



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

REDUCCIÓN DE LA EMISIÓN DE CO₂ PROVENIENTE DE LA
DESCOMPOSICIÓN DE ESTIÉRCOL PORCINO MEDIANTE EL USO DE
MICROALGAS

AUTORA

Carmen María Leiva Fernández

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

REDUCCIÓN DE LA EMISIÓN DE CO₂ PROVENIENTE DE LA
DESCOMPOSICIÓN DE ESTIÉRCOL PORCINO MEDIANTE EL USO DE
MICROALGAS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera Ambiental en Prevención y
Remediación

Profesor Guía
MSc. Yasser Alejandro González Romero

Autora
Carmen María Leiva Fernández

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Yasser Alejandro González Romero
Ingeniero Master en Ingeniería Ambiental
C.I: 070373762-7

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado éste trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.”

Miguel Ángel Gualoto Oñate
MSc. en Ciencias Biológicas
C.I: 170742935-1

DECLARACIÓN DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Carmen María Leiva Fernández

C.I: 171421310-3

AGRADECIMIENTOS

A Dios por guiarme a cumplir una meta más en mi vida.

A mis papas y hermana por todo el apoyo, ayuda y cariño dado durante ésta etapa.

A Johanna Herdohíza por formar parte de este proceso y ser una compañera de trabajo incondicional.

Al Ing. Alejandro González por ser un guía constante en el desarrollo de este proyecto y durante mi formación profesional.

A Nory González y Cristina Guamán por orientarme en el desarrollo de mi investigación y abrirme las puertas para realizarla BIOTEC.

DEDICATORIA

A mis papas por su apoyo incondicional, por enseñarme a ser una persona perseverante, por darme la oportunidad de formarme como profesional y por ser un ejemplo de dedicación y constancia.

A mi hermana que siempre está conmigo, por su ayuda, cariño y apoyo de todos los días.

RESUMEN

La emisión de Gases de Efecto Invernadero (GEI) a nivel mundial aumenta progresivamente, lo que contribuye de manera directa al cambio climático a través de los daños producidos sobre la atmósfera. La industria pecuaria es responsable de la generación de grandes cantidades de estiércol, que una vez iniciado su proceso de descomposición emanan una abundante cantidad de GEIs, entre éstos 668 millones de toneladas anuales de dióxido de carbono equivalente (CO₂eq) aproximadamente. En Ecuador existen alrededor de 1,6 millones de cabezas de ganado porcino, que anualmente generan cerca de 2,750 millones de kilogramos de estiércol. En la actualidad las microalgas y cianobacterias están siendo investigadas debido a su alta afinidad al proceso de captación de CO₂, lo que las ha catalogado como herramientas para el desarrollo de nuevos Mecanismos de Desarrollo Limpio (MDLs). El presente trabajo de titulación tuvo como objetivo principal identificar el género de microalga o cianobacteria con mayor afinidad y eficiencia respecto al proceso de captación del CO₂ generado por estiércol porcino en proceso de descomposición, comparando el rendimiento de tres diferentes tratamientos experimentales: uno por cada género y un tercero para su consorcio. Para esta experimentación se utilizó el género de microalgas *Pleurococcus* sp. con código CMIE – K2-003 y de cianobacterias *Rhabdoderma* sp. con código CMIE – J1-003. Ambos géneros son propiedad del Laboratorio de Biotecnología Energética – BIOTE C perteneciente a la Corporación para la Investigación Energética y forman parte de la Colección de Microalgas para la Investigación del Ecuador – CMIE. Los resultados obtenidos sugieren que el género de microalgas *Pleurococcus* sp. (CMIE – K2-003) fue aquel que presentó mayor afinidad al proceso de captación de CO₂ al tener un mayor número de individuos en los conteos celulares, la velocidad de crecimiento más elevada, el menor tiempo de duplicación requerido y mayor peso en forma de biomasa microalgal.

Palabras clave: Microalgas, cianobacterias, captación, dióxido de carbono (CO₂), estiércol.

ABSTRACT

Greenhouse gases (GHGs) emissions worldwide increase progressively, which contributes directly to climate change through damages to the atmosphere. Livestock industry is responsible from the generation of big quantities of manure that once its decomposition process starts produces a plenty amount of GHGs, from this gases, approximately 668 tons are from equivalent carbon dioxide (CO₂eq); in Ecuador, there are around 1,6 millions of pigs, which annually produce about 2,750 million kilograms of manure. Nowadays, microalgae and cyanobacteria are having a universal great reception in the investigation field due to their affinity to the process of carbon capture, which has cataloged them as a tool for the development of new Clean Development Mechanisms (CDMs). The present titling work aims to identify the genus of microalgae or cyanobacteria with a higher affinity and efficiency to the capture from the CO₂ generated by pig manure in decomposition process, comparing the yield of three different experimental treatments: one for each gender and a third one for their consortium. For this experimentation the genus of microalgae used was *Pleurococcus* sp. with code CMIE – K2-003, and the cyanobacterias *Rhabdoderma* sp. with code CMIE – J1-003. Both genders are property of the Laboratory of Energy Biotechnology – BIOTEC, which belongs to the Corporation for Energy Research and form part of the Collection of Microalgae for Research from Ecuador – CMIE. The obtained results suggest that the gender of microalgae *Pleurococcus* sp. (CMIE – K2-003) was the one which had a higher affinity to the process of carbon dioxide capture having the greater number of individuals at the cell counting's, the highest growth rate, the least required doubling time and the maximum weight of microalgal biomass.

Key words: Microalgae, cyanobacteria, capture, carbon dioxide (CO₂), manure.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes	1
Alcance	4
Justificación	5
Objetivos	6
Objetivo General	6
Objetivos Específicos	6
II. DESARROLLO DEL TEMA	7
1. CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	7
1.1. Energía	7
1.1.1. Seguridad energética	7
1.1.2. Energías renovables	8
1.1.2.1. Biomasa	9
1.1.3. Producción de biogás	9
1.2. Microalgas y cianobacterias	10
1.2.1. Especies de microalgas	11
1.2.2. Cultivos	12
1.2.3. Producción y/o escalamiento	12
1.2.4. Curva cinética de crecimiento	13
1.2.5. Conteo celular con la cámara de Neubauer	14
1.3. Captación biológica de carbono	15
2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA	18
2.1. Descripción del área de estudio	18
2.2. Microalgas	18
2.2.1. Selección de las cepas	18
2.2.2. Aislamiento y escalamiento de las cepas seleccionadas	19
2.2.3. Producción de biomasa	20

2.2.4.	Determinación de la curva cinética de crecimiento	20
2.2.4.1.	Curva de crecimiento base	20
2.2.4.2.	Curva de crecimiento experimental	21
2.2.4.3.	Cálculo de la velocidad de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (td)	21
2.3.	Diseño del sistema	22
2.3.1.	Digestor	22
2.3.2.	Medición del CO ₂	24
2.3.3.	Distribución del CO ₂	25
2.3.4.	Tanques de microalgas	25
2.4.	Diseño experimental	26
2.4.1.	Variables	26
2.4.1.1.	Especies de microalgas seleccionadas	26
2.4.2.	Parámetros a controlar	26
2.4.2.1.	Tiempo	26
2.4.2.2.	Volumen	27
2.4.2.3.	Alimentación de CO ₂ artificial	28
2.4.2.4.	Temperatura	28
2.4.2.5.	Aireación	28
2.4.2.6.	Potencial de Hidrógeno (pH)	28
2.4.2.7.	Luz	29
2.4.3.	Determinación de las combinaciones a realizarse	29
2.4.4.	Dilución del estiércol	30
2.5.	Monitoreos	31
2.6.	Medición de sólidos	31
2.6.1.	Sólidos totales	32
2.6.2.	Sólidos disueltos	33
2.6.3.	Sólidos suspendidos	33
2.6.4.	Sólidos sedimentables	35
3.	CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS	36
3.1.	Esquema de presentación de resultados y análisis	36
3.2.	Parámetros controlados	37

3.2.1. Potencial de Hidrógeno (pH)	37
3.2.2. Temperatura	38
3.2.3. Concentración de CO ₂	39
3.2.4. Presión del tanque	40
3.3. Microalgas	42
3.3.1. Curvas de crecimiento	42
3.3.1.1. CMIE - K2-003	42
3.3.1.2. CMIE - J1-003	44
3.3.1.3. Consorcio	46
3.3.1.3.1. Comportamiento consorcios	47
3.3.2. Cálculos de la velocidad de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (td)	49
3.3.3. Análisis estadístico del crecimiento celular con SPSS	53
3.3.3.1. Prueba Kruskal-wallis	53
3.3.3.2. Diagrama de cajas	60
3.3.4. Sólidos	61
III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	64
1.1. Conclusiones	64
1.2. Recomendaciones	66
REFERENCIAS	68
ANEXOS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de producción de biogás	10
Figura 2. Ejemplo general de una curva cinética de crecimiento de microalgas	13
Figura 3. Cámara de Neubauer para el conteo celular	14
Figura 4. Tanque – digestor dilución de estiércol	23
Figura 5. Estructura protectora (plástico de invernadero)	23
Figura 6. Sensor electroquímico	24
Figura 7. Mangueras para la distribución del gas (CO ₂) y aire	25
Figura 8. Línea del tiempo descriptiva de la fase experimental	27
Figura 9. Análisis de sólidos totales	32
Figura 10. Análisis sólidos disueltos	33
Figura 11. Equipo de filtración ensamblado para el análisis de sólidos suspendidos	34
Figura 12. Análisis de sólidos suspendidos	35
Figura 13. Esquema para la presentación de resultados y análisis	36
Figura 14. Variación del pH durante los 15 días de experimentación pertenecientes a la fase #3	37
Figura 15. Variación de la temperatura durante los 25 días de experimentación pertenecientes a las fases #2 y #3	39
Figura 16. Variación de concentración de CO ₂ en el tanque durante los 15 días de experimentación pertenecientes a la fase #3	40
Figura 17. Variación de la presión en el tanque durante los 25 días de experimentación pertenecientes a las fases #2 y #3	41
Figura 18. Crecimiento celular CMIE - K2-003 experimental vs. base	43
Figura 19. Crecimiento celular CMIE - K2-003 experimental	44
Figura 20. Crecimiento celular CMIE - J1-003 experimental vs. base	45
Figura 21. Crecimiento celular CMIE - J1-003 experimental	46
Figura 22. Crecimiento celular Consorcio	47
Figura 23. Comportamiento Consorcio (1)	48
Figura 24. Comportamiento Consorcio (2)	48
Figura 25. Comportamiento Consorcio (3)	49

Figura 26. Comportamiento Consorcio (BLANCO)	49
Figura 27. Resultados de Sólidos Totales para cada tratamiento y sus repeticiones	62
Figura 28. Composición de los sólidos totales de cada muestra	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Detalle de los géneros experimentales seleccionados	26
Tabla 2. Combinaciones entre las variables a considerar dentro de la experimentación	29
Tabla 3. Resumen de los valores promedio obtenidos para “ μ ” y “td” para cada género, el consorcio y sus repeticiones (base y experimental)	52
Tabla 4. Valores de “P” registrados para cada día de experimentación en la fase #3	55

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Concentración de la biomasa	14
Ecuación 2. Velocidad de crecimiento de las microalgas (μ)	22
Ecuación 3. Tiempo de duplicación de las microalgas (td)	22
Ecuación 4. Cálculo de los Sólidos Totales (ST) por diferencia de pesos	32
Ecuación 5. Cálculo de los Sólidos Suspendidos (S _{susp}) por diferencia de pesos	34
Ecuación 6. Cálculo de los sólidos totales (ST)	35
Ecuación 7. Cálculo de los sólidos disueltos (S _{dis})	35

I. INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La contaminación del aire y el cambio climático son dos problemáticas que presentan gran relación entre sí y que a su vez, en la actualidad se han convertido en temas de gran controversia y preocupación a nivel mundial. Su progresivo agravamiento a causa de las emisiones desmedidas de Gases de Efecto Invernadero (GEI), que aportan un continuo desgaste y modificación de la atmósfera, ha ocasionado que el mundo se vuelque en la búsqueda de alternativas para frenar estos preocupantes fenómenos que afectan significativamente al ambiente y a la salud humana (Maione et al., 2016), (Zhongchao, 2014).

Los GEI pueden tener un origen tanto natural como artificial, siendo la primera cuando provienen de eventos como incendios forestales o erupciones volcánicas y artificial cuando se producen a partir de las emisiones generadas por actividades industriales, la quema de combustibles fósiles, la ganadería, la agricultura, entre otras (Idowu, 2012), (Saulnier y Varella, 2013). Estos gases son reconocidos como los más nocivos para la atmósfera, y por ende para el ambiente, cuando sus concentraciones en ésta exceden los límites naturales; el vapor de agua, CO₂, CH₄, N₂O, O₃, SF₆ y otros compuestos como los CFC's, HFCs y PFCs son los gases que conforman el grupo en cuestión (Idowu, 2012), (Zhongchao, 2014).

La industria pecuaria presenta una gran incidencia a nivel mundial en lo que respecta a la generación de contaminantes que afectan al agua, aire y suelo alrededor del mundo (Pinos-Rodríguez et al., 2012). Referente al aire, las actividades ganaderas son responsables del 16% de las emisiones globales de GEI que perjudican de manera directa a la atmósfera, además de la generación de olores indeseables y gran cantidad de polvos; a pesar de esto, tiene un gran valor dentro de la industria alimenticia, por lo que su crecimiento y desarrollo ulteriores son necesarios (Hall y Wreford, 2012), (Pinos-Rodríguez et al., 2012).

Uno de los problemas puntuales de la ganadería es el estiércol y el manejo adecuado de éste, para así evitar la generación de impactos ambientales mayores sobre el ambiente (Zhongqi y Zhang, 2014).

El estiércol producido por animales emite gran cantidad de gases una vez que inicia su proceso de descomposición, siendo los más abundantes y nocivos para el medio el metano (CH₄) y el dióxido de carbono (CO₂) en concentraciones del 60% y 35% a 40% respectivamente (Abdeshahian, Lim, Ho, Hashim, & Lee, 2016). En lo que respecta al ganado porcino, se conoce que al nivel global, este es responsable de la emisión de aproximadamente 668 millones de toneladas de CO₂(equivalente) anuales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], n.d.). La descomposición de esta materia se produce por la acción de microorganismos endógenos (Abdeshahian et al., 2016).

La abundante generación de estiércol por parte de las actividades ganaderas ha motivado el desarrollo de varios proyectos a nivel mundial, enfocados en la reducción y mitigación de la contaminación de las diferentes matrices ambientales previamente mencionadas; en cuanto al aire, las estrategias de captura y secuestro de carbono (Carbon Capture and Storage – CCS) han tenido una aceptación limitada debido a los elevados costos de implementación y a las grandes extensiones de tierra u océanos requeridas (Acién et al., 2012) (Singh y Ahluwalia, 2013).

Por otra parte, los cultivos de microalgas y cianobacterias están teniendo gran acogida como herramientas utilizadas para la captura biológica de CO₂ debido a la viabilidad de su aplicación, la efectividad del proceso y los múltiples beneficios que dichos organismos tienen sobre el ambiente (Raeesossadati et al., 2015), (Mouahid et al., , 2016), (Singh y Ahluwalia, 2013).

Las microalgas y las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos; a través de este proceso logran convertir al CO₂, agua y sales inorgánicas en biomasa ayudándose de la luz solar (Vainshtein, 2014). Estos microorganismos son

capaces de soportar y fijar elevadas concentraciones de CO₂ presentes en el medio, teniendo un rendimiento de 10 y hasta 50 veces mayor al de las plantas terrestres (Raeesossadati et al., 2015), (Sayre, 2010), (Singh y Ahluwalia, 2013), (Chen et al., 2015). Debido a sus características y eficiencia relacionadas a la captura de carbono, los proyectos desarrollados con microalgas han sido catalogados como Mecanismos de Desarrollo Limpio (MDLs) que aportan a la mitigación de los daños generados por las emisiones de GEIs (Singh y Ahluwalia, 2013).

Algunas de las especies de microalgas y cianobacterias que ya han sido estudiadas en el campo de la fijación de carbono y que han reflejado resultados favorables son: *Tetraselmis* sp. con capacidad de fijar 0.0241 g L⁻¹ d⁻¹ de CO₂, *Nannochloropsis oculata* con 0.017 g L⁻¹ d⁻¹, *Dunaliella tertiolecta* con 0.12 g L⁻¹ d⁻¹, *Chlorella vulgaris* con 0.09 g L⁻¹ d⁻¹ y *Scenedesmus obliquus* con 0.150 g L⁻¹ d⁻¹ (Raeesossadati et al., 2015). A pesar de que las microalgas son microorganismos que presentan una elevada capacidad de adaptación a diferentes condiciones experimentales, resulta indispensable controlar ciertas variables que inciden de manera directa en el desarrollo de las mismas y por lo tanto en un proceso eficiente de captación de carbono. Las variables que se deben controlar son la luz, temperatura, aireación, pH, concentración de CO₂ presente, entre otros (Gonçalves et al., 2016), (Raeesossadati et al., 2014) (Raeesossadati et al., 2015).

Alcance

Con el presente trabajo de titulación se identificó el género de microalgas y cianobacterias nativas del Ecuador, que logró fijar la mayor cantidad dióxido de carbono (CO₂) emitido por el estiércol porcino en proceso de descomposición, tras haberse ejecutado un proceso previo de selección, purificación y escalamiento de las especies de microalgas disponibles. Para el desarrollo de la investigación, se seleccionaron dos géneros (una cianobacteria y una microalga) pertenecientes a la Colección de Microalgas para la Investigación del Ecuador – CMIE: *Rhabdoderma* sp. con código CMIE – J1-003 y *Pleurococcus* sp., con código CMIE-K2-003. Los géneros de microalgas y cianobacterias mencionados fueron identificados mediante un análisis de sus características morfológicas y son propiedad del Laboratorio de Biotecnología Energética – BIOTEC, perteneciente a la Corporación para la Investigación Energética. BIOTEC opera bajo el permiso de investigación para la colectación de muestras No. 002-14 IC-MC-DNB/MA otorgado por el Ministerio de Ambiente (MAE) y, además, cuenta con un Contrato Marco del Permiso de Acceso de Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015-0011. Todos los ensayos, así como el manejo de las microalgas y cianobacterias, fueron realizados en las instalaciones de BIOTEC, que se encuentra dentro del Centro de Capacitación de la Empresa Eléctrica Quito, por lo que los microorganismos siempre estuvieron bajo su custodia.

El proyecto fue ejecutado a escala laboratorio en las instalaciones de BIOTEC; para lo cual se controlaron variables como la luz, temperatura, dilución del estiércol y su pH, con el fin de brindar a las microalgas y cianobacterias un medio de trabajo y crecimiento adecuado. En lo que respecta a la cuantificación de CO₂ a la salida del experimento, se utilizó una celda electroquímica, con la cual se realizó la medición de la concentración de dicho gas, la misma que se ejecutó diariamente durante los últimos 15 días de experimentación dentro del período de 25 días establecido.

Justificación

A través del presente proyecto se espera proporcionar una alternativa viable para dar solución a uno de los mayores problemas por los que atraviesa actualmente la industria ganadera: la emisión de GEIs a la atmósfera, con un enfoque puntual en la reducción de las emisiones de CO₂ generadas por estiércol porcino en proceso de descomposición.

En Ecuador, de acuerdo a los datos registrados en la última Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua - ESPAC, realizada en el año 2015 por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos - INEC, se determinó que existían aproximadamente 1,6 millones de cabezas de ganado porcino (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos [INEC], 2015). Adicionalmente, se conoce que el ganado porcino genera alrededor de 4,7kg diarios de estiércol por cabeza de ganado; lo que significaría que anualmente se están produciendo un aproximado de 2,750 millones de kilos de estiércol de origen porcino en el país (Noorollahi et al., 2015), (Pinos-Rodríguez et al., 2012).

Muchos proyectos se han enfocado en la mitigación de las emisiones de metano (CH₄), sin embargo, el dióxido de carbono (CO₂) que resulta de la descomposición del estiércol generado, durante los 25 primeros días, está ocasionando también un gran impacto sobre el medio, sobre todo, en la atmósfera (Varnero, 2011).

Por lo tanto, se puede evidenciar la necesidad de desarrollar sistemas de tratamiento de estiércol porcino, que permitan reducir la cantidad de dióxido de carbono (CO₂) que está siendo emitido a la atmósfera una vez que su proceso de descomposición inicia; teniendo como resultado una alternativa viable y aplicable a la reducción y mitigación de los daños generados, para que así, la industria ganadera se continúe desarrollando de manera sostenible y responsable con el medio ambiente.

Objetivos

Objetivo General

Determinar cuál es el experimento más eficiente con respecto a la reducción de la emisión CO₂ proveniente de estiércol porcino en proceso de descomposición, mediante la implementación de cultivos de microalgas que ayuden a disminuir la concentración de dicho gas al final del proceso.

Objetivos Específicos

- Diseñar un sistema que permita la contención y conducción del CO₂ generado desde el tanque de estiércol diluido hacia los tanques de microalgas y cianobacterias.
- Cuantificar la cantidad de dióxido de carbono captado por las microalgas y cianobacterias en los diferentes experimentos.
- Identificar el género de microalga o cianobacteria que presente una mayor eficiencia con respecto al proceso de captación de CO₂ dentro de la experimentación planteada.
- Verificar la existencia de un aumento progresivo en la cantidad de biomasa durante el período de experimentación como un indicador de la fijación del CO₂ emitido por el estiércol.

II. DESARROLLO DEL TEMA

1. CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Energía

A medida que crece la población mundial, la demanda energética aumenta; esta problemática ha ocasionado que la quema de combustibles fósiles a nivel mundial se acelere, por lo que la contaminación del aire se ha visto agravada, derivando en impactos nocivos sobre el medio ambiente y la salud (International Energy Agency [IEA], 2016), (Xueqin et al., 2013). Este acelerado consumo de combustibles fósiles, además de ocasionar impactos nocivos sobre el medio ambiente y la salud, ha encaminado al mundo a un uso desmedido de estos recursos naturales no renovables, que tarde o temprano derivará en el agotamiento de los mismos y por ende, en una escasez energética (Holechek et al., 2015).

La Agencia Internacional de Energía (AIE), ha establecido 3 estrategias dirigidas al sector energético que resultan rentables y que encaminan a los gobiernos del mundo hacia la reducción de las emisiones que se liberan a la atmósfera; el establecimiento de objetivos ambiciosos a largo plazo enfocados en la mejora de la calidad del aire, la generación de políticas que se enfoquen en la calidad del aire y su mejora continua, facilitando así el alcanzar dichos objetivos y la ejecución de programas de seguimiento y control enfocados en el monitoreo, evaluación, aplicación y comunicación efectivos (IEA, 2016).

1.1.1. Seguridad energética

Los combustibles fósiles son actualmente la principal fuente de energía, tanto térmica como eléctrica, a nivel mundial; sin embargo, es conocido que la combustión de éstos (hidrocarburos y carbón) genera una gran cantidad de GEI, los mismos que agravan la condición actual de contaminación ambiental y por ende, aportan significativamente al cambio climático (Umbarila, 2015).

