas han adquirido gran importancia en los últimos años ya que presentan la solución a diversos problemas en aspectos de alimentación, producción de biomasa y metabolitos de alto valor agregado de origen natural. Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial (Chapman y Guellenbeck, 1998, pág. 26).



Las aguas residuales de origen doméstico, animal o industrial han constituido un medio apropiado para el crecimiento de microalgas, las que crecen rápidamente en estos medios alternativos (Abalde, 1995, pág. 15).

Las microalgas representan una alternativa para el tratamiento de aguas residuales por su capacidad de remoción de nutrientes y alto valor comercial de la biomasa producida (Chapman y Hall, 1992, pág. 34), siendo una fuente proteínica con posibles aplicaciones en la nutrición humana y como complemento de piensos animales, debido básicamente a sus elevados contenidos proteicos, potenciados por el hecho de poseer un buen balance de aminoácidos y bajos valores de ácidos nucleicos en comparación con otras fuentes de proteína unicelular (Borowitzka, 1988, pág. 210).

1.9.1. Microalgas clorofitas

Esta clase de microalgas son conocidas como algas verdes. Son una división extremadamente variada. Son la base de la línea evolutiva que conduce hasta las plantas superiores. La mayoría son cosmopolitas y viven en agua dulce: tan solo un 10 % de las especies viven en el mar. La mayoría de algas verdes prefieren aguas mesoprobias (Strebla y Krauter, 1997, pág. 38).

Estas microalgas son de gran interés, y se encuentran especialmente en aguas dulces, agrupan un gran número de géneros distribuidos en varias familias. Muy diversas por su aspecto, son formas unicelulares e inmóviles, solitarias o coloniales, filamentosas

o membranosas, en forma de hojas o tubulares no presentan divisiones celulares vegetativas. Las únicas divisiones celulares se producen en el momento de la formación de las esporas o de los gametos (Strebla y Krauter, 1997, pág. 49).

Dentro de las microalgas clorofitas el género *Chlorella* y *Scenedesmus*, son de las microalgas más estudiadas debido a su alto contenido en grasas y proteínas, fácil adaptación al medio en el que se encuentre, lo cual resulta económico en el tratamiento de efluentes, así como en la remoción de metales pesados (Pellón, 2003, pág. 87).

1.9.2. Reproducción de las microalgas

Las microalgas presentan una amplia variedad de ciclos de reproducción, algunas especies tienen reproducción sexual o asexual, aunque algunas presentan los dos tipos de reproducción. Los ciclos de reproducción pueden llegar a presentar cambios fisiológicos debido a factores del medio ambiente (Abalde, 1995, pág. 27).

- **Reproducción asexual:** Es la más común, se puede empezar a formar una colonia con un fragmento multicelular que se halla desprendido, por lo general este tipo de reproducción es más compleja (Pelezar, 1982, pág. 45). En las microalgas unicelulares suele ser por división simple, originándose dos o más células, en formas multicelulares se lleva a cabo a partir de células vegetativas o por medio de fragmentación. Se conocen varios tipos de reproducción como división binaria, con tiempos de duplicación de una hora o menos para las procariotas, pero de 8 a 24 horas para las eucariotas, gemación, formación de esporas, reproducción vegetativa y partenogénesis (Nason, 1994, pág. 6).

- **Reproducción sexual:** No es tan común, en general ocurre al final de la estación o cuando las condiciones ambientales se vuelven desfavorables (Nason, 1994, pág. 6).

En este ciclo se unen dos células llamadas gametos para dar origen a una célula encargada de perpetuar la especie, por lo general cada gameto se origina de diferentes progenitores (Nason, 1994, pág. 6).

La mayor parte de las algas que llevan a cabo la reproducción sexual caen dentro de tres patrones los cuales se diferencian en la etapa de ploidía del organismo maduro y en el punto en el cual ocurre la meiosis.

En el primer caso el individuo maduro es haploide, la única célula diploide del ciclo es el cigoto y la meiosis ocurre después de la germinación del cigoto (de aquí la meiosis cigótica). En éste tipo de ciclo, el cigoto suele sufrir un periodo de latencia, un estado en el cuál el alga tiene la capacidad de soportar condiciones ambientales adversas, por ejemplo, la desecación de un estanque en el verano. Por lo tanto este tipo de ciclo es más común en las algas terrestres y de agua dulce que en las que viven en el ambiente marino más estable. En el segundo patrón de ciclo de vida el individuo maduro es diploide y sufre meiosis durante la formación de los (Nason, 1994, pág. 7).

Los gametos son los únicos orgánulos haploides en este tipo de ciclo. El ciclo termina por lo general sin pasar por un periodo de latencia. En el tercer patrón del ciclo de vida aparecen individuos de vida libre, tanto haploides como diploides, o que se conoce como el ciclo de vida que incluye una alternancia de generaciones.

La fase haploide (el esporofito) libera gametos, ocurre durante la producción de las esporas en el esporofito (de aquí la meiosis esporica) Las fases haploides y diploides del ciclo de vida pueden parecerse entre sí (una alternativa de generaciones isomorfas) o bien, puede diferir morfológicamente (una alternancia de generaciones heteromorfas) (Nason, 1994, pág. 7).

1.9.3. Parámetros de cultivo de las microalgas

Más que la influencia de un solo parámetro es el conjunto de parámetros lo que crea determinadas respuestas en el crecimiento de las microalgas (Cañizares, 1994, pág. 22). Estos son los límites de tolerancia máximos y mínimos de un organismo a cualquier factor ambiental (Abalde, 1995, pág. 18), es importante conocer las

condiciones óptimas y los límites de tolerancia de una microalga dentro de los parámetros se consideran:

- **Temperatura:** La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C, es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies (Abalde, 1995, pág. 18).
- **pH:** el rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7.0 y 9.0, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo (Abalde, 1995, pág. 18).
- **Luz:** Constituye un factor fundamental en todo tipo de cultivo de microalgas (Abalde, 1995, pág. 19), estas son foto autótrofas encargadas de convertir la energía luminosa en metabólica por medio de la fotosíntesis y sus periodos de exposición a ésta pueden ser: continuos mediante luz artificial continua o discontinuos periodos de iluminación alternados con periodos de oscuridad también con luz artificial o el ciclo natural día y noche (Richmond, 2004, pág. 39). Se necesita una cierta intensidad de luz para que pueda realizarse la fotosíntesis. La tasa de fotosíntesis aumenta con la intensidad luminosa, alcanzándose el nivel de saturación a intensidades variables en función de la especie, después del cual la intensidad se hace limitante, provoca la disminución de la tasa fotosintética y, por tanto, del crecimiento (Abalde, 1995, pág. 19).
- **Agitación:** una suficiente agitación del medio de cultivo es necesaria e incide directamente en el cultivo de microalgas. Cuando los requerimientos están satisfechos y las condiciones ambientales son satisfactorias, la agitación constituye el requisito más importante

para la obtención de altos rendimientos de biomasa microalgal (Becker, 1986, pág. 33). La agitación del medio se produce mediante la acción del aire, éste es provisto por aireadores de acuario de bajo consumo (9 watts) (Abalde, 1995, pág. 20).

- Aireación: Asegura la distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo dejándolos disponibles para su mejor aprovechamiento, mejora la distribución de la luz a las células asegurando que permanezcan fotosintéticamente activas evitando que se sedimenten y previene una estratificación térmica (Abalde, 1995, pág. 20).

- Salinidad: la concentración de sales inorgánicas disueltas, tanto en las aguas dulces como marinas, puede potencialmente afectar al crecimiento de las microalgas en función de su actividad osmótica. El efecto de la salinidad adquiere más influencia cuando se relaciona con otras variables, como temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes. El intervalo de salinidad óptimo para una microalga depende de la especie para microalgas clorofitas la salinidad oscila entre 25 a 35 g/L (Abalde, 1995, pág. 20).

1.9.4. Nutrientes

Fuentes de carbono: el macronutriente más importante es el carbono que constituye el 50% de la biomasa microalgal. El crecimiento microalgal está limitado por la fuente de carbono y se utiliza como tal carbono orgánico e inorgánico (Abalde, 1995, pág. 21). La fuente principal de carbono es el CO₂ aunque algunas microalgas pueden utilizar compuestos orgánicos. El CO₂ es la fuente de carbono celular durante el crecimiento foto autotrófico característico de las microalgas. El CO₂ se suministra generalmente mezclando con aire, produciendo un burbujeo que sirve también en agitación. La mayoría de las microalgas tienen en el medio, aparte del CO₂, CO₃, CO₃H₂ y sus iones, CO₃H⁻ y CO₃²⁻ y sus proporciones dependen del pH, de modo que según aumenta éste las proporciones de HCO₃⁻ y CO₃²⁻ aumenta en relación al CO₂ disuelto. El CO₂ es la fuente de C preferida por las microalgas, dado que difunde

rápidamente del agua al interior de la célula y es utilizable directamente en los procesos de fijación (Abalde, 1995, pág. 21).

Fuente de nitrógeno: el siguiente elemento en importancia es el nitrógeno, ya que después del carbono es cuantitativamente el elemento que tiene una mayor contribución a la materia seca de las células micro algales. La fuente de nitrógeno utilizada suele ser inorgánica (nitratos, nitritos y amonio). Cuando el nitrógeno se incorpora en forma oxidada, como nitrato o nitrito, debe ser reducido antes de que pueda incorporarse en moléculas orgánicas. La reducción del nitrato ocurre en dos pasos catalizados por la nitrato reductasa y la nitrito reductasa (Abalde, 1995, pág. 21).

Otros nutrientes: el fósforo interviene en la mayoría de los procesos celulares de transferencia de energía y de síntesis de ácidos nucleicos. ATP y clorofila. Asimismo es importante la relación N/P. El azufre se toma como sulfato inorgánico y es fundamental para la división celular. La cantidad requerida de calcio varía mucho entre las especies y está relacionada con el tipo de pared celular. El sodio, potasio y cloro son universalmente requeridos por las microalgas, actuando el sodio y el potasio como activadores de enzimas, mientras que el cloro es fundamental para la fotosíntesis. El magnesio forma parte de la molécula de clorofila y determina la agregación. Los micronutrientes son requeridos en el primero para el metabolismo del nitrógeno fotosíntesis y síntesis de citocromos. El manganeso y el cobre forman parte de la cadena de transporte electrónico y son cofactores de muchas enzimas. EL cobalto es necesario en aquellas microalgas que sintetizan la vitamina B, las que no la sintetizan no necesitan el cobalto pero si la vitamina. A veces se requieren bajas concentraciones de tiamina y biotina (Abalde, 1995, pág. 22).

Tabla 4. Valores óptimos para el cultivo de microalgas

	Requerimiento	Valores
Físico-Químicos	Luz	2,000 – 4,000 lux
	Temperatura	16 – 27 °C
	Salinidad	0,37%
	Ph	7 – 9
Nutricionales	C	g/100Ml
	O, H	g/100Ml
	N	g/100mL
	P	g/100Ml
	S	g/100mL
	Na, K, Ca, Mg	g/100mL
	Fe, Zn, Mn, B, Br, Si	mg/100mL
	Cu, Co, Cl, I, Sr, Rb, Al.	µg/100mL
	Vitamina (Tiamina, Biotina B ₁₂)	µg/100mL

Nota: (Romero, 2004)

1.9.5. Sistemas de cultivo

En biotecnología de cultivos se debe seleccionar el sistema de cultivos más adecuado para estudios sobre variables ambientales independientes bien sea a través de un diseño experimental simple o factorial, para inducción de algún pigmento, proteínas, lípidos hasta alcanzar fase estacionaria o para la producción diaria de biomasa microalgal (Arredondo, 2004, pág. 45).

En este sentido hay que tener presente el modo de operación de un sistema de cultivo el cual es dependiente del diseño propio del reactor o unidad de cultivo, del modelo cinético de crecimiento del cultivo y del proceso de producción (González, 2011, pág. 66).

Los sistemas más empleados en la actualidad son:

- Discontinuo o batch: se carga con medio de cultivo y con inóculo, hasta que se ejecute el proceso productivo o crecimiento del microorganismo alcanzado la fase estacionaria sin haber incluido más inóculo o más medio nutritivo (Gonzales, 2011, pág. 66). La densidad celular aumenta constantemente hasta el agotamiento de algún factor limitante mientras que otros componentes disminuyen en el medio con respecto al tiempo. En estos cultivos las propiedades de las células,

como el tamaño, la composición de nutrientes y la función metabólica varían considerablemente (Morales, 2012, pág. 11).

- Semicontinuo: una porción del cultivo es retirada (tasa de renovación) y sustituida por medio fresco a diferentes intervalos de hora, logrando así que la población siempre se desarrolle. Esta técnica prolonga los cultivos y además es posible mantener elevadas tasas de división celular, y en los que la composición bioquímica de las microalgas es modulada por la tasa de renovación y disponibilidad de nutrientes. Los parámetros más importantes a tomarse en cuenta en este sistema son: Tasa de renovación, Densidad celular de estabilización, Productividad, Sincronización de la división celular, Concentración de nutrientes, Productividad celular, Composición bioquímica, Tasa de duplicación celular (Morales, 2012, pág. 11).

- Discontinuo alimentado: en este tipo de cultivos el sustrato o nutrientes se añade a intervalos de tiempo predeterminado, pero no se retira volumen alguno, por lo que el volumen del cultivo se incrementa con el tiempo. Las consideraciones que se deben tomar en cuenta son: Si el nutriente que se alimenta es el limitante del crecimiento, esta técnica permite controlar la velocidad de crecimiento del microorganismo. Útil en bioprocesos en los que el crecimiento celular y /o la formación del producto son sensibles a la concentración del sustrato limitante. Sistema de cultivo empleado para evitar fenómenos de inhibición por sustrato y se requiere alcanzar una alta concentración de biomasa (Morales, 2012, pág. 12).

- Continuo: los nutrientes son potencialmente infinitos, los cultivos se mantendrán en un punto determinado en la curva de crecimiento mediante la adición de medio de cultivo fresco. En este, se alimenta una línea de entrada F1 o alimentación y se drena una línea de salida F2 o lavado de manera que los flujos o caudales de ambas líneas sean iguales y la producción sea continua proporcional a la tasa del crecimiento de las microalgas, mientras se retira un volumen igual del

cultivo. Este tipo de cultivos puede modificar la composición bioquímica de las microalgas en función de la concentración de nutrientes y de la salinidad (Morales, 2012, pág. 12).

1.9.6. Medios de cultivo

El cultivo de todo tipo de microorganismos amerita el uso de medios nutritivos para su crecimiento, mantenimiento, y para estudios bioquímicos clínicos, biotecnológico y ambientales. En cuanto se refiere al estudio de bacterias fotosintéticas, cianobacterias y microalgas, se han diseñado medios genéricos; los cuales contienen todos los nutrientes y en especial a las fuentes de C, N y P; además de oligoelementos, también se han descrito diferentes medios selectivos; cuyos componentes químicos estimulan el crecimiento de ciertos grupos funcionales de estos microorganismos (González, 2010, pág. 22).

1.9.7. Recuento celular en microalgas

La medición de la biomasa es importante en el cultivo de microalgas para tener un recuento directo de la población celular y se puede hacer a través de diferentes métodos. Existen técnicas de conteo para microorganismos fotosintéticos: método de turbidez a una longitud de onda seleccionada, es recomendable para el caso de las bacterias fotosintéticas, o el recuento de unidades formadoras de colonias en medio sólido. En cuanto a la cuantificación de las microalgas y cianobacterias está determinada por su morfología, las unicelulares o coloniales de un bajo número de células, como en *Chlorella* y *Scenedesmus*, pueden ser monitoreadas mediante el uso de cámara de recuento celular, mientras que las filamentosas mediante cámara de Sedgwick-Rafter, peso seco, contenido de clorofila, ficocianina, ficoeritrina, o en algunos casos mediante turbidez, cuando la población es homogénea en cultivos líquidos (Bastidas, 2010, pág. 5).

El recuento celular es una de las técnicas más utilizadas dependiendo de la población de microalgas que se obtengan en un cultivo. Existen diferentes métodos para evaluar el crecimiento de los microorganismos, las microalgas unicelulares pueden ser monitoreadas con una cámara de recuento (Neubauer), y las microalgas filamentosas por medio de peso seco o mediante la extracción de clorofilas (Morales, 2012, pág. 8).

Cámara Neubauer: Es una cámara de vidrio utilizada para realizar recuentos de diferentes microorganismos. Conocida también como hematocitometro de 0.1 mm, de profundidad con rejilla Neubauer, la cual consta de 9 cuadrados lados de 1 mm, cada uno de los cuales corresponden a un volumen de 0.1 μ L. Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadrados pequeños.

Para células más grandes de 6 μ m y con cultivos relativamente poco concentrados, se aconseja que los recuentos sean en los cuatro cuadrantes denominados A, B, C y D (Arredondo y Voltolina, 2000, pág. 8).

Fórmula para determinar el recuento celular (Guillard, 1973, pág. 8).

$$DC = N/4 \times 10.000 \times (F.d.)$$

DC= Densidad celular (x 10 cel/mL.)

N= Promedio de células presentes en 1 mm (0.1 μ L).

Este número de célula se divide de acuerdo al número de cuadrantes contados.

10 = Factor de conversión de 0.1 μ L a 1 mL.

F. d.= Factor de dilución (cuando se considera necesario diluir la muestra)

F.d: (Volumen inicial +Volumen Final/Volumen inicial) (Arredondo y Voltolina, 2000, pág. 8).

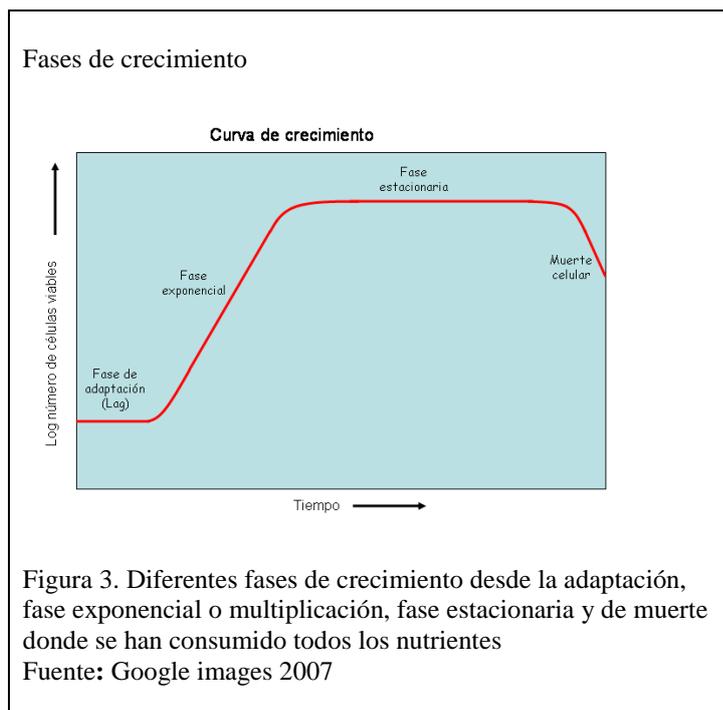
1.9.8. Fases de crecimiento de las microalgas

Existen cinco fases generalmente reconocidas en el crecimiento de población de las microalgas.

