



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

USO DE MICROALGAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA RELACIÓN
CARBONO NITRÓGENO EN ESTIERCOL PORCINO

AUTORA

Johanna Alejandra Herdoíza Barreno

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

USO DE MICROALGAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA RELACIÓN
CARBONO NITRÓGENO EN ESTIERCOL PORCINO

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

Profesor Guía

MSc. Yasser Alejandro González Romero

Autora

Johanna Alejandra Herdoíza Barreno

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

Magíster en Ingeniería Ambiental

CC: 0703737627

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

Magíster en Ciencias Biológicas

CC: 1707429351

DECLARACIÓN DE AUTORÍA 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”.

Johanna Alejandra Herdoíza Barreno

CC: 1721394128

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por brindarme tantas bendiciones; A mis amigos, en especial, Carmen L. por su compañía, consejos y porque sin ella esta experiencia no hubiera sido igual. Al Laboratorio de BIOTEC por la oportunidad y confianza brindada; a la M.Sc Nory González por toda la paciencia desde el primer día tanto en el laboratorio como en durante la investigación; a la M.Sc Cristina Guamán por toda su valiosa asesoría; al M.Sc Alejandro González por su tiempo y dedicación durante todo el proceso,

DEDICATORIA

Este sueño está dedicado a mis padres, quienes con mucho sacrificio me han brindado todo para cumplir cada meta y salir adelante. A mi hermano por ser un ejemplo de fuerza para superar cualquier problema, siempre vas a ser mi consentido y mi alegría. A mi compañero de vida Omar por luchar conmigo cada día, dando todo tu amor y amistad. A mi familia por su cariño y preocupación siempre.

Los amo muchísimo y todo esfuerzo es y será siempre por ustedes.

RESUMEN

La industria agrícola-ganadera es una de las principales actividades económicas en el Ecuador; sin embargo, implica alto riesgo de contaminación al suelo y agua por la producción diaria de residuos como el estiércol. La especie de mayor relevancia dentro del sector es el cerdo, debido a la dificultad para tratar las excretas y el incremento acelerado de la población. Adicionalmente, la pérdida de suelos fértiles y la producción a gran escala de cultivos, demandan mayores cantidades de fertilizantes nitrogenados, los cuales pueden resultar tóxicos para el ambiente y costosos. Por tal motivo, el presente trabajo tuvo como objetivo biodegradar aeróbicamente el estiércol a través del uso de microalgas, para obtener la mejor relación carbono: nitrógeno (C/N) para su aplicación al suelo como fertilizante. Los géneros de microalgas y cianobacterias utilizados en la experimentación fueron *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 y *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 respectivamente, además de la formación de un consorcio. El tratamiento propuesto, consistió en un digestor conformado por fotobioreactores cerrados y cilíndricos, compuesto por estiércol fresco evaluado en tres diferentes diluciones con agua potable, que fueron: 1:8, 1:6 y 1:4; en conjunto con los géneros de microalgas y cianobacterias. La experimentación duró 25 días y se mantuvieron condiciones ambientales constantes como luz, aireación y pH. Al final del proceso, se extrajeron los sedimentos para cuantificar la relación C/N de los reactores. En la investigación se pudo concluir que solo la cepa de microalgas *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 optimiza la relación C/N mediante biodegradación, con un valor de 11,6 y un porcentaje de remoción de nitrógeno de 90%, en dilución de 1:8. El estiércol tratado puede utilizarse como abono quelatado orgánico rico en nitrógeno; sin embargo, es necesario realizar más estudios en cuanto al comportamiento de estos géneros de microalgas para la biodegradación de estiércol.