La seguridad energética se basa en garantizar a los diferentes países del mundo el acceso a los recursos energéticos necesarios para abastecer la demanda de energía existente en cada uno de ellos, tanto en el aspecto físico que se refiere netamente a la producción de energía, como en la parte económica que se relaciona directamente con la capacidad de abastecer de la demanda existente con dicha producción. Por lo tanto, se busca contar de manera permanente con el suministro de energía requerido por cada nación y con los recursos económicos para su producción y distribución (Segoviano, 2015), (Wang, 2015).

1.1.2. Energías renovables

Las energías renovables se han convertido en una alternativa de desarrollo sostenible a nivel mundial, ya que, además de aportar de manera significativa a la mitigación del cambio climático y sus efectos nocivos sobre el medio, aporta también al crecimiento de la economía mundial; dando paso a un desarrollo socio – económico de los países (especialmente de aquellos que aún se encuentran en vías de desarrollo) al ser una nueva fuente de trabajo y, a la vez, disminuyen la necesidad de importar energía, y por ende, reducen significativamente los costos energéticos (Filho et al., 2013).

Las energías renovables se generan a partir del aprovechamiento de diferentes recursos naturales como son la luz y calor del sol, el viento, el calor de la tierra, el agua y la biomasa. El uso adecuado de estos recursos, en términos energéticos, da origen a la producción de diferentes tipos de energías como son la energía solar, eólica, geotérmica, hidráulica, marina y de la biomasa (Woldeyohannes et al., 2016).

La importancia de estos recursos energéticos recae en la disminución de las emisiones de GEI y en el garantizar una seguridad energética basada en el uso de recursos renovables que presentan varios aspectos favorables al momento de aprovecharlos: son ilimitados, sus niveles de contaminación e impacto

ambiental son bajos y se encuentran disponibles en todo el mundo (Woldeyohannes et al., 2016), (Umbarila, 2015).

1.1.2.1. Biomasa

De acuerdo a investigaciones actuales referentes al rendimiento y efectividad en la utilización de energías renovables como una nueva fuente energética, varios expertos han coincidido en la idea de que la biomasa se está convirtiendo en una de las principales alternativas a ser aprovechadas debido a su abundancia, fácil aprovechamiento y elevados beneficios económicos (Xueqin et al., 2013).

En base a varios estudios realizados por el Comité de la Energía, de la Real Academia Sueca de la Ciencia, se ha dado a conocer que para el año 2050 se espera que la energía proveniente de la biomasa represente el 20% de la provisión de energía en el mundo y un 10% de la producción de electricidad (Destouni, 2010).

1.1.3. Producción de biogás

El biogás generado a partir de la descomposición de los desechos (estiércol), proveniente de las actividades ganaderas (ver *Figura 1*), se está convirtiendo a nivel mundial en una de las principales fuentes de energía renovable en forma de biomasa (Magnani, 2012). Esto se da especialmente en zonas rurales, ya que es ahí donde las actividades ganaderas tienen mayor presencia y por lo tanto, la generación de gases provenientes de la descomposición del estiércol resulta representativa y se genera en cantidades adecuadas para el sistema (Magnani, 2012).

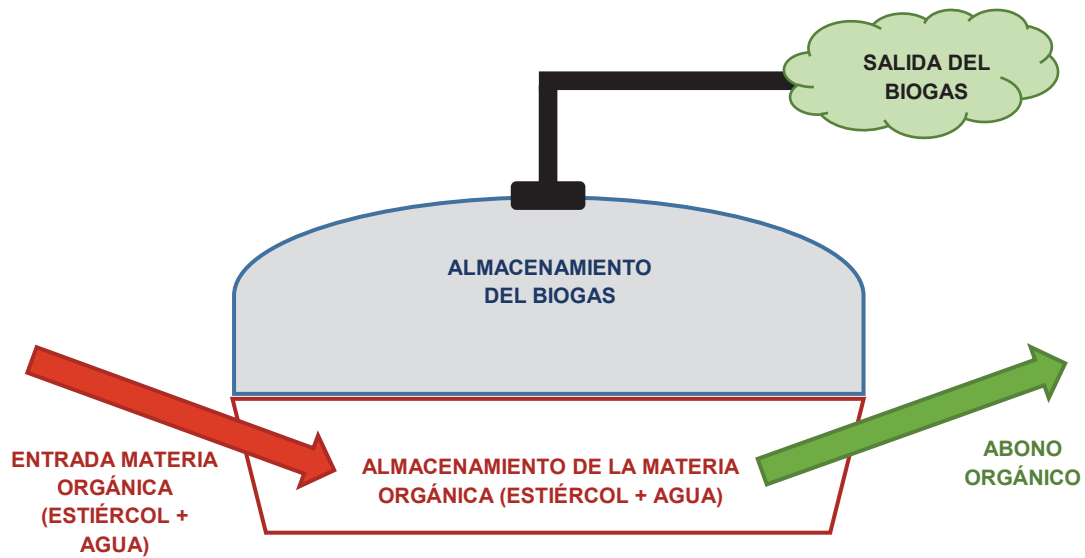


Figura 1. Sistema de producción de biogás.

Adaptado de (Abdeshahian et al., 2016), (Noorollahi et al., 2015) & (Varnero, 2011).

1.2. Microalgas y cianobacterias

Las microalgas y cianobacterias son microorganismos fotosintéticos, por lo que consumen agua, luz solar y CO_2 como principales fuentes de alimento y por ende de energía. Estos microorganismos han demostrado tener una gran eficiencia en cuanto al consumo de dichos recursos, especialmente del CO_2 , la misma que se ve reflejada en su crecimiento celular acelerado y abundante, razón por la cual, las microalgas han sido catalogadas como mecanismos naturales de fijación de carbono atmosférico y han despertado un gran interés actualmente en el mundo de la investigación (Chen et al., 2015).

Sus aplicaciones se han distribuido en una gran cantidad de campos de investigación, tal como lo detallan Fernández, I., y sus colaboradores (2016), en su trabajo de investigación "*Hierarchical control for microalgae biomass production in photobioreactors*", donde mencionan que algunas de las industrias

donde ya están siendo implementados dichos microorganismos son las siguientes: farmacéutica, cosmética, química, alimenticia y combustibles (Fernández et al., 2016).

Además, se conoce que bajo las condiciones atmosféricas ideales y controladas, estos microorganismos son capaces de alcanzar su mayor tasa de captación / fijación de carbono y por ende de crecimiento celular, lo cual tiene una relación directa con la producción de biomasa (Fernández et al., 2016). Esto ha dado paso a que las microalgas se conviertan en materia prima, en forma de biomasa, para la generación de energía limpia y biocombustibles, presentando la ventaja de que a diferencia de otros mecanismos de captación natural de CO₂, la implementación de cultivos de microalgas requieren de extensiones territoriales menores y presentan un rendimiento mayor (Zawar et al., 2016).

1.2.1. Especies de microalgas

Estos microorganismos fotosintéticos representan una de las formas de vida más antiguas habitando la Tierra. Una de las clasificaciones que se les ha dado ha sido como microalgas y cianobacterias según sus características, siendo las cianobacterias conocidas también como algas verde-azuladas, mientras que las microalgas más estudiadas han pertenecido principalmente al orden de las clorofitas, conocidas también como algas verdes; ambos se caracterizan por el tamaño microscópico de sus células que generalmente se encuentran en un rango entre 5 y 20 micrómetros (Lama et al., 2016), (Taelman et al., 2013).

Existen varias especies que ya han sido analizadas en diferentes experimentaciones que buscan medir las tasas de crecimiento de éstos microorganismos; algunas de éstas especies son: *Amphora* spp., *Ankistrodesmus falcatus*, *Botryococcus braunii*, *Chaetocero gracilis*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella sorokiniana*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella* spp., *Nannochloropsis atomus*, *Rhodomonas* spp., *Scenedesmus obliquus*, *Tetraselmis suecica*, entre otras (Mennaa et al., 2015), (Santos-ballardo et al., 2015). Sin embargo, la mayoría de experimentos se han desarrollado en los

campos de investigación referentes al tratamiento de aguas residuales, escalamiento de cultivos de microalgas y cianobacterias con alimentación artificial de CO₂ y tratamiento de niveles elevados de fosforo y nitrógeno (Mennaa et al., 2015).

1.2.2. Cultivos

Se conoce que las microalgas y cianobacterias, a diferencia de otros microorganismos, son capaces de resistir condiciones ambientales extremas, lo cual ha sido uno de los factores determinantes para que estos microorganismos hayan tenido tanto éxito en el campo de la remediación ambiental; han logrado resistir la exposición a medios tanto gaseosos como líquidos altamente contaminados, utilizando a las sustancias contaminantes como: CO₂ y nutrientes (fósforo y nitrógeno) como sus principales fuentes de alimento y energía (Caporgno et al., 2015).

1.2.3. Producción y/o escalamiento

Los cultivos de microalgas y cianobacterias se manejan en sistemas conocidos como fotobiorreactores, los cuales pueden ser abiertos o cerrados según la experimentación que vaya a desarrollarse y los requisitos referentes a las condiciones ambientales de la misma (Taelman et al., 2013).

Generalmente, los cultivos de microalgas o cianobacterias se desarrollan a partir de muestras previamente colectadas y conservadas a escala laboratorio, las mismas que normalmente pertenecen a colecciones de diferentes universidades o centros de investigación (Caporgno et al., 2015). A partir de dichas muestras se inicia un proceso de escalamiento que consiste en aumentar progresivamente el volumen del medio en el cual se encuentra contenido el cultivo de microalgas o cianobacterias, con el fin de impulsar el desarrollo de las mismas brindándoles más espacio y los nutrientes necesarios (Caporgno et al., 2015).

Existen ciertas especies, que incluso de una día para el otro logran duplicar su población si las condiciones ambientales son las óptimas para su desarrollo (Mckennedy et al., 2016).

1.2.4. Curva cinética de crecimiento

La curva de crecimiento de las microalgas pasa por 5 fases: fase "lag", que se refiere a un período de adaptación por el cual atraviesan las microalgas, seguido de las etapas de crecimiento exponencial y lineal donde las microalgas alcanzan la mayor tasa de desarrollo, posteriormente atraviesan una fase estacionaria donde ya no se da una variación representativa en la abundancia de la comunidad de microalgas y finalmente esta la fase de senescencia que se refiere a la muerte de los individuos (Essmann, 2011). Este proceso se indica en la *Figura 2.* a continuación.

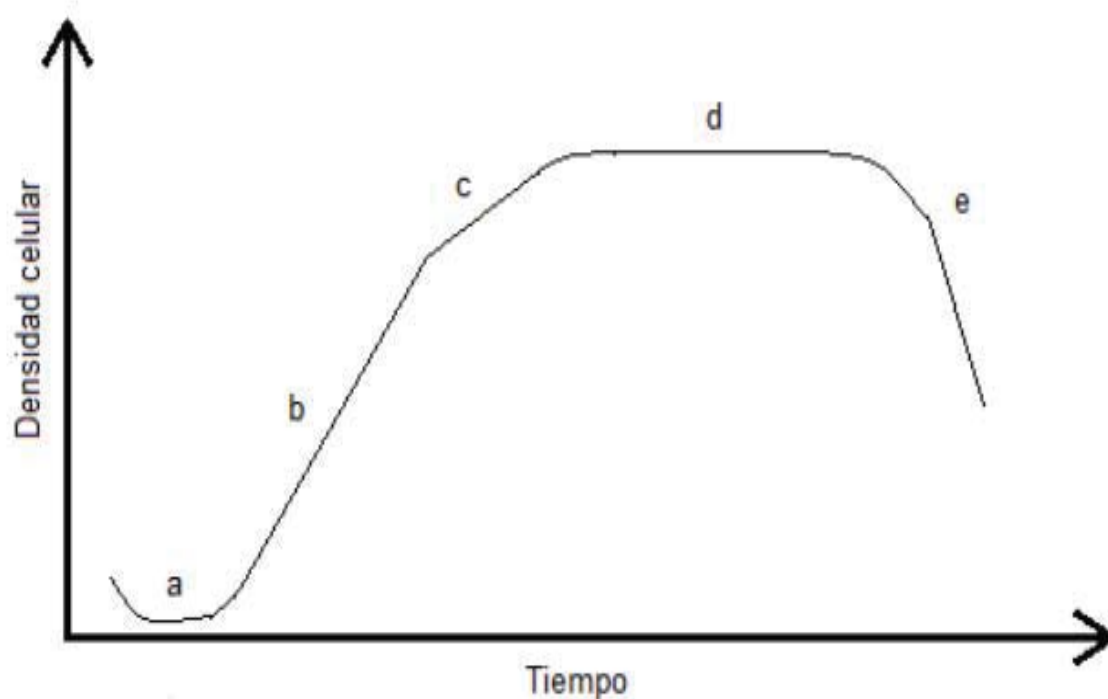


Figura 2. Ejemplo general de una curva cinética de crecimiento de microalgas. Tomado de (Essmann, 2011).

1.2.5. Conteo celular con la cámara de Neubauer

El conteo es un método de recuento celular, para el cual se utilizan cámaras cuadrículadas con una dimensión conocida; la cámara de Neubauer es una de las herramientas empleadas para la ejecución de conteos celulares; ésta posee una cuadrícula general dividida en varias porciones de sub-cuadrículas, que se categorizan por secciones (1, 2 y 3) de acuerdo al volumen que abarcan, tal como se puede apreciar en la *Figura 3*, en éstas cuadrículas se realiza el conteo de los microorganismos presentes (Arnáiz, Isac y Lebrato, 2000, pp. 45-52).

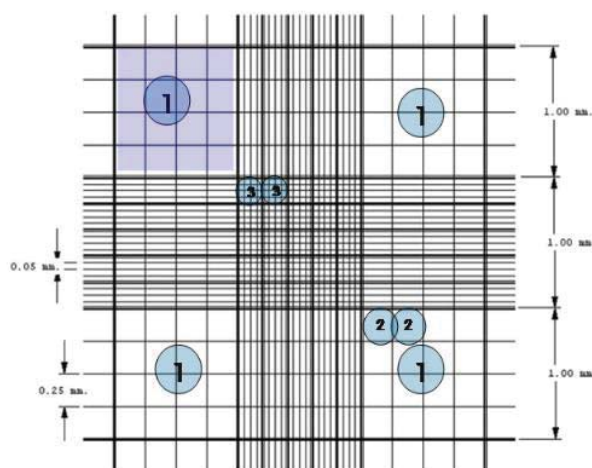


Figura 3. Cámara de Neubauer para el conteo celular.

Tomado de (Bastidas, 2011).

Una vez realizado el conteo, se deben aplicar los cálculos que permitan conocer la concentración de células en un volumen determinado (generalmente en 1 ml), para lo cual se aplica la fórmula detallada en la *Ecuación 1*; al número de microorganismos resultante del conteo se lo multiplica por el factor de dilución con el que se trabajó, además, de acuerdo a la sección de la cuadrícula en la que se trabaje (1, 2 o 3) al número de microalgas obtenido en el conteo se lo multiplica también por un determinado factor, siendo éste de 10.000 para la sección #1, 160.000 para la #2 y 250.000 para la #3 (Bastidas, 2011).

$$\text{Concentración} \left(\frac{\text{biomasa}}{\text{ml}} \right) = \frac{\# \text{ de microalgas} * \text{factor para cada sección} * fd}{\text{Número de cuadrados}} \quad (\text{Ecuación 1})$$

1.3. Captación biológica de carbono

La fijación biológica de carbono se basa en la capacidad de ciertos organismos de captar el CO₂ atmosférico de manera natural, utilizándolo como fuente de energía y alimento para su desarrollo (Mouahid et al., 2016). Las microalgas y cianobacterias, a través de varias experimentaciones e investigaciones, han demostrado tener una gran afinidad al proceso de captación de dicho CO₂, proceso que además de aportar significativamente a la reducción de la concentración de GEI en la atmósfera, ha permitido generar abundantes cantidades de biomasa que actualmente están siendo investigadas en el campo energético y de los biocombustibles (Mouahid et al., 2016).

Las microalgas y cianobacterias han sido catalogadas como los organismos vivos más eficientes al ser aplicados en sistemas de captación biológica de carbono debido a la capacidad fotosintética elevada que las caracteriza (Raeesossadati et al., 2015), (Sayre, 2010), (Taelman et al., 2013). Se conoce que estos microorganismos son incluso más eficientes que las plantas terrestres, ya que pueden alcanzar un rendimiento entre 10 y 50 veces mayor, utilizando extensiones territoriales mucho menores, a lo cual se le suma la ventaja de que la recolección de la biomasa es de fácil ejecución y puede incluso alcanzar niveles del 100%, lo cual aporta positivamente a los usos posteriores que se le pueda dar a ésta (Raeesossadati et al., 2015), (Sayre, 2010), (Taelman et al., 2013).

La capacidad de las microalgas y cianobacterias para captar el carbono se debe a que las células de éstos microorganismos poseen una estructura adecuada para retener y transportar dicho elemento, lo cual genera un crecimiento exponencial de la biomasa y posibilita el uso de estos microorganismos como herramientas para el desarrollo de estrategias de captura y secuestro de carbono (Raeesossadati et al., 2015), (Santos-ballardo et al., 2015), (Sayre, 2010).

Además de lo expuesto previamente, de acuerdo a la investigación realizada por Richard Sayre en el año 2010, en su publicación *“Microalgae: The Potential for*

Carbon Capture”, las microalgas y cianobacterias presentan una serie de ventajas referentes a su utilización para la captura de dióxido de carbono y la producción de biocombustibles tal como se detalla a continuación:

- Los cultivos de estos microorganismos requieren de extensiones de terreno menores que las plantas terrestres.
- Tienen una gran capacidad para capturar CO₂ debido a su estructura, reduciendo considerablemente las emisiones de dicho gas a la atmósfera.
- Presentan una eficiencia fotosintética mayor a la de las plantas terrestres ya que poseen una capacidad más elevada de captar la luz solar y convertirla en energía química.
- Son capaces de destinar la mayor parte de su energía al proceso de división celular, siempre y cuando las condiciones del medio sean las apropiadas para el crecimiento, lo cual influye de manera directa en la cantidad de biomasa que se genera.
- A diferencia de las plantas terrestres, no requieren gastar energía en desarrollar estructuras como raíces, tallos, flores o frutos que no resultan funcionales en la producción de biomasa aprovechable.
- Son capaces de almacenar concentraciones elevadas de carbono.
- El desarrollo de cultivos de microalgas y cianobacterias no se ve condicionado por las estaciones del año; su cultivo se puede ejecutar en cualquier temporada / estación, siempre que las condiciones ambientales se controlen adecuadamente.
- Son capaces de adaptarse a condiciones de crecimiento irregulares.
- Al controlar variables como el pH del medio, la temperatura y la alimentación de CO₂ se puede maximizar la producción de biomasa.

Mediante investigaciones pasadas, se ha podido comprobar que los cultivos abiertos de microalgas y cianobacterias han alcanzado un promedio del 90% de efectividad referente a la captura de carbono, por lo que la utilización de éstos microorganismos como una alternativa de bajo impacto ambiental para la generación de energía y biocombustibles está teniendo una gran acogida como parte de un desarrollo sostenible basado en la producción de energías limpias y

reducción de las emisiones, en éste caso, de CO₂ (Mouahid et al., 2016), (Sayre, 2010).

2. CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Descripción del área de estudio

El experimento se realizó bajo la dirección científica de Cristina Guamán y Nory González, investigadoras de BIOTEC, en las instalaciones del laboratorio BIOTEC ubicadas dentro del Centro de Capacitación de la Empresa Eléctrica Quito, que se encuentra en la calle Manuela Sáenz - vía a Nayón, dentro de la Parroquia de Cumbayá.

La Parroquia de Cumbayá pertenece al Distrito Metropolitano de Quito – DMQ, ubicada a una altitud de 2.369 m.s.n.m., ocupa una extensión de 2700 hectáreas y sus límites son al Norte: Nayón (en el sector donde se unen los ríos San Pedro y Machángara), al Sur: Conocoto y Guangopolo, al Este: Río San Pedro y al Oeste: el Río Machángara (Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Cumbayá [GADPC], 2012, pp. 28-34). Presenta un clima cálido con una temperatura que varía entre los 5°C y los 26°C normalmente y la humedad relativa que se evidencia en la zona se encuentra entre un 60% y 80%, la misma que se presta a variaciones, especialmente en épocas lluviosas (GADPC, 2012, pp. 28-34), (Worldmeteo, 2016).

2.2. Microalgas

Previo al desarrollo de la experimentación del presente trabajo de titulación, se llevó a cabo un proceso de purificación y escalamiento de las cepas de microalgas y cianobacterias disponibles en la colección (CMIE). Este proceso se encuentra descrito dentro del Anexo 5.

2.2.1. Selección de las cepas

Se seleccionaron las cepas de microalgas y cianobacterias disponibles dentro de la CMIE pertenecientes a BIOTEC. La identificación de los géneros seleccionados se realizó en base a claves taxonómicas referenciales y a la

literatura consultada, mediante la comparación de los caracteres morfológicos, de acuerdo a lo establecido en el Catálogo de Microalgas y Cianobacterias de agua dulce del Ecuador elaborado por las investigadoras de BIOTEC Cristina Guamán y Nory González (Guamán & González, 2016).

2.2.2. Aislamiento, purificación y escalamiento de las cepas seleccionadas

Se trabajó con cultivos de microalgas pertenecientes a la CMIE, utilizando 11 géneros diferentes de microalgas y cianobacterias pertenecientes a diferentes partes del Ecuador. Los cultivos fueron sometidos a un proceso de aislamiento mediante estrías discontinuas en medios de cultivo BG-11 (RippKa et al., 1979) y Bold's Basal Medium - BBM (Bold 1949, Bischoff & Bold 1963), cuyas composiciones se pueden ver en los Anexos 1 y 2. Este proceso tuvo como objetivo separar los diferentes géneros de microalgas y cianobacterias de los que se disponía y asegurar que estas nuevas cepas no se encuentren contaminadas por otros géneros, por hongos o bacterias.

Una vez purificadas las cepas, se recolectó la biomasa generada en las cajas Petri y se la traspasó a tubos falcon de 50ml, en los cuales además de la biomasa, se colocaron 30ml del medio de cultivo correspondiente para así dar inicio al proceso de escalamiento, para lo cual se revisó y siguió el procedimiento: "*Escalamiento de cultivos para microalgas*" perteneciente a BIOTEC.

A medida que la población microalgas crecía, se aumentó el volumen de medio de cultivo en el siguiente orden: 30ml → 200ml → 600ml → 2,5L → 5L.

Al pasar a los 600ml de cultivo, se seleccionaron los dos géneros con los que se trabajaría, basándose en la abundancia de biomasa presente, mediante métodos de colorimetría. Los géneros seleccionados fueron la cianobacteria *Rhabdoderma* sp. con código CMIE – J1-003 y la microalga *Pleurococcus* sp., con código CMIE - K2-003.

Con esto se buscó brindar a cada género de microalgas y cianobacterias los nutrientes necesarios para su desarrollo, siguiendo metodologías que detallan los procedimientos para la purificación y aislamiento de cultivos de estos microorganismos, basándose tanto en aquel perteneciente al laboratorio BIOTEC: *“Técnicas de aislamiento para microalgas y cianobacterias”*, como algunos detallados en el libro *“Algal Culturing Techniques”* de Robert. A. Andersen dentro de los capítulos 8 y 9 (Andersen, R., 2005, pp. 117-132), (Andersen, R., 2005, pp. 133-144).