- Fase de latencia: en esta fase las células en el cultivo apenas empiezan a absorber los nutrientes los nutrientes presentes en el medio, no se registra un incremento aparente en el número de células debido a que las células viables no se encuentran en condiciones adecuadas para dividirse inmediatamente debido a la necesidad de un ajuste bioquímico (Fulks y Main, 1991, pág. 67).

- Fase exponencial: es la fase en que la reproducción celular es extremadamente rápida y constante, de tal manera que el crecimiento de la población celular es exponencial. Si se controla la dilución del cultivo esta se puede controlar por semanas. Es recomendable cosechar células durante esta fase si se van a usar como inóculos ya que se dividen más rápidamente (Fulks y Main 1991, pág. 67).
- Fase de desaceleración: el crecimiento de la población celular continua en esta fase pero en una proporción menor, disminuyendo la tasa de crecimiento, esto se puede deber a factores tales como: Alteración del pH del medio, agotamiento de los nutrientes, reducción de la intensidad de la luz y auto inhibición debido a la producción de metabolitos tóxicos, entre otros (Fulks y Main 1991, pág. 67).
- Fase estacionaria: durante el periodo de esta fase no hay un aumento de la población celular, ya que el número de células permanece relativamente constante (Fulks y Main 1991, pág. 67).
- Fase de muerte: en esta etapa la disminución progresiva de las células viables es evidente, propiciando el inevitable fin del cultivo. Al incrementarse el número de células muertas y las condiciones desfavorables como el aumento de número de bacterias, hongos y espuma, producto de la división celular, genera el colapso final del cultivo (Fulks y Main 1991, pág. 67).

Todas las fases dependen del estado nutricional de las células. La duración de cada fase de crecimiento puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse dependiendo de diferentes factores como son: la intensidad de la luz, temperatura, composición del medio de cultivo, estado fisiológico de la microalga y tamaño del inóculo (Fulks y Main, 1991, pág. 68).



1.9.9. Microalga *Chlorella*

Esta microalga fue descubierta en 1890 por M. W. Beijerinck, pertenece al reino eucariota (Bourrelly, 1990, pág. 154). Tiene forma esférica, posee un cloroplasto dentro de una fina membrana alrededor de su pared; se encuentran solitarias o en colonias; poseen un cloroplasto lateral con pirenoide carente. Su reproducción es únicamente por auto-esporas, representa un sistema biológico ideal para la investigación debido a su alta eficiencia y adaptación en laboratorio (Huss y Morris, 1999, pág. 218). Esta microalga es una de los géneros más abundantes y frecuentes en la flora de las aguas residuales y las lagunas de oxidación, crece rápidamente a elevadas temperaturas y tolera hasta 37 °C (Lincoln y Earle, 1990, pág. 118).

El género *Chlorella*, es una de las microalgas más estudiadas debido a su alto contenido en grasas y proteínas, su rápido crecimiento en medios hostiles permiten una fácil adaptación a cambios bruscos de pH, pueden ser inoculadas como cultivos mono-específicos o mezclados conformando consorcios gracias a que son microalgas muy resistentes, se ha comprobado su adaptación en efluentes a diferentes concentraciones, convirtiéndose en un factor clave en técnicas de ficorremediación, lo cual resulta económico en el tratamiento de efluentes, así como en la remoción de metales pesados (Pellón, 2003, pág. 37).

Vista de *Chlorella* al microscopio

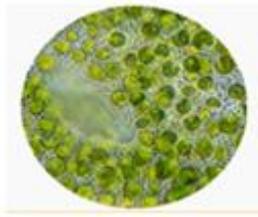


Figura 4. *Chlorella* vista al microscopio lente 40X
Fuente: (Google images, 2002)

Tabla 5. Taxonomía de la microalga *Chlorella*

Reino	Protista
División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Familia	<i>Chlorellaceae</i>
Género	<i>Chlorella</i>

Nota: (Méndez, Albarracín, Cravero, y Salomón, 2010)

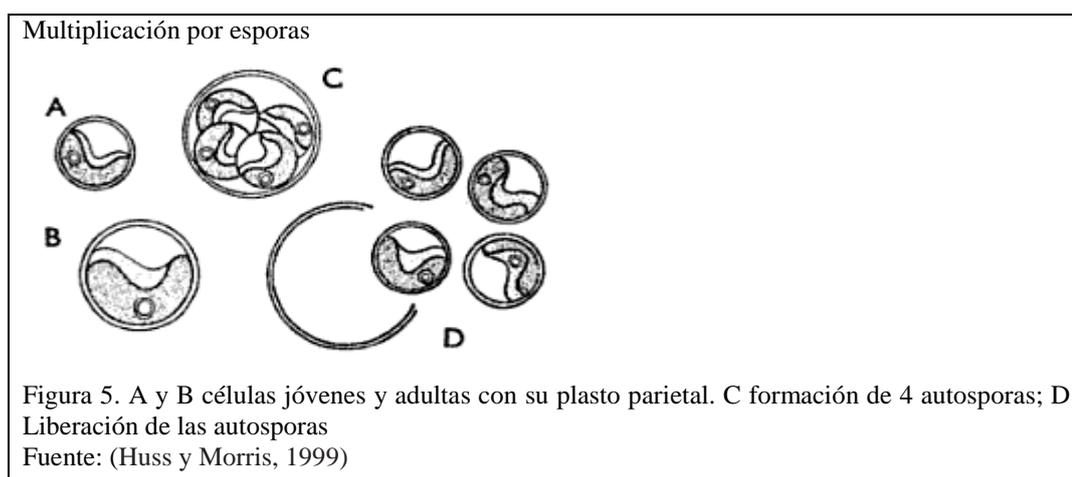
Este género ha sido aplicado en el tratamiento biológico de aguas residuales debido a su gran capacidad de remoción de nitrógeno, fosforo, demanda química de metales y asociación con otros microorganismos (Garza, 2012, pág. 56). *Chlorella* ha ocupado la atención de los biotecnólogos al ser una importante fuente de biomasa para la producción de biodiesel de segunda generación (Cléber y Converti, 2009, pág. 78). Este es probablemente el género de *Chlorococcales* más comúnmente reportado y frecuentemente abundante en aguas ricas en nutrientes, especialmente con un alto contenido de nitrógeno (Wehr y Sheath, 2003, pág 89).

En condiciones normales de cultivo la biomasa seca de *Chlorella*, obtenida a partir de cultivos a cielo abierto, puede llegar a tener un contenido proteico del 50-56%, por lo que constituye una fuente valiosa de proteínas de origen celular (Soeder y Hegewald, 1988, pág. 110), con excelente calidad nutricional, por lo tanto la biomasa resultante puede ser aplicada para diferentes objetivos, incluyendo su uso como aditivo para la alimentación, la extracción de productos de valor añadido, como los carotenoides u otras biomoléculas o la producción de biocombustible. (Hernández, 2004, pág. 11)

1.9.9.1 Reproducción *Chlorella*

Se reproduce de forma asexual (Hoek, 1981, pág 67). Su reproducción consiste en la división en porciones cada vez menores, las células esféricas aisladas contienen un plasto parietal voluminoso provisto de un pirenoide. Cuando estas células han alcanzado su tamaño máximo, el núcleo se divide en 4 o en 8 y se forman en el interior de la célula madre 4 a 8 células más pequeñas, idénticas a ella; son las autosporas (de tipo no motiles) liberadas por deshicencia de la pared de la célula madre, transformándose directamente en nuevas *Chlorellas* al crecer. Este tipo de reproducción asexual es el único conocido en esta microalga; esta reproducción permite un aumento rápido del número de individuos aproximadamente cada 6 a 8 horas se encuentran multiplicandos, cuando estos se encuentran en el agua que contiene las sales minerales necesarias y las condiciones de fotosíntesis son favorables. En resumen sus ciclos de vida y necesidades nutricionales son muy simples, al ser unicelulares, la energía se dirige a través de la fotosíntesis al crecimiento y reproducción, ya que no es necesario formar y mantener tejidos y órganos muy complejos (Crawford, 1995, pág 98).

Debido a la facilidad de cultivo puro y de su multiplicación rápida es uno de los géneros de microalgas más estudiada (Dillard, 1989, pág 145).



1.9.9.2. Asimilación de nitrógeno en *Chlorella*

El nitrógeno (N) es un elemento esencial incorporado en muchas macromoléculas, incluyendo proteínas (aminoácidos y ácidos nucleicos). *Chlorella* puede utilizar una

gran variedad de compuestos de nitrógeno orgánico e inorgánico. Sin embargo las fuentes principales su crecimiento son el amonio y sales de nitrato, nitrito y a veces urea. Cuando el amonio y nitrato se suministran juntos, las microalgas preferentemente utilizan en primer lugar el nitrógeno del amonio que se incorpora en los compuestos orgánicos producidos por la microalga. La absorción de los iones NO_3 conduce a un aumento en el pH del medio mientras que el consumo de los iones NH_4 conduce a una disminución en el pH (Oh Hamma y Miyachi, 1992, pág 67).

- Reducción de nitrato y nitrito

Cuando el nitrato es la fuente de nitrógeno, las células de *Chlorella* lo transportan a través de su membrana para posteriormente ser reducido a amonio, antes de la incorporación en compuestos orgánicos. Estudios realizados en plantas superiores y microalgas sugieren que sólo dos enzimas, la nitrato reductasa (NR, EC 1.6.6.1-3) y nitrito reductasa (NiR; EC 1.7.7.1) trabajan de forma secuencial para catalizar la reducción total de nitrato a amonio. La asimilación de NR cataliza la reducción nitrato a nitrito, utilizando nucleótidos piridina reducidos como donadores de electrones. NiR cataliza el segundo paso de la asimilación de nitrato, la reducción de nitrito a amonio, con ferredoxina como donador de electrones en una reacción que implica la transferencia de seis electrones. NiR es una enzima de los cloroplastos mientras que NR se encuentran especialmente en el citoplasma. En la mayoría de las microalgas, la nitrato reductasa (NR) se expresa plenamente en cultivos de células que crecen en nitrato como única fuente de nitrógeno y es reprimida en las células que crecen en medios que contienen exceso de amonio o una mezcla de amonio (Marquéz, 2013, pág. 5).

- Asimilación de amonio

El amonio es la fuente de nitrógeno preferida por microalgas. También es la fuente más eficiente energéticamente, ya que requiere menos energía para su captación. La asimilación de amonio es un proceso bioquímico fundamental para el crecimiento así como el

desarrollo, y están implicadas dos rutas enzimáticas. La más importante es la glutamina sintetasa, y la otra es la animación reductiva reversible de α -oxoglutarato, catalizada por la glutamato deshidrogenasa, que funciona como ruta auxiliar. La vía glutamina sintetasa es considerada como la principal vía de asimilación de amonio, mientras que la función de la vía glutamato deshidrogenasa sigue siendo obscura, y se cree que se activa bajo condiciones de estrés (Marquéz, 2013, pág. 5).

Glutamina sintetasa (glutamato amonio ligasa) es conocida por su gran afinidad por el amonio y por incorporar de manera eficiente el amonio en aminoácidos. Esta encima juega un doble papel al proporcionar glutamina, se forma mediante la adición de NH_4 en el grupo carboxilo y del ácido glutámico en una reacción catalizada por esta enzima. Es ampliamente distribuida en las plantas y se produce en dos formas principales, uno en el cloroplasto y otra en el citosol. La forma glutamina sintetasa de plásmidos está ampliamente distribuida en el cloroplasto y es generalmente considerado como universal

Glutamato sintetasa son enzimas esenciales en la asimilación de amonio en las plantas y las bacterias, en los que catalizan la formación de dos moléculas de l-glutamina y α -oxoglutarato. Se distinguen 3 clases distintas de glutamato sintetasa: una glutamato sintetasa ferredoxina- dependiente (FD-GITS), una enzima hierro azufre y que contiene ferredoxina - detectado en los cloroplastos de plantas superiores, cianobacterias y algas. Una glutamato sintetasa dependiente de NADPH (forma oxidada de nicotinamida adenina di nucleótido fosfato) (NADPH glutamato sintetasa), en su mayoría se encuentra principalmente hongos, animales inferiores, y los tejidos no verdes, como la nitrogenasa en glutamina y glutamato puede ser inhibida por la metionina sulfoximina.

En la vía alternativa la glutamato deshidrogenasa, cataliza la formación de glutamato directamente de NH_4 y α - oxoglutarato. *Chlorella* contiene dos iso enzimas de deshidrogenasa en glutamato:

nicotinamida adenina di nucleótido fosfato–glutamato deshidrogenasa localizado en la mitocondria y a - oxoglutarato nicotinamida adenina di nucleótido fosfato–glutamato deshidrogenasa localizada en el cloroplasto, dependiente de la inducción de luz y amonio se somete a la inactivación rápida después de la eliminación de amonio a partir de células inducidas por completo.

Glutamina sintetasa tiene una mayor afinidad por el amonio (30mm), comparada con la glutamato deshidrogenasa (40mm), lo que significa que las funciones de glutamina sintetasa son mayores, incluso a niveles muy bajos de amonio (Marquéz, 2013, pág. 5).

1.9.9.3. Usos y aplicaciones de *Chlorella*

Los usos y aplicaciones de *Chlorella* se pueden generar en diferentes campos como: Agricultura (Fijación de nitrógeno, biofertilizantes, ciclos de nutrientes), Alimentación (Biomasa, suplementos), salud (Tratamiento, prevención), medio ambiente (Biocombustibles, biorremediación, bio indicadores), biotecnología (Producción de fármacos, pigmentos, suplementos dietéticos) (Mendoza, 2003, pág. 15).

- **Farmacéutico:** *Chlorella* contiene un porcentaje más alto de clorofila en el mundo vegetal conocido 1.7 a 7.0%. Su molécula de clorofila es muy similar a la molécula de hemoglobina, y actúa como un limpiador en riñones, hígado y corriente sanguínea, es un buen destoxicante de la sangre, tiene un alto contenido de hierro que es un elemento esencial para el transporte de oxígeno en la sangre. Por muchos años ha sido conocido como normalizador de la presión sanguínea, los experimentos del laboratorio han mostrado que su uso regular reduce la presión sanguínea alta. El ácido eicosapentaenoico (EPA) es capaz de disminuir el colesterol en la sangre y es posible obtenerlo de esta especie de microalgas que es superior en pureza, olor y menor costo de producción que el de otras fuentes. *Chlorella* produce el B-1,3 glucano, el cual tiene una respuesta inmunológica muy importante para la salud humana además de reducir la concentración de lípidos en sangre (Kano y Kazie, 2005, pág. 10).

- **Nutricional:** en varios países como Japón ha sido explotada como complemento nutricional, por su composición química: *Chlorella* es alta en proteínas y otros nutrientes esenciales, aproximadamente 55% de proteína, 20% de grasa, 20% de carbohidratos, 5% fibra, y un 10% de minerales y vitaminas (Kano y Kazie, 2005, pág. 12). Esta microalga contiene 19 aminoácidos incluidos los más esenciales para la vida humana, todas las principales vitaminas, excepto la vitamina D, y todos los principales minerales, y suficiente beta caroteno y xantofilas para que sea un poderoso antioxidante, su contenido en clorofila puede ser desde 1.7 a 7.0%. de clorofila, es rica en hierro de fácil asimilación, gracias a la presencia natural de vitamina C y clorofila. (Becerra y Monzoy, 1992, pág. 13). La estructura genética de *Chlorella* se considera la responsable de su alto valor nutricional, facilidad de cultivo y su asombrosa tasa de crecimiento, ya que se estima produce de 40-50 ton/acre/año. En condiciones normales de cultivo la biomasa seca de *Chlorella*, obtenida a partir de cultivos puede llegar a tener un contenido protéico, por lo que constituye una fuente valiosa de proteínas de origen celular (Soeder y Hegewald, 1988, pág. 64), con excelente calidad nutricional.
- **Biorremediación:** este género ha sido aplicado en el tratamiento biológico de aguas residuales debido a su gran capacidad de remoción de nitrógeno (amonio, nitratos y nitritos), fosforo, demanda química de metales y asociación con otros microorganismos (Garza, 2012, pág 59). *Chlorella* suple suficientemente todo requerimiento de oxígeno; remueve eficientemente el bióxido de carbono, elimina nocivos tóxicos de mal olor provenientes del aire, y ha demostrado ser eficiente en la remoción de metales como: Cd, Zn, Cu, Ag, Pb, Hg, Ni y Cr (Kojima y Lee, 2001, pág. 310). La capacidad de las microalgas para degradar contaminantes orgánicos peligrosos es bien conocida en este género de microalga y ha sido utilizadas con éxito para el tratamiento de aguas residuales (Abeliovich, 1986, pág. 54).
- **Acuicultura y agronomía:** esta microalga por poseer las siguientes cualidades: es de fácil manejo, tiene una alta capacidad de reproducción, es rica en proteínas, lípidos y ácidos grasos, es ampliamente utilizada en acuicultura como por ejemplo en la alimentación de larvas de camarón y langostino, como alimento para rotíferos, debido a su valor nutritivo y digestibilidad, además de su capacidad

para crecer en cultivos masivos, también su uso se extiende hacia la producción de biofertilizantes, específicamente en cultivos de interés agronómico.

- **Biocombustible:** *Chlorella* ha ocupado la atención en la biotecnología al ser una importante fuente de biomasa para la producción de biodiesel de segunda generación (Converti, Casazza, y Perrego, 2009, pág. 48). En la actualidad se ha detectado el uso de lípidos de *Chlorella* para la producción de biodiesel, ya que es una alternativa que asegura satisfacer o reemplazar la demanda global de petrodiesel. Esta tecnología es prometedora dadas las ventajas que ofrece en contraste con las plantas oleaginosas, tales como: mayor eficiencia fotosintética; eficacia superior en la asimilación de nutrientes; y periodos cortos de producción sostenida durante todo el año, a causa de los breves tiempos de duplicación (Cléber, 2006 y Converti, 2009, pág. 76).