ABSTRACT

The livestock industry is one of the main economic activities in the Ecuador; however, it involves high risk of contamination for soil and water by the daily production of waste as manure. The species of greatest relevance within the sector is the swine, due to the difficulty to treat dung and the rapid increase in the population. Additionally, the loss of fertile soil and the production large scale crop demand greater amounts of nitrogen fertilizers, which can be toxic to the environment and expensive. For this reason, this investigation aimed biodegrade aerobically manure using microalgae, to obtain the best ratio carbon: nitrogen (C/N) for it is application to the soil as a fertilizer. The microalgae and cyanobacteria used in the research were *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 and *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 respectively in addition to the formation of a consortia. The proposed treatment consisted in a digester composed of cylindrical closed photobioreactors with fresh manure, evaluated in three different dilutions with tap water that were: 1:8, 1:6 and 1:4, in conjunction with the microalgae and cyanobacteria. The research kept constant light, aeration and pH conditions in the course of 25 days. At the end of the process, the supernatant was centrifuged and sediments were extracted to obtain the sample and quantify the C/N ratio of the reactors. The research concluded that only the microalgae *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 optimize the ratio C/N through biodegradation with a value of 11,6 and a percentage of removal of nitrogen from 90% at 1:8 dilution. The treated manure can be used as fertilizer nitrogen-rich organic chelated; however, is necessary to perform more studies on the behavior of these genus of microalgae for the biodegradation of manure.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. ALCANCE	3
1.3. JUSTIFICACIÓN	4
1.4. OBJETIVOS	5
1.4.1. Objetivo General.....	5
1.4.2. Objetivos Específicos	5
2. MARCO REFERENCIAL	6
2.1. Estiércol Porcino	6
2.1.1. Manejo del estiércol porcino en Ecuador	7
2.1.2. Usos del estiércol porcino	7
2.2. Abonos orgánicos	8
2.2.1. Abono quelatado orgánico	9
2.3. Fitorremediación	10
2.3.1. Microalgas	11
2.3.2. Uso de microalgas en Ecuador	12
2.3.3. Especies de microalgas y cianobacterias	13
2.3.4. Bioabsorción.....	14
2.4. Relación carbono: nitrógeno	15
2.4.1. Importancia de Relación C/N en el suelo	15
3. METODOLOGÍA.....	16
3.1. Recolección de estiércol de cerdo.....	16
3.2. Sitio de experimentación	18
3.3. Implementación del sistema de tratamiento.....	19
3.3.1. Selección de cepas de microalgas.....	19
3.3.2. Purificación de cepas seleccionadas	20
3.3.3. Escalamiento de cepas de microalgas y cianobacterias.....	20

3.4.4. Elaboración de curva cinética de crecimiento	22
3.4. Implementación del sistema para biodegradación de estiércol de cerdo	23
3.5. Integración de microalgas y cianobacterias en envases para biodegradación	23
3.5.1. Parámetros de funcionamiento de los reactores.....	24
3.6. Medición del parámetro relación C/N	26
3.6.1. Preparación de la muestra	26
3.6.2. Análisis de la muestra.....	27
3.7. Diseño experimental	28
3.7.1. Análisis estadístico	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
4.1 Caracterización de muestra inicial de estiércol	30
4.2. Especies seleccionadas de microalgas y cianobacterias	31
4.3. Curvas de cinéticas de crecimiento y parámetros de las cepas.....	33
4.4. Mediciones de parámetros	40
4.5. Sistema de biodegradación de estiércol.....	44
4.6. Medición del parámetro relación C/N	45
4.7. Análisis estadístico	50
4.7.1. Parámetro relación C/N	50
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	54
5.1. Conclusiones	54
5.2. Recomendaciones	56
REFERENCIAS	57
ANEXOS	66

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ANTECEDENTES

En la actualidad, uno de los principales retos de la humanidad es la lucha contra la pérdida y degradación de suelos productivos debido a la alta demanda de cultivos para abastecer a la población (Pinos et al., 2012, pp. 359-370; Porta, López, y Poch, 2011, pp. 420-430; Salazar, 2014, p. 210). Se calcula que para el año 2050, la población mundial va a ascender a 9 billones aproximadamente; es inevitable no pensar que cada día se requiere de más cultivos para abastecer la demanda alimenticia (Kiersch, 2015; Wildner y Veiga, 1992).