2.2.3. Producción de biomasa

Una vez alcanzado el volumen de 5 litros, se procedió a dividirlo en la mitad y aforar cada uno de los duplicados hasta 5L nuevamente para que la biomasa continúe creciendo, disponiendo del medio de cultivo y espacio necesarios. Según el crecimiento observado a través de la coloración de los tanques, se repitió este proceso (generalmente cada 5 días) hasta alcanzar el volumen total de microalgas requerido, el cual fue de 30 L.

Adicionalmente, al alcanzarse los 5 L de cultivo, para asegurar que las microalgas y cianobacterias dispongan de los nutrientes necesarios para su desarrollo, se les agregó semanalmente 1 ml de Nitrofoska® foliar por cada litro de cultivo. La Nitrofoska® foliar es un suplemento nutritivo que aporta al desarrollo foliar, por ende actúa como alimento para éstos microorganismos; la composición de ésta se puede revisar en el Anexo 3.

2.2.4. Determinación de la curva cinética de crecimiento

2.2.4.1. Curva de crecimiento base

Tras haber seleccionado los géneros de microalgas y cianobacterias experimentales, se procedió a generar la curva de crecimiento base (normal) para cada uno de ellos; para esto se realizaron conteos celulares diarios a las 8:00 AM los días lunes, miércoles y viernes durante los 30 días de conteo

establecidos, haciendo uso de la cámara de Neubauer. Para cada conteo se hicieron 3 repeticiones y luego se calculó el valor medio, que sería el que represente la densidad celular (# cel / ml) de cada día. Cabe resaltar que para los conteos se trabajó con una dilución de 1:9, es decir, 1ml de cultivo en 9ml de agua destilada y al número de células obtenido (densidad celular) se lo multiplicó por el factor de dilución, el mismo que correspondía a 10, para así obtener la concentración en mililitros.

Para aplicar esta metodología se siguió el siguiente proceso: tomar 10 μ l (0,01ml) de la muestra, colocarlo en la cámara desde el lateral y realizar el conteo siguiendo una forma de zigzag sobre la cuadrícula (Bastidas, 2011).

Cabe resaltar que a partir del día 25 de conteo, se registraron puntos atípicos en ambas curvas de crecimiento, por lo que los datos correspondientes a estos días se eliminaron con el fin de tener una mejor comprensión de la evolución y tendencia de las curvas.

2.2.4.2. Curva de crecimiento experimental

Para la obtención de las curvas de crecimiento experimentales se siguió el mismo procedimiento que se detalló previamente en el apartado 2.4.1., con la única diferencia de que los conteos fueron ejecutados por un período de 15 días (tiempo de experimentación con microalgas y cianobacterias del presente trabajo de titulación); ver *Figura 8*.

2.2.4.3. Cálculo de la velocidad de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (td)

Con los datos obtenidos a partir de los conteos celulares ejecutados para la realización de la curva cinética de crecimiento de cada uno de los géneros de microalgas seleccionados, se procedió a realizar los cálculos para obtener los valores de la velocidad de crecimiento (μ), ver la *Ecuación 2*, y del tiempo de duplicación (td) de las microalgas, ver la *Ecuación 3*, aplicando las fórmulas

proporcionadas por el Instituto de Ciencias Básicas de la Unidad de Biología perteneciente a la Universidad Central del Ecuador para la determinación de parámetros cinéticos en microorganismos fotosintéticos, las mismas que fueron elaboradas por Franklin Gavilánez Elizalde, Ever Morales Avedaño y Denisse Molina en el año 2013; a continuación se indican dichas fórmulas en las *Ecuaciones 2 y 3*.

$$\mu = \frac{\ln(X_2 - X_1)}{t_2 - t_1} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Nota: Para aplicar esta ecuación se deben seleccionar dos puntos continuos de muestreo.

$$td = \ln 2 / \mu \quad (\text{Ecuación 3})$$

Cabe resaltar que para la aplicación de éstas ecuaciones, se tomó en cuenta únicamente aquellos intervalos donde la diferencia entre X2 y X1 resultaba positiva, con el fin de que los resultados aporten valores significativos.

2.3. Diseño del sistema

2.3.1. Digestor

El digestor fue construido tomando como estructura base un tanque con capacidad de almacenar 55 galones, equivalentes a 208,2 L. El tanque se encontraba sellado herméticamente tanto en la parte superior como en la base del mismo y contó únicamente con dos tapas pequeñas en la parte superior de éste, las mismas que fueron utilizadas para la alimentación del estiércol y posteriormente para la colocación tanto del sistema de distribución de CO₂, como para el manómetro.

En lo que respecta al aislamiento del mismo, con el fin de evitar la existencia de un shock térmico durante las noches (cuando la temperatura bajara), se colocó material aislante alrededor del tanque. Adicionalmente, se construyó una

estructura protectora con plástico de invernadero alrededor del tanque para impermeabilizar y almacenar el calor recibido durante el día, permitiendo mantener al reactor caliente para que el proceso de descomposición sea lo más efectivo posible. En las figuras 4 y 5 se puede apreciar el tanque y la infraestructura que lo protege.



Figura 4. Tanque – digestor dilución de estiércol.



Figura 5. Estructura protectora (plástico de invernadero)

2.3.2. Medición del CO₂

La medición del CO₂ se realizó haciendo uso de una celda electroquímica a través de un analizador de gases de combustión que basa su funcionamiento en la utilización de una sonda o sensor electroquímico que permite la medición o cuantificación de éstos en porcentaje o partes por millón (0,01% - 100ppm o 0,1% - 1000ppm); ppm para concentraciones bajas y porcentaje para concentraciones elevadas (TESTO 350, n.d.).

Estos sensores o celdas contienen un electrolito acuoso que se elige de acuerdo a la medición a realizarse y en éste se encuentran por lo general dos o tres electrodos entre los que se genera un campo eléctrico (Academia TESTO, 2010). Además de esto, la celda se encuentra rodeada por membranas que son permeables al gas al que será expuesta la celda; para que el sensor realice la medición de CO₂, se lleva a cabo la siguiente reacción química: $\text{CO} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CO}_2 + 2\text{H} + 2\text{e}^-$ (Academia TESTO, 2010).

En la *Figura 6.* presentada a continuación, se puede apreciar la estructura de un sensor o celda electroquímica y su funcionamiento.

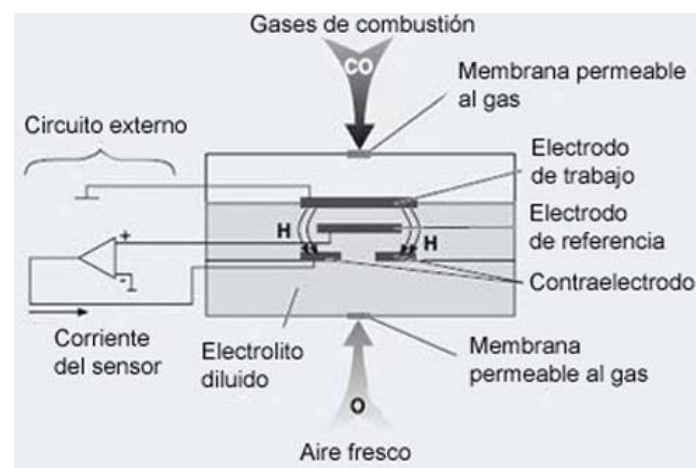


Figura 6. Sensor electroquímico.

Tomado de (Academia TESTO, 2010).

Para realizar esta medición, en el tanque de almacenamiento de la dilución de estiércol se adaptó una llave de paso para el gas, hecha a la medida de la sonda

del equipo con el fin de que esta pueda ingresar al tanque al momento de la medición, evitando la existencia de pérdidas significativas del gas durante su ejecución.

2.3.3. Distribución del CO₂

La distribución del CO₂ se realizó directamente desde el tanque de almacenamiento del estiércol diluido hacia los tanques de microalgas, esto se ejecutó implementando un sistema de distribución con mangueras sellado herméticamente con el fin de prevenir y evitar pérdidas indeseables del gas tal como se puede apreciar en la *Figura 7*. Para distribuir el gas se diseñó un dispositivo de succión que permitió recoger 1696 cm³ de gas por carga; diariamente a los tanques de cada tratamiento se les alimento con 2 descargas del dispositivo, por lo que cada tanque recibió una alimentación diaria de CO₂ de aproximadamente 848 cm³.



Figura 7. Mangueras para la distribución del gas (CO₂) y aire

2.3.4. Tanques de microalgas

Para los tanques de almacenamiento de las microalgas se utilizaron bidones de plástico con capacidad de 10 litros. A las tapas de los tanques, se les hicieron uno o dos agujeros (uno en el caso de los blancos que solo requerían alimentación del CO₂ artificial) con el fin de canalizar por estos agujeros los

sistemas de distribución del CO₂ (natural o artificial respectivamente) y de aireación.

2.4. Diseño experimental

La experimentación se llevó a cabo en reactores cerrados, con el fin de almacenar el CO₂ que se genere para posteriormente medir su concentración dentro de cada uno de éstos.

2.4.1. Variables

2.4.1.1. Especies de microalgas seleccionadas

De acuerdo a las curvas cinéticas de crecimiento y a la adaptabilidad de las microalgas y cianobacterias a las condiciones atmosféricas del área de experimentación, se seleccionaron los siguientes géneros: *Rhabdoderma* sp. y *Pleurococcus* sp., además, entre ambas especies se conformó un consorcio.

En la *Tabla 1.* se detalla la información más relevante referente al tipo y origen de los géneros elegidos.

Tabla 1.

Detalle de los géneros experimentales seleccionados.

GÉNERO	CÓDIGO	TIPO
<i>Rhabdoderma</i> sp.	CMIE - J1-003	Cianobacteria
<i>Pleurococcus</i> sp.	CMIE - K2-003	Microalga

2.4.2. Parámetros a controlar

2.4.2.1. Tiempo

El tiempo total de experimentación fue de 25 días continuos ya que en este período se evidencia la mayor tasa de emisión de CO₂ dentro del proceso (Varnero, 2011). Los primeros 10 días correspondieron a la fase de maduración del estiércol, mientras que los siguientes 15 días a la fase de mediciones y alimentación del CO₂ generado a los tanques de microalgas.

Previo a éstos 25 días de experimentación, se ejecutó un proceso de purificación y escalamiento de las cepas de microalgas durante los 5 meses anteriores al inicio de la experimentación. En la *Figura 8* se puede apreciar el tiempo de experimentación dividido entre las fases 2 y 3, además de una primera fase de preparación de las microalgas y cianobacterias ejecutada antes de que inicie el proceso experimental.

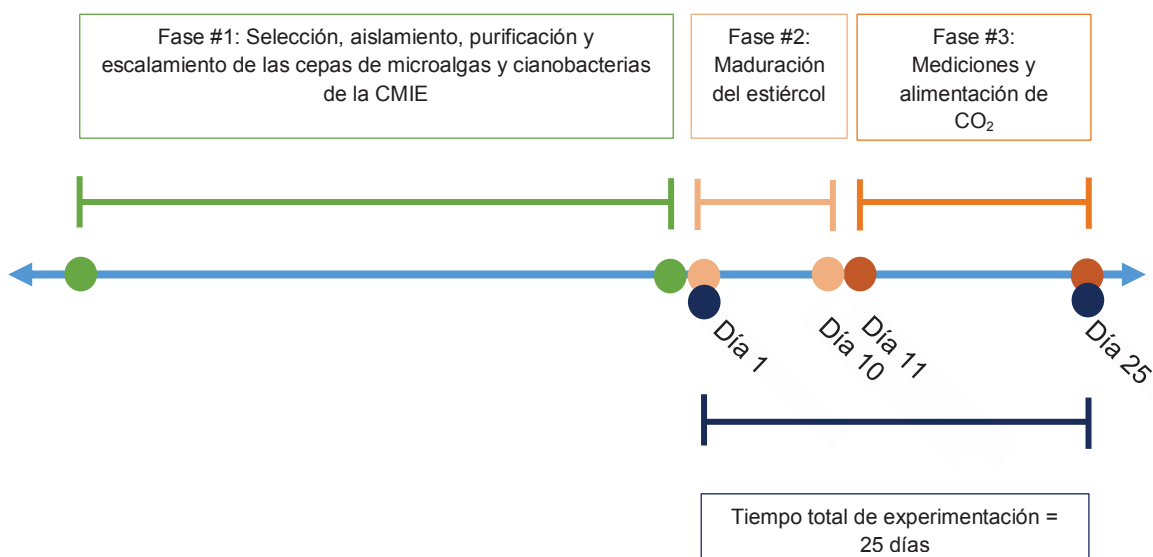


Figura 8. Línea del tiempo descriptiva de la fase experimental.

2.4.2.2. Volumen

Para el estiércol diluido se utilizó un tanque con capacidad de almacenar un volumen de 55 galones; se debió considerar un espacio para el almacenamiento del gas, por lo tanto se trabajó con 2/3 partes del recipiente para la mezcla y 1/3 del recipiente para almacenar el CO₂ que se genere. Por otra parte, para el

almacenamiento de las microalgas, se utilizaron recipientes con capacidad de almacenar 10 litros; de este espacio se hizo uso de un volumen de 5 litros.

2.4.2.3. Alimentación de CO₂ artificial

Durante los 15 días pertenecientes a la fase #3 de la experimentación, se alimentó a los tanques de microalgas con 3 minutos diarios de CO₂ al 5%, complementarios a la alimentación diaria de CO₂ natural que se les dio (Gonçalves et al., 2016).

2.4.2.4. Temperatura

La temperatura es uno de los factores más importantes a tomar en cuenta para el crecimiento de las microalgas; cuando la temperatura es elevada el desarrollo de las microalgas es acelerado, mientras que las temperaturas bajas impiden el crecimiento de estos microorganismos (Shimako et al., 2016). La temperatura ideal para el desarrollo de las microalgas depende de la especie en cuestión, sin embargo, se conoce de manera general que el rango ideal para el crecimiento es de 5 °C a 35 °C (Vainshtein, 2014). Para estas mediciones se utilizó un termómetro digital marca Traceable ®.

2.4.2.5. Aireación

Los reactores contaron con un sistema de aireación constante, es decir durante las 24 horas del día durante el tiempo de experimentación establecido. Este sistema consistió en la proporción y distribución de aire a los tanques, a través de la implementación de bombas de aireación conectadas con mangueras a los mismos.

2.4.2.6. Potencial de Hidrógeno (pH)

El pH debía ser neutro, con un valor de 7 en la escala de 0 a 14, ya que un pH muy ácido o básico puede inhibir el adecuado desarrollo del proceso de

fotosíntesis y por ende la captura de carbono y crecimiento de la biomasa (Vainshtein, 2014). Para realizar la medición del pH se utilizaron tiras de medición de pH marca MACHEREY-NAGEL (MN).

2.4.2.7. Luz

Las microalgas son microorganismos que basan su crecimiento en la cantidad de luz que reciben; el espectro, la intensidad y el tiempo que están expuestas a la luz influye directamente en su desarrollo (Huang et al., 2016), (Thawechai et al., 2016). Para que las microalgas logren aprovechar la luz solar, la radiación fotosintética debe encontrarse en un rango de entre 400 y 700nm, en dicho rango se produce la Radiación Fotosintéticamente Activa – RFA que es aquella en la cual las plantas logran realizar el proceso de fotosíntesis (Vainshtein, 2014).

Durante el día las microalgas recibían la luz del sol directamente, mientras que por las noches se les brindó luz artificial con 2 lámparas fluorescentes con una potencia de 40 watts. Para conocer la cantidad de luxes transmitidos por las lámparas se realizó la medición con un luxómetro marca SPER SCIENTIFIC® 850007, el resultado fue de 27667 luxes.

2.4.3. Determinación de las combinaciones y repeticiones a realizarse

Tabla 2.

Combinaciones entre las variables a considerar dentro de la experimentación

Nº DE EXPERIMENTO	TIPO DE ESTIÉRCOL	TIPO DE MICROALGAS	CÓDIGO	Nº DE REPETICIONES	TOTAL DE EXPERIMENTOS
1	Porcino	Blanco <i>Rhabdoderma</i> sp.	CMIE - J1-003	1	12
2	Porcino	Blanco <i>Pleurococcus</i> sp.	CMIE - K2-003	1	
3	Porcino	Blanco Consorcio	Consorcio	1	
4	Porcino	<i>Rhabdoderma</i> sp.	CMIE - J1-003	3	
5	Porcino	<i>Pleurococcus</i> sp.	CMIE - K2-003	3	

6	Porcino	Consortio	Consortio	3	
---	---------	-----------	-----------	---	--

Nota: Los primeros tres experimentos corresponden a los blancos, en los cuales se basó la comparación de resultados. Se realizaron 3 repeticiones para cada experimento, sin tomar en cuenta los blancos, por lo tanto se tuvo un total de 12 reactores.

Los blancos constaron de tanques con las diferentes cepas de microalgas y cianobacterias seleccionadas, así como su consorcio, sometidos únicamente a una alimentación de CO₂ artificial, mientras que los tanques experimentales (3 repeticiones por tratamiento) fueron aquellos a los que se les brindó una alimentación combinada de CO₂ artificial y natural (proveniente del tanque de descomposición del estiércol porcino).

2.4.4. Dilución del estiércol

La dilución de estiércol varía según el origen del mismo; en el caso del estiércol porcino, éste debe encontrarse en proporción 1:3 o 1:4, una parte de estiércol en tres o cuatro partes de agua (Herrero, 2008) (Varnero, 2011). Es necesario que el estiércol se mezcle con agua para permitir que este sea manejado como un líquido (menos del 12% de sólidos presentes en la mezcla) y debe estar fresco (Noorollahi et al., 2015).

El factor de dilución elegido fue de 1:3, tomando en cuenta que se necesitó dejar 1/3 del volumen total del tanque libre para el almacenamiento del CO₂ generado. Los cálculos desarrollados para determinar el volumen del tanque vacío y las cantidades de estiércol y agua requeridas fueron los siguientes:

Determinación volumen gas – volumen dilución:

$$1 \text{ galón} = 3,785 \text{ L}$$

$$55 \text{ gal} = 208,17 \text{ L} \rightarrow \underline{\text{volumen total del tanque}}$$

$$208,17 \text{ L} / 3 = 69,39 \text{ L} \rightarrow \underline{1/3 \text{ del tanque}}$$

$$69,39 \text{ L} * 2 = 138,78 \text{ L} \rightarrow \underline{2/3 \text{ del tanque}}$$

Determinación cantidad estiércol – cantidad agua:

Proporción 1:3 → 1 parte de estiércol en 3 partes de agua

$138,78 \text{ L} / 4 = 34,69 \text{ L} \rightarrow$ Cantidad estiércol

$34,69 \text{ L} * 3 = 104,07 \text{ L} \rightarrow$ Cantidad agua

2.5. Monitoreos

Con el fin de apreciar la evolución del experimento, se llevó a cabo un monitoreo diario, por la tarde, durante los 15 días de experimentación; el monitoreo comprendió los siguientes aspectos: medición de CO₂ en el tanque, conteo celular de cada tanque de experimentación, medición de la temperatura y medición del pH de los tanques de microalgas.

2.6. Medición de sólidos

Para obtener el peso neto de biomasa en cada reactor se realizó la medición de sólidos presentes en cada uno de ellos; para esto se aplicaron los procedimientos descritos en el 22^{va} edición del libro "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", en el cual se detalla cómo obtener los valores correspondientes a las fracciones de sólidos totales, disueltos, suspendidos y sedimentables, a través de los respectivos análisis de laboratorio.

Previo al inicio de la ejecución de los análisis, se homogeneizaron los 5L de microalgas contenidos en cada tanque por medio de agitación, con el fin de evitar que la biomasa se encuentre sedimentada al momento de tomar las muestras.

A continuación se detalla la metodología seguida para obtener los valores correspondientes a éstos parámetros en cada uno de los 12 tanques de microalgas con los que se experimentó.

2.6.1. Sólidos totales

Se tomaron 12 crisoles de porcelana (uno por tanque), se los lavó con agua y jabón, para posteriormente enjuagarlos con ácido nítrico al 0,05N y agua destilada. Una vez enjuagados los crisoles, se los introdujo en la estufa por 4 horas a 105°C. Tras transcurrir las 4 horas, los crisoles fueron llevados a la mufla por 30 minutos y se procedió a pesarlos en la balanza analítica (Rice et al., 2012).

Una vez registrado el peso de los crisoles, se tomaron 20ml de muestra de cada tanque por separado y se los colocó en cada uno de los crisoles respectivamente. Una vez distribuidas las muestras, se introdujeron nuevamente los crisoles en la estufa, esta vez por un período de tiempo de 12 horas a 105°C y después en la mufla por 30 minutos (Rice et al., 2012).

Se finalizó el análisis pesando los crisoles con la biomasa seca en la balanza analítica y realizando una diferencia de pesos para obtener el peso neto de la biomasa en cada muestra (ver *Ecuación 4*); valor que representa los sólidos totales presentes en las mismas (Rice et al., 2012).

$$ST \left(\frac{gr}{L} \right) = \frac{(A-B) \times 100}{Vm} \quad \text{(Ecuación 4)}$$



Figura 9. Análisis de sólidos totales

2.6.2. Sólidos disueltos

Para éste análisis se tomaron 100 ml de muestra de cada tanque y se los colocó en un vaso de precipitación, posteriormente se introdujo la sonda de medición del conductivímetro (electrolito previamente calibrado) y se registró la medición dada por el equipo (Rice *et al.*, 2012).



Figura 10. Análisis sólidos disueltos.

2.6.3. Sólidos suspendidos

Para armar el equipo de filtración se utilizaron los siguientes materiales y equipos: una bomba de vacío, un Erlenmeyer kitasato de 500 ml, un embudo Buchner, manguera y el papel filtro con un tamaño de poro de 0,2 μm . Se puede observar el equipo en la *Figura 11* presentada a continuación.



Figura 11. Equipo de filtración ensamblado para el análisis de sólidos suspendidos.

Para éste análisis se tomaron 500 ml de muestra de cada tanque y una vez armado el equipo, se vertió poco a poco la muestra sin que el volumen a filtrar supere la altura del papel filtro para evitar desbordamientos. Durante el proceso de filtración se tomó en cuenta la saturación del papel filtro para cambiarlo cada vez que fuese necesario, para que así el proceso continúe con normalidad (Rice et al., 2012).

Previo al inicio del proceso de filtración, se tomó el peso seco del papel filtro en la balanza analítica y una vez finalizado el proceso, se dejaron secar las muestras filtradas por 12 horas y nuevamente se pesó el papel filtro con la biomasa en la balanza analítica. Para obtener únicamente el peso de la biomasa se realizó la resta de ambos aplicando la *Ecuación 5* (Rice et al., 2012).

$$S_{susp}\left(\frac{gr}{L}\right) = \frac{(A-B)X100}{Vm} \quad (\text{Ecuación 5})$$



Figura 12. Análisis de sólidos suspendidos.