1.9.10. Microalga *Scenedesmus*

El género *Scenedesmus* fue descrito por primera vez por Teodorico en 1905, y su nombre fue otorgado por M. F. Dunal, que fue el primero en reconocer éste género posee 29 especies y una gran cantidad de variedades aún no muy bien definidas.

Todas las algas de este género son unicelulares pero se diferencian enormemente en tamaño y forma. Sus dimensiones varían entre 8 y 25 μm de largo y 5 y 15 μm de ancho. Forma cenobios, ordenadas linealmente, elipsoidales a cilíndricos con polos más o menos redondeados, su pared celular posee verrugas que se unen formando cortas costillas con la forma de una C mayúscula, la pared celular es lisa, cloroplasto parietal con un pirenoide de almidón (Becerra y Monzoy, 1992, pág. 13).

Pueden ser ovoides, periformes, alargadas o esféricas con una papila apical bien definida cuando se trata de individuos pequeños, y ovoides o elípticas con un estrechamiento en la parte central y una papila apical muy pequeña o ausente cuando las células son grandes. *Scenedesmus* tiene los orgánulos celulares típicos: núcleo rodeado de membrana, mitocondrias, pequeñas vacuolas, golgi y una mancha ocular. Además, presenta un cloroplasto de gran tamaño en forma de copa con un pirenoide

simple embebido en la parte basal. Este pirenoide está rodeado de gránulos de polisacárido que son el producto de reserva (González, 2010, pág. 11).

Su principal característica morfológica es la ausencia de una pared celular rígida de polisacárido. La célula está incluida en una delgada y elástica membrana plasmática y envuelta mucídica. Esto le permite responder rápidamente a cambios osmóticos, alterando su forma y volumen celular. Por otro lado, ésta falta de pared celular rígida aumenta su sensibilidad a fuerzas de tensión externa e impone algunas limitaciones a la manipulación de los cultivos (Mayeli, Nandini, y Sarma, 2005, pág. 88).

Este género de microalga posee una fácil adaptación al medio en el que se encuentre, pueden ser inoculadas como cultivos mono - específicos o mezclados conformando consorcios gracias a que son microalgas muy resistentes a cambios bruscos de pH, se ha comprobado su adaptación en efluentes a diferentes concentraciones, convirtiéndose en un factor clave en técnicas de ficorremediación, lo cual resulta económico en el tratamiento de efluentes, así como en la remoción de metales pesados (Pellón, 2003, pág 84).

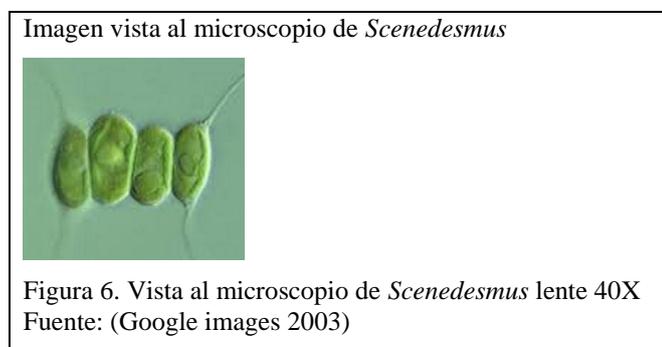


Tabla 6. Taxonomía de la microalga *Scenedesmus*

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

Nota: (Bold y Alexopoulos, 1987)

Es uno de los géneros más comúnmente reportado y frecuentemente abundante en aguas ricas en nutrientes, especialmente con un alto contenido de nitrógeno (Wehr y Sheath, 2003, pág. 22). Por eso también es utilizado en biorremediación de aguas residuales (Martínez, Sánchez, Jiménez, Yousfi y Muñoz, 2000, pág. 36). La remoción de nutrientes y materia orgánica obtenida en las aguas residuales cultivadas con *Scenedesmus* demuestra su efectividad en el tratamiento de las mismas, reportando eficiencias del 100% para nitrógeno, del 78% para fosfatos y del 36% para materia orgánica (González, 2010, pág. 12). También es utilizado en la producción de biodiesel con muy buenos resultados.

1.9.10.1. Ciclo celular de *Scenedesmus*

Las formas de reproducción de la microalga *Scenedesmus* son la clave para entender el proceso de crecimiento de la concentración celular en los cultivos (González, 2010, pág. 11).

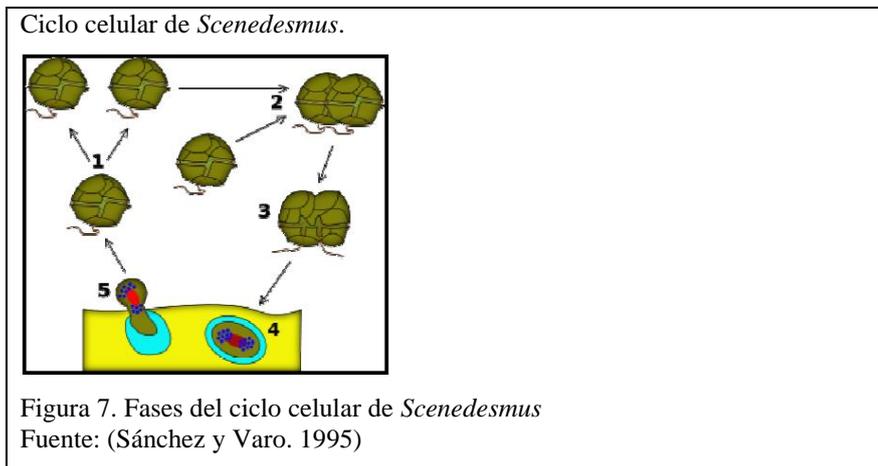
En la reproducción asexual: Las microalgas del tipo *Scenedesmus* se reproducen por división longitudinal independientemente de su tamaño, se los puede llamar individuos grandes e individuos pequeños, en vez de jóvenes y adultos como se designan comúnmente, y mantienen la actividad celular durante la división (Sánchez y Varo, 1996, pág. 56). Esta división realiza mediante la formación de auto colonias o cenobios en el interior de cada célula adulta. Dichas auto colonias quedan en libertad por ruptura de la pared de la célula madre y después alcanzan gradualmente el tamaño y la ornamentación característica de la especie (González, 2010, pág. 12).

En la reproducción sexual: Las células hijas originadas de este modo mantienen la morfología típica y la estructura de sus células parentales. Cuando se exponen a condiciones que inducen la reproducción sexual (bajo pH, baja temperatura o ausencia de nutrientes), ambos tipos de células responden de distinto modo (Sánchez y Varo, 1996, pág 43).

Los individuos grandes son capaces de conjugarse directamente. Los individuos pequeños atraviesan un estado previo de maduración: la etapa “palmeloide”. En este estado la mancha ocular se desorganiza y todos sus orgánulos quedan embebidos en una capa mucilaginosa. Se consideran a este estado como una estrategia para

facilitar la supervivencia en condiciones desfavorables de crecimiento. (Lurling, 2003, pág. 32)

Cuando se añade medio fresco, las nuevas células son capaces de actuar como gametos. Estos son morfológicamente similares a las células vegetativas pero su cloroplasto no está tan desarrollado (Sánchez y Varo, 1996, pág. 44).



La conjugación lateral y la germinación del cigoto originan de 4 a 8 individuos nuevos. Los individuos grandes derivan de los pequeños: en la replicación donde se parte exclusivamente de individuos pequeños, al cabo de 4-5 días de cultivo parecen los dos tipos de células. Además, el número de células grandes aumenta gradualmente durante la fase logarítmica de crecimiento y se hace máximo en la fase estacionaria (González, 2010, pág. 13).

Los quistes son células redondas, de color rojo y gran tamaño que pierden los flagelos, y por tanto, su movilidad. Están rodeados de una doble pared con una superficie de aspecto rugoso (Sánchez y Varo, 1996, pág. 47).

La formación de estas células tiene lugar en cultivos en fase de N_2 y presencia de sulfatos. La intensidad luminosa no parece ejercer ningún efecto, sin embargo, la baja temperatura aumenta su formación. También se ha descrito la formación de aplanosporas cuando se produce la desecación de su hábitat natural lo que ha llevado a pensar que se trata de una estrategia de resistencia a condiciones adversas. La característica más notable de esta forma celular es su diferente composición en pigmentos respecto a las células vegetativas, siendo la cantaxantina el carotenoide mayoritario en lugar del β -caroteno. (Sánchez y Varo, 1996, pág. 47).

1.9.10.2. Asimilación de Nitrógeno a las células de *Scenedesmus*

En las microalgas, el proceso de asimilación reductora del nitrato en amonio puede considerarse un proceso foto dependiente, ya que utilizan directa o indirectamente gran parte del poder reductor generado en el cloroplasto. Este proceso consta de dos pasos fundamentales: la incorporación del nitrato y nitrito a partir del medio, y su reducción intracelular, catalizada por la nitrato reductasa (NR) y la nitrito reductasa (Ni_R). Este proceso de asimilación de nitrato y nitrito está regulado a tres niveles: la actividad y capacidad de los sistemas de transporte; la actividad de la NR y la Ni_R, enzimas fuertemente reguladas por las condiciones de luz y la concentración de nitrógeno celular (Ilangovan, 1998, pág. 6).

La fuente de nitrógeno en *Scenedesmus* procede de la reducción del nitrato. El primer paso es la entrada de nitrato al interior de la célula mediado por transportadores específicos (T_N). A continuación, el nitrato es reducido hasta amonio, por la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa (N_R) que cataliza la reducción de nitrato a nitrito con la transferencia de dos electrones, y la nitrito reductasa (Ni_R) que cataliza la reducción de nitrito a amonio con la transferencia de dos electrones (Ilangovan, 1998, pág. 6).

1.9.10.3. Usos y aplicaciones de *Scenedesmus*

- **Biocombustible:** *Scenedesmus* ha ganado gran interés en el escenario energético actual, debido a su rápido crecimiento y a los porcentajes de lípidos que son relativamente altos, hidratos de carbono y su contenido de nutrientes, todas estas propiedades la hacen una excelente fuente de biocombustibles como el biodiesel. La concentración de lípidos reportada para el género *Scenedesmus*, de 15 a 35%, sumada a la facilidad de su cultivo, hacen de esta microalga una opción importante para la producción de biodiesel (Ilangovan, 1998, pág. 8).
- **Biorremediación:** *Scenedesmus* representan una alternativa para el tratamiento de aguas residuales por su capacidad de remoción de nutrientes y alto valor comercial de la biomasa producida, con la obtención de biomasa microalgal de alto valor agregado para alimentación animal como un subproducto (Salazar M. , 2005, pág. 8).

- El género *Scenedesmus* es comúnmente encontrado en los cuerpos de agua y se han estudiado diferentes especies de este género en todo el mundo in vitro debido a su rápido crecimiento y facilidad de manejo, esta microalga tiene la capacidad de degradar contaminantes orgánicos en aguas residuales (Oswald, 1988, pág. 305).
- Esta microalga presenta diversas adaptaciones y ciertos mecanismos de tolerancia, los cuales son los responsables de llevar a cabo a través de la membrana, los procesos de adsorción, absorción y desorción. Los metales que más se han estudiados en este tipo de tratamiento son: Cd, Zn, Cu, Ag, Pb, Hg, Ni y Cr. este género también ha demostrado eficiencia en la remoción de amonio, nitrato y fosforo.
- Alimentación y acuicultura: según el perfil de aminoácidos obtenido para la microalga *Scenedesmus* se encuentra que ésta tiene aplicación potencial en la industria de alimentos balanceados para animales, la elevada capacidad de crecimiento de la microalga permite su uso como fuente de alimento en acuicultura, debido a su composición química: proteínas de 24-35 %, lípidos 15-35 %, fibra bruta 10-15 %, minerales 23- 25 % (Hernández y Martínez, 2008, pág. 2). se usa para enriquecer piensos, tanto para acuicultura como para las industrias cárnicas, que se benefician de las propiedades de los carotenoides para mejorar el color de la carne.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio consto de dos fases, una de campo y una de laboratorio que se describe a continuación.

2.1. Localización del estudio

La presente investigación se realizó en los laboratorios del ciencias de la vida de la UPS bloque B tercer piso. Ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, campus el Girón.

La recolección de las muestras se realizó en el río San Pedro, ubicado en el cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, capital Sangolquí. (Ver tabla 7)

Tabla 7. Localización del Río San Pedro

Provincia	Pichincha
Cantón	Rumiñahui
Capital	Sangolquí
Sectores que atraviesa el río	Amaguaña, Sangolqui, San Rafael, Conocoto y Guangopolo
Coordenadas	0°13'S 78°31'O / -0.217, -78.517
Latitud	00°20'18"S
Longitud	78°27'6.06" W
Altitud	2535 msnm
Extensión	137.2 km ²

Nota: (Acurio y Arciniegas 2015)

Ubicación río San Pedro



Figura 8: Vista del río San Pedro desde el satélite
Fuente: (Google Earth, 2015)

2.2 Fase de campo

Dentro de la fase de campo se realizaron dos muestreos: el primero para la recolección de microalgas, y el segundo para la implementación del ensayo.

2.2.1 Georeferenciación de los puntos de muestreo

La toma de muestras se realizó en el puente de la Urbanización Fajardo, aguas abajo y aguas arriba. Previo a la toma de muestras se registró las coordenadas geográficas de los puntos de muestreo mediante el uso de un GPS, estos puntos se presentan a continuación: Pto1/UTM 9964347: Pto2/UTM 9962923: Pto3/UTM 9962067: Pto4/UTM 9960712.

2.2.2 Primer muestreo: recolección de agua con microalgas del río San Pedro

Equipo de muestreo y materiales

- Botas, guantes, mascarilla y pantalones impermeables.
- Cepillo de dientes
- Botellones plásticos de agua de 6L para recolectar la muestra
- Etiquetas y bolígrafo

Procedimiento

- El muestreo se realizó en los puntos georeferenciados anteriormente, donde el agua se encontraba estancada, utilizando equipos de protección personal.

- Con ayuda de un cepillo de dientes se cepilló las piedras para que las microalgas adheridas a ella se separen.
- Se sumergió el botellón a 30cm de profundidad, evitando la influencia de la corriente.
- Se recolectó 4 muestras en botellas de plástico, con un volumen aproximado de 1L.
- La recolección del agua se efectuó a contra corriente para minimizar el efecto de contaminación.
- Cada botella se etiquetó como: muestra 1, muestra 2, muestra 3 y muestra 4
- Se transportó las muestras al Laboratorio de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana. Para posteriores ensayos (INEN, 1998, pág. 5).

2.2.3 Segundo muestreo: recolección de agua para implementación del ensayo

Equipo de muestreo y materiales

- Botas, mascarilla, guantes y pantalones impermeables.
- Botellones de 6L para recolectar la muestra
- Etiquetas y bolígrafo

Procedimiento:

- El muestreo se realizó en los puntos georeferenciados anteriormente, utilizando el adecuado EPPs.
- Se recolectó 16 muestras de agua en botellones de 6L para obtener un volumen de 96L, lo más lejos posible de las orillas, a 30 cm de la superficie o procurando no remover el fondo.
- Se evitó los remansos o zonas de estancamiento.
- Se sujetó el botellón por el fondo en forma invertida.
- Se sumergió el botellón completamente en sentido contrario a la corriente.
- Una vez recolectadas las muestras se las transportó al Laboratorio de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana. Donde todas las muestras fueron mezcladas en un tanque de 100 L de capacidad para posteriores ensayos.

2.3 Fase de laboratorio

Esta fase se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la vida de la Universidad Politécnica Salesiana Bloque B en el tercer piso, ubicado en la provincia de Pichincha, cantón Quito, Campus El Girón, y en el río San Pedro de donde se tomaron las muestras para la realización del estudio.

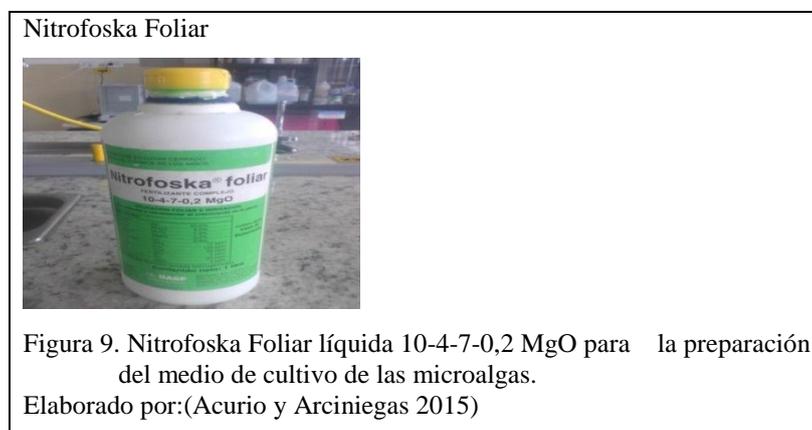
Dentro de esta fase el estudio se dividió en dos etapas:

- Etapa I: identificación de microalgas y producción de biomasa microalgal mediante escalamientos.
- Etapa II: implementación del ensayo de tratabilidad

2.3.1 Etapa I. Identificación y producción de biomasa microalgal mediante escalamientos

2.3.1.1 Preparación del medio de cultivo

Para la preparación de medio se utilizó Nitrofoska Foliar líquida 10-4-7-0,2 MgO (1L), a dos diferentes dosis.



Materiales

- Botella de plástico (6 L)
- Tirillas de pH
- Nitrofoska Foliar 10-4-7-0,2 MgO
- Agua destilada
- Bicarbonato de sodio

- Pipeta Pasteur 4mL

Procedimiento

Dosis 1mL/L: Esta dosis se utilizó solo en el inicio del escalamiento

- Se colocó 5 L de agua esterilizada en un botellón plástico de capacidad de 6L.
- Se añadió (1mL) de fertilizante foliar NITROFOSKA por litro (total 5mL), con una pipeta.
- Se midió el pH mediante las tirillas de pH
- Se ajustó el pH a 8 con 2 g de bicarbonato de sodio

Procedimiento

Dosis 3mL/L:

- Se colocó 5 L de agua esterilizada en un botellón plástico de capacidad de 6L.
- Se añadió (3 mL) de fertilizante foliar NITROFOSKA por litro (total 15mL).
- Se midió el pH mediante tirillas de pH
- Ajustar el pH entre 8 con 2 g de bicarbonato de sodio.