Los suelos cuya fertilidad ha sido afectada por la degradación carecen de los nutrientes necesarios, como el nitrógeno, para producción de cultivos (García et al., 2006, p. 375; Díez, 1999, p. 74; Martínez y Olalde, 2008, p. 58). Las causantes de este fenómeno normalmente son la erosión natural o acelerada por acción antrópica debido al manejo inadecuado en la agricultura, un ejemplo es la aplicación directa del estiércol sin ningún tipo de tratamiento en la superficie del suelo (Benzing, 2001, p. 310; Kiersch, 2015). La producción de excrementos por ganado como cerdos y gallinas, es una problemática considerada inmanejable por su cantidad, si se calcula que en 50 años la demanda de estos animales de consumo creció en un 50%, 200% y 280% respectivamente (Cañizares et al., 1994; Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), 2011; Kebede, Pizarro, y Mulbry, 2006).

La especie de mayor problemática, es el cerdo, tanto por la producción diaria de estiércol con 4 kg por cabeza en un adulto, como la falta de tratamientos de las mismas, puesto que el 60% de las granjas no tienen un medio para tratar las excretas (Godos et al., 2010; Sandefur et al., 2016). En la actualidad, existen diversos tratamientos para el estiércol porcino, sin embargo; la mayoría

implica alta inversión, la cual muchas veces no es viable (Christenson y Sims, 2011; Franchino et al., 2016). Entre los principales tratamientos se puede encontrar plantas para recuperación de energía, recuperación de carbono a partir de procesos especializados, reciclaje de nutrientes para diferentes usos, entre otros (Sandefur et al., 2016; Wildner y Veiga, 1992; Yen, Jeng, y Horng, 2008).

El reciclaje de nutrientes o el uso de estiércol como abono orgánico se lo realiza mediante tecnología que modifica la composición de los mismos antes de ser aplicados y se enfoca en reducir su cantidad, más no en evaluar la relación carbono nitrógeno al final del proceso (Porta et al., 2011, pp. 420-430; Salazar, 2014, p. 210). Entre los tratamientos más relevantes, se puede nombrar a los biodigestores anaeróbicos, cuya desventaja es producir fertilizantes ácidos, y compostaje aeróbico, donde el estiércol con relación Carbono Nitrógeno (C/N) baja y pH ácido no permiten un correcto procedimiento y a su vez elevan el costo para su uso como fertilizante al usar la técnica de separación líquida-sólida (Godos et al., 2010; Tapia y Fries, 2007, p. 120).

La búsqueda de tratamientos de estiércol porcino eficientes y sostenibles para la producción de abono orgánico, ha llevado a probar métodos de biorremediación a partir de microorganismos como las microalgas y cianobacterias (Cañizares et al., 1994; Miao et al., 2014). Los cultivos de microalgas y cianobacterias se utilizan para absorber el exceso de nutrientes del estiércol durante la fase de crecimiento, mientras consumen la materia orgánica como fuente de energía para procesos metabólicos, sin generar desperdicios y bajo consumo de energía durante todo el proceso a un bajo costo, ligado a la capacidad de generar biofertilizantes (Spaulding, Lubinski, y Potapova, 2010, p. 50; Wehr y Sheath, 2003, p. 120; Ycaza, 2016). Sin embargo; la mayoría de investigaciones se enfocan en la concentración de nutrientes al final del tratamiento, más no en parámetros para evaluar la acción

como fertilizante, como la relación C/N (Solovchenko et al., 2013; Soria y Barba, 2013, p. 12).

La importancia de la relación C/N radica en la capacidad de los nutrientes para estar disponibles en un cultivo, además del potencial del suelo para transformar la materia orgánica en nitrógeno mineral (Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro (AGROCALIDAD) y Asociación