2.6.4. Sólidos sedimentables

La determinación de los sólidos sedimentables presentes en cada tanque se realizó mediante la aplicación de la fórmula para la obtención de los sólidos totales, de la cual se despejó la variable en cuestión tal como se indica en las Ecuaciones 6 y 7 a continuación.

$$ST = S_{\text{susp}} + S_{\text{sed}} + S_{\text{dis}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

$$S_{\text{dis}} = ST - S_{\text{susp}} - S_{\text{sed}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

3. CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1. Esquema de presentación de resultados y análisis

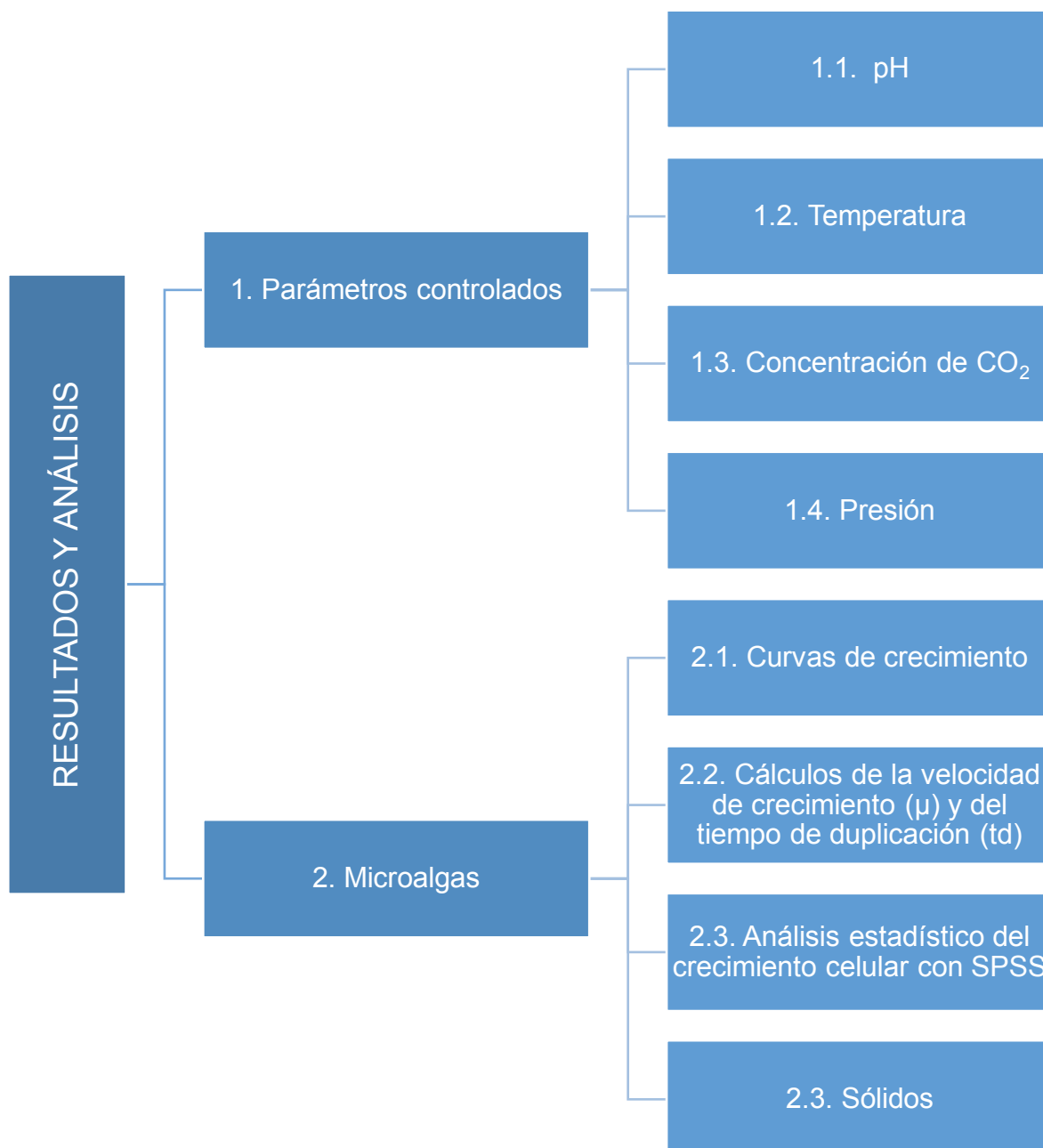


Figura 13. Esquema para la presentación de resultados y análisis.

3.2. Parámetros controlados

3.2.1. Potencial de Hidrógeno (pH)

A pesar de que existen determinadas especies o géneros de microalgas y cianobacterias resistentes a medios extremadamente ácidos (pH bajo) o básicos (pH alto), la mayoría de investigadores recomiendan que de manera general se procure experimentar en medios con un pH neutro, es decir, un pH 7; por lo tanto, durante los 15 días correspondientes a la fase 3 de la experimentación, se realizaron monitoreos diarios del pH del medio en el cual se encontraban las microalgas, con el fin de controlar que este se mantuviese neutro (Sakarika y Kornaros, 2016).

Se registró un pH 7 constante en los tanques durante los 15 días previamente mencionados, a excepción del día 6, donde se evidenció una leve acidificación del medio con un valor de pH 6 tal como se puede apreciar en la *Figura 14*; para neutralizar nuevamente el medio, se agregaron 2ml de Hidróxido de Potasio (KOH), lo cual permitió neutralizar el medio nuevamente y que así la experimentación continúe con normalidad.

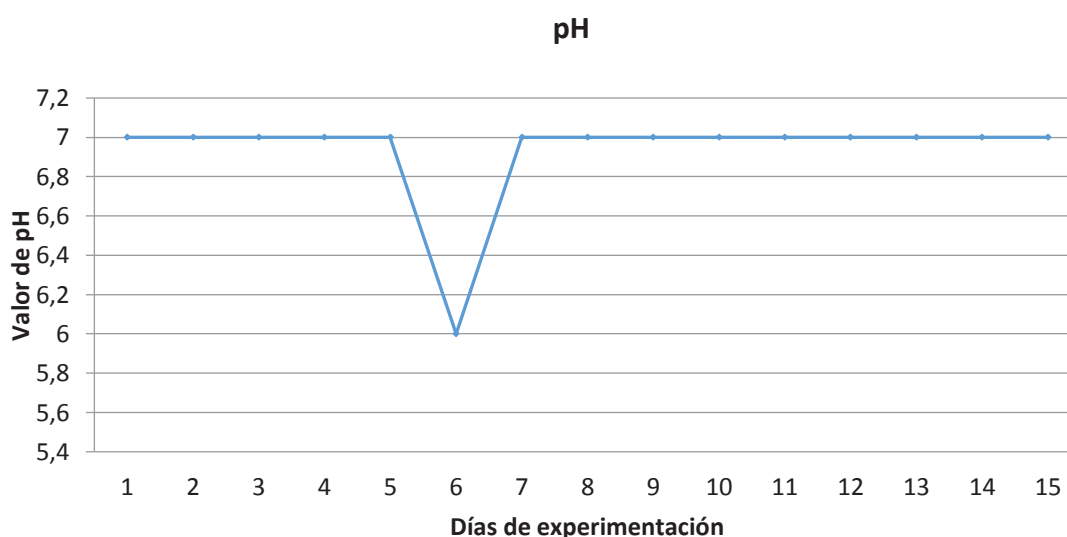


Figura 14. Variación del pH durante los 15 días de experimentación pertenecientes a la fase #3.

3.2.2. Temperatura

De acuerdo a otras investigaciones, se conoce que para que el proceso de fotosíntesis, y por ende la captura del CO₂ por parte de las microalgas y cianobacterias se desarrolle adecuadamente, es necesario que la temperatura ambiental sea elevada, inclusive en rangos de entre 39,8°C y 59,8°C para ciertas especies, ya que la temperatura ambiental influye de manera directa en la tasa de generación de biomasa (Shimako et al., 2016).

Con el fin de mantener un ambiente cálido (con temperaturas superiores a los 20°C) se construyó un invernadero que conserve el calor recibido durante el día en su interior, con el fin de que en la noche no se produzca un shock térmico que pueda afectar al desarrollo de los microorganismos en cuestión, pudiendo incluso ocasionarles la muerte.

Se realizaron monitoreos diarios de la temperatura durante los 25 días de experimentación, tanto fuera como dentro del invernadero; en la *Figura 15* se puede apreciar el comportamiento de ésta, evidenciándose que, durante los 25 días de experimentación la temperatura dentro del invernadero siempre fue mayor a la del exterior, registrando una máxima de 48,9°C al décimo primer día y una mínima de 16,3°C al décimo noveno día.

Durante la semana que comprendió a los días 15 a 21 de la experimentación, se registró una baja significativa de las temperaturas (con presencia de lluvias intensas) en las instalaciones de BIOTEC, lo cual derivó en un enfriamiento del interior del invernadero, incluso por debajo de las temperaturas recomendadas para el cultivo de microalgas y cianobacterias en el día 19, donde se registró la menor temperatura del proceso, lo cual pudo afectar al desarrollo y crecimiento celular durante esos días. Sin embargo, entre los días 6 y 11, se puede apreciar un aumento considerable de la temperatura, situación que pudo beneficiar al proceso de generación de biomasa.

Pese a que durante algunos días se registraron bajas considerables de la temperatura, podemos apreciar comparando las Figuras 14 y 15 que esto no influyó en la variación del pH en los tanques de experimentación, por lo que se aprecia que el pH no varía según el comportamiento de la temperatura.

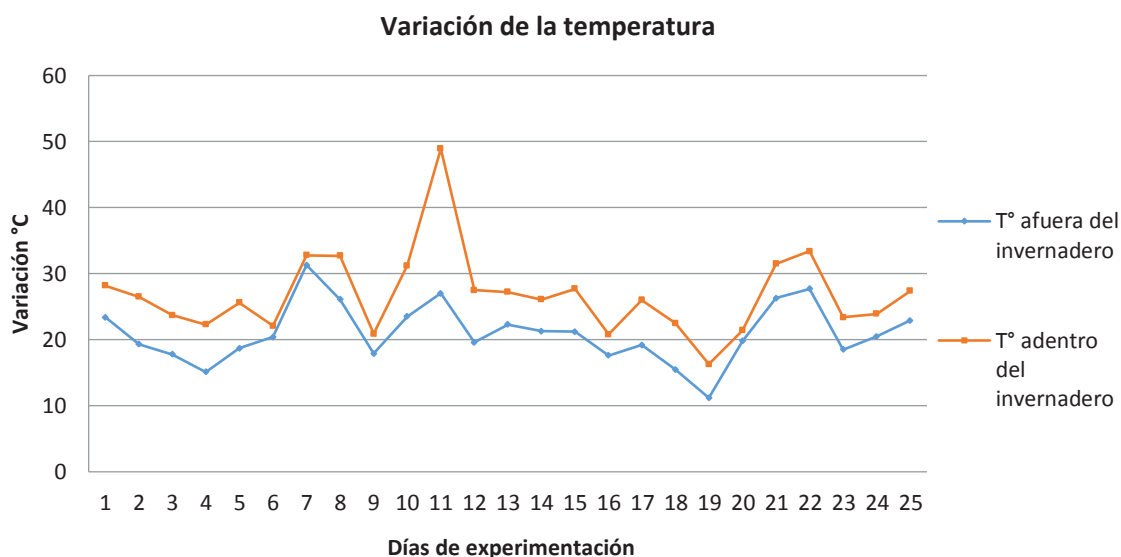


Figura 15. Variación de la temperatura durante los 25 días de experimentación pertenecientes a las fases #2 y #3.

3.2.3. Concentración de CO₂

De acuerdo a lo establecido en la bibliografía revisada, la generación de gases en el reactor inicia después de que la dilución de estiércol haya pasado por un período de maduración también conocido como un período de retención hidráulica (Tsapekos et al., 2016); en el caso de la presente investigación, se estableció que la fase de maduración del estiércol (fase #2) sería de 10 días.

Una vez superados los 10 días correspondientes a la fase de maduración del estiércol, se iniciaron las mediciones diarias de la concentración de dicho gas presente en el tanque experimental. Se pudo evidenciar que del día 10 al 12 se presentó un crecimiento exponencial de la concentración de CO₂, posteriormente, durante los días 12 y 14 se registró la mayor tasa de generación de dióxido de carbono con concentraciones entre el 10% y 12%, siendo el día

doce aquel en el que se produjo la mayor cantidad del gas durante la experimentación alcanzando una concentración del 11,7%. Finalmente, entre los días 14 y 15 se presenta un descenso significativo de la concentración del gas en cuestión, alcanzando así un nivel aproximado de un 1%, el cual se mantuvo constante hasta el final de la experimentación. La evolución de éste parámetro se puede apreciar en la *Figura 16*.

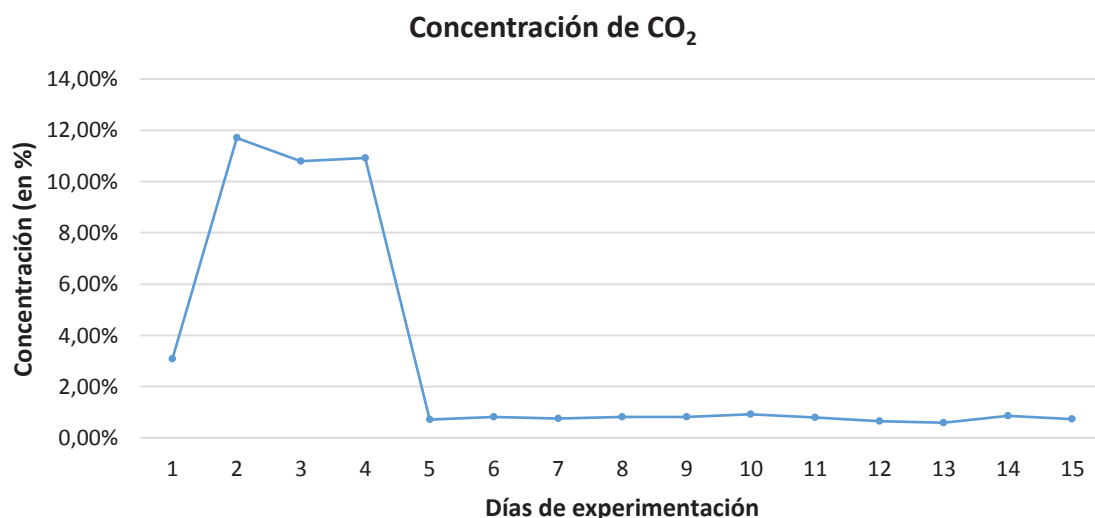


Figura 16. Variación de concentración de CO₂ en el tanque durante los 15 días de experimentación pertenecientes a la fase #3.

3.2.4. Presión del tanque

Ya que la generación de gases (metano y CO₂) aumenta progresivamente dentro de un digester anaerobio, el comportamiento del tanque experimental ratificó dicha afirmación (Wang et al., 2016), (De Souza et al., 2013) tal como se puede apreciar en la *Figura 17*.

Durante los 4 primeros días no se generó presión en el tanque, sin embargo, a partir del quinto día los gases comienzan a generarse y por ende la presión aumenta poco a poco. Entre los días 11 y 14 se aprecia una fase de crecimiento exponencial de ésta, así como en el transcurso del día 17 al 18. Por otra parte,

entre los días 6 y 11 se aprecia que el incremento de la presión es pausado, así como entre los días 14 y 17.

En base a estos datos, se puede decir que el comportamiento de la presión en el tanque pasa por una primera fase de aumento pausado, seguido de un crecimiento exponencial; este comportamiento tiende a repetirse a lo largo de la experimentación, lo cual se puede deber al ritmo de degradación de la materia orgánica ocasionado por la actividad bacteriana en el interior del tanque experimental (De Souza et al., 2013).

Cabe resaltar, que a partir del día 22, la presión en el tanque llegó a ser mayor a 100 PSI, excediendo así el límite de medición del manómetro utilizado, es por esto que no se analiza a este como un período de presión constante como lo refleja la *Figura 17*.

Se conoce que a pesar de que la presión aumente progresivamente, esto no indica que los gases que se están formando dentro del tanque aumenten equitativamente, aspecto que se ratifica por el descenso drástico de la concentración del CO₂ que registraron las mediciones realizadas durante la experimentación (ver *Figura 16*).

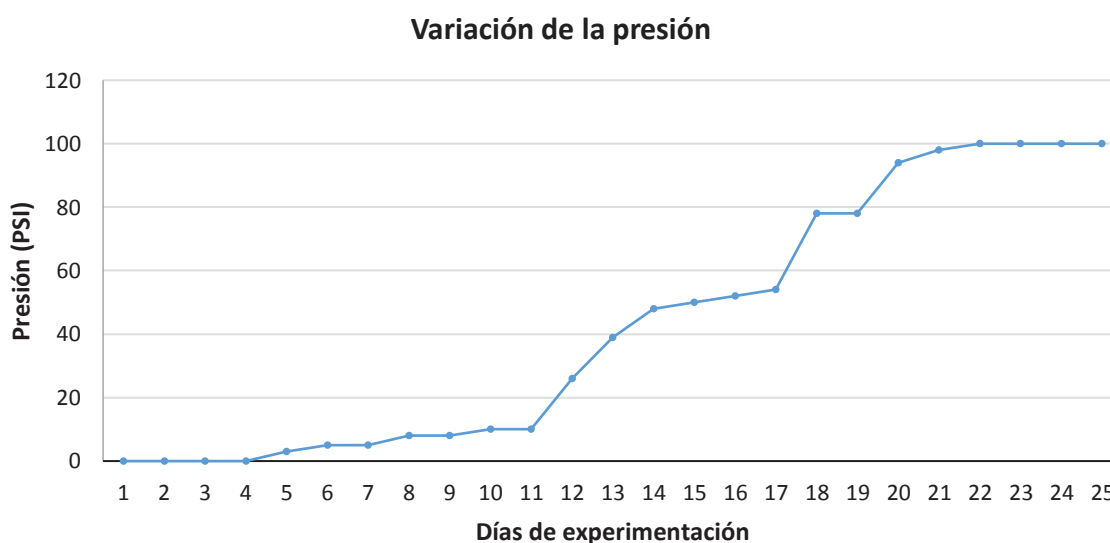


Figura 17. Variación de la presión en el tanque durante los 25 días de experimentación pertenecientes a las fases #2 y #3.

3.3. Microalgas

3.3.1. Curvas de crecimiento

A continuación se presentan las curvas de crecimiento resultantes para cada género de microalgas y cianobacterias (CMIE - K2-003 y CMIE - J1-003) y para el consorcio formado con éstas. En lo que respecta a las curvas del consorcio y sus repeticiones, se graficó tanto la curva general de crecimiento, como las individuales (una curva para cada género) con el fin de apreciar el desarrollo de cada uno y así conocer su comportamiento.

Además, para cada género, se agregó en color rojo dentro de las *Figuras 18 y 20* la curva de crecimiento base, con el fin de poder comparar el crecimiento normal de las microalgas versus el crecimiento experimental.

3.3.1.1. CMIE - K2-003

El género de microalgas *Pleurococcus* sp., tuvo un comportamiento experimental que siguió la tendencia de crecimiento que esta cepa presentó en su curva base (bajo condiciones normales). A pesar de que las curvas de crecimiento experimentales partieron de una concentración celular menor a la de la curva base, se puede apreciar en la *Figura 18* que la concentración celular crece y decrece a un ritmo similar en ambos casos, siendo el rango de días comprendido entre el día 10 y 15 en el que se evidencia la mayor concentración y por ende abundancia de individuos.

Se puede evidenciar también que las curvas experimentales de las microalgas que recibieron alimentación de CO₂ combinado natural (proveniente de la descomposición del estiércol porcino) y artificial crecieron más que aquellas a las que solo se las alimentó con CO₂ artificial (curva base) tal como lo refleja la *Figura 19*. Aquellas microalgas pertenecientes a la curva base, incluso comenzaron a morir a partir del día 9, mientras que las otras en ese día se encontraban en la etapa de mayor crecimiento.

Además, se evidenció que las curvas experimentales siguieron el comportamiento normal de la curva genérica de crecimiento de las microalgas, es decir, entre los días 1 y 8 se encontraron en la etapa de latencia o acondicionamiento al medio, entre los días 8 y 9 se presentó la fase de crecimiento exponencial, desde el día 9 en adelante permanecieron en la fase estacionaria y en algunos casos, como el de las repeticiones 2 y 3, desde los días 13 y 12 respectivamente, los individuos comenzaron a morir; éste mismo ciclo de vida se evidenció en las experimentaciones realizadas por Lin-Lan Zhuang y sus colaboradores (2016) y D. Surendhiran y sus copartícipes (2015) donde se pudo apreciar que el crecimiento de las microalgas atraviesa las mismas fases de crecimiento, siendo el rango de días comprendido entre el 6 y 12 donde se presentó el crecimiento exponencial de los individuos, es decir la mayor tasa de crecimiento de la población de microalgas, lo cual es muy cercano al rango de días en que se presentó dicha fase en la presente experimentación.

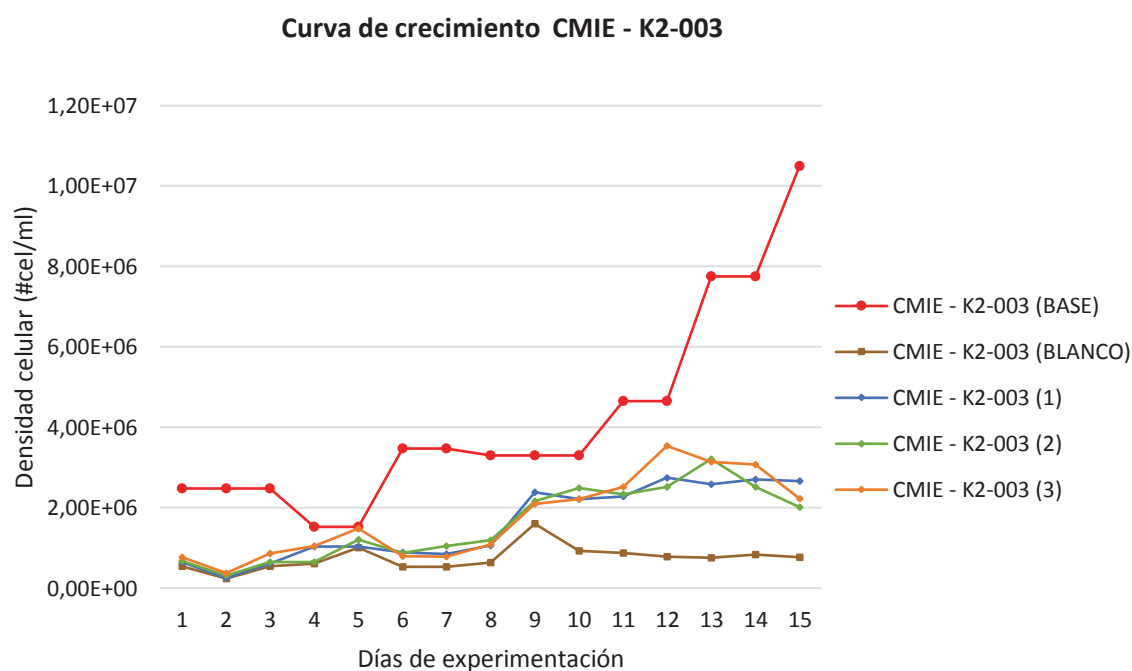


Figura 18. Crecimiento celular CMIE - K2-003 experimental vs. base.