Tabla 8. Dosificación de los medios de cultivo

Medios de cultivo	Dosis Agua destilada	Dosis Nitrofoska	pH
Medio de cultivo 1mL /L	3L	3mL	8
Medio de cultivo 3mL /L	5L	15 mL	8

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

La selección de estas dosis fueron basadas en estudios realizados previamente en los que establece que a menor densidad celular, menor requerimiento de nutrientes (1ml NF/L), y a mayor densidad celular, mayor requerimiento de nutrientes (3ml NF/L), según (Morales, 2012, pág. 3).

2.3.1.2 Identificación de microalgas Clorofitas

La identificación se realizó en las cuatro muestras recolectadas en el primer muestreo (M1, M2, M3, M4).

Materiales y Equipos:

- Porta objetos
- Cubre objetos
- Pipeta Pasteur plástica
- Microscopio

Procedimiento:

- Con una pipeta Pasteur plástica se tomó una gota de cada muestra (M1, M2, M3, M4) y se preparó cuatro placas para realizarla la observación.
- Se colocó la placa en el microscopio y se observó empezando en el lente de menor aumento 4x, hasta llegar al lente de 40x.
- Se observó los caracteres morfológicos microscópicos de las microalgas y se comparó con fuentes bibliográficas de los autores (Streble y Krauter, 1987), y (Morales, 2014)
- Se tomó fotografías de las células observadas en el microscopio.
- Se comparó con fotos de los autores, Streble y Krauter, 1987, y Morales, 2014.
- Con la ayuda del experto en microalgas Dr. Ever Morales, citas bibliográficas, observación y comparación microscópica y se identificó la presencia de *Chlorella* y *Scenedesmus*

2.3.1.3 Recuento celular mediante cámara de Neubauer

El recuento celular se determinó en cada una de las muestras anteriores, cada tres días, durante todo el proceso, mediante el uso de cámara de Neubauer.

Materiales:

- Cámara Neubauer
- Tubos de ensayo
- Pipeta Pasteur
- Agua destilada

Equipos

- Microscopio

Procedimiento

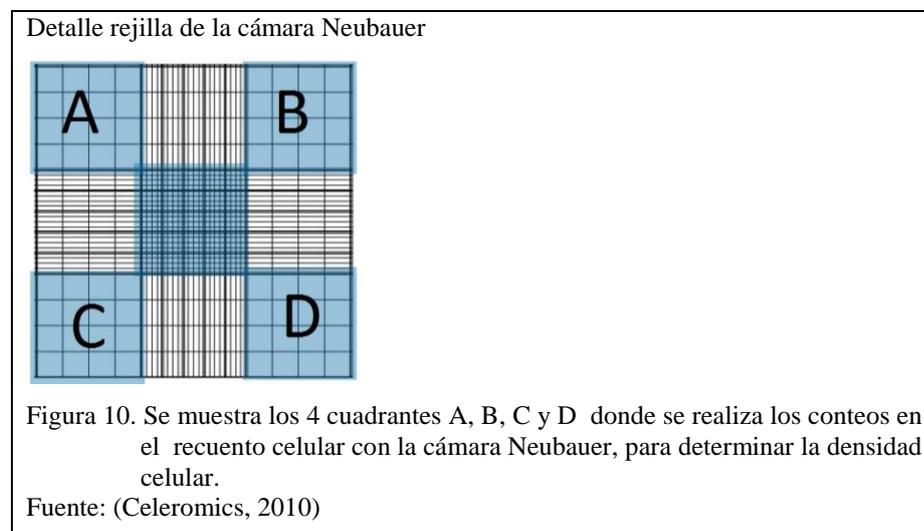
- Se las agito las muestras, para mayor homogenización.
- Se tomó 1mL de cada muestra con una pipeta.
- Se colocó en un tubo de ensayo limpio y seco.
- El tubo se agitó y se succionó la muestra con una pipeta Pasteur
- Se llenó la cámara con el cubreobjetos ya puesto, se colocó la punta de la pipeta Pauster con la muestra en un ángulo de 90 grados.
- Se observó en el microscopio empezando en el lente de menor aumento 4x, hasta llegar al lente de 40x, para proceder con el conteo.
- El registro se hace contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como A, B, C Y D. (Ver figura 12)
- No se consideró las células que están asentadas justo en medio de cualquier línea de los cuadros, sean de las internas o de los laterales, ya que estas generan un error de conteo.
- Se aplicó la fórmula descrita en el marco teórico por los autores Guillard, Arredondo y Voltolina:

$$DC = N/4 \times 10^4 \times (F.d.)$$

$$DC = 882/4 \times 10.000 \times (4)$$

$$DC = 220.5 \times 10.000 \times (4)$$

$$DC = 8'820.000 \text{ Cel/mL}$$



2.3.1.4. Curva de crecimiento del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*

Con los datos del conteo celular (cel/mL), en tiempos sucesivos (3 y 4 días). Se realizó una gráfica de la curva de crecimiento, en el eje de las “Y” los valores del logaritmo de concentración celular y en el eje de las “X” el tiempo.

2.3.1.5. Parámetros de cultivo del consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus*

Los parámetros se controlaron cada 3 días durante todo el ensayo.

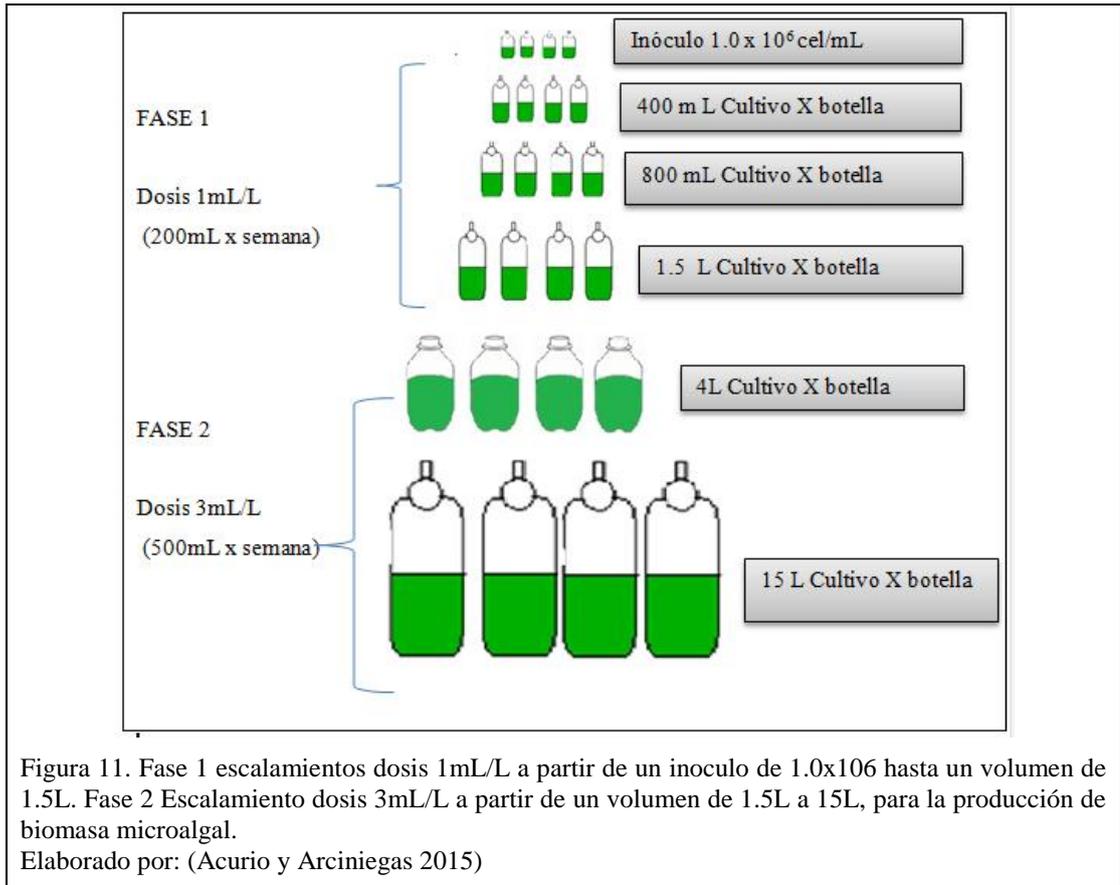
- Para el pH se utilizó tirillas de pH marca MERK.
- La temperatura se midió mediante un termómetro con entrada para sensor de temperatura externo marca S- DHT.
- La intensidad de la luz se determinó mediante el uso de un luxómetro marca FISHER SCIENTIFIC

2.3.1.6. Producción de biomasa microalgal mediante fases de escalamientos

Partiendo del conteo celular realizado anteriormente, se determinó el número de células por mililitro presentes en cada muestra, por lo que los escalamientos se iniciaron con un inóculo de 1.0×10^6 cel/mL.

Se acondicionó un estante con luz artificial 2000 lux, mediante lámparas fluorescentes, un sistema de aireación, que consto de un compresor de aire de 35W de poder en el cual se conectó mangueras de diámetro 1/4", la difusión de aire produjo pequeñas burbujas para proporcionar oxígeno y agitación a las microalgas evitando su sedimentación. Donde se colocaron las botellas en las que se realizaron todos los escalamientos. Para mejor entendimiento (ver figura 11)

Escalamiento de los cultivos



Al concluir la producción de biomasa del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*, todas las muestras se dejaron sedimentar y se decantaron para recolectarlas en un solo bidón de 20L, del cual se tomó el inóculo para la Fase de tratabilidad.

2.3.2. Etapa II: tratabilidad

2.3.2.1 Diseño e implementación del sistema de tratamientos

El diseño constó de 5 tratamientos con tres repeticiones cada uno, distribuido de la siguiente manera:

Diseño de tratamientos

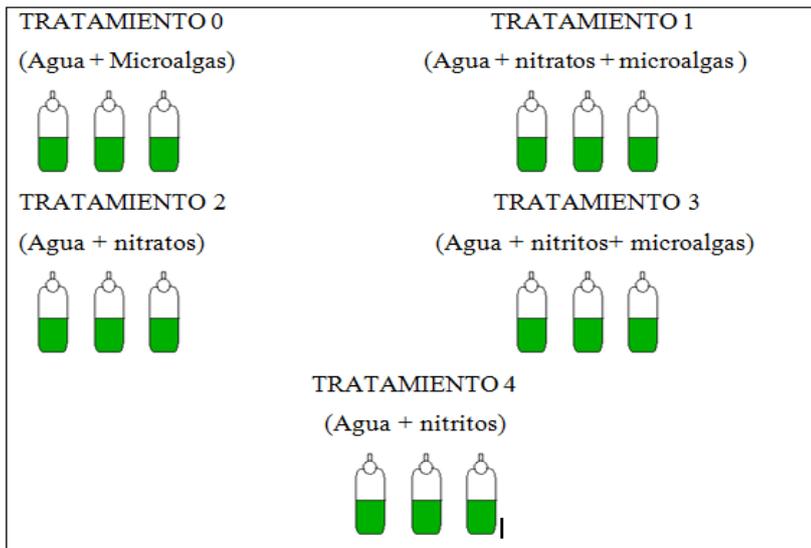


Figura 12. Distribución de los diferentes tratamientos con sus repeticiones y la dosificación respectiva de 20mg/L nitritos , 40mg/L nitratos y 8mg /L de fosfatos
Elaborado por: (Acurio y Arciniegas 2015).

2.3.2.2 Esquema de tratamientos

Para los tratamientos, se utilizó 15 botellones de 6L de capacidad, en los cuales se distribuyó 4L del agua recolectada anteriormente (como se observa en el punto 2.2.2), y tapones de gasa y algodón estériles. En la tabla 9 se muestran las dosificaciones de nitritos, nitratos, fosfatos y el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus* que se adicionaron a cada tratamiento.

Tabla 9. Descripción de la dosificación en cada tratamiento

Tratamientos	Descripción	Nº Repeticiones
T0	Agua río San Pedro: (4L) Microalgas clorofitas: 3×10^6 Cel/ mL.	3
T1	Agua río San Pedro: (4L) Microalgas clorofitas: 3×10^6 Cel/ mL Nitrato de potasio: 40 mg/L Fosfato de Potasio: 8 mg	3
T2	Agua río San Pedro: (4L) Fosfato de Potasio: 8 mg de Nitratos de potasio: 40 mg/L	3
T3	Agua río San Pedro: (4L) Microalgas clorofitas: 3×10^6 Cel/ mL Fosfato de Potasio: 8 mg Nitrito de potasio: 20mg/L	3
T4	Agua río San Pedro: (4L) Nitrito de potasio: 20mg/L Fosfato de Potasio: 8 mg	3

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

2.3.2.3 Caracterización cualitativa y cuantitativa de las muestras de agua del río San Pedro

Para la caracterización de las muestras recolectada anteriormente (como se observa en el punto 2.2.2), se tomó 1L de agua, y se envió al laboratorio Labiotec donde se realizaron los análisis de los siguientes parámetros: DBO, DQO, nitritos, nitratos y fosfatos, siguiendo las técnicas estandarizadas para esos parámetros.

Tabla 10. Parámetros analizados en el laboratorio Labiotec y su metodología

Parámetro	Método	Laboratorio
Demanda Bioquímica de oxígeno	APHA 5220B PTA 1200	Labiotec
Demanda Química de oxígeno	APHA 5210B PEE.03	Labiotec
Fosfatos	APHA 4500-PO4 PEE.23	Labiotec
Nitritos	APHA 4500-NO2-B PEE.219	Labiotec
Nitratos	APHA 4500-NO3-E PEE.19	Labiotec

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

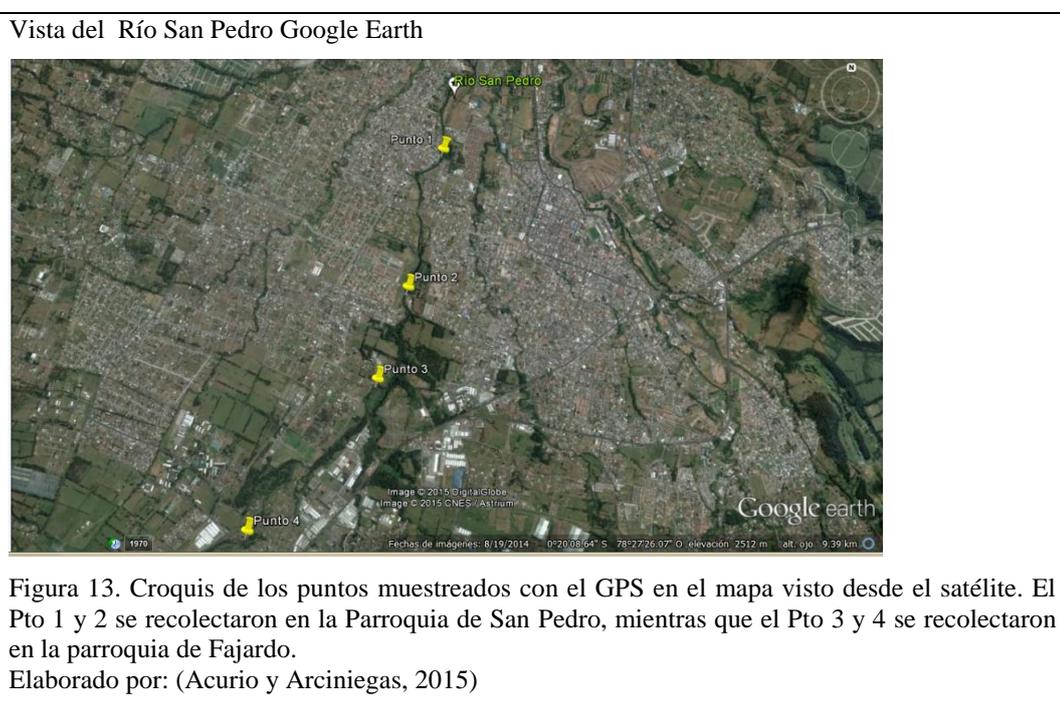
Dentro de la etapa II de tratabilidad cada 6 días durante 18 días se realizó una toma de muestra compuesta, es decir, se tomó 330mL de las tres repeticiones del efluente del río con el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus* para formar una sola muestra compuesta de 1L. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 15 minutos en los laboratorios CIBAVI en la centrífuga para tubos falcon de 50 mL. Ver anexo 11. Posteriormente las muestras fueron enviadas al laboratorio Labiotec, para realizar los respectivos análisis.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se muestra el croquis de los puntos de muestreo, la presencia de microalgas, y la recolección de muestras de agua en el río San Pedro. La identificación de microalgas su cultivo y su posterior uso en la remoción de nitritos y nitratos en las muestras de agua del río San Pedro.

3.1 Croquis de los puntos de muestreo en el río San Pedro



3.1.1. Puntos de muestreo

Tabla 11. Coordenadas geográficas convertidas a partir de UTM

Punto	Longitud	Latitud
Punto 1	78°27'30.02"O	0°19'22.80"S
Punto 2	78°27'38.58"O	0°20'6.42"S
Punto 3	78°27'46.16"O	0°20'34.27"S
Punto 4	78°28'19.64"O	0°21'18.37"S

Nota: (Acurio y Arciniegas 2015)

3.2 Evidencia de microalgas en el río San Pedro

En los diferentes puntos de muestreo del río San Pedro se evidenció una fina capa de color verde claro adherida tanto en las piedras como en las orillas, de esta manera se pudo evidenciar la presencia de microalgas presentes en el río San Pedro. (Ver figura 14 y 15).

<p>Microalgas en el Río</p> 	<p>Microalgas en el agua</p> 
<p>Figura 14. Microalgas adheridas a las rocas del río San Pedro Fotografía tomada por: (Acurio y Arciniegas, 2015)</p>	<p>Figura 15. Microalgas desprendidas con un cepillo en el río San Pedro Fotografía tomada por: (Acurio y Arciniegas, 2015)</p>

3.2.1. Identificación macroscópica del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus* en muestras de agua del río San Pedro

La tabla 12 muestra las características macroscópicas observadas en las muestras tomadas del río San Pedro.

Tabla 12: Características macroscópicas del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus* en muestras de agua del río San Pedro

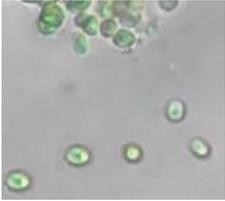
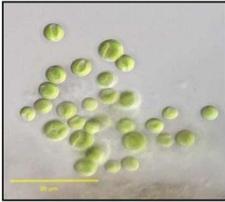
Características		Fotografía macroscópica del consorcio de <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> en muestras de agua del río San Pedro
Apariencia:	Ligeramente turbia	 <p>Figura 16. Imagen que muestra las características macroscópicas de microalgas en muestras de agua del río San Pedro para su identificación. Fotografía tomada por: (Acurio y Arciniegas, 2015)</p>
Color:	Verde	
Textura:	Pastosa húmeda	
Olor:	Característico	

En el fondo de las botellas se observó un sedimento con una textura pastosa húmeda de color verde, el agua era turbia, por lo que se evidenció la presencia de estas microalgas, esta descripción es corroborada por Dakin (1997), quien describe que la asociación y agrupación de las células forman un conglomerado de color verde, con una textura suave y ligeramente pastosa (pág. 56), lo que permite la evidencia macroscópica de las mismas, sin embargo el autor recomienda que para una identificación de géneros es necesario el uso de un microscopio óptico

3.2.2. Identificación microscópica del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus* en muestras de agua del río San Pedro

La tabla 13 muestra la comparación morfológica de la microalga obtenida en el laboratorio y la microalga descrita por Barsanti y Gualtier (2006), para establecer la identificación de *Chlorella*.

Tabla 13: Comparación e identificación morfológica microscópica de *Chlorella* con el lente 40X

<p>Fotografía en laboratorio</p>  <p>Figura 17. Foto microscópica de <i>Chlorella</i> lente 40X Elaborado por: (Acurio y Arciniegas 2015)</p>	<p>Fotografía Referencia bibliográfica</p>  <p>Figura 18. Foto bibliográfica de <i>Chlorella</i> Fuente: (Sandoval, 2003, pág. 7)</p>
<p>Descripción Microscópica</p> <p>Color: Verde Amarillento Forma: Redonda Tamaño: 3-6 μm Membrana: Fina Organización: Aisladas o formando colonias</p>	<p>Descripción Autor</p> <p>Células pequeñas, verde amarillentas, aisladas, o formando colonias flojas, con forma irregular, 3-8 μm de diámetro</p>

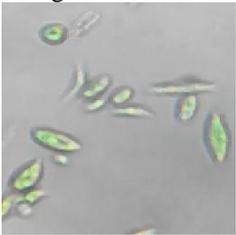
Elaborado por: (Acurio y Arciniegas 2015)

En estas fotografías se aprecian células en forma esférica y elipsoidal, aisladas y formando colonias, con la presencia de una membrana definida, su tamaño aproximado fue de 5 μm , presentó una coloración verde amarillento, el mismo que se presume se debe a los pigmentos producidos por este género para realizar fotosíntesis, Becerra y Monzoy (1992), afirman que “*Chlorella* crece en forma aislada o poco agrupadas, su coloración es verde claro por la presencia de pigmentos fotosintéticos como clorofila a, b y carotenoides, su tamaño varía entre 3-8 μm y presenta una fina membrana”(pág. 18)

Las características descritas, tanto gráfica como bibliográficamente, por Sandoval y en comparación con las células obtenidas en el presente estudio describen a esta microalga como *Chlorella*, ya que, todas sus características morfológicas son similares, tanto su color, la forma y tamaño por lo que se afirma que las células aisladas en el presente estudio pertenecen a la especie de la *Chlorella*.

En la tabla 14 se muestra la comparación morfológica de la microalga obtenida en el laboratorio y la microalga descrita por Pellón (2003), para establecer la identificación de *Scenedesmus*

Tabla 14. Comparación e identificación morfológica microscópica de *Scenedesmus* con el lente 40X

<p>Fotografía en laboratorio</p>  <p>Figura 19. Foto microscópica de <i>Scenedesmus</i> con el lente 40X Fotografía tomada por: (Acurio y Arciniegas 2015)</p>	<p>Fotografía Referencia Bibliográfica</p>  <p>Figura 20: Foto bibliográfica de <i>Scenedesmus</i> Fuente: (Sandoval, 2003, pág. 7)</p>
<p>Descripción Microscópica</p>	<p>Descripción Bibliográfica</p>
<p>Color: Verde Forma: Ovoide, alargada Tamaño: 12 μm Membrana: Fina Organización: Cenobios</p>	<p>Sus tamaño varía entre 8 y 25 μm. Forma cenobios, ordenadas linealmente, elipsoidales a cilíndricos con polos más o menos redondeados, su pared celular posee verrugas que se unen formando cortas costillas con la forma de una C mayúscula</p>

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

En estas fotografías se aprecian células ovoides y elipsoidales, unicelulares, formando cenobios, de 12 μm de largo, su pared celular era lisa y con forma de C, su color fue verde claro. Becerra y Monzoy (1992), quienes describen que todas las algas de este género son unicelulares pero se diferencian enormemente en tamaño y forma. Sus dimensiones varían entre 8 y 25 μm de largo y 5-15 μm de ancho. Forma cenobios, ordenadas linealmente, elipsoidales a cilíndricos con polos más o menos redondeados, su pared celular posee verrugas que se unen formando cortas costillas con la forma de una C mayúscula, y pared celular es lisa (pág. 18).

Las características descritas tanto gráfica como bibliográficamente por el autor y en comparación con las células obtenidas en el presente estudio describen a esta microalga como *Scenedesmus*, ya que, todas sus características morfológicas son similares, tanto su color, la forma y tamaño por lo que se afirma que las células aisladas en el presente estudio pertenecen a la especie de la *Scenedesmus*.

Después de comparar las características e identificar estos dos géneros de microalgas clorofitas, se estableció un consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus* para la producción de biomasa.

3.2.3 Producción de biomasa y cinética de crecimiento en los consorcios de *Chlorella* y *Scenedesmus* en cada muestra.

En la tabla 15, figura 21, se observan los valores promedio de densidad celular alcanzados durante 61 días de producción de biomasa, donde se puede apreciar que el crecimiento de los consorcios es similar entre las muestras, así se obtuvo un volumen de 30'000.000 de cel/mL para la M2, 31'340.000 cel/mL para M3, y 33'070.000 cel/mL para la M4.

Tabla 15. Densidades celulares (cel/mL) alcanzadas en los consorcios de las muestras 1, 2, 3 y 4 durante los 61 días de cultivo.

Días	Consortio M1 1x10 ⁶ cel /Ml	Consortio M2 1x10 ⁶ cel /mL	Consortio M3 1x10 ⁶ cel /mL	Consortio M4 1x10 ⁶ cel /mL
5	6,77	7,97	6,97	6,43
8	7,68	9,65	9,94	6,65
12	8,37	10,34	9,94	9,61
15	8,48	10,80	9,89	11,47
19	7,59	13,20	12,69	13,26
22	6,25	13,88	13,26	14,35
26	4,39	15,30	14,02	16,09
29	1,32	12,37	19,01	18,02
33	0	18,28	20,95	20,24
36	0	24,77	25,62	24,98
40	0	25,69	30,58	30,13
43	0	29,40	34,39	34,80
47	0	30,96	33,62	32,82
50	0	33,61	30,18	30,99
54	0	30,86	29,87	31,32
57	0	29,01	30,39	32,19
61	0	30,00	31,34	33,07

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas 2015)

Curva de crecimiento de la densidad celular

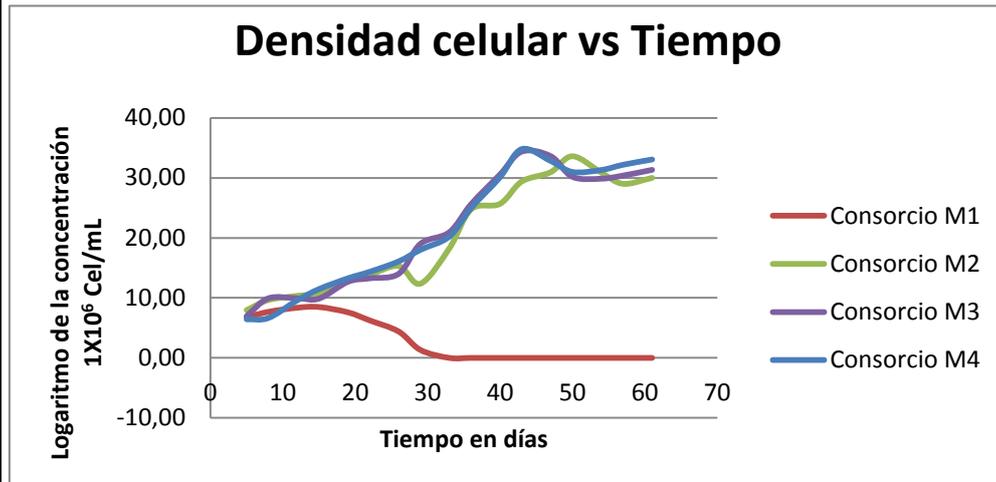
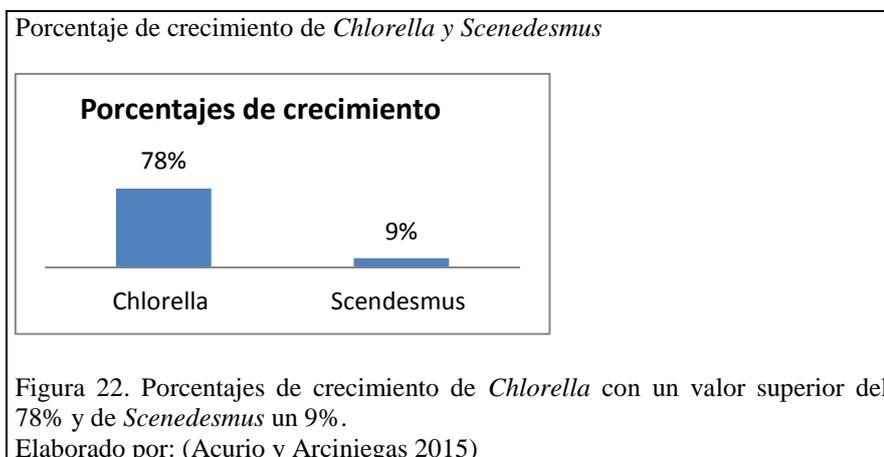


Figura 21. Curva de crecimiento de la densidad celular (cel/mL) de los consorcios durante los 61 días de producción de biomasa y sus diferentes fases de crecimiento.

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

En los consorcio de la muestra M4 se obtuvo un valor máximo de densidad celular de 34'800.000 cel/mL siendo este el mejor cultivo, en la muestra M3 de 34'385.000 cel/mL, y en la muestra M2 un valor de 33'610.000 cel/mL, estos valores se alcanzaron al día 40, por lo que se supone los cultivos se encontraban en fase exponencial, esto pudo deberse a una rápida multiplicación, ya que se reproducen cada 24h, y al ser un cultivo continuo al que se le adicionó Nitrofoska como fuente de nutrientes proporcionó el alimento necesario para su crecimiento. Se han reportado casos de producción de *Chlorella vulgaris* a nivel de escalamiento en los que se ha inoculado a una densidad de 1×10^6 cel/mL, y el máximo crecimiento se ha alcanzado a los 38 días con una producción de 1.09×10^7 cel/mL, equivalente a 4.5 g/L de biomasa, Cervera (2011), valores similares a los alcanzados en esta investigación. Martínez (2005), en su trabajo de cultivo de microalgas en distintos medios de cultivo, (Bold Basal, medios enriquecidos con macro y micronutrientes, Guillard, entre otros), esto indica que microalgas como *Scenedesmus* y *Chlorella* poseen un buen crecimiento en cualquier tipo de medio (pág. 32).

3.2.4 Porcentaje de crecimiento de *Chlorella* y *Scenedesmus* en las muestras de agua del río San Pedro



En la figura 22 se puede observar el porcentaje promedio de crecimiento entre *Chlorella* y *Scenedesmus* en todas las muestras, donde el 78% equivale a *Chlorella* y solo el 9% equivale a *Scenedesmus*, esto puede deberse a que *Chlorella* es una microalga con mayor resistencia y adaptabilidad a distintas condiciones en comparación a *Scenedesmus*. Según Matuk (2007), una de las razones para el predominio de la microalga *Chlorella* es su capacidad de adaptabilidad y resistencia a diferentes medios de cultivo en los que se desarrolla, pudiendo tolerar hasta un pH 3, y una temperatura de 36°C considerándola como un bioindicador de resistencia (pág. 54).

Según Ontaneda (2013), el bajo crecimiento de *Scenedesmus* puede deberse a que el género *Chlorella* produce compuestos alelopáticos llamados chlorelinas, que son antibióticos e inhiben el crecimiento de otras algas (pág. 92).

3.2.4 Parámetros físico-químicos evaluados en el cultivo de microalgas

La tabla 16 muestra los parámetros físico- químicos evaluados durante los 61 días de producción de biomasa del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Tabla 16. Valores promedio obtenidos en el control de los parámetros físico químicos del consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus*, y valores óptimos de crecimiento de un cultivo microalgal.

Parámetros evaluados	Valores promedio obtenidos	Valores óptimos para el cultivo (Abalde, 2012)
Temperatura	20 – 25 °C	16-27 °C
Iluminación	2000 lux	2000-4000 lux
pH	8	7-9
Aireación	Constante	Constante

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas 2015)

La temperatura se mantuvo al ambiente del laboratorio, en un rango de 20–25 °C, según Abalde (2012), el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de microalgas es de 16-27°C (pág. 26), lo que demuestra que el ensayo se mantuvo dentro de los valores establecidos, la iluminación fue de 2000 lux, ya que con valores inferiores a este el crecimiento es retardado y a valores superiores produce un nivel de saturación en las células disminuyendo la tasa fotosintética Abalde (2012), lo que supone permitió que las microalgas tengan un mejor aprovechamiento de la luz para realizar fotosíntesis (pág. 26).

Según Albear, Castillo y Henao (2011), las microalgas son altamente dependientes del pH del medio de cultivo, y el valor óptimo se encuentre entre 7 y 9, el pH obtenido del ensayo fue de 8, lo que supone fue óptimo para su crecimiento, ya que a un pH inferior a 3 puede ser letal, mientras que a un incremento de pH son más tolerantes (pág. 27).

La agitación del medio de cultivo aseguró la distribución homogénea de las células y nutrientes evitando la sedimentación en el fondo del recipiente, mejorando la distribución de la luz, y el intercambio gaseoso entre el medio de cultivo y el aire (Becker, 1995).

Al comparar los resultados obtenidos durante los 61 días de cultivo, con los valores óptimos de crecimiento de las microalgas en consorcio, se observa que ninguno de estos parámetros, físico - químicos estuvo fuera del rango, por lo cual el crecimiento fue positivo y se obtuvo la biomasa necesaria para la implementación del ensayo, dando confiabilidad a la investigación Abalde (2012).

3.3 Caracterización cualitativa y cuantitativa de la calidad físico-química de las muestras de agua contaminada del río San Pedro.

La tabla 17 indica los resultados de la caracterización cualitativa y cuantitativa de la calidad de agua del río San Pedro. La apariencia del agua fue clara y transparente en la superficie lo que supone un nivel bajo de contaminación.

Tabla 17. Caracterización cualitativa y cuantitativa de las muestras de agua del río San Pedro

Parámetros	Resultados	Límite máximo permisible según la ordenanza 404 Quito- Ambiente	Referencia con la norma
Apariencia	Aguas claras y transparentes	Incoloro	CUMPLE
Olor	Agua residual	Inodoro	NO CUMPLE
pH	8	6,5 – 8,5	CUMPLE
DBO	15 mg/L	100mg/L	CUMPLPE
DQO	59 mg/L	200mg/L	CUMPLE
Fosforo	1,80 mg/L	10mg/L	CUMPLE
NO ₃	20,20 mg/L	10mg/L	NO CUMPLE
NO ₂	0,59 mg/L	10mg/L	CUMPLE

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

El olor fue a desechos residuales característico de este tipo de aguas, lo que supone existe presencia de una contaminación que afecta la calidad de agua.

En cuanto a los resultados de las características cuantitativas, el valor de pH fue de 8, de tal manera cumple con los límites permisibles establecidos según la normativa Quito- Ambiente, ordenanza 404 donde el límite es de 6,5 a 8,5. Los autores Sawyer, McCarty y Parkin (1994), establecen que, “el agua residual es alcalina, propiedad que adquieren como resultado del tratamiento de aguas, el agua subterránea, y los materiales añadidos en los usos domésticos” (pág. 56). Este valor indica que el río tiene una gran capacidad de neutralizar los ácidos existentes por las descargas.

En cuanto al DBO el valor obtenido fue de 15 mg/L y el del DQO fue de 59 mg/L por lo que al comparar con en la normativa Quito - Ambiente, ordenanza 404, cumplen con los niveles establecidos. Esto puede deberse al gran poder de autodepuración de las aguas superficiales del río, es decir su capacidad de

biodegradación, caudal, la presencia de oxígeno y de microorganismos en el agua, esto es corroborado por (Orellana, 2005, pág.22).

El valor obtenido de DBO fue de 15mg/L, comparado con los límites permisibles es bajo y aceptable, lo que supone una buena autodepuración del río, sin embargo el valor de DQO indica que existe un indicio de contaminación, esto puede deberse a las descargas de aguas residuales crudas municipales y no municipales que son vertidas en este río. Según Rosales y García (2008), las descargas existentes producen sustancias inorgánicas que se oxidan produciendo una mayor demanda química de oxígeno, por lo tanto sería recomendable manejar y controlar los vertidos y descargas sólidas y líquidas que no han recibido un previo tratamiento, mejorando los niveles de estos parámetros, para de esta manera mantener un bajo contenido de materia orgánica biodegradable y una mejor calidad de agua (pág. 3).

Los valores obtenidos en el caso de los nitratos fue de 20,20 mg/L, por lo tanto no cumple con los niveles establecidos por la normativa Quito- Ambiente, ordenanza 404, esto puede deberse a que existe la presencia de contaminación producida por las descargas líquidas, tanto domésticas como industriales que son desalojadas directamente al río, lo que genera un aumento en la concentración de este compuesto. Según Universidad Central- FIGEMPA, (2012), los nitratos son indicadores de aguas residuales, debido a su muy alta movilidad, por lo que se encuentran en aguas superficiales (pág. 59). Otra causa de que este compuesto se encuentre en mayores cantidades en los ríos es que los nitritos se transforman rápidamente para dar nitratos por lo que este compuesto predomina tanto en aguas superficiales como subterráneas, así como en el ambiente (Castillo, 2004, pág. 15)

En el caso de los nitritos el valor obtenido fue de 0,59mg/L, por lo tanto cumplen con la norma establecida Quito- Ambiente, ordenanza 404, esto puede deberse a que se evaporan con facilidad y se absorbe fácilmente en el sedimentos, es decir se sedimenta muy rápido por lo que son menos detectables. El nitrito en comparación con el nitrato, es menos soluble en agua y menos estable, por lo que es muy reactivo y solo se encuentra en cantidades apreciables en condiciones de baja oxigenación García (1994, pág. 37).