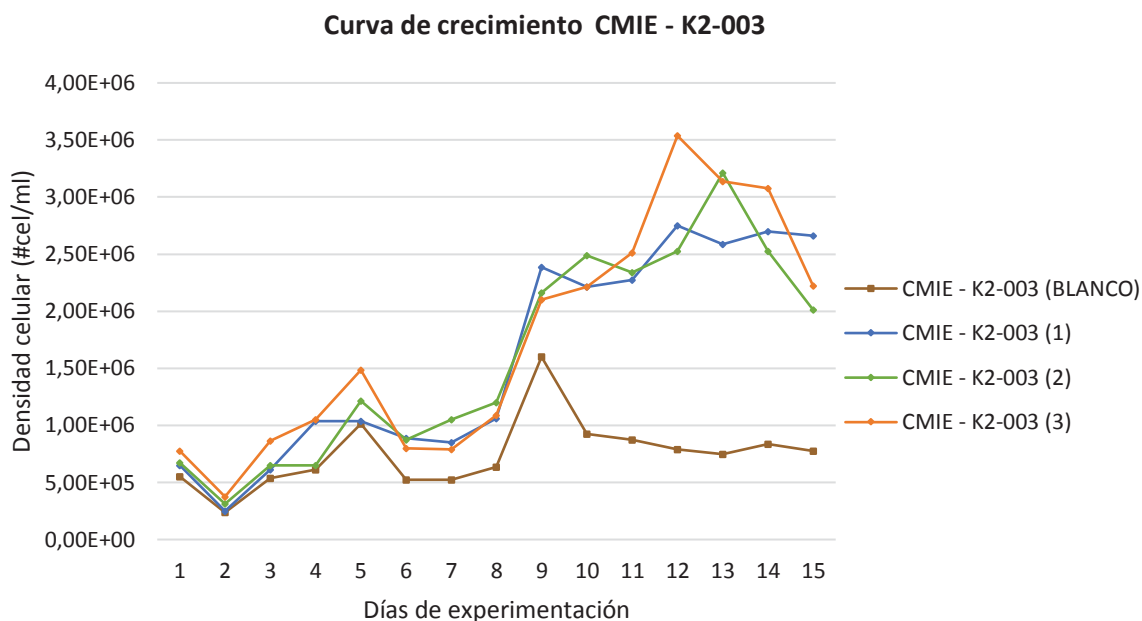


Figura 19. Crecimiento celular CMIE - K2-003 experimental.

3.3.1.2. CMIE - J1-003

En lo que respecta al género de cianobacterias *Rhabdoderma* sp. Aparentemente presentó un crecimiento normal, sin embargo, el cultivo no logró adaptarse al medio y desarrollarse, lo cual derivó en la muerte de los individuos de dicho género y la invasión del medio por parte de las microalgas del género *Pleurococcus* sp. (CMIE - K2-003).

El comportamiento de éste género no siguió el de una curva de crecimiento normal de cianobacterias; como se puede observar en la Figura 21, durante los primeros 6 días la concentración celular crece y decrece constantemente, por lo que los individuos no logran adaptarse a las condiciones ambientales del medio de experimentación, esto ocasionó la muerte y desaparición de este género, sin que éste pase por ninguna de las fases que conforman a la curva de crecimiento esperada, lo cual se reconfirma al observar los resultados obtenidos por D. Surendhiran y sus colaboradores (2015) donde se ve que las microalgas pasan por las diferentes fases de crecimiento logrando así multiplicar significativamente los individuos presentes, así mismo Hai-Xing Chang y sus contribuyentes (2016)

logra evidenciar en su experimentación que bajo condiciones normales las microalgas y cianobacterias crecen de manera progresiva a medida que el tiempo de experimentación transcurre, hasta alcanzar así su máximo desarrollo antes de que los individuos mueran.

Es probable que la resistencia de este género a condiciones irregulares de crecimiento sea inferior a la de otros; si se observa la curva de crecimiento base en la *Figura 20*, se puede apreciar que si bien ésta tiende a seguir el comportamiento de una curva normal de crecimiento, no permanece en la fase estacionaria por mucho tiempo, teniendo así una muerte celular muy temprana, a diferencia de lo que reflejan los resultados obtenidos por Lin-Lan Zhuang (2016) donde se aprecia que la fase estacionaria dura 6 días, en los cuales la cepa logra adaptarse y desarrollarse a las nuevas condiciones del medio. A esto se le podría sumar que el nivel de CO₂ que se les brindó (concentración y cantidad) no haya sido la suficiente para el desarrollo de éste género, tal como se sugiere en el trabajo realizado por M.H. Wison y sus contribuyentes (2014) que establecen dentro de sus resultados la importancia de que estos microorganismos reciban una alimentación de CO₂ adecuada y constante.

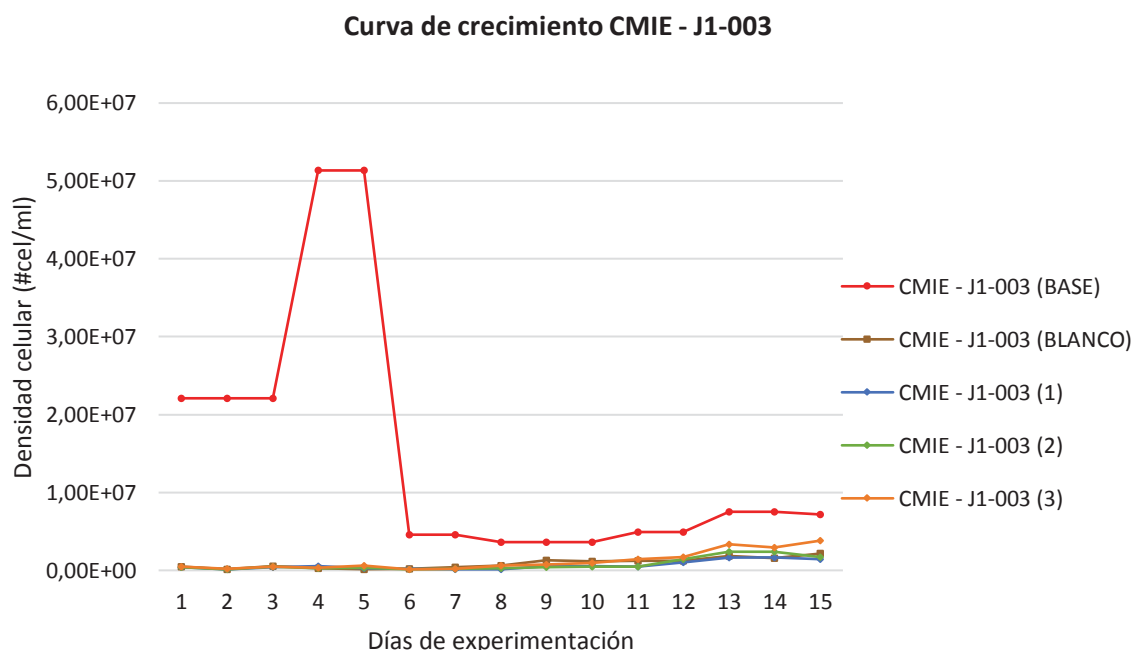


Figura 20. Crecimiento celular CMIE - J1-003 experimental vs. base

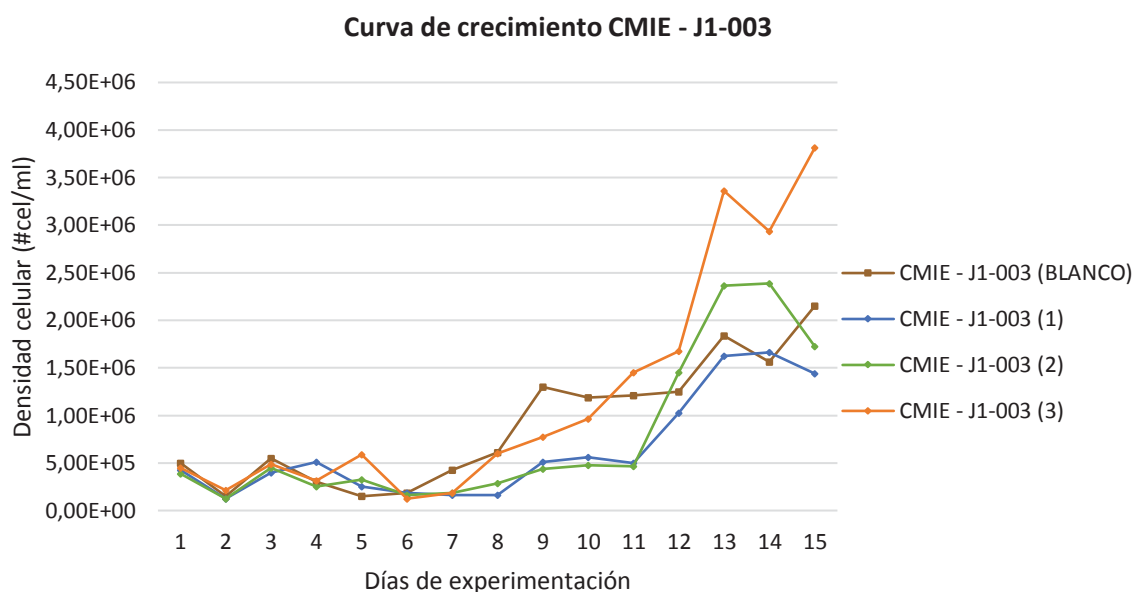


Figura 21. Crecimiento celular CMIE - J1-003 experimental.

3.3.1.3. Consorcio

En cuanto al comportamiento del consorcio se puede observar en la *Figura 22* que éste resulta atípico en referencia al de la curva de crecimiento normal de las microalgas y cianobacterias, que de acuerdo a los resultados obtenidos por M. H. Wilson (2014) debe pasar por una fase de adaptación seguida por la etapa de crecimiento exponencial de la cepa, donde se alcanza el desarrollo del mayor número de individuos; se aprecia que entre los días 3 y 5 la densidad celular se mantiene constante, sin embargo, al llegar al día 4 se evidencia una disminución significativa en el número de individuos presentes en el medio, siendo el sexto día en el cual todas las cepas llegan a su menor concentración. De manera inmediata, en el día 7, la concentración aumentó exponencialmente y a partir del día 8, ésta comienza a disminuir gradualmente.

La irregularidad en los datos registrados para la concentración celular del consorcio pudo deberse a que cada género de microalgas se comportó de manera distinta dentro del éste de acuerdo a su capacidad de adaptación y resistencia al medio, además, es posible que dentro del consorcio los

microorganismos hayan establecido una relación de competencia más que de colaboración entre ambos géneros, por lo que las microalgas y cianobacterias no lograron tener un desarrollo normal, este fenómeno se puede apreciar en los resultados obtenidos en los dos estudios realizados por Ana Gonçalves y sus colaboradores (2016a y 2016b) donde se establece que la lucha de los individuos por obtener los nutrientes para su desarrollo puede generar una relación de competencia que altere el desarrollo normal del microorganismo, haciendo que su crecimiento se vea modificado y no siga el de la curva normal.

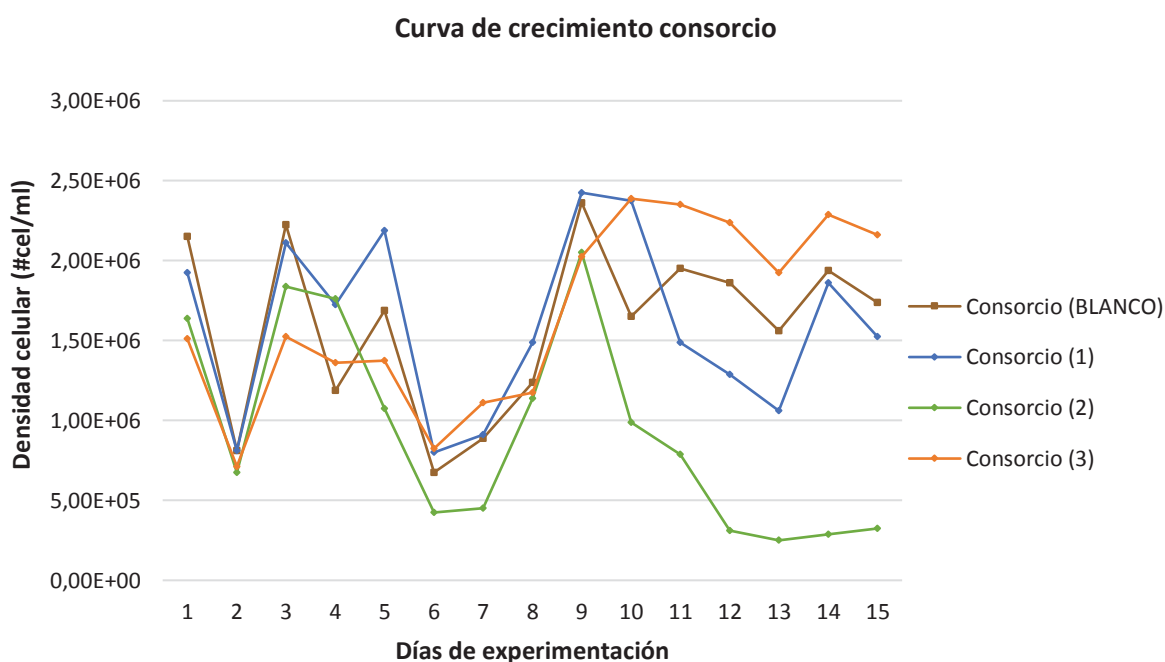


Figura 22. Crecimiento celular Consorcio.

3.3.1.3.1. Comportamiento consorcios

Para poder apreciar el comportamiento de cada género dentro del consorcio, se graficaron las curvas correspondientes a la densidad celular de cada uno de ellos dentro del consorcio, esto se puede apreciar en las Figuras 23, 24, 25 y 26.

De manera general, tanto para las cepas que recibieron una alimentación de CO₂ natural y artificial, como para el Blanco que recibió alimentación de CO₂ artificial únicamente, se puede observar que la cianobacteria *Rhabdoderma* sp. (CMIE - J1-003) desaparece en el transcurso del 7mo al 8vo día. Por otra parte, la

microalga *Pleurococcus* sp. predomina en el consorcio durante toda la experimentación, convirtiéndose así en el género más resistente y por ende, en el que logra sobrevivir y desarrollarse.

A partir del día 8, el consorcio deja de existir, y los reactores pasan a ser cultivos únicamente de *Pleurococcus* sp. (CMIE – K2-003).

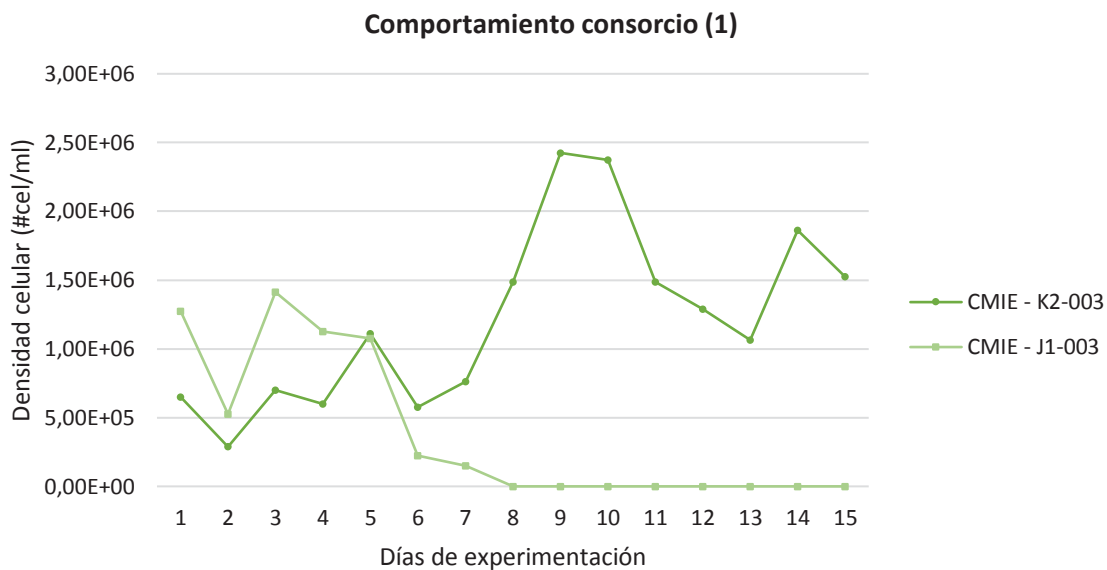


Figura 23. Comportamiento Consorcio (1).

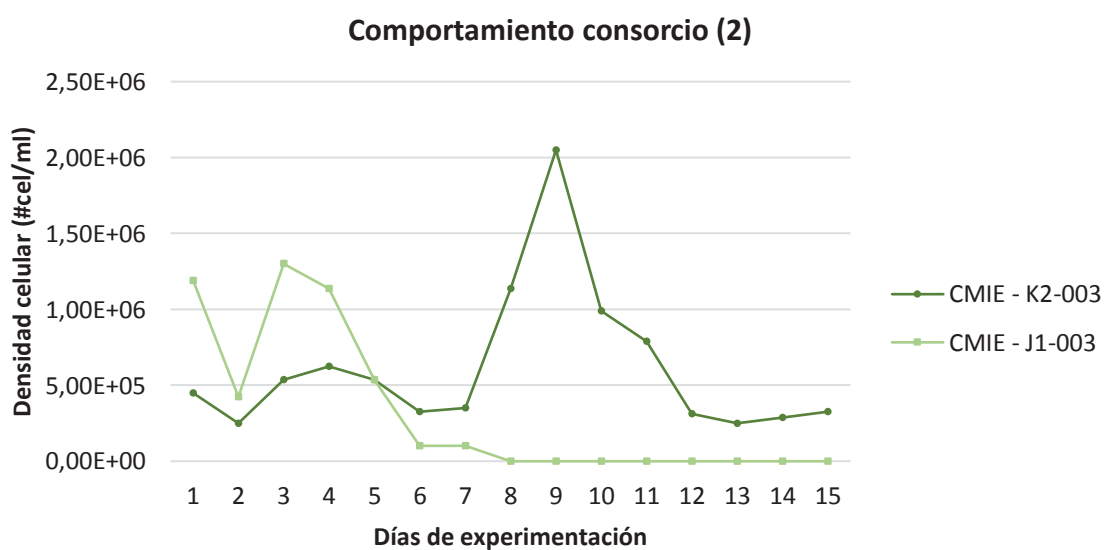


Figura 24. Comportamiento Consorcio (2).

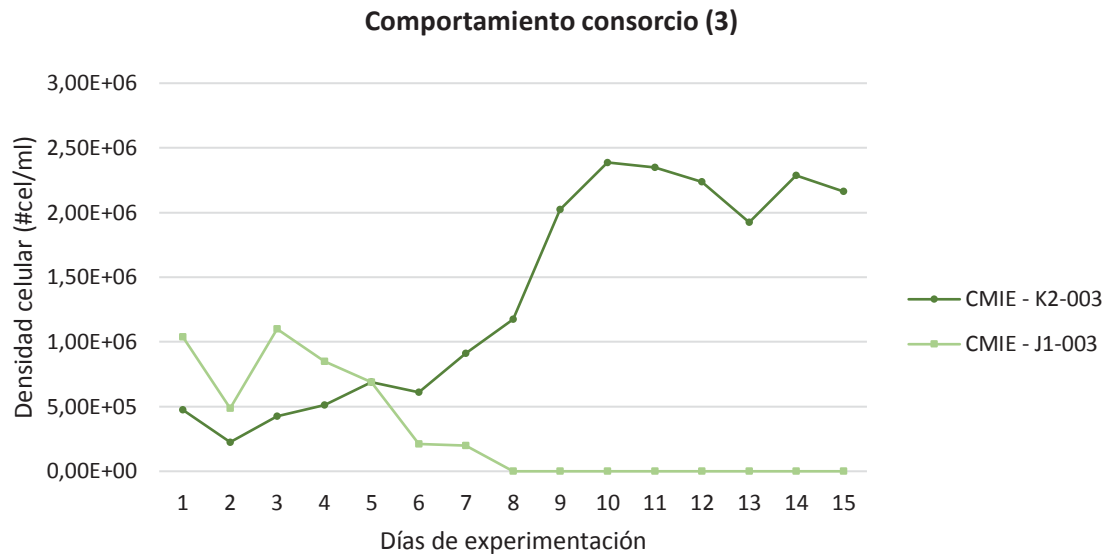


Figura 25. Comportamiento Consorcio (3).

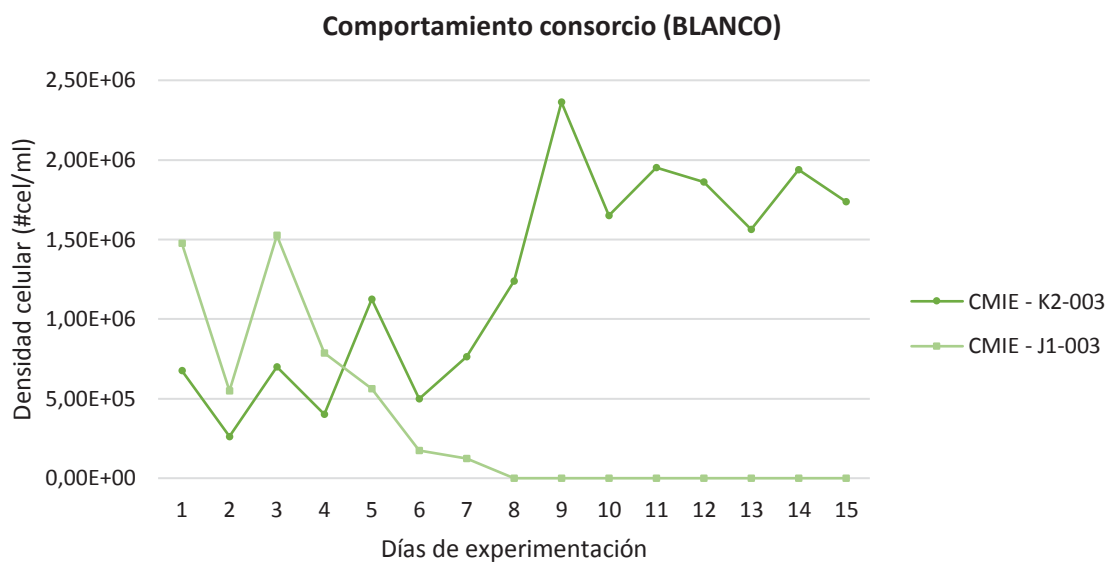


Figura 26. Comportamiento Consorcio (BLANCO).

3.3.2. Cálculos de la velocidad de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (td)

Para la obtención de los valores de la velocidad de crecimiento (μ) y del tiempo de duplicación (td) se aplicaron las *Ecuaciones 2 y 3* previamente descritas en el

literal 2.2.4.1. correspondiente al capítulo II referente a la metodología, las tablas de descripción de los datos se pueden observar en el Anexo 4.

La velocidad de crecimiento (μ) refleja la cantidad de microalgas y cianobacterias nuevas que se generaron diariamente en cada reactor (Radzun et al., 2015), (Sarbatly y Suali, 2013), (Wang et al., 2016); en base a los resultados expuestos en la *Tabla 3*, se evidencia que en lo que respecta al crecimiento base, el género de cianobacterias (*Rhabdoderma* sp.: CMIE – J1-003) produjo más células nuevas en menor tiempo al tener un valor de “ μ ” de $9,50E+03$ células por día en 1 ml, comparado con las microalgas (*Pleurococcus* sp.: CMIE – K2-003) que alcanzaron un “ μ ” de $8,00E+03$ células por día en 1 ml; según la investigación realizada por Khairul Adzfa Razdun y sus colaboradores (2015), el día en el que se registra la mayor velocidad de crecimiento tiene una relación directa con la etapa de desarrollo exponencial de la cepa.

Sin embargo, en lo que respecta a los resultados experimentales, se puede observar en la *Tabla 3* que las mayores tasas de generación de células nuevas por día en 1ml se presentaron en las repeticiones 1 y 3 de la cepa de microalgas *Pleurococcus* sp. (CMIE – K2-003) con valores de $1,29E+04$ y $1,26E+04$, mientras que las menores tasas se encontraron en el Blanco perteneciente al consorcio y en el consorcio 3, con valores de $7,43E+03$ cel/día*ml y $5,38E+03$ cel/día*ml respectivamente. Por otra parte, la cepa de cianobacterias *Rhabdoderma* sp (CMIE – J1-003), presentó valores de “ μ ” que se encontraban intermedios entre los del consorcio y las microalgas *Pleurococcus* sp, sin embargo, debido a la muerte de los microorganismos al sexto día de experimentación éstos valores no reflejan el crecimiento real de la cepa durante toda la experimentación.

Este análisis se ve reforzado por los valores obtenidos para el tiempo de duplicación requerido por cada género, lo cuales reflejan que las microalgas *Pleurococcus* sp. (CMIE – K2-003) requieren de un menor tiempo para lograr la producción de una mayor cantidad de células nuevas con valores de “td” de 0,14 y 0,16 días / # células generadas, mientras que en el consorcio se reflejan los mayores “td” de la experimentación, siendo el consorcio (2) el que requiere el

mayor tiempo de toda la experimentación siendo éste de 0,66 días/ # células generadas. Según Yue Wang (2016) el tiempo de duplicación de las microalgas varía según la especie o género y las condiciones experimentales a las que son sometidas, por lo que este parámetro resulta muy variable según el proceso experimental y las condiciones del medio a las que dichos microorganismos estén sometidos, así mismo Rosalam Sarbatly y Emma Suali (2013) evidencian en su investigación que la alimentación de CO₂ aporta de manera significativa al desarrollo acelerado de las microalgas, lo cual puede reducir significativamente los tiempos de duplicación; de acuerdo a esto la cepa de microalgas K2-003 pudo haber presentado una mayor afinidad a las condiciones de experimentación a las que se sometió a ambas especies, dando como resultado un mejor desarrollo y por ende un menor tiempo de duplicación requerido.

Siendo la cepa de microalgas *Pleurococcus* sp. (CMIE – K2-003) la que presenta los mejores resultados experimentales en función de las velocidades de crecimiento reflejadas y los tiempos de duplicación requeridos, el análisis individual de éste género nos permite apreciar también que la comparación entre los resultados de la cepa base que recibió únicamente alimentación de CO₂ artificial, con respecto a las cepas experimentales que recibieron la misma alimentación de CO₂ artificial complementado con el CO₂ natural proveniente del estiércol porcino, presentan diferencias significativas entre sí.

Se puede apreciar que aquellas microalgas que recibieron alimentación combinada de CO₂ artificial y natural presentaron una velocidad de crecimiento (μ) promedio mayor que la de las microalgas base, siendo los valores de éstas de 1,26E+04 células por día en 1 ml vs. 1,11E+04 células por día en 1 ml respectivamente, por lo que las células que se alimentaron con CO₂ natural crecen 1,13 veces más rápido aquellas que solo reciben CO₂ artificial.

Adicionalmente, el tiempo de duplicación requerido por las microalgas que recibieron alimentación de CO₂ artificial y natural es menor al de aquellas que solo se alimentaron de CO₂ artificial con valores de “td” de 0,14 y 0,16 respectivamente, lo cual indica que las microalgas que recibieron el CO₂ natural

requieren 0,9 veces menos de tiempo que aquellas que solo recibieron CO₂ artificial para duplicarse.

Tabla 3.

Resumen de los valores promedio obtenidos para “ μ ” y “td” para cada género, el consorcio y sus repeticiones (base y experimental).

CEPA	Promedio “ μ ” en base a la concentración celular de los conteos (generación de células nuevas / día)	Valor de “ μ ” en base a la concentración celular total (generación de células nuevas / día x ml)	Promedio de “ μ ” (generación de células nuevas / día x ml)	Promedio “td” (días/ # células generadas)	Promedio “td” (días/ # células generadas)
Base <i>Pleurococcus</i> sp. (CMIE – K2-003)	3,20	8,00E+03	8,00E+03*	0,22	0,22*
Base <i>Rhabdoderma</i> sp. (CMIE – J1-003)	3,80	9,50E+03	9,50E+03*	0,19	0,19*
CMIE – K2-003 (Blanco)	4,43	1,11E+04	1,11E+04*	0,16	0,16*
CMIE – K2-003 (1)	5,17	1,29E+04	1,26E+04*	0,14	0,14*
CMIE – K2-003 (2)	4,93	1,23E+04		0,14	
CMIE – K2-003 (3)	5,02	1,26E+04		0,14	
CMIE – J1-003 (Blanco)	3,63	9,08E+03	9,08E+03*	0,20	0,2*
CMIE – J1-003 (1)	4,26	1,07E+04	1,09E+04*	0,17	0,16*
CMIE – J1-003 (2)	4,14	1,04E+04		0,17	
CMIE – J1-003 (3)	4,7	1,18E+04		0,15	

Consortio (Blanco)	2,97	7,43E+03	7,43E+03*	0,24	0,24*
Consortio (1)	3,10	7,75E+03	5,98E+03*	0,25	0,35*
Consortio (2)	1,93	4,83E+03		0,66	
Consortio (3)	2,15	5,38E+03		0,14	

Nota: Los valores marcados con * corresponden a los promedios obtenidos para las repeticiones de CMIE – K2-003, CMIE – J1-003 y del Consortio y al valor de sus blancos respectivamente.

3.3.3. Análisis estadístico del crecimiento celular con SPSS

Para el desarrollo del análisis estadístico de los datos obtenidos para el crecimiento presentado por cada género (microalgas y cianobacterias) se hizo uso del software IBM® SPSS® Statistics 20 y sus herramientas para calcular la significancia de los resultados obtenidos tanto numérica como visualmente a través de la prueba de Kruskal-wallis y la generación de diagramas de cajas.

3.3.3.1. Prueba Kruskal-wallis

La Prueba de Kruskal-wallis permitió calcular el valor de P para cada día de experimentación perteneciente a la fase #3 para así conocer el nivel de significancia de los resultados obtenidos en función de la distribución de éstos en cada uno de los 3 tratamientos planteados (*Pleurococcus* sp. - CMIE – K2-003, *Rhabdoderma* sp: CMIE – J1-003 y el consorcio) (Guo, Zhong, y Zhang, 2013). Durante los días 1 y 9 todos los valores de “P” registrados fueron menores a 0,05 tal como se puede apreciar en la *Tabla 4*, siendo P=0,007 el menor valor registrado durante toda la experimentación, por lo tanto, se puede observar que durante éste período de tiempo los datos presentan diferencias significativas entre sí (entre ambos géneros y el consorcio) por lo que se evidencia que el comportamiento en términos de velocidad de crecimiento y abundancia de individuos difiere en un alto grado entre los 3 tratamientos.

Por otra parte, a partir del día 10 hasta el final de la experimentación, los valores de “P” son mayores a 0,05 alcanzando un máximo nivel con un valor de P=0,58, por lo que se puede apreciar que durante esos días las diferencias entre los 3

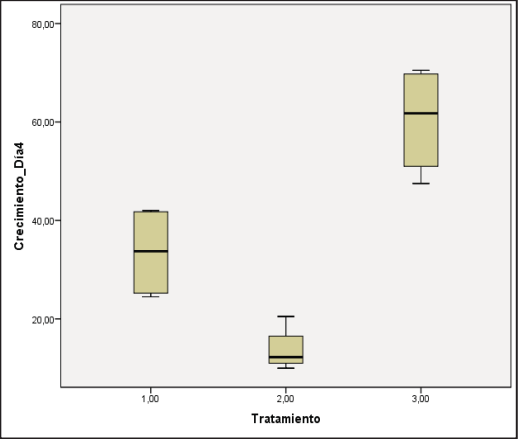
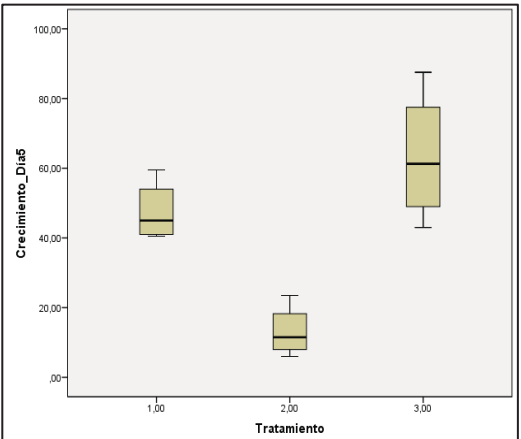
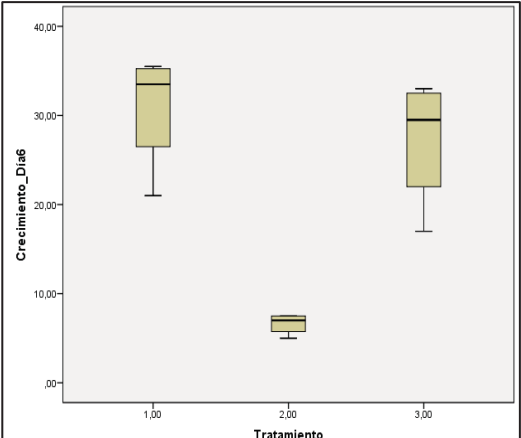
tratamientos no fueron significativas, es decir que el comportamiento de los individuos se volvió similar entre todos los experimentos; en las investigaciones realizadas por Yunzhi Lin (2016) y por Jun Wu y sus colaboradores (2016) se establece que dentro de procesos experimentales, el valor de P tiende a normalizarse a medida que la experimentación avanza, lo cual coincide con el comportamiento de las microalgas dentro de la experimentación, ya que a medida que avanzan los días el número de individuos presentes en cada tratamiento comienza a asemejarse entre sí, lo cual deriva en la obtención de resultados no significativos en la fase final de experimentación (desde el día 10 en adelante).

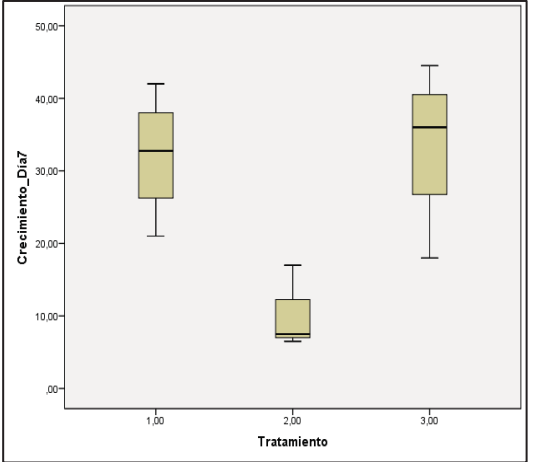
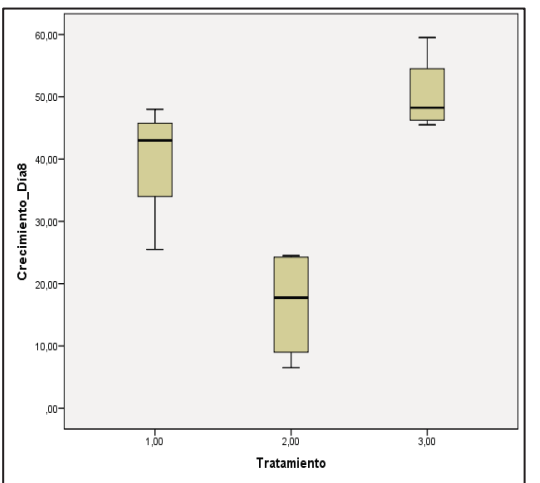
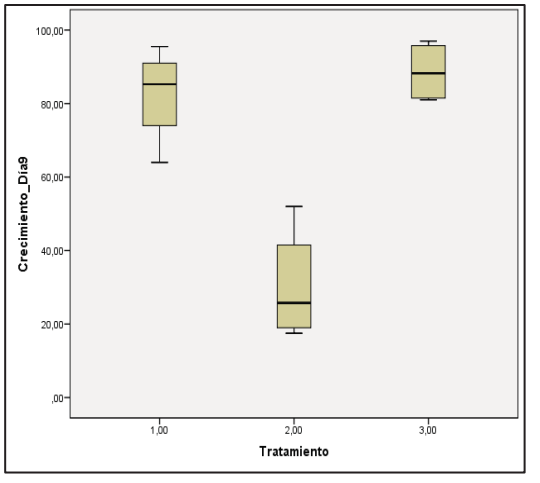
A través del valor "P" se puede apreciar que la fase en la que el desarrollo de las microalgas difiere con mayor intensidad entre los tratamientos corresponde a los 9 primeros días de crecimiento celular, lo cual coincide con la fase de crecimiento exponencial de las microalgas en todos los casos, sin embargo, se entiende que no todas crecen en igual proporción y velocidad, lo cual da paso a la existencia de éstas diferencias significativas; esto se corrobora con lo establecido dentro de los estudios realizados por Yunzhi Lin (2016) y por Jun Wu y sus colaboradores (2016) donde se aprecia que dentro de un proceso experimental, por lo general, existe un período específico donde los resultados difieren en mayor proporción, es decir, que existe una distribución más alejada de los datos, siendo este período de tiempo donde se obtendrán los resultados más significativos; dentro la presente experimentación éste período se evidenció al inicio de la misma tal como lo reflejan los resultados obtenidos durante los nueve primeros días mencionados previamente.

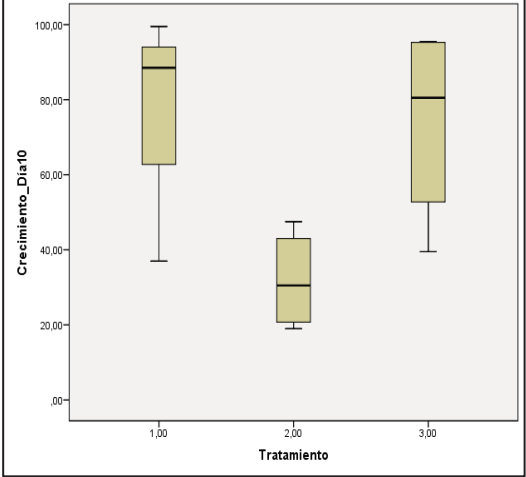
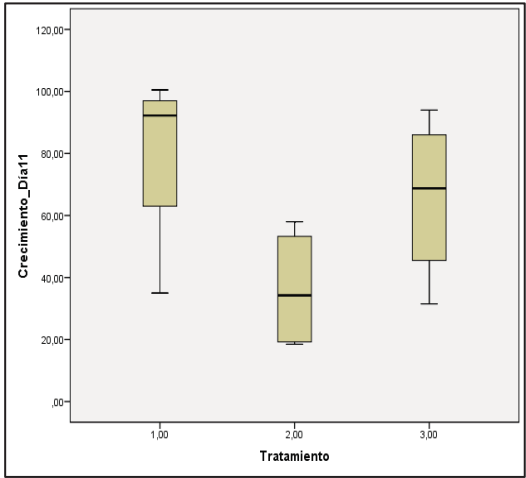
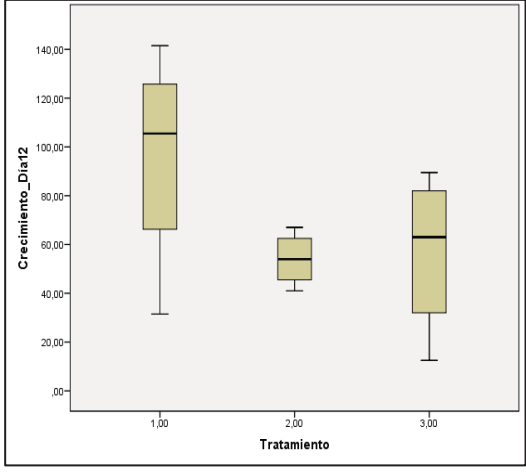
Tabla 4.

Valores de "P" registrados para cada día de experimentación en la fase #3.

DÍA DE EXPERIMENTACIÓN	VALOR DE "P"	Significancia	Diagrama de cajas
1	0,007	Diferencia Significativa	
2	0,007	Diferencia Significativa	
3	0,010	Diferencia Significativa	

4	0,007	Diferencia Significativa	 <p>Box plot showing the distribution of growth (Crecimiento_Dia4) for three treatments (1, 2, and 3). The y-axis ranges from 0 to 80.00. Treatment 1 has a median around 35, treatment 2 has a median around 10, and treatment 3 has a median around 60. All treatments show significant differences.</p> <table border="1"><thead><tr><th>Tratamiento</th><th>Min</th><th>Q1</th><th>Median</th><th>Q3</th><th>Max</th></tr></thead><tbody><tr><td>1,00</td><td>25</td><td>28</td><td>35</td><td>42</td><td>45</td></tr><tr><td>2,00</td><td>5</td><td>8</td><td>10</td><td>15</td><td>20</td></tr><tr><td>3,00</td><td>48</td><td>52</td><td>60</td><td>68</td><td>72</td></tr></tbody></table>	Tratamiento	Min	Q1	Median	Q3	Max	1,00	25	28	35	42	45	2,00	5	8	10	15	20	3,00	48	52	60	68	72
Tratamiento	Min	Q1	Median	Q3	Max																						
1,00	25	28	35	42	45																						
2,00	5	8	10	15	20																						
3,00	48	52	60	68	72																						
5	0,015	Diferencia Significativa	 <p>Box plot showing the distribution of growth (Crecimiento_Dia5) for three treatments (1, 2, and 3). The y-axis ranges from 0 to 100.00. Treatment 1 has a median around 45, treatment 2 has a median around 10, and treatment 3 has a median around 60. All treatments show significant differences.</p> <table border="1"><thead><tr><th>Tratamiento</th><th>Min</th><th>Q1</th><th>Median</th><th>Q3</th><th>Max</th></tr></thead><tbody><tr><td>1,00</td><td>40</td><td>42</td><td>45</td><td>55</td><td>60</td></tr><tr><td>2,00</td><td>5</td><td>8</td><td>10</td><td>18</td><td>22</td></tr><tr><td>3,00</td><td>45</td><td>50</td><td>60</td><td>78</td><td>88</td></tr></tbody></table>	Tratamiento	Min	Q1	Median	Q3	Max	1,00	40	42	45	55	60	2,00	5	8	10	18	22	3,00	45	50	60	78	88
Tratamiento	Min	Q1	Median	Q3	Max																						
1,00	40	42	45	55	60																						
2,00	5	8	10	18	22																						
3,00	45	50	60	78	88																						
6	0,019	Diferencia Significativa	 <p>Box plot showing the distribution of growth (Crecimiento_Dia6) for three treatments (1, 2, and 3). The y-axis ranges from 0 to 40.00. Treatment 1 has a median around 30, treatment 2 has a median around 5, and treatment 3 has a median around 28. All treatments show significant differences.</p> <table border="1"><thead><tr><th>Tratamiento</th><th>Min</th><th>Q1</th><th>Median</th><th>Q3</th><th>Max</th></tr></thead><tbody><tr><td>1,00</td><td>21</td><td>27</td><td>30</td><td>35</td><td>38</td></tr><tr><td>2,00</td><td>4</td><td>5</td><td>5</td><td>7</td><td>8</td></tr><tr><td>3,00</td><td>17</td><td>22</td><td>28</td><td>32</td><td>33</td></tr></tbody></table>	Tratamiento	Min	Q1	Median	Q3	Max	1,00	21	27	30	35	38	2,00	4	5	5	7	8	3,00	17	22	28	32	33
Tratamiento	Min	Q1	Median	Q3	Max																						
1,00	21	27	30	35	38																						
2,00	4	5	5	7	8																						
3,00	17	22	28	32	33																						

7	0,023	Diferencia Significativa	 <p>Box plot showing 'Crecimiento_Dia7' (Y-axis, 0.00 to 50.00) versus 'Tratamiento' (X-axis, 1.00, 2.00, 3.00). The plot displays three box plots representing the distribution of growth for each treatment group. Treatment 1 shows a median growth of approximately 33, treatment 2 shows a median growth of approximately 8, and treatment 3 shows a median growth of approximately 36. The distributions are significantly different (p=0.023).</p>
8	0,012	Diferencia Significativa	 <p>Box plot showing 'Crecimiento_Dia8' (Y-axis, 0.00 to 60.00) versus 'Tratamiento' (X-axis, 1.00, 2.00, 3.00). The plot displays three box plots representing the distribution of growth for each treatment group. Treatment 1 shows a median growth of approximately 44, treatment 2 shows a median growth of approximately 18, and treatment 3 shows a median growth of approximately 48. The distributions are significantly different (p=0.012).</p>
9	0,024	Diferencia Significativa	 <p>Box plot showing 'Crecimiento_Dia9' (Y-axis, 0.00 to 100.00) versus 'Tratamiento' (X-axis, 1.00, 2.00, 3.00). The plot displays three box plots representing the distribution of growth for each treatment group. Treatment 1 shows a median growth of approximately 86, treatment 2 shows a median growth of approximately 26, and treatment 3 shows a median growth of approximately 88. The distributions are significantly different (p=0.024).</p>

10	0,086	Diferencia No Significativa	 <p>Box plot showing the distribution of growth (Creceimiento_Dia10) for three treatments (1.00, 2.00, 3.00). The y-axis ranges from 0.00 to 100.00. Treatment 1.00 has the highest median growth (around 90), followed by 3.00 (around 80) and 2.00 (around 30). The boxes represent the interquartile range, and the horizontal line inside each box is the median. Whiskers extend to the minimum and maximum values.</p>
11	0,105	Diferencia No Significativa	 <p>Box plot showing the distribution of growth (Creceimiento_Dia11) for three treatments (1.00, 2.00, 3.00). The y-axis ranges from 0.00 to 120.00. Treatment 1.00 has the highest median growth (around 90), followed by 3.00 (around 70) and 2.00 (around 35). The boxes represent the interquartile range, and the horizontal line inside each box is the median. Whiskers extend to the minimum and maximum values.</p>
12	0,298	Diferencia No Significativa	 <p>Box plot showing the distribution of growth (Creceimiento_Dia12) for three treatments (1.00, 2.00, 3.00). The y-axis ranges from 0.00 to 140.00. Treatment 1.00 has the highest median growth (around 105), followed by 3.00 (around 65) and 2.00 (around 55). The boxes represent the interquartile range, and the horizontal line inside each box is the median. Whiskers extend to the minimum and maximum values.</p>

13	0,174	Diferencia No Significativa	
14	0,390	Diferencia No Significativa	
15	0,584	Diferencia No Significativa	

Nota: Los valores se registraron para los 15 días de experimentación, una vez transcurridos los 10 días de la fase de maduración del estiércol.