Según Erikson (1985), valores entre 0,1 y 0,9 mg/L pueden presentar problemas de toxicidad, y valores superiores a 1mg/L son totalmente tóxicos (pág. 66).

Según Albert (1990), indica que la concentración de nitritos en aguas superficiales es muy baja pero puede aparecer ocasionalmente en concentraciones elevadas debido a descargas tanto industriales como domésticas.

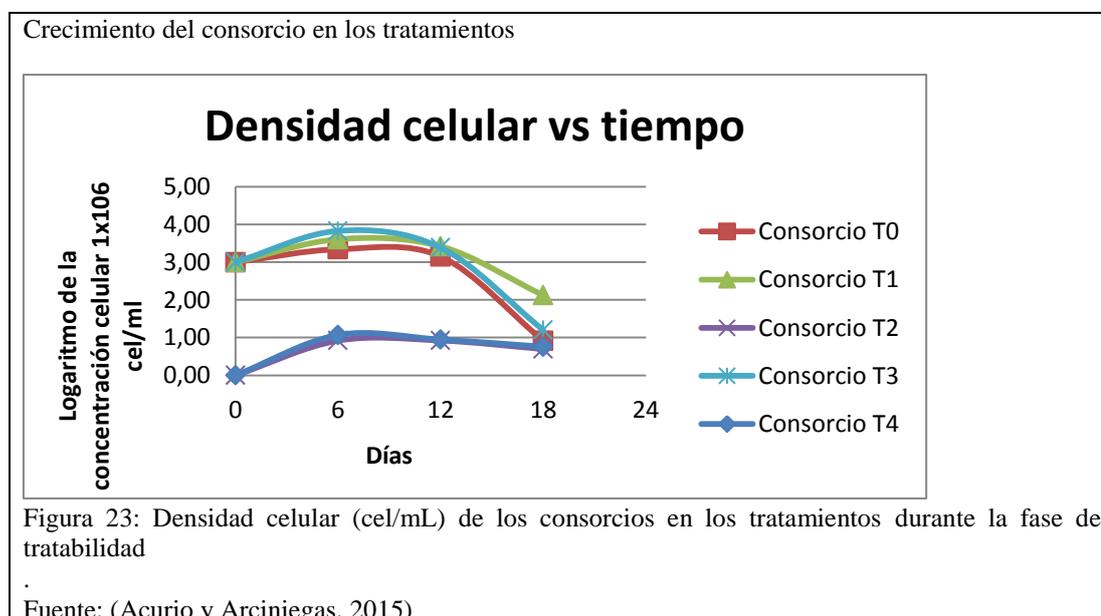
3.4 Crecimiento del consorcio microalgal *Chlorella- Scenedesmus* en los tratamientos inoculados y no inoculados con estas microalgas

En la tabla 18, figura 23. Se puede apreciar la densidad celular de las microalgas en cada uno de los tratamientos desde el día 6 hasta el día 18.

Tabla 18. Densidad celular del consorcio microalgal *Chlorella - Scenedesmus* aplicados en los tratamientos

Densidad celular (1×10^6 cel/mL)					
Días	Consortio T0	Consortio T1	Consortio T2	Consortio T3	Consortio T4
0	3,00	3,00	0,00	3,00	0,00
6	3,34	3,61	0,92	3,83	1,07
12	3,15	3,42	0,92	3,38	0,95
18	0,92	2,12	0,70	1,20	0,76

Elaborado por: (Acurio, Arciniegas, 2015)



El crecimiento en los tratamientos T0 sin adición de nutrientes, T1 con adición de nitratos y T3 con adición de nitritos fue similar, estos 3 tratamientos fueron inoculados con $3,0 \times 10^6$ cel/ml del consorcio microalgal *Chlorella Scenedesmus*, al

día 6 se produjo el máximo crecimiento en los tres tratamientos aunque se evidencia relativamente una mayor densidad celular en el T3 con $3,8 \times 10^6$ cel/mL esto pudo deberse a que la microalgas asimilan mejor el nitrito que el nitrato, ya que los nitritos se reducen directamente a amonio para ser incorporado directamente a las células, en cambio los nitratos requieren un mayor gasto de energía ya que primero deben reducirse a nitritos para posteriormente reducirse a amonio, esta información es corroborada por (González, 2010, pág. 13).

Al día 12 se puede apreciar que el crecimiento se mantiene constante es decir, estos 3 tratamientos se encontraron en fase estacionaria hasta este día, sin embargo al día 18 se puede apreciar claramente una fase de declive, esto probablemente se debe a que las microalgas agotaron todas las formas de nitrógeno presentes en el cultivo, según Abalde (2012) el crecimiento microalgal se rige por la ley del mínimo, es decir el factor limitante de crecimiento, en este caso pudo haber sido el nitrógeno (pág.12).

Orellana, (2005), asegura que la deficiencia de este nutriente tiene un efecto negativo en el crecimiento poblacional ya que en su investigación la deficiencia de nitrógeno fue el nutriente más limitante en el crecimiento tanto de *Chlorella* como *Scenedesmus* (pág. 3).

En cuanto a los tratamientos control T2 para nitratos y T4 para nitritos, a pesar de que no fueron inoculados con microalgas presentaron un crecimiento de microalgas con una densidad celular máxima alcanzada al día 6 de 0,92 para el T2 y de 1,07 para el T4, esto se puede deber a la flora microalgal propia existente en el río, Orellana (2005), asegura que “las microalgas son abundantes en agua dulce, en lagos y en ríos” (pág. 4). El inmediato crecimiento probablemente se debe a que a estos tratamientos se les acondiciono de luz, aireación y hubo un adecuado control el pH esto es corroborado por Abalde (2012), quien afirma que “tanto *Chlorella* como *Scenedesmus* se multiplican rápidamente en cuanto son proporcionados de luz, aireación y se efectuó un correcto controle el pH”, también menciona que “la reproducción de *Chlorella* y de *Scenedesmus* es entre 8 a 24 horas, por lo cual se evidenció la presencia de microalgas en muy poco tiempo”

3.5 Determinación de la remoción de nitritos y nitratos en el agua del río enriquecida con estos nutrientes por el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*

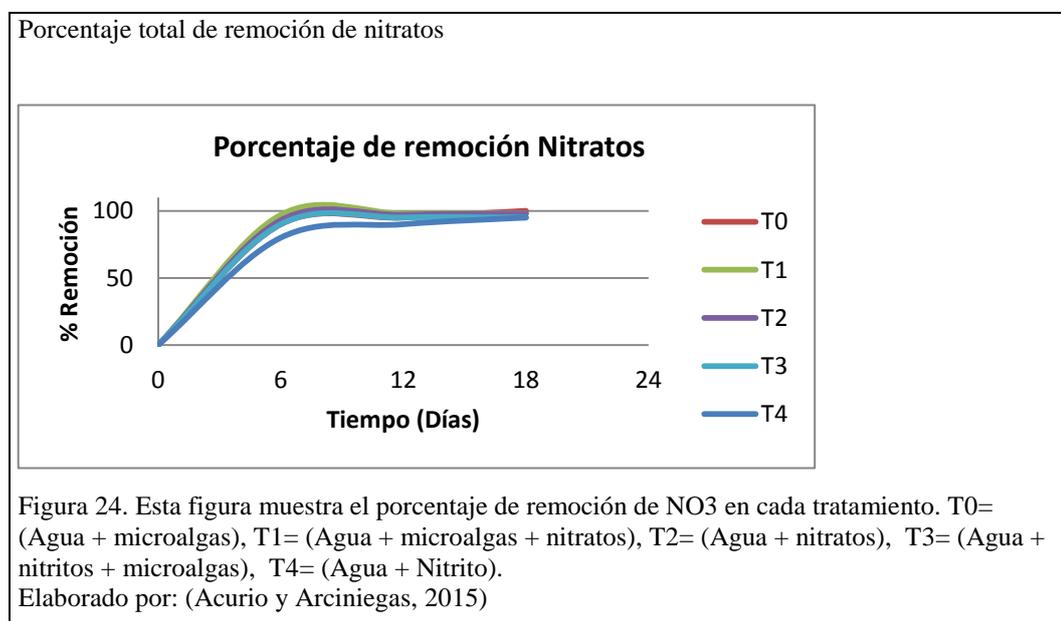
Después de la caracterización de las muestras de agua del río San Pedro se adicionó 40mg/L de nitratos, 20mg/L de nitritos y 8mg/L de fosfatos respectivamente a los tratamientos como se describió anteriormente en la metodología (Ver tabla 9), para de esta manera poder evidenciar la capacidad de remoción de este consorcio de microalgas. Los valores iniciales se encuentran en el anexo 14.

En la tabla 19, gráfico 24, se describen los diferentes porcentajes de remoción de nitratos en cada tratamiento durante los 18 días.

Tabla 19. Porcentajes de remoción de nitratos por el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*

Porcentaje de Remoción de nitratos					
Días	T0 (Agua + Microalgas)	T1(Agua + microalgas + nitratos)	T2(Agua + nitratos)	T3(Agua + nitritos + microalgas)	T4(Agua + Nitrito)
6	90%	97%	93%	90%	80%
12	95%	98%	97%	95%	90%
18	100%	98%	98%	95%	95%

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)



Se observó que a partir del día 6 hubo una elevada eficiencia de remoción en todos los tratamientos, con un 97% en T1 que fue el tratamiento al que se le adicionó nitratos y microalgas, un 93% en el T2 que fue el tratamiento control para nitratos, un 90% para T3 que fue el tratamiento al que se le adicionó microalgas y nitritos y el mismo porcentaje para el tratamiento T0 al que sólo se le adicionó microalgas y un 80% en T4 que fue el tratamiento control para nitritos.

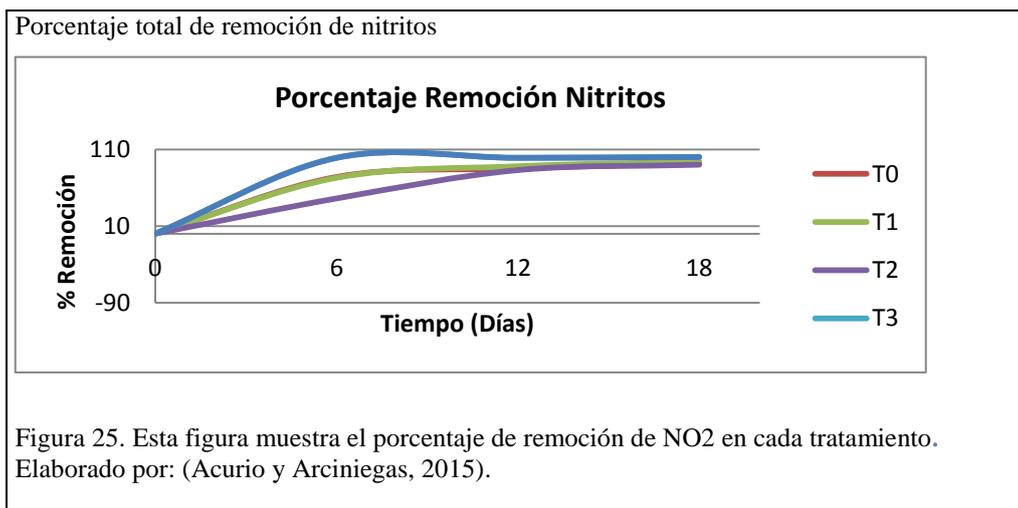
Al día 12 se observa un ligero aumento de remoción, hasta que al día 18 los porcentajes de remoción alcanzados fueron de un 100% en el tratamiento T0, un 98% en los tratamientos T1 y T2 y un 95% en los tratamientos T3 y T4, lo que indica una eficacia de remoción de estos nutrientes incluso en los tratamientos que no fueron inoculados con microalgas, esto puede deberse a la existencia de flora bacteriana aerobia y microalgas propias del río que empezaron a desarrollarse gracias a las condiciones ambientales óptimas que se les proporcionó generando que en todos los tratamientos exista un nivel alto de remoción. Los autores Zhu, Li, Ketola, (2011, pág.98) afirman que los microorganismos en asociación dentro de un cultivo de microalgas contribuyen a la remoción de nutrientes a través del proceso de nitrificación y desnitrificación, es decir, catalizan el proceso de remoción de los nitratos presentes en el medio, permitiendo el crecimiento microalgal. Por lo tanto el uso de microalgas como alternativa para biorremediación es una opción viable debido a que de manera natural, están adaptadas a altas concentraciones de nutrientes removiendo del 80% al 98% de NO_2 y NO_3 y a otras sustancias presente en las mismas, resultando ser interesantes para otros usos biotecnológicos como: fármacos, biorremediación, biodiesel, biomasa (Reyes, Palacios, Rodríguez, Hernández, 2008, pág. 18).

Según la tabla 20, figura 25, se describen los diferentes porcentajes de remoción de nitritos en cada tratamiento durante los 18 días.

Tabla 20. Porcentajes de remoción de nitritos por el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*

de Remoción de Nitritos					
Días	T0 (Agua + Microalgas)	T1(Agua + microalgas + nitratos)	T2(Agua + nitratos)	T3 (Agua + nitritos + microalgas)	T4 (Agua + Nitrito)
6	74%	73%	46%	99%	99%
12	85%	88%	83%	99%	99%
18	92%	94%	90%	100%	100%

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)



Se observó que al día 6 hubo una elevada eficiencia de remoción del 99% en los tratamientos T3 y T4, que fueron enriquecidos con nitritos, en T0 y T1 el porcentaje de remoción fue del 74% y 73% respectivamente y el tratamiento T2 presentó un porcentaje de remoción del 46%.

Al día 12 se observa un ligero aumento de remoción, hasta que al día 18 los porcentajes de remoción alcanzados fueron de un 100% para T3 y T4, un 94% para T1, un 92% en T0 y un 90% en T2, al comparar los porcentajes finales se puede evidenciar la eficiencia de remoción de estos nutrientes incluso en los tratamientos que no fueron inoculados con microalgas, esto puede deberse a la existencia de flora bacteriana aerobia y microalgas propias del río que empezaron a desarrollarse gracias a las condiciones ambientales óptimas que se les proporcionó generando que en todos los tratamientos exista un nivel alto de remoción, esto posiblemente se debe a que las microalgas prefieren remover en primer lugar los nitritos, ya que supone menor gasto energético para ser reducido a amonio y entra directamente a las células para formar parte de las moléculas orgánicas, incorporándose en aminoácidos (Abalde, 2012, pág. 54).

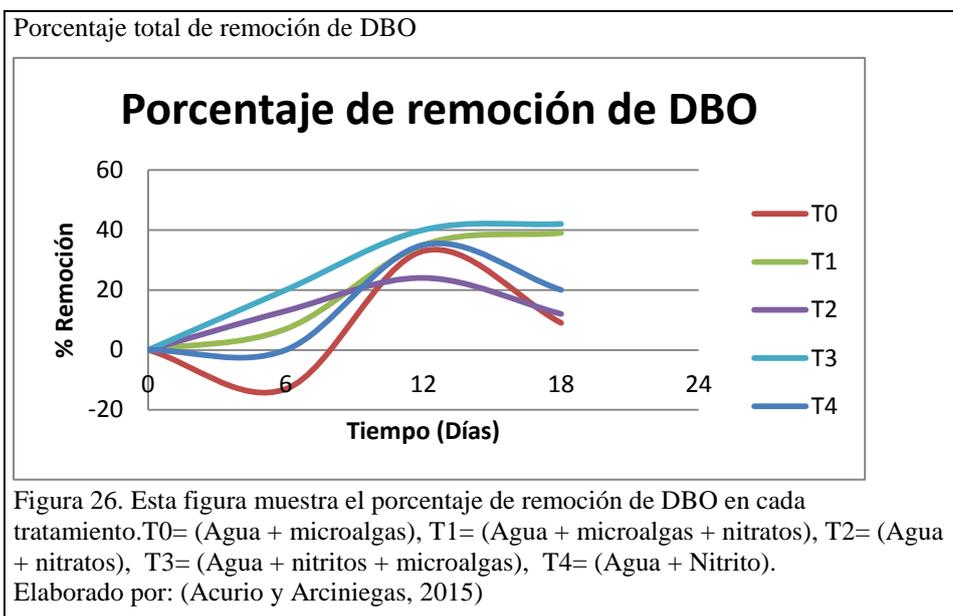
3.5.1 Evaluación de otros parámetros (DBO y DQO)

En la tabla 21 y figura 26, se observa el porcentaje de remoción de DBO en todos los tratamientos, durante los 18 días.

Tabla 21. Porcentajes de remoción de DBO por el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*

Porcentaje de Remoción de DBO					
Días	T0 (Agua + Microalgas)	T1(Agua +microalgas + nitratos)	T2(Agua + nitratos)	T3 (Agua + nitritos + microalgas)	T4 (Agua + Nitrito)
6	-13%	7%	13%	20%	0%
12	33%	35%	24%	40%	35%
18	9%	39%	12%	42%	20%

Elaborado por : (Acurio y Arciniegas, 2015)



El tratamiento T3 presentó un 42 % de remoción, seguido del tratamiento T1 donde se observa una remoción del 39%, estos dos tratamientos alcanzaron un mayor porcentaje de remoción, en cuanto a los tratamientos T2 y T4 que no fueron inoculados con microalgas tuvieron un porcentaje de remoción del 12% y 20 % respectivamente, sin embargo el tratamiento T0 que también fue inoculado con el consorcio microalgas *Chlorella Scenedesmus* tuvo un porcentaje de remoción del 9 %, esto puede deberse a que la capacidad de remoción del DBO por las microalgas está también ligada a la disponibilidad de nutrientes por lo que en el caso del tratamiento T3 y T1 que fueron enriquecidos con nitritos y nitratos respectivamente y a su vez fueron inoculados con microalgas presentaron un mayor porcentaje de remoción. El aumento de este parámetro puede ocurrir como consecuencia de la oxidación biológica del amoníaco a nitrito y a continuación, a nitrato. Por lo tanto

para la disminución de DBO es de gran ayuda el uso de este tipo de microalgas ya que estas aumentan el oxígeno disuelto en el agua durante la fotosíntesis (Park, 2001, pág. 7).

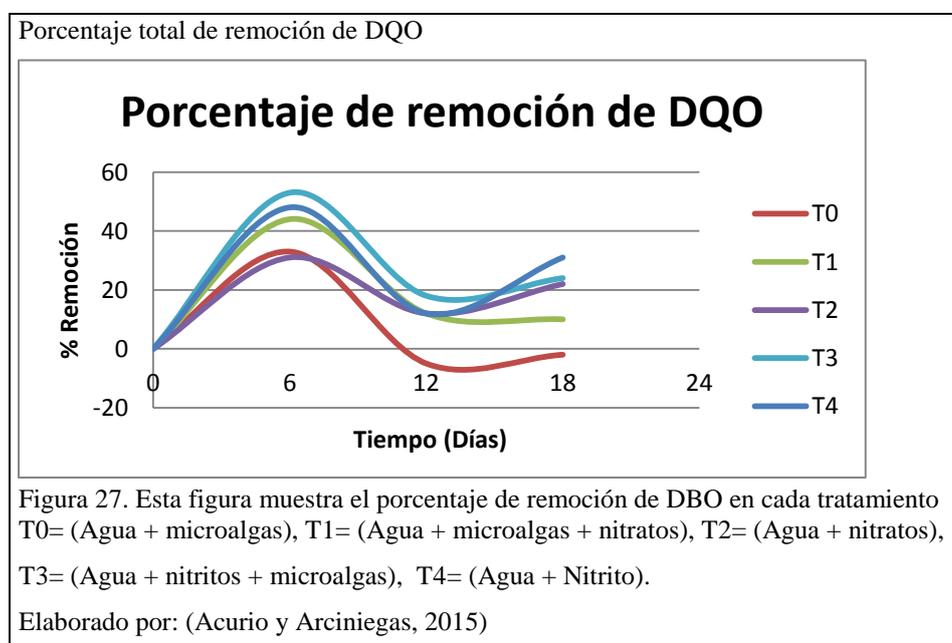
Se presentaron valores menores a cero, esto pudo deberse a que el día de toma de la muestra el cultivo se encontraba sedimentado, tal vez por una falta de aireación o deficiencia de las mangueras lo que originó un aumento de este parámetro, generando este tipo de valores.

En la tabla 22, figura 27, se observa que el porcentaje de remoción de DQO durante los 18 días de tratamiento.

Tabla 22. Porcentajes de remoción de DQO por el consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus*

Porcentaje de Remoción de DQO					
Días	T0	T1	T2	T3	T4
6	33%	44%	31%	53%	48%
12	-5%	12%	12%	18%	12%
18	-2%	10%	22%	24%	31%

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)



El mayor porcentaje de remoción de DQO en los tratamientos se produjo en el día 6, con un 53% para el tratamiento T3, un 48% para el tratamiento T4, un 44 % para el tratamiento T1, un 33% para el tratamiento T0 y un 31% para el tratamiento T2. Los porcentajes obtenidos entre los tratamientos tanto inoculados como no inoculados con microalgas son similares, lo que supone que la cantidad de microalgas no afecta el nivel de remoción de este parámetro. Según Hee y Seung (2005), “el porcentaje de remoción de DQO no es afectada significativamente por el aumento en la concentración de inóculo de microalgas, por lo tanto las microalgas son capaces de removerlo eficientemente” (pág. 256),

Al día 18 no se aprecia una disminución significativa de este parámetro, esto puede deberse a que las microalgas empezaron a sedimentarse, posiblemente por una falta de aireación generando acumulación de materia orgánica.

3.6 Evaluación de la remoción de nitritos y nitratos en muestras de agua del río San Pedro con microalgas clorofitas (Consortio *Chlorella* y *Scenedesmus*)

Al determinar la capacidad de remoción de nitritos y nitratos en muestras de agua enriquecidas con estos nutrientes se estableció que todos los tratamientos dieron resultados positivos, demostrando así que las microalgas intervienen en la remoción de nutrientes, sin embargo la remoción de Nitritos fue mejor debido a que, según Abalde (2012), “las microalgas poseen una mejor absorción del nitrógeno en forma de amonio, luego nitritos y por último los nitratos”, esto se debe a que la transformación a sus formas reducidas implica un gasto de energía (pág. 25).

Al comparar el nivel de remoción de nitritos y nitratos por tratamientos físicos, como filtración y sedimentación el porcentaje de remoción fue de ningún efecto, tanto para nitritos como para nitratos, con el proceso de flotación remueve del 65-95% de Nitritos mientras que no causa ningún efecto para nitratos, en tratamientos químicos como coagulación y floculación remueve del 90-100% de nitritos y no genera ningún efecto para nitratos, con el intercambio iónico no presenta ningún efecto para remover nitritos mientras que con nitratos remueve del 70-90%, para osmosis inversa remueve del 60-90% para ambos compuestos y con tratamientos biológicos como lodos activados remueve del 40-70% de nitratos y una ligera remoción de nitratos.

Por lo tanto al usar tratamientos físicos, químicos y biológicos se obtiene un porcentaje de remoción menor al de las microalgas y el costo de los tratamientos es elevado por lo que el uso de un consorcio de microalgas como *Chlorella* y *Scenedesmus* ayuda a disminuir de manera más rápida y menos costosa, estos compuestos.

CONCLUSIONES

Se puede obtener diferentes microalgas clorofitas en muestras de agua del río San Pedro ya que son abundantes en este tipo de efluentes, y al proporcionarle condiciones adecuadas en cuanto a temperatura, pH, aireación y luz puede alcanzar densidades de 34.0×10^6 cel/mL.

En la caracterización del río San Pedro, los parámetros físico-químico tales como pH, apariencia, DBO, DQO, P y NO_2 , cumplen con los límites permisibles establecidos en la normativa Quito-Ambiente, esto se debe a que el río posee un alto poder de autodepuración, sin embargo en el caso de NO_3 , incumple el límite establecido en la norma por lo que no es apto para diferentes usos.

Tanto los tratamientos controles que no tuvieron la adición de microalgas, como los tratamientos que fueron inoculados con las mismas no presentaron diferencias significativas, esto se debe a que también existió crecimiento microalgal que en asociación con la flora bacteriana propia del río potenció su capacidad para remover contaminantes (nitratos, nitritos, DBO, DQO), convirtiéndolas en una buena alternativa de bajo costo y alta eficiencia en la ficorremediación.

La aplicación del consorcio *Chlorella* y *Scenedesmus* tiene una doble función, pues puede ser utilizado tanto en el tratamiento de aguas residuales, como para la eliminación de nutrientes, y para la producción de biomasa algal, que posteriormente puede tener otros usos biotecnológicos, como producción de biocombustibles, biofertilizantes, suplemento alimenticio, entre otros.

En la fase de tratabilidad se determinó que el nitrógeno es un factor limitante para las microalgas, pues al consumir todas las formas asimilables de este nutriente como nitratos y nitritos, se produjo un retardo en el crecimiento, por lo que el cultivo empezó a entrar en una fase de declive. El declive pudo deberse también otro tipo de factores o componentes, que debido a pertinencia con el tema no fueron tomados en cuenta, pero el nitrógeno es la fuente principal de alimento y fuente de energía para este tipo de microalgas, por lo tanto es el principal factor limitante en su desarrollo.

Los porcentajes de remoción, tanto de nitrito como de nitratos obtenidos en este estudio son del 80 al 100%, por lo que la utilización del consorcio *Chlorella* y

Scenedesmus para el tratamiento de efluentes contaminados con este tipo de compuestos son eficientes.

RECOMENDACIONES

Evidenciar la capacidad de remoción de *Chlorella* y *Scenedesmus* sin asociación con otros microorganismos, auto clavando el agua del efluente, eliminando así la flora microbiana presente.

Efectuar ensayos con aireación y sin aireación, para poder evaluar si existen diferencias significativas entre tratamientos al aplicar microalgas.

Realizar lagunas de estabilización para probar la eficiencia de remoción de nutrientes en mayores volúmenes de agua residual.

Caracterizar el agua cada 2 días para poder determinar de manera más precisa en qué días existe un porcentaje significativo de remoción.

Probar la eficiencia de remoción de otros contaminantes, mediante el uso de diferentes medios de cultivo, y otras asociaciones de microalgas.

LISTA DE REFERENCIAS

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, C. (2012). *Microalgas cultivo y aplicaciones*. Quito: Conejo.
- Abeliovich, A. (1986). *Algae in wastewater oxidation ponds*. Colorado: SABANA.
- al., A. e. (2012). *Aislamiento de Microorganismos proteolíticos con potencial de Bioconversión a partir de efluentes de Curtiembre*. (2. d. Producción, Ed.) Lima, Perú: UNMSM.
- Arredondo, G., Voltolina, D., Gómez, H., & Correa, G. (2005). Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and a simulated light and temperature cycle. *Bioresource Technology*.
- Barsanti, L., & Gualtier, P. (2006). *Algae, anatomy biochemistry and biotechnology*. Boca raton Florida : Taylor y Francis Group.
- Bastidas, O. (2010). *Conteo Celular con el Hematocitómetro*. México: SELOROMICS.
- Becerra, M., & Monzoy, L. (1992). *Monografía del género Chlorella*. Iztapalapa.
- Birge, A. (2000). *Ciclo del nitrógeno*. Sparta.
- Cabrera, E., Hernández, L., Gómez, H., & Cañizares, P. (2003). Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar. *Revista de la Sociedad Química de México vol 47, Núm. 1* , 88-92.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos toxicológicos y métodos de Evaluación de ña calidad de aguas* . México: edmun pag 25- 30.
- Cervera, O. (2011). Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal. 11.
- Chapman, D., & Guellenbeck, K. (1998). *An Historical perspective of Algal Biotechnology*. Ney York: Longman Scientific Technical Press.
- Chapman., & Hall. (1992). *Eutrophication of freshwaters: Princples, Problems and Restoration*. Londres: Acribia .
- Converti, A., Casazza, A., & Perrego, P. (2009). *Effect of temperatur and nitrogen concentration of the growth and lipid content of nannochloropsis oculata Chlorella oculata* .
- Dakin, N. (1997). *Acuario Marino: Manual de preguntas y respuestas* . España: EL DRAC.

- Emilio, E. (2003). Tratamiento de aguas. *Cientifics* , 7.
- FAO. (2008). *Manual practico cultivo de algas* . Version electronica .
- Fulks, W., & Main, K. (1991). *The design y operation of live feeds production system*. Hawaii: OS-Asia Works.
- González, L. (2010). *Influencia de la deficiencia de nitrógeno y fósforo en las interacciones competitivas entre Chlorella vulgaris y Scenedesmus acutus*. Colombia.
- Graham, L., Graham, j., & Wilcox, L. (2009). *Algae Second Edition*. San Fransisco: Pearson.
- Hanumantha et al. (2011). *Application of phycoremediation technology in the treatment of wasterwater from a leather- processing chemical manufacturing facility*. Tamil Nadu, India: Department of Plant Biology and Plant Biotechnology, R.K.M. Vivekananda College, Chennai 600 004.
- Hernández, J. (2004). *Evaluación de un sitema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas* . La Paz.
- Ilangovan, K. (1998). *Efect of cadmiun and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and inmobilized cultures of Chlorella Vulgares and Scenedesmus Acutus*. San Diego.
- INEN. (1998). *Agua, Calidad de agua, muestreo y tecnicas de muestreo*. Ecuador.
- Kojima, H., & Lee, K. (2001). *Photosynthetic microorganisms and envormental biotechnology*. Hong Kong: Springer- Verlag.
- Leon, M., Andrea, R., Sanchez, M., & Vaness, L. (20 de Diciembre de 2012). *Repositorio Institucional Universidad Industrial de Santander*. Recuperado el 14 de Enero de 2014, de Repositorio Institucional Universidad Industrial de Santander: <http://www.repositorio.uis.edu.co/jspui/browse?type=author&value=Sanchez+Martin+ez%2C+Vanessa+Lucia>
- Lurling, M. (2003). Phenotypic plasticity in the green algae Desmodesmus and Scenedesmus with special reference to the induction of defensive morphology. *Internacional Journal of Limnology*.
- Marquéz, B. (2013). *Efecto del acido indol-3-acetico producido por Azospirillum brasilense en las enzimas de asimilación del amonio en chlorella vulgaris, bajo condiciones de coinmovilización*. La Paz.
- Martínez, M., Sánchez, S., & Jiménez, J. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obluquos. *Bioresource Technology* .

- Mayeli, S., Nandini, S., & Sarma, S. (2005). The efficacy of *Scenedesmus* morphology as a defense mechanism against grazing by selected species of rotifers and cladocerans. *Aquatic Ecology*.
- Méndez, L., Albarracín, I., Cravero, M., & Salomón, R. (2010). Crecimiento de *scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. *CONICET*, 5-6.
- Mendoza, H. (2003). *Aplicaciones de las microalgas*. Islas Canarias : ITC.
- Miller, C., Pardo, L., & Mejía, G. (2000). *Sistemas de manejo de aguas residuales para núcleos pequeños y descentralizados*. Bogotá: McGraw–hill interamericana S.A.
- Morales, E. (3 de mayo de 2014). Medios de cultivo microalgas. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Mulbry, W., & Kondrad, S. (2008). Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. *Bioresource technol.*
- Muñoz, A. (2008). *Caracterización y tratamiento de aguas residuales*. España: La reforma.
- Muñoz, M. (2011). *Removal of suspended solids from wastewater of an Ecuadorian leather tannery*. Quito ECUADOR: Universidad Politécnica Nacional.
- OMS. (2009). *Concentraciones de nitrógeno*.
- Orellana, J. (2005). Contaminación Ambiental. *Ingeniería Sanitaria- UTN -FRR0*, 3 y 4.
- Oswald, W. (1988). *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Eds.
- Pellón, A. (2003). *Empleo de microalgas *scenedesmus oblicuos* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas*. Madrid- España: Revista Metalurgia.
- Pozo, M. (2008). *Cultivo de microalgas* Mexico MDC .
- Rewat, I., Kumar, R., & Mutanda, T. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. USA: Blackwell Publishing.
- Rincón, A. (2011). *El Agua: Recurso Vital*. Republica Dominicana: Programación OEI.
- Rodier, J. (2011). *Análisis de agua*. España : SB EDITION.

Romero, A. (2004). *Tratamiento de aguas residuales Teoría y principios de diseño*. Bogotá: Escuela Colombiana de Ingeniería.

Rubens, R. (2003). *Tratamiento de aguas Residuales*. España: REVERTE.

Salazar, M. (2005). *Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales*. Mexico: UAMI.

Sawyer, C., Perry, L., & Mcarty, L. (2001). *Química para ingeniería ambiental*. Madrid: McGraw – Hill Interamericana S.A.

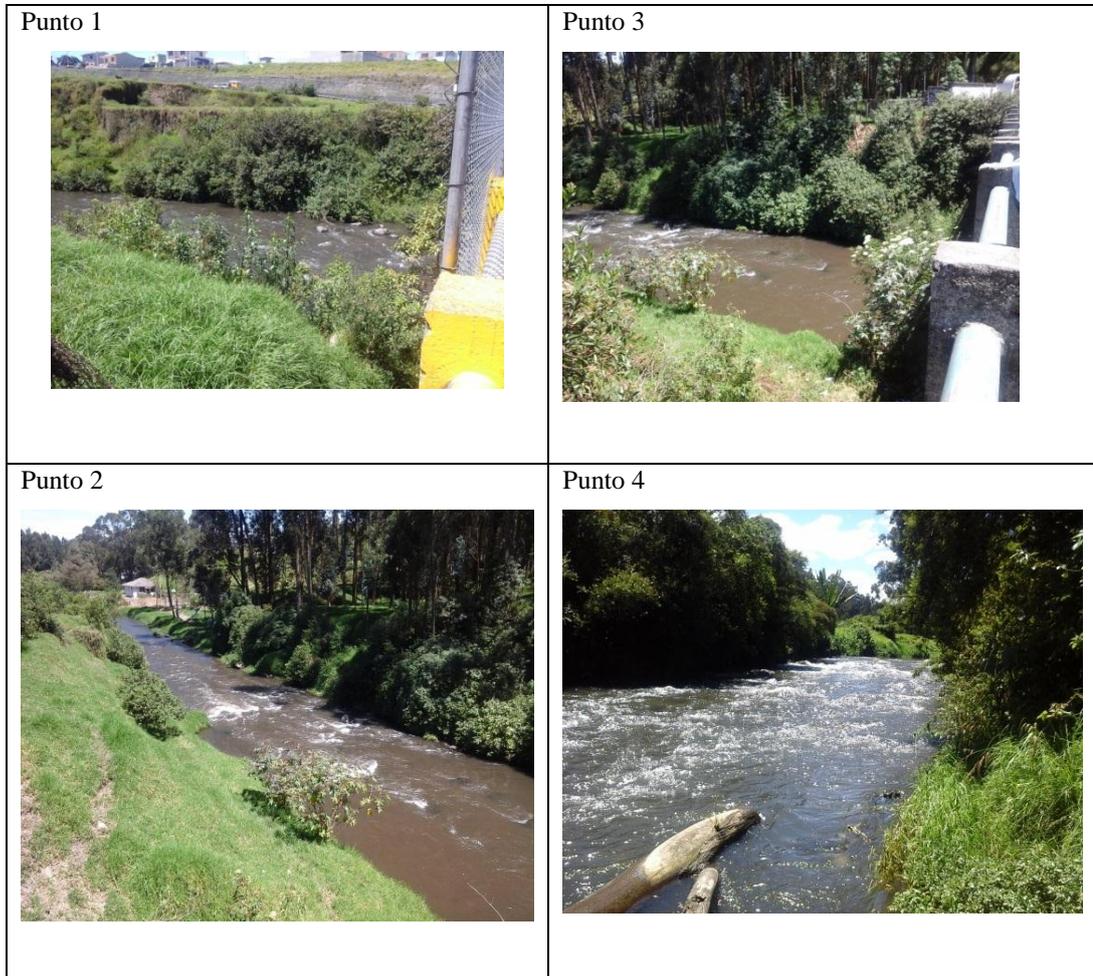
Strebla, H., & Krauter, D. (1987). *Atlas de los Microorganismos de Agua Dulce*. Barcelona: Ediciones Omega S.A.

TULSMA. (2009). Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce . En *Texto Unificado de la legislación Secundaria del ministerio del ambiente* (pág. tabla 12). Ecuador.

UCE-FIGEMPA. (2012). *Proyecto de toma de principales descargas líquidas, domésticas e industriales en los ríos Pita y San Pedro en el cantón Rumiñahui*. Quito.