3.3.3.2. Diagrama de cajas

En base a los diagramas de cajas generados para cada día de experimentación correspondientes a la fase #3 del proceso, se puede ver que al igual que en el caso del valor P, éstos reflejan que entre los días 1 y 9 la abundancia de individuos en cada tratamiento varía mucho entre ellos por lo que las diferencias son significativas, mientras que en los últimos días la cantidad de individuos presentes en cada tratamiento se asemeja más entre los 3 tratamientos, por lo que las diferencias dejan de ser significativas; esto se ratifica a través de lo establecido por Pértega Díaz y Pita Fernández (2001) dentro de su trabajo referente a la representación gráfica de análisis de datos estadísticos, donde indican que a medida que los datos sean más distantes entre los diferentes tratamientos los valores de sus medianas (donde se encuentra concentrado el 50% de los datos) lo serán también y por ende la significancia de éstos será mayor (lo cual se evidencia al inicio de la experimentación hasta el noveno día), mientras que a medida que los datos de los diferentes tratamientos sean más cercanos entre sí el valor de su mediana tenderá a asemejarse también, reflejando así datos no significativos como resultado (lo cual se evidencia al final de la experimentación a partir de décimo día).

Se puede apreciar que durante los 4 primeros días el tratamiento 3 (consorcio) presenta una mayor concentración de individuos en sus muestras, mientras que la cepa de cianobacterias CMIE – J1-003 evidencia la menor concentración, sin embargo, a partir del día 5 se observa que la cantidad de microorganismos presentes en el tratamiento 1 (CMIE – K2-003) comienza a aumentar progresivamente hasta igualar al consorcio en el día 9.

A partir del noveno día la concentración de individuos en el consorcio comienza a disminuir, mientras que las microalgas CMIE – K2-003 continúan creciendo y aumentando su población, dando así como resultado en el último día de experimentación la siguiente clasificación de los tratamiento en orden de abundancia mayor a menor: Tratamiento 1 (CMIE – K2-003), Tratamiento 2 (CMIE – J1-003) y finalmente el Tratamiento 3 correspondiente al consorcio.

Debido al comportamiento atípico del tratamiento 2 (CMIE – J1-003) no se puede decir que las cianobacterias aumentaron su población de manera significativa, ya que a partir del sexto día éstas murieron y el medio fue invadido por individuos de la cepa de microalgas CMIE – K2-003.

Cabe resaltar, que a partir del décimo día las concentraciones de microorganismos en cada tratamiento comienzan a asemejarse entre sí, es decir, las poblaciones tienden a adoptar el mismo nivel de desarrollo, por lo que al final de la experimentación los resultados entre tratamientos ya no presentan diferencias significativas entre sí.

3.3.4. Sólidos

En lo que respecta a la medición de sólidos presentes en las muestras, se sabe que los sólidos totales representan todo el conjunto de sólidos presentes en cada una de ellas, es decir, la sumatoria de los sólidos sedimentables, suspendidos y disueltos (Liu et al., 2016), (Hassan y Salmani, 2016); tal como se puede apreciar en la *Figura 27*, la concentración de sólidos resultante en los blancos de cada tratamiento fue menor que aquella registrada en las repeticiones de éstos, a excepción de la tercera del consorcio.

Se puede apreciar que las diferencias más notorias entre los blancos y sus repeticiones son las correspondientes a la cepa de microalgas CMIE – K2-003, siendo en la repetición 2 de ésta cepa en la que mayor concentración de biomasa total se registró al final de la experimentación con un 68,15% más que su blanco, lo que indica que la alimentación combinada de CO₂ (artificial y natural) si aporta a que el desarrollo de las microalgas y por ende la formación de biomasa sea mayor; en éste caso 68 veces mayor que aquellas a las que se las alimentó únicamente con CO₂ artificial.

Por otra parte, vemos que las diferencias en las concentraciones finales de la cepa de cianobacterias CMIE – J1-003 y del consorcio no son significativas, ya que varían en porcentajes muy bajos; entre el 2,18% y el 8,5% para el tratamiento 2 (CMIE – J1-003) llegando incluso a presentar una concentración

menor a la de su blanco en la muestra #3 con un -9,47% y de entre el 3,64% y 17,36% en el caso del consorcio.

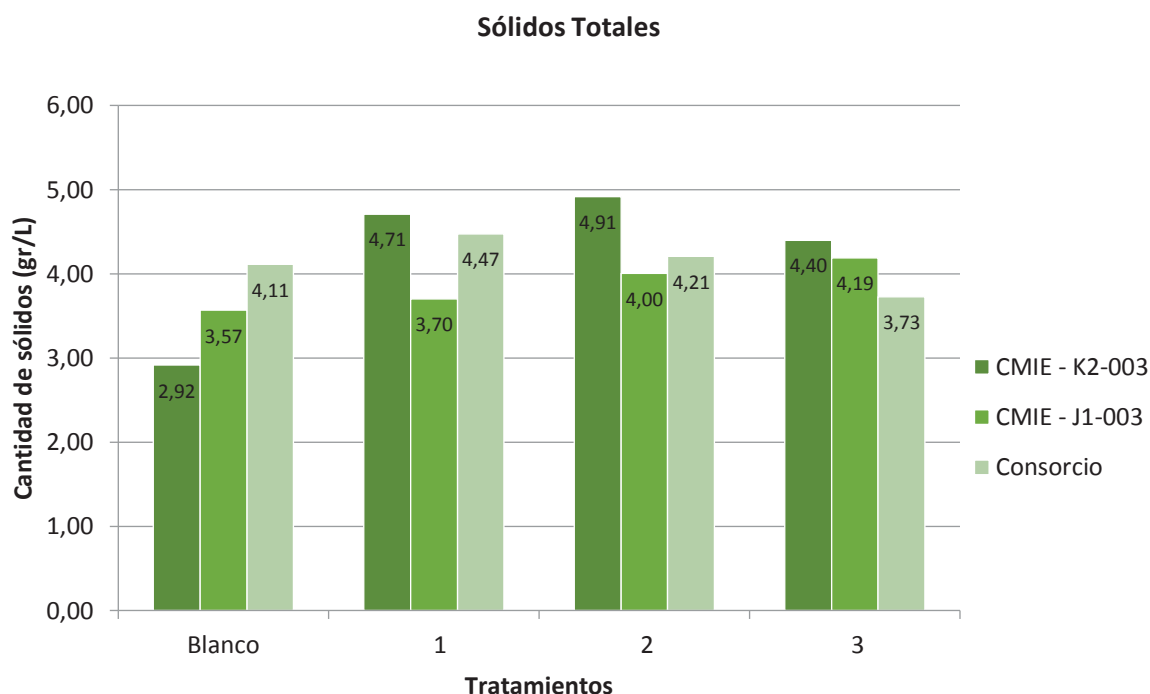


Figura 27. Resultados de Sólidos Totales para cada tratamiento y sus repeticiones

Así mismo, en la *Figura 28.* se aprecia que la mayor proporción de sólidos presentes en todas las muestras pertenece a los sólidos sedimentables, mientras que la cantidad de sólidos disueltos resulta casi despreciable debido a la concentración tan baja en la que éstos se presentan; tanto Carlos Prata y sus colaboradores (2016) como Mohammad Hassan y Efat Salmani (2016) coinciden dentro de sus investigaciones en que al analizarse los diferentes tipos de sólidos presentes en una muestra sus proporciones variaran significativamente dependiendo del tipo de fluido a analizarse; en el caso de aguas de río normalmente la porción de sólidos disueltos suele ser muy elevada, mientras que en el caso de las microalgas, tal como se puede apreciar dentro de la presente investigación, los sólidos disueltos fueron los menos abundantes a comparación de los sólidos sedimentables que predominaron en cantidad dentro de todos los tratamientos y sus repeticiones.

Los sólidos suspendidos en todas las muestras abarcan una porción significativa de los sólidos totales presentes, siendo en los consorcios donde se evidencia una mayor cantidad de éstos; según lo establecido dentro de la investigación realizada por Khemngeun Pongmala y sus contribuyentes (2015), la concentración de los sólidos suspendidos varía dependiendo de la agitación del medio en el que se encuentran, por lo que dentro del presente trabajo de investigación los sólidos suspendidos pudieron alcanzar las concentraciones establecidas debido a la aireación – agitación ininterrumpida bajo la que se les tuvo a los tanques experimentales de microalgas.

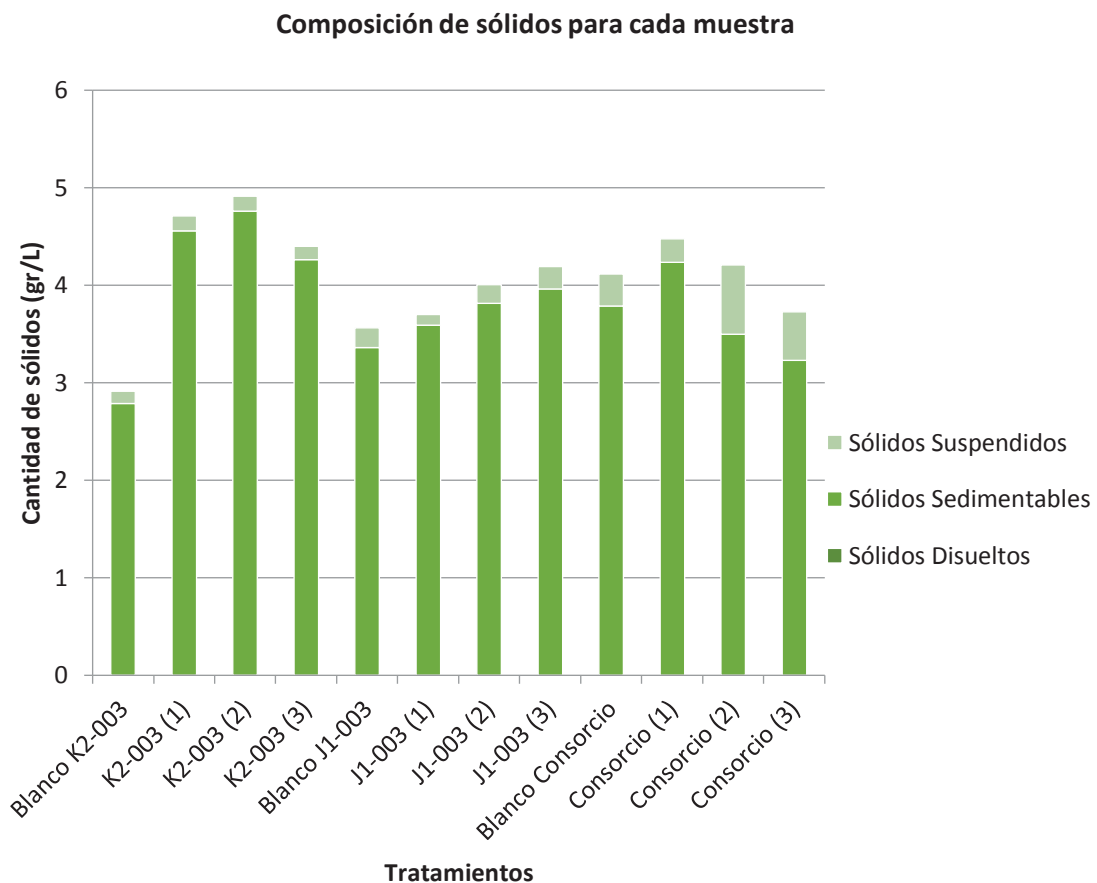


Figura 28. Composición de los sólidos totales de cada muestra

III. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.1. Conclusiones

El presente trabajo de titulación se enfocó en identificar el género de microalgas o cianobacterias más eficiente en cuanto a la captación de CO₂ natural proveniente de la descomposición de estiércol porcino. Para esto se implementaron cultivos experimentales de dos géneros diferentes; uno de microalgas (CMIE – K2-003), otro de cianobacterias (CMIE – J1-003) y adicionalmente un consorcio formado entre ambos; cada uno de ellos fue denominado como tratamiento 1, 2 y 3 respectivamente.

En base a los resultados obtenidos, tanto de los conteos celulares realizados durante los 15 días correspondientes a la fase #3 de la experimentación, como de la medición de sólidos ejecutada al finalizar el proceso, se pudo apreciar que la especie que presentó una mayor afinidad al proceso de captación del CO₂ natural fue la especie de microalgas identificada como *Pleurococcus* sp., catalogada bajo el código CMIE – K2-003.

Por otra parte, las cianobacterias con código CMIE – J1-003, categorizadas como *Rhabdoderma* sp., no presentaron afinidad al proceso experimental, ya que al sexto día de experimentación de la mencionada fase éstas murieron, impidiendo así el desarrollo completo del proceso y por ende brindando resultados no confiables.

El consorcio de microalgas y cianobacterias sí se adaptó a la alimentación de CO₂ natural, presentando un aumento en la abundancia de los individuos en el medio, al final de la experimentación las cianobacterias habían desaparecido del consorcio, por lo que éste ya era un cultivo conformado únicamente por las microalgas *Pleurococcus* sp., (CMIE – K2-003).

En todos los tratamientos se evidenció que en los tanques que se proporcionó una alimentación combinada de CO₂ artificial y natural se tuvo una mayor concentración y abundancia de biomasa al final de la experimentación en

comparación a los blancos de cada tratamiento que fueron alimentados con CO₂ artificial únicamente.

Cabe resaltar que la alimentación de dióxido de carbono artificial fue igual tanto para los blancos, como para los tratamientos y las repeticiones de cada uno de ellos; se les brindó CO₂ al 5% durante 3 minutos una vez al día, esto se repitió durante los 15 días de experimentación pertenecientes a la fase #3 del proceso.

El diseño del sistema aportó a la contención del gas sin la existencia de fugas dentro del tanque, ya que éste se encontraba cerrado herméticamente; las dos tapas pequeñas con las que contaba el tanque en la parte superior fueron aprovechadas primero para la alimentación del mismo con la dilución de estiércol, y posteriormente, fueron utilizadas para adaptar tanto el medidor de presión, como la llave de paso para la distribución del gas.

El uso de un pegamento especial para sellar las llaves de paso de ambos sistemas permitió minimizar al máximo el riesgo de pérdida de gases, lo cual se pudo evidenciar a través de la medición de la presión que reflejó que durante los 25 días de experimentación (fase #2 y #3) ésta aumentó progresivamente.

En cuanto a la distribución del gas, el dispositivo de succión permitió recoger el CO₂ formado en el tanque para posteriormente repartirlo por los diferentes tratamientos a través de un sistema de alimentación elaborado con mangueras. Además, éstas fueron aprovechadas para la distribución permanente de aire en todos los tanques, lo cual contribuyó a estimular el crecimiento del cultivo y evitar la sedimentación de la biomasa.

El plástico de invernadero ayudó a mantener los niveles de temperatura ambiente adecuados para el desarrollo de los cultivos, teniendo una temperatura interna promedio de 26,8 °C para los 25 días de experimentación.

Mediante las mediciones de la concentración a la que se encontraba el CO₂ generado en el tanque de digestión, se pudo evidenciar que cada tanque de microalgas y cianobacterias fueron capaces de captar aproximadamente 848

cm³ de CO₂ natural diarios; éste gas se encontró a diferentes concentraciones que fueron desde un 11,7% en su máxima, hasta un 0,6% en su mínima.

El género de microalgas *Pleurococcus* sp. con código CMIE – K2-003, perteneciente a la Colección de Microalgas para la Investigación del Ecuador – CMIE de BIOTEC, fue el que presentó una mayor afinidad al proceso de captación de CO₂ dentro de la experimentación ejecutada; esto se pudo comprobar a través de los conteos celulares ejecutados y de la medición de sólidos al final de la experimentación, ambos análisis reflejaron un aumento significativo en la cantidad de biomasa generada hasta el final del proceso.

Así mismo los cálculos ejecutados para obtener las velocidades de crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación (td) requeridos por cada tratamiento, reflejaron que las cepas que recibieron alimentación combinada de CO₂ artificial y natural crecieron más que aquellas que solo se alimentaron de CO₂ artificial, además de requerir de un tiempo menor para la duplicación de los individuos.

El CO₂ proveniente de la descomposición de estiércol porcino sí puede ser aprovechado como una fuente de alimento para cultivos de microalgas, lo cual aporta de manera positiva y significativa a la reducción de la emisión de gases de efecto invernadero a la atmósfera.

El presente proyecto puede funcionar como una herramienta o mecanismo de desarrollo limpio al aportar al crecimiento de cultivos de microalgas y cianobacterias, a través del aprovechamiento de un residuo orgánico abundante y responsable de la emisión de elevados niveles de CO₂ a nivel mundial; estos cultivos pueden ser aprovechados posteriormente como fuentes de energía limpia o para la producción de biocombustibles.

1.2. Recomendaciones

Para el desarrollo de investigaciones futuras referentes a la captación de CO₂ natural con microalgas o cianobacterias, se recomienda que en la fase de aislamiento, purificación y escalamiento de las cepas, éstas no sean alimentadas

con CO₂ artificial, ya que así las microalgas no desarrollan una dependencia sobre su alimentación con éste, logrando así alimentarse únicamente del CO₂ natural, lo cual permitirá evaluar con mayor precisión su afinidad a la captación de éste gas cuando es de origen natural.

Al trabajar con gases, el almacenamiento y transporte de éstos resulta complejo debido al riesgo de pérdidas que existe; se recomienda diseñar un sistema que permita la compresión del CO₂ generado por el tanque de digestión, para que posteriormente éste pueda ser distribuido en los tanques experimentales con una mayor eficiencia y por un período de tiempo prolongado con un flujo constante.

Las microalgas y cianobacterias deben ser manejadas con extremo cuidado, ya que al ser microorganismos el riesgo de contaminación cruzada entre cultivos es muy elevado.

Debido a que para el desarrollo de experimentaciones de éstas características se suelen utilizar cultivos en grandes volúmenes, generalmente se requiere que la investigación sea desarrollada en áreas grandes y en el exterior, por tanto, se recomienda establecer protocolos de bioseguridad que guíen y permitan al investigador manejar de manera adecuada los materiales y microorganismos, reduciendo así al máximo los riesgos de contaminación cruzada a causa de una mala manipulación de los instrumentos, reactivos y microorganismos.

REFERENCIAS

- Abdeshahian, P., Lim, J. S., Ho, W. S., Hashim, H., & Lee, C. T. (2016). *Potential of biogas production from farm animal waste in Malaysia. Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Recuperado el 02 de junio del 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.rser.2016.01.117>
- Academia Testo. (2010). Academia Online Testo. Recuperado el 18 de noviembre de 2016, de <http://www.academiatesto.com.ar/cms/inicio>
- Acién, G., Gonzalez, C., Fernández, J., & Molina, E. (2012). *Conversion of CO2 into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO2 removal? Applied Microbiology and Biotechnology*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1007/s00253-012-4362-z>
- Andersen, R. (2005). *Isolation and Purification Techniques for Microalgae - Algal Culturing Techniques*. Londres, Reino Unido: Elsevier / Academic Press.
- Andersen, R. (2005). *Purification Methods for Microalgae - Algal Culturing Techniques*. Londres, Reino Unido: Elsevier / Academic Press.
- Arnáiz, C., Isac, L., & Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note- Neubauer Chamber Cell Counting*. Recuperado el 05 de julio de 2016, de <http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>
- CIE -BIOTEC. (2013). Determinación de Parámetros Cinéticos en Microorganismos Fotosintéticos. Protocolo de Laboratorio No. 5. 1. Quito, Ecuador
- CIE -BIOTEC. (2013). Escalamiento de cultivos para microalgas. Protocolo de Laboratorio No. 6. 1-2. Quito, Ecuador
- CIE -BIOTEC. (2013). Manual de Identificación de Caracteres Morfológicos y Descripción de Microalgas de Colecta. Protocolo de Laboratorio No. 2. 1. Quito, Ecuador
- CIE -BIOTEC. (2013). Técnicas de Aislamiento para Microalgas y Cianobacterias. Protocolo de Laboratorio No. 4. 1-3. Quito, Ecuador

- Caporgno, M. ., Taleb, A., Olkiewicz, M., Font, J., Pruvost, J., Legrand, J., & Bengoa, C. (2015). *Microalgae cultivation in urban wastewater: Nutrient removal and biomass production for biodiesel and methane*. Recuperado el 01 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.algal.2015.05.011>
- Chang, H., Huang, Y., Fu, Q., Liao, Q., & Zhu, X. (2016). *Kinetic characteristics and modeling of microalgae Chlorella vulgaris growth and CO₂ biofixation considering the coupled effects of light intensity and dissolved inorganic carbon*. Recuperado el 19 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.01.087>
- Chen, W., Huang, M., Chang, J., Chen, C., & Lee, W. (2015). *An energy analysis of torrefaction for upgrading microalga residue as a solid fuel*. Recuperado el 27 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.02.095>
- Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Cumbayá. (2012). Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia Cumbayá 2012 - 2025.
- De Souza, S., Werncke, I., Marques, C., Bariccatti, R., Santos, R., Nogueira, C., & Bassegio, D. (2013). *Electric energy micro-production in a rural property using biogas as primary source*. Recuperado el 19 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.rser.2013.07.035>
- Destouni, H. (2010). *Renewable Energy*. Recuperado el 24 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1007/s13280-010-0059-7>
- Díaz, P. y Fernández, P. (2001). Representación gráfica en el Análisis de Datos. A Coruña, España: Universidad de A Coruña
- Essmann, M. (2011). Determinación de parámetros biológicos de la microalga Isochysis AFF - Galbana: comparación de un fotobiorreactor continuo VS un cultivo Batch. Recuperado el 8 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (n.d.). Mensajes principales del capítulo 3 - La situación global - Emisiones totales.
- Fernández, I., Berenguel, M., Guzmán, J. L., Ación, F. G., de Andrade, G. A., & Pagano, D. J. (2016). Hierarchical control for microalgae biomass

- production in photobioreactors. Recuperado el 26 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.conengprac.2016.06.007>
- Filho, Mannke, F., Mohee, R., Schulte, V., y Surroop, D. (2013). *Climate-Smart Technologies: Integrating Renewable Responses, Adaptation*. Recuperado el 26 de septiembre de 2016, de <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-37753-2>
- Gavilanez, F., et al. (2013). Determinación de parámetros cinéticos en microorganismos fotosintéticos. Taller teórico - práctico: BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR - Instituto de Ciencias Básicas - UNIDAD DE BIOLOGÍA.
- Gonçalves, A., Pires, J., & Simões, M. (2016a). *A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- Gonçalves, A., Pires, J., & Simões, M. (2016b). *Biotechnological potential of Synechocystis salina co-cultures with selected microalgae and cyanobacteria: Nutrients removal, biomass and lipid production*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.10.023>
- Gonçalves, A., Rodrigues, C., Pires, J., & Simões, M. (2016c). *The effect of increasing CO2 concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria*. Recuperado el 03 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.008>
- Guamán, C., y González, N. (2016). CATÁLOGO DE MICROALGAS Y CIANOBACTERIAS DE AGUA DULCE DEL ECUADOR, 9942.
- Guo, S., Zhong, S., & Zhang, A. (2013). *Privacy-preserving Kruskal – Wallis test*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.cmpb.2013.05.023>
- Hall, C., y Wreford, A. (2012). *Adaptation to climate change: The attitudes of stakeholders in the livestock industry*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1007/s11027-011-9321-y>
- Hassan, M., y Salmani, E. (2016). *Forecasting models for flow and total dissolved solids in Karoun river-Iran*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016,

- de <http://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2016.01.085>
- Herrero, J. M. (2008). *Biodigestores familiares: Guía de diseño y manual de instalación*. Recuperado el 07 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Holechek, J., Sawalhah, M., & Cibilis, A. (2015). *Renewable Energy, Energy Conservation, and US Rangelands*. Recuperado el 21 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.rala.2015.01.003>
- Huang, Y., Xiong, W., Liao, Q., Fu, Q., Xia, A., Zhu, X., y Sun, Y. (2016). *Comparison of Chlorella vulgaris biomass productivity cultivated in biofilm and suspension from the aspect of light transmission and microalgae affinity to carbon dioxide*. Recuperado el 11 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.099>
- Idowu, S. O. (2012). *Banking regulation*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1007/978-3-642-28036-8>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2015). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) 2015*. Recuperado el 15 de septiembre de 2016, de http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac_2014-2015/2015/Presentacion de resultados ESPAC_2015.pdf
- International Energy Agency. (2016). *Energy and Air Pollution*. Recuperado el 06 de octubre de 2016, de <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/WorldEnergyOutlookSpecialReport2016EnergyandAirPollution.pdf>
- Lama, S., Muylaert, K., Bahadur, T., Foubert, I., Henderson, R. K., y Vandamme, D. (2016). *Flocculation properties of several microalgae and a cyanobacterium species during ferric chloride, chitosan and alkaline flocculation*. Recuperado el 01 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.080>
- Lin, Y. (2016). *Robust inference for responder analysis: Innovative clinical trial design using a minimum p-value approach*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.conctc.2016.04.001>
- Liu, S., Ge, X., Xu, F., & Li, Y. (2016). *Effect of total solids content on giant reed ensilage and subsequent anaerobic digestion*. Recuperado el 22 de

noviembre de 2016, de https://www.researchgate.net/publication/284358912_Effect_of_total_solids_content_on_giant_reed_ensilage_and_subsequent_anaerobic_digestion

- Magnani, N. (2012). *Exploring the Local Sustainability of a Green Economy in Alpine Communities*. Recuperado el 26 de septiembre de 2016, de <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1659/MRD-JOURNAL-D-11-00105.1>
- Maione, M., Fowler, D., Monks, P. S., Reis, S., Rudich, Y., Williams, M. L., & Fuzzi, S. (2016). *Environmental Science & Policy Air quality and climate change: Designing new win-win policies for Europe*. Recuperado el 31 de mayo del 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.envsci.2016.03.011>
- Mckennedy, J., Önenç, S., Pala, M., & Maguire, J. (2016). *Supercritical carbon dioxide treatment of the microalgae *Nannochloropsis oculata* for the production of fatty acid methyl esters*. Recuperado el 31 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.06.003>
- Mennaa, F., Perales, A., & Arbib, Z. (2015). *Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability*. Recuperado el 31 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.watres.2015.06.007>
- Mouahid, A., Crampon, C., Toudji, S. A., & Badens, E. (2016). *Effects of high water content and drying pre-treatment on supercritical CO₂ extraction from *Dunaliella salina* microalgae: Experiments and modelling*. Recuperado el 31 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.supflu.2016.06.007>
- Noorollahi, Y., Kheirrouz, M., Asl, H. F., Yousefi, H., & Hajinezhad, A. (2015). *Biogas production potential from livestock manure in Iran*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.rser.2015.04.190>
- Pinos-Rodríguez, J. M., García-López, J. C., Peña-Avelino, L. Y., Rendón-Huerta, J. A., González-González, C., & Tristán-Patiño, F. (2012). *Impactos Y Regulaciones Ambientales Del Estiércol Generado Por Los Sistemas Ganaderos De Algunos Países De América*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de

<http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v46n4/v46n4a4.pdf>

- Pongmala, K., Autixier, L., Madoux-Humery, A., Fuamba, M., Galarneau, M., Sauv e, S., ... Dorner, S. (2015). *Modelling total suspended solids , E . coli and carbamazepine , a tracer of wastewater contamination from combined sewer overflows*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2015.10.042>
- Prata, C., Da Paz, F., Schmidt, P., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2016). *Effect of different total suspended solids concentrations on the growth performance of Litopenaeus vannamei in a BFT system*. Recuperado el 22 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2016.03.004>
- Radzun, K. A., Wolf, J., Jakob, G., Zhang, E., Stephens, E., Ross, I., & Hankamer, B. (2015). *Automated nutrient screening system enables high-throughput optimisation of microalgae production conditions*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1186/s13068-015-0238-7>
- Raesossadati, M. J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M. P., & Moheimani, N. R. (2014). *CO2 bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO2 concentrations, light, and temperature*. Recuperado el 03 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.algal.2014.09.007>
- Raesossadati, M. J., Ahmadzadeh, H., McHenry, M. P., & Moheimani, N. R. (2015). *Biomass and Biofuels from Microalgae: Chapter 7 CO2 Environmental Bioremediation by Microalgae*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7>
- Rice, E., et al. (2012). *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016, de https://www.mwa.co.th/download/file_upload/SMWW_1000-3000.pdf
- Sakarika, M., & Kornaros, M. (2016). *Effect of pH on growth and lipid accumulation kinetics of the microalga Chlorella vulgaris grown heterotrophically under sulfur limitation*. Recuperado el 11 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.033>
- Santos-ballardo, D., Rossi, S., Hernández, V., Vázquez, R., Rendón-unceta, C., Caro-corrales, J., & Valdez-ortiz, A. (2015). *A simple*

- spectrophotometric method for biomass measurement of important microalgae species in aquaculture*. Recuperado el 31 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.05.044>
- Sarbatly, R., & Suali, E. (2013). *Membrane Photobioreactor as a Device to Increase CO₂ Mitigation by Microalgae*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-6249-1>
- Saulnier, J. B., & Varella, M. D. (2013). *Global Change Research II : Some Keys to the Climage/Energy Crisis*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <https://books.google.com/books?id=wblEAAAQBAJ&pgis=1>
- Sayre, R. (2010). *Microalgae: The Potential for Carbon Capture*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1525/bio.2010.60.9.9>
- Segoviano, S. (2015). NUEVOS PLANTEAMIENTOS EN LA SEGURIDAD ENERGÉTICA DE LA UNIÓN EUROPEA Y OPCIONES EN EL MEDITERRÁNEO OCCIDENTAL. Recuperado el 13 de octubre de 2016, de <https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-74789/UNISCIDP39-2SEGOVIANO..pdf>
- Shimako, A., Tiruta-Barna, L., Pigné, Y., Benetto, E., Navarrete, T., Guiraud, P., & Ahmadi, A. (2016). *Environmental assessment of bioenergy production from microalgae based systems*. Recuperado el 11 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.08.003>
- Singh, U. B., y Ahluwalia, A. S. (2013). *Microalgae: A promising tool for carbon sequestration - Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1007/s11027-012-9393-3>
- Surendhiran, D., Vijay, M., Sivaprakash, B., & Sirajunnisa, A. (2015). *Kinetic modeling of microalgal growth and lipid synthesis for biodiesel production*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1007/s13205-014-0264-3>
- Taelman, S. ., De Meester, S., Roef, L., Michiels, M., & Dewulf, J. (2013). *The environmental sustainability of microalgae as feed for aquaculture : A life cycle perspective*. Recuperado el 01 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.044>
- TESTO 350. (n.d.). testo 350 · Analizador de gases de combustión.
- Thawechai, T., Cheirsilp, B., Louhasakul, Y., Boonsawang, P., & Prasertsan, P.

- (2016). *Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light illumination and carbon dioxide feeding strategies*. Recuperado el 11 de noviembre del 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.109>
- Tsapekos, P., Kougias, P., Treu, L., Campanaro, S., & Angelidaki, I. (2016). *Process performance and comparative metagenomic analysis during co-digestion of manure and lignocellulosic biomass for biogas production*. Recuperado el 15 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.10.081>
- Umbarila Paola, A. F. & R. J. (2015). *Importance of renewable energies in the energy security and its relationship with economic growth*. Recuperado el 05 de octubre de 2016, de <http://hemeroteca.unad.edu.co/revista1/index.php/riaa/article/view/1419/1743>
- Vainshtein, M. (2014). *Current Environmental Issues and Challenges*. Recuperado el 07 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1007/978-94-017-8777-2>
- Varnero, M. T. (2011). *Manual de Biogás. Physiological Research*. Recuperado el 07 de junio de 2016, de <http://doi.org/10.1073/pnas.0703993104>
- Wang, L. (2015). *Sea Lanes and Chinese National Energy Security*. Recuperado el 23 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.2112/SI73-099.1>
- Wang, T., Hsu, C.-L., Huang, C.-H., Hsieh, Y.-K., Tan, C.-S., y Wang, C.-F. (2016). *Environmental impact of CO₂-expanded fluid extraction technique in microalgae oil acquisition*. Recuperado el 19 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.179>
- Wang, Y., Ho, S.-H., Cheng, C.-L., Guo, W.-Q., Nagarajan, D., Ren, N.-Q., y Chang, J.-S. (2016). *Bioresource Technology Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106>
- Wilson, M., Groppo, J., Placido, A., Graham, S., Shea, A., Crocker, M., y Andrews, R. (2014). *CO₂ recycling using microalgae for the production of fuels*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1007/s13203-014-0052-3>

- Woldeyohannes, A., Woldemichael, D., & Aklilu, B. (2016). *Sustainable renewable energy resources utilization in rural areas*. Recuperado el 13 de octubre de 2016, de http://ac.els-cdn.com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/S1364032116303409/1-s2.0-S1364032116303409-main.pdf?_tid=f03c5a4a-9191-11e6-a28a-00000aacb361&acdnat=1476396846_7a3e3507db7c609d05a07e6f2447ae79
- Worldmeteo. (2016). Previsión del tiempo Nayon, Ecuador. Recuperado el 18 de septiembre de 2016, de <http://www.worldmeteo.info/es/america-del-sur/ecuador/nayon/tiempo-234582/>
- Wu, J., He, Z., Gu, F., Liu, X., Zhou, J., y Yang, C. (2016). *Computing exact permutation p -values for association rules*. Recuperado el 20 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.ins.2016.01.094>
- Xueqin, L., Yuefang, S., & Dai, W. (2013). *Challenges in Development of the Biomass Energy Industry in China*. Recuperado el 23 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.5814/j.issn.1674-764x.2013.04.008>
- Zawar, P., Javalkote, V., Burnap, R., Mahulikar, P., & Puranik, P. (2016). *CO2 capture using limestone for cultivation of the freshwater microalga Chlorella sorokiniana PAZ and the cyanobacterium Arthrospira sp.* Recuperado el 27 de octubre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.079>
- Zhongchao, T. (2014). *Air Pollution and Greenhouse Gases*. Recuperado el 31 de mayo de 2016, de <http://download.springer.com.bibliotecavirtual.udla.edu.ec/static/pdf/555/bok:978-981-287-212-8.pdf?originUrl=http://link.springer.com/book/10.1007/978-981-287-212-8&token2=exp=1464729855~acl=/static/pdf/555/bok%3A978-981-287-212-8.pdf?originUrl=http%>
- Zhongqi, H., & Zhang, H. (2014). *Applied Manure and Nutrient Chemistry for Sustainable Agriculture and Environment*. Recuperado el 02 de junio de 2016, de http://encore.fama.us.es/iii/encore/record/C__Rb2615640__Syield management__P2,56__Orightresult__X1?lang=spi&suite=cobalt
- Zhuang, L., Azimi, Y., Yu, D., Wang, W., Wu, Y., & Dao, G. (2016). *Enhanced*

attached growth of microalgae Scenedesmus - LX1 through ambient bacterial pre-coating of cotton fiber carriers. Recuperado el 19 de noviembre de 2016, de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.07.013>

ANEXOS

Anexo 1. Composición del medio de cultivo Bold's Basal Medium – BBM

Component	Stock Solution (g · L⁻¹ dH₂O)	Quantity Used	Concentration Final Medium (M)
<i>Macronutrients</i>			
NaNO ₃	25.00	10 mL	2.94 x 10 ⁻³
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2.50	10 mL	1.70 x 10 ⁻⁴
MgSO ₄ · 7H ₂ O	7.50	10 mL	3.04 x 10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7.50	10 mL	4.31 x 10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17.50	10 mL	1.29 x 10 ⁻³
NaCl	2.50	10 mL	4.28 x 10 ⁻⁴
<i>Alkaline EDTA Solution</i>		1 mL	
EDTA	50.00		1.71 x 10 ⁻⁴
KOH	31.00		5.53 x 10 ⁻⁴
<i>Acidified Iron Solution</i>		1 mL	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	4.98		1.79 x 10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1 mL	
<i>Boron Solution</i>		1 mL	
H ₂ BO ₃	11.42		1.85 x 10 ⁻⁴
<i>Trace Metals Solution</i>		1 mL	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.82		3.07 x 10 ⁻⁵
MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.44		7.28 x 10 ⁻⁶
MoO ₃	0.71		4.93 x 10 ⁻⁶
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1.57		6.29 x 10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.49		1.68 x 10 ⁻⁶

Anexo 2. Composición del medio de cultivo BG-11.

Solución	Reactivo	Cantidad (g)
Solución 1a (para 1L de solución)	NaNO ₃	150
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	7
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	3,6
Solución 2 (para 1L de solución)	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	4
	EDTA	0,1
	Na ₂ CO ₃	2
Solución 3 (para 1L de solución)	Ácido cítrico	0,6
	Citrato de sodio	0,6
Solución 4 (para 1L de solución)	H ₂ BO ₃	2,86
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1,81
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,22
	NaMoO ₄ · 5H ₂ O	0,39
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,8
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,05
	FeCl ₂	0,22

Anexo 3. Composición Nitrofoska® foliar.

APLICACIÓN FOLIAR E IRRIGACIÓN		
Para estimular e incrementar el crecimiento de plantas		
INGREDIENTES		
Nitrógeno	(N)	10%
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

Anexo 4. Tablas de datos para los cálculos de velocidad de crecimiento “ μ ” y tiempo de duplicación “td”.

4.1. Resumen de los conteos celulares (base)

Día	K2-003	J1-003
1	990	8850
4	610	20540
6	1390	18400
8	1320	14500
11	1860	19800
13	3100	30100
15	4200	28600
18	2730	39000
20	3360	27600
22	3780	29400
25	3000	12800
27	4500	18300
29	3400	36800

Nota: Los datos para los cálculos se presentan ya multiplicados por el factor de dilución aplicado en cada conteo.

4.2. Cálculos para el género *Pleurococcus* sp.- K2-003 (base).

INTERVALOS	Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (td)
6 a 4	3,33	0,21
11 a 8	2,10	0,33
13 a 11	3,56	0,19
15 a 13	3,50	0,20
20 a 18	3,22	0,22
22 a 20	3,02	0,23
27 a 25	3,66	0,19
PROMEDIO	3,20	0,22

4.3. Cálculos para el género Rhabdodermasp. - J1-003 (base).

INTERVALOS	Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (td)
4 a 1	3,12	0,22
11 a 8	2,86	0,24
13 a 11	4,61	0,15
18 a 15	3,08	0,23
22 a 20	3,75	0,18
27 a 25	4,31	0,16
29 a 27	4,91	0,14
PROMEDIO	3,80	0,19

4.4. Resumen de los datos registrados en los conteos celulares para el género Pleurococcusp.- K2-003 (experimental).

Día	K2-003 (Blanco)	K2-003 (1)	K2-003 (2)	K2-003 (3)
1	220	260	270	310
2	95	100	125	150
3	215	245	260	345
4	245	415	260	420
5	405	415	485	595
6	210	355	350	320
7	210	340	420	315
8	255	425	480	435
9	640	955	865	840
10	370	885	995	885
11	350	910	935	1005
12	315	1100	1010	1415
13	300	1035	1285	1255
14	335	108	1010	1230
15	310	1065	805	890

4.5. Resumen de los datos registrados en los conteos celulares para el género Rhabdodermasp. - J1-003 (experimental).

Día	J1-003 (Blanco)	J1-003 (1)	J1-003 (2)	J1-003 (3)
1	200	170	155	180
2	60	50	50	85
3	220	160	180	195
4	120	205	100	125
5	60	100	130	235
6	75	75	65	50
7	170	65	75	75
8	245	65	115	240
9	520	205	175	310
10	475	225	190	385
11	485	200	185	580
12	500	410	580	670
13	735	650	945	1345
14	625	665	955	1175
15	860	575	690	1525

4.6. Resumen de los datos registrados en los conteos celulares para el consorcio (experimental).

Día	Consortio (Blanco)	Consortio (1)	Consortio (2)	Consortio (3)
1	860	770	655	605
2	325	325	270	285
3	890	845	735	610
4	475	690	705	545
5	675	875	430	550
6	270	320	170	330
7	355	365	180	445
8	495	595	455	470

9	945	970	820	810
10	660	950	39,5	955
11	780	595	315	940
12	745	515	125	895
13	625	425	100	770
14	775	745	115	915
15	695	610	130	865

4.7. Cálculos de “ μ ” y “td” para el género *Pleurococcus* sp.- K2-003 (experimental).

INTERVALOS	Velocidad de crecimiento (μ)				Tiempo de duplicación (td)			
	K2-003 (Blanco)	K2-003 (1)	K2-003 (2)	K2-003 (3)	K2-003 (Blanco)	K2-003 (1)	K2-003 (2)	K2-003 (3)
1 a 2	-	-	-	-	-	-	-	-
2 a 3	4,79	4,98	4,91	5,27	0,14	0,14	0,14	0,13
3 a 4	3,40	5,14	-	4,32	0,20	0,13	-	0,16
4 a 5	5,08	-	5,42	5,16	0,14	-	0,13	0,13
5 a 6	-	-	-	-	-	-	-	-
6 a 7	-	-	4,25	-	-	-	0,16	-
7 a 8	3,81	4,44	4,09	4,79	0,18	0,16	0,17	0,14
8 a 9	5,95	6,27	5,95	6,00	0,12	0,11	0,12	0,12
9 a 10	-	-	4,87	3,81	-	-	0,14	0,18
10 a 11	-	3,22	-	4,79	-	0,22	-	0,14
11 a 12	-	5,25	4,32	6,02	-	0,13	0,16	0,12
12 a 13	-	-	5,62	-	-	-	0,12	-
13 a 14	3,56	-	-	-	0,19	-	-	-
14 a 15	-	6,86	-	-	-	0,10	-	-
PROMEDIOS	4,43	5,17	4,93	5,02	0,16	0,14	0,14	0,14

4.8. Cálculos de “ μ ” y “td” para el género *Rhabdodermasp.* - J1-003 (experimental).

INTERVALOS	Velocidad de crecimiento (μ)				Tiempo de duplicación (td)			
	J1-003 (Blanco)	J1- 003 (1)	J1- 003 (2)	J1-003 (3)	J1-003 (Blanco)	J1-003 (1)	J1-003 (2)	J1-003 (3)
1 a 2	-	-	-	-	-	-	-	-
2 a 3	5,08	4,70	4,87	4,70	0,14	0,15	0,14	0,15
3 a 4	-	3,81	-	-	-	0,18	-	-
4 a 5	-	-	3,40	4,70	-	-	0,20	0,15
5 a 6	2,71	-	-	-	0,26	-	-	-
6 a 7	4,55	-	2,30	3,22	0,15	-	0,30	0,22
7 a 8	4,32	-	3,69	5,11	0,16	-	0,19	0,14
8 a 9	5,62	4,94	4,09	4,25	0,12	0,14	0,17	0,16
9 a 10	-	3,00	2,71	4,32	-	0,23	0,26	0,16
10 a 11	2,30	-	-	5,27	0,30	-	-	0,13
11 a 12	2,71	5,35	5,98	4,50	0,26	0,13	0,12	0,15
12 a 13	5,46	5,48	5,90	6,51	0,13	0,13	0,12	0,11
13 a 14	-	2,71	2,30	-	-	0,26	0,30	-
14 a 15	5,46	-	-	5,86	0,13	-	-	0,12
PROMEDIOS	4,25	4,28	3,92	4,84	0,18	0,17	0,2	0,15




4.9. Cálculos de “ μ ” y “td” para el consorcio (experimental).

INTERVALOS	Velocidad de crecimiento (μ)				Tiempo de duplicación (td)			
	Consortio (Blanco)	Consortio (1)	Consortio (2)	Consortio (3)	Consortio (Blanco)	Consortio (1)	Consortio (2)	Consortio (3)
1 a 2	-	-	-	-	-	-	-	-
2 a 3	4,03	3,95	3,84	3,48	0,17	0,18	0,18	0,20
3 a 4	-	-	-	-	-	-	-	-
4 a 5	3,00	2,92		-0,69	0,23	0,24		-1,00
5 a 6	-	-	-	-	-	-	-	-
6 a 7	2,14	1,50	0,00	2,44	0,32	0,46	0,00	0,28
7 a 8	2,64	3,14	3,31	0,92	0,26	0,22	0,21	0,76
8 a 9	3,81	3,62	3,60	3,53	0,18	0,19	0,19	0,20
9 a 10	-	-	-	2,67	-	-	-	0,26
10 a 11	2,48	-	-	-	0,28	-	-	-
11 a 12	-	-	-	-	-	-	-	-
12 a 13	-	-	-	-	-	-	-	-
13 a 14	2,71	3,47	0,41	2,67	0,26	0,20	1,71	0,26
14 a 15	-	-	0,41	-	-	-	1,71	-
PROMEDIOS	2,97	3,10	1,93	2,15	0,24	0,25	0,66	0,14

Anexo 5. Secuencia de todo el proceso de experimentación.


5.1. Fase 1: Selección, aislamiento, purificación y escalamiento de las cepas de microalgas y cianobacterias de la CMIE.



Paso	Descripción	Evidencia
1	Selección de cepas de microalgas y cianobacterias disponibles en la CMIE.	
2	Aislamiento y purificación en cajas Petri mediante estrías discontinuas.	

<p>3</p>	<p>Inicio del proceso de escalamiento – traspaso de la biomasa a tubos falcon de 50 ml (se lo llenó hasta 30 ml).</p>	
<p>4</p>	<p>Traspaso a 200 ml</p>	
<p>5</p>	<p>Traspaso a 600 ml</p>	

6	Traspaso a 2,5 L	
7	Traspaso a 5 L	




5.2. Fase 2: Maduración del estiércol.




Paso	Descripción	Evidencia
1	Prueba de la proporción de agua y estiércol para la dilución.	

<p>2</p>	<p>Tanque experimental con la dilución de estiércol porcino en agua.</p>	
<p>3</p>	<p>Estructura para el desarrollo de la experimentación (con plástico de invernadero para almacenar el calor).</p>	

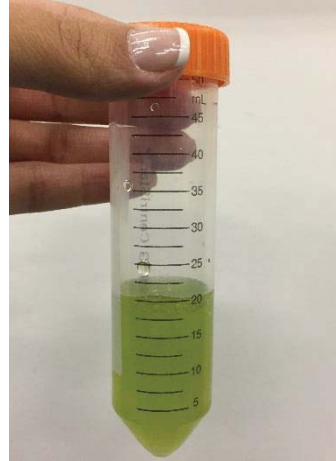
5.3. Fase 3: Mediciones y alimentación de CO₂.

Paso	Descripción	Evidencia
1	Preparación de los tanques experimentales de microalgas y cianobacterias.	
3	Iluminación 24 horas del invernadero.	

		
4	Medición de la temperatura.	
5	Medición de la presión.	

<p>6</p>	<p>Medición del pH.</p>	
<p>7</p>	<p>Medición del CO₂.</p>	
<p>8</p>	<p>Distribución del CO₂ en los tanques de microalgas y cianobacterias.</p>	

9 Medición de sólidos totales.



10 Medición de sólidos disueltos.



11 Medición de sólidos suspendidos.