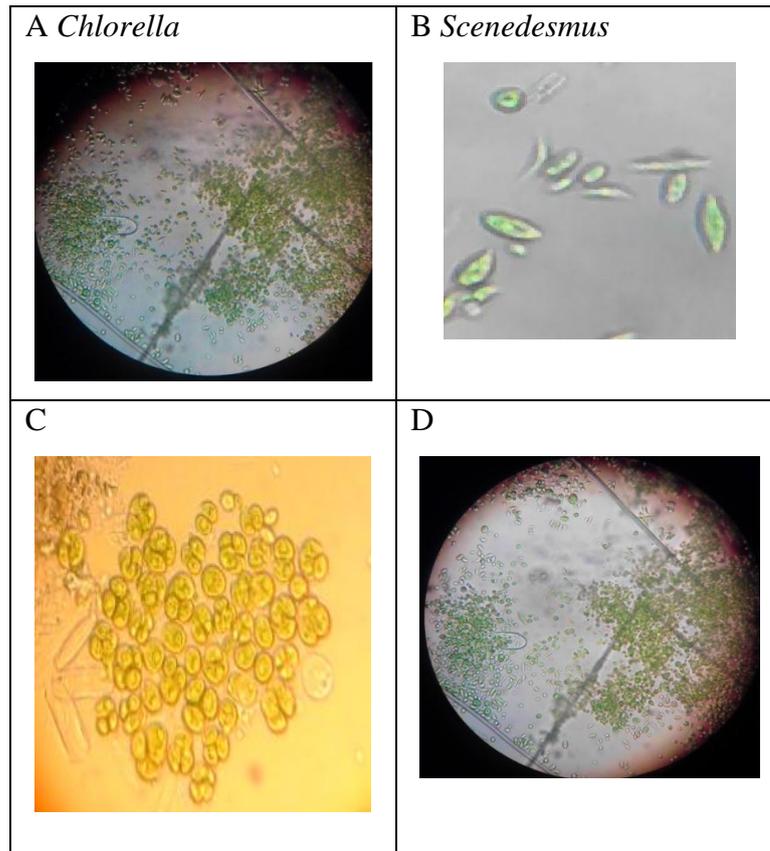
Anexos

Anexo 1. Puntos de muestreo



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 2. Observación de *Chlorella* y *Scenedesmus* en el microscopio



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 3. Recolección de muestras de agua

Muestras recolectadas M1, M2, M3, M4



Piedras con microalgas para la toma de muestras



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 4. Medio de cultivo

Nitrofoska foliar



Composición de la Nitrofoska

APLICACIÓN FOLIAR E IRRIGACIÓN
Para estimular e incrementar el crecimiento

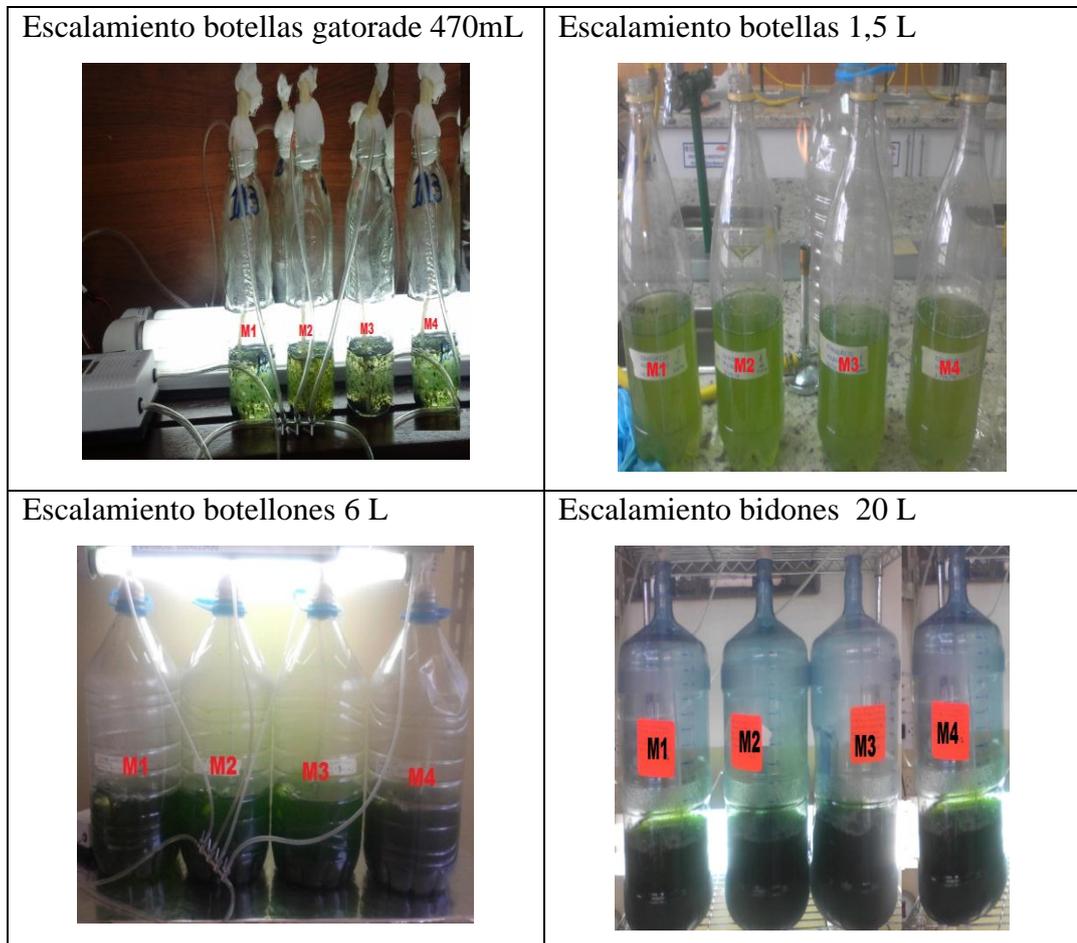
Ingredientes:		
Nitrógeno	(N)	10.0%
Fósforo	(P ₂ O ₅)	4.0%
Potasio	(K ₂ O)	7.0%
Magnesio	(MgO)	0.2%
Azufre	(S)	0.8%
Manganeso	(Mn)	17 ppm
Hierro	(Fe)	140 ppm
Cobre	(Cu)	25 ppm
Cinc	(Zn)	5 ppm
Boro	(B)	22 ppm
Molibdeno	(Mo)	3 ppm

Fertilizante: Solución acuosa homogénea
Contenido neto: 1 litro

BASF
The Chemical Company

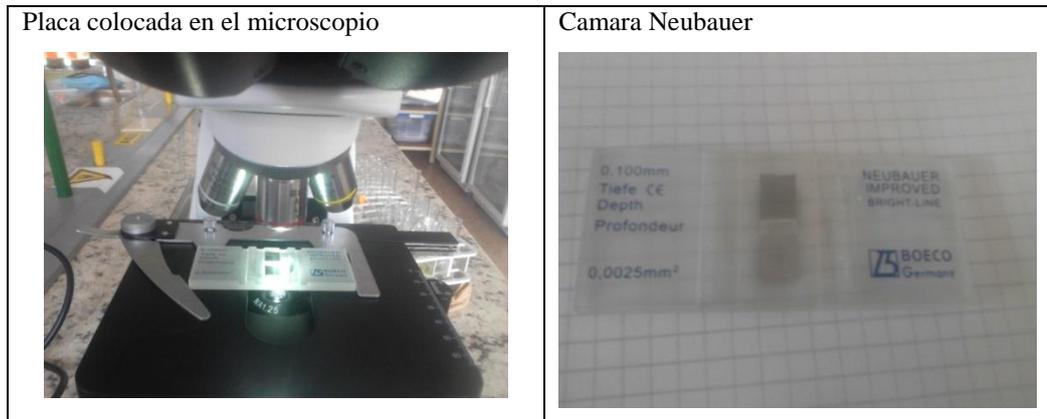
Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 5. Escalamientos en la producción de biomasa microalgal



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 6. Conteo celular en cámara Neubauer



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 7. Tratabilidad de las muestras de agua día 0

Tratamiento T0 (Agua rio + Microalgas)



Tratamiento T1 (Agua rio + Microalgas + Nitratos + Fosfatos)



Tratamiento T2 (Agua rio + Nitratos + Fosfatos)



Tratamiento T3 (Agua rio + Microalgas + Nitritos + Fosfatos)



Tratamiento T4 (Agua rio + Nitritos + Fosfatos)



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 8. Tratabilidad de las muestras de agua día 6

Tratamiento T0 (Agua rio + Microalgas)



Tratamiento T1 (Agua rio + Microalgas + Nitratos + Fosfatos)



Tratamiento T2 (Agua rio + Nitratos + Fosfatos)



Tratamiento T3 (Agua rio + Microalgas + Nitritos + Fosfatos)



Tratamiento T4 (Agua rio + Nitritos + Fosfatos)



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 9. Tratabilidad de las muestras de agua día 12

<p>Tratamiento T0 (Agua rio + Microalgas)</p> 	<p>Tratamiento T1 (Agua rio + Microalgas + Nitratos + Fosfatos)</p> 
<p>Tratamiento T2 (Agua rio + Nitratos + Fosfatos)</p> 	<p>Tratamiento T3 (Agua rio + Microalgas + Nitritos + Fosfatos)</p> 
<p>Tratamiento T4 (Agua rio + Nitritos + Fosfatos)</p> 	

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

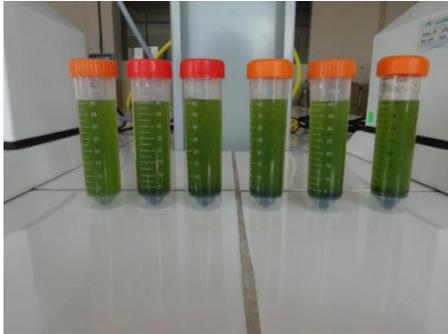
Anexo 10. Tratabilidad de las muestras de agua día 18

<p>Tratamiento T0 (Agua rio + Microalgas)</p>  <p>Three clear plastic bottles containing a yellowish-green liquid. Each bottle has a pink label with 'TRATAMIENTO T0' and sub-labels 1, 2, and 3.</p>	<p>Tratamiento T1 (Agua rio + Microalgas + Nitratos + Fosfatos)</p>  <p>Three clear plastic bottles containing a yellowish liquid. Each bottle has a green label with 'TRATAMIENTO T1' and sub-labels 1, 2, and 3.</p>
<p>Tratamiento T2 (Agua rio + Nitratos + Fosfatos)</p>  <p>Three clear plastic bottles containing a clear, colorless liquid. Each bottle has a red label with 'TRATAMIENTO T2' and sub-labels 1, 2, and 3.</p>	<p>Tratamiento T3 (Agua rio + Microalgas + Nitritos + Fosfatos)</p>  <p>Three clear plastic bottles containing a yellowish-green liquid. Each bottle has a white label with 'TRATAMIENTO T3' and sub-labels 1, 2, and 3.</p>
<p>Tratamiento T4 (Agua rio + Nitritos + Fosfatos)</p>  <p>Three clear plastic bottles containing a clear, colorless liquid. Each bottle has a red label with 'TRATAMIENTO T4' and sub-labels 1, 2, and 3.</p>	

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 11. Centrifugación de muestras para análisis de parámetros en los laboratorios Labiotec

Tubos Falcon



Sedimento de la centrifugacion de las muestras



Centrífuga



Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 12. Valores de densidad celular del consorcio de *Chlorella* y *Scenedesmus* durante los 61 de cultivo en cada una de las muestras.

<i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i>												
DÍAS	Densidad Celular Cel/mL											
	M1	M1	Consortio	M2	M2	Consortio	M3	M3	Consortio	M4	M4	Consortio
5	3035000	3730000	6765000	6895000	1070000	7965000	5965000	1005000	6970000	5620000	810000	6430000
8	5040000	2640000	7680000	8662500	982500	9645000	8902500	1035000	9937500	5795000	855000	6650000
12	5895000	2470000	8365000	9532500	810000	10342500	9037500	900000	9937500	8775000	832500	9607500
15	6435000	2045000	8480000	10080000	720000	10800000	9135000	750000	9885000	10650000	820000	11470000
19	6025000	1565000	7590000	12540000	660000	13200000	11950000	740000	12690000	12550000	712500	13262500
22	5825000	420000	6245000	13212500	662500	13875000	12600000	662500	13262500	13750000	600000	14350000
26	4010000	380000	4390000	14812500	487500	15300000	13387500	630000	14017500	15550000	537500	16087500
29	1030000	290000	1320000	12270000	100000	12370000	18465000	540000	19005000	17565000	450000	18015000
33	0	0	0	18012500	262500	18275000	20175000	775000	20950000	19170000	1065000	20235000
36	0	0	0	24465000	300000	24765000	23580000	2040000	25620000	23560000	1420000	24980000
40	0	0	0	25305000	382500	25687500	27900000	2675000	30575000	27375000	2750000	30125000
43	0	0	0	28980000	420000	29400000	30192500	4192500	34385000	31440000	3360000	34800000
47	0	0	0	30000023	960000	30960023	29425000	4192500	33617500	30540000	2280000	32820000
50	0	0	0	32950000	660000	33610000	27317500	2860000	30177500	28260000	2730000	30990000
54	0	0	0	30240000	621000	30861000	23367500	6500000	29867500	28280000	3040000	31320000
57	0	0	0	28580000	430000	29010000	24507500	5882500	30390000	27520000	4670000	32190000
61	0	0	0	29190000	810000	30000000	27202500	4137500	31340000	28240000	4830000	33070000

Elaborado por: (Acurio y Arciniegas, 2015)

Anexo 13: Informe de análisis de agua del río San Pedro al día 0

ANÁLISIS SOLICITADO POR :	SHEYLLA ACURIO		
DIRECCION:	POLITECNICA SALESIANA		
EMPRESA (LUGAR MONITOREO)	TESIS DE GRADO ING. BIOTECNOLÓGICO		
DIRECCION:	FACULTAD INGENIERIA BIOTECNOLÓGICA		
FECHA DE TOMA DE MUESTRA :	2015/01/14		
HORA DE TOMA DE MUESTRA	15:00:00		
FECHA DE INGRESO DE LA MUESTRA :	2015/01/14		
FECHA DE SALIDA DE LA MUESTRA :	2015/01/29		
PERIODO DE ANALISIS:	2015/01/14	al	2015/01/29
TIPO DE MUESTRA:	SIMPLE		
CARACTERISTICAS DE LA MUESTRA	AGUAS CLARAS Y TRANSPARENTES		
MUESTREADO POR :	CLIENTE PROCEDIMIENTO TOMA DE MUESTRA PT 01		
COORDENADAS	NO INDICA		
UBICACIÓN :	XI TESTIGO O BLANCO		

Laboratorio de ensayo acreditado por el OAE
con acreditación N° OAE LE 2C 05-004

* PARAMETROS NO ACREDITADOS OAE

CODIGO LABORATORIO: 15-04-01

No	PARAMETROS	EXPRESADO COMO:	UNIDAD:	LABORATORIO	LIMITE MAXIMO PERMISIBLE	METODO DE ANALISIS	RESULTADO OBTENIDO	INCERTIDUMBRES U RZ	CRITERIO DE ACEPTACION
1	DEMANDA BIQUÍMICA DE OXÍGENO *	DBO	mg/l	LAGIN	100 (2)	APHA 5210 B PTA.12-00	15	20%	CUMPLE
2	DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO	DQO	mg/l	LAGIN	160 (2)	APHA 5220 B PEE.03	59	20%	CUMPLE
3	FOSFATOS *	PO4	mg/l	LAGIN	NO INDICA (2)	APHA 4500 P E PEE.23	1.80	20%	NO APLICA
4	NITRATOS *	NO3	mg/l	LAGIN	NO INDICA (2)	APHA 4500 NO3 E PEE.19	20,20	20%	NO APLICA
5	NITRITOS *	NO2	mg/l	LAGIN	NO INDICA (2)	APHA 4500 NO2 B PEE.210	0.50	20%	NO APLICA

REF LMP:

(2) Ordenanza Municipal 0404, Norma Técnica 00002 SA-2014 Tabla 2 Límites Máximos Permisibles para Descarga Cauce de Agua

LAGIN ECUADOR

Anexo 14. Glosario

Bioindicador: Es una especie vegetal, hongo o animal, cuya presencia (o estado) nos indica y da información sobre ciertas características ecológicas (físico-químicas, micro-climáticas, biológicas y funcionales), del medio ambiente, o sobre el impacto de ciertas prácticas en el medio. Se utilizan sobre todo para la evaluación ambiental (seguimiento del estado del medio ambiente, o de la eficacia de las medidas compensatorias, o restauradoras).

Biorremediación: Es el proceso en el que se utilizan microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para remediar el medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural

Cenobios: Grupo de células que, tras dividirse, no se separan y permanecen en grupos dentro de una vaina o sustancia mucilaginosa.

Microalgas: Son microorganismos microscópicos (2-200 μm), fotosintéticos que pueden crecer de manera autotrófica o heterotrófica en diferentes ambientes incluso los más extremos, lo cual permite encontrarlas ampliamente distribuidas en la biósfera adaptadas a una gran cantidad de condiciones.

Remoción: Es la acción de quitar o sacar o remover algo de su lugar, independientemente de que sea reemplazado o no por otro.

Palmeloide: Agrupación de las algas cuando las células se multiplican vegetativamente dentro de una masa mucilaginosa que producen.

Amonificación: Es la conversión a ion amonio del nitrógeno

Nitrificación: Es la oxidación biológica de amonio con oxígeno en nitrito, seguido por la oxidación de esos nitritos en nitratos.

Desnitrificación: Es un proceso metabólico que usa el nitrato como aceptor terminal de electrones en ausencia de oxígeno principalmente.

Bioconversión: También conocido como biotransformación se refiere al uso de organismos vivos a menudo microorganismos para llevar a cabo una reacción

química que es más costoso o no viable no biológicamente. Estos organismos convierten una sustancia a una forma modificada químicamente.

Glutamato deshidrogenasa: Es una enzima que cataliza la reacción de oxidación de glutamato a 2 oxoglutarato desprendiéndose amonio

Glutamina sintetasa: Es un enzima que tiene un papel esencial en el metabolismo del nitrógeno, catalizando la condensación del glutamato y el amoníaco para formar glutamina.

Consorcio: Es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo.

Sustancias Alelopáticas: Son compuestos bioquímico producidos por organismos que puede interferir en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros microorganismos de manera positiva o negativa.

Tratabilidad: Es un proceso que se realiza a nivel de laboratorio o de planta piloto, que permita establecer los procesos y operaciones adecuado para el tratamiento de agua.

Tratamiento Es el conjunto de operaciones y procesos unitarios que se realizar sobre el agua cruda con el fin de modificar sus características físicas, químicas y bacteriológicas para obtener agua que cumpla con las normas y criterios de calidad establecida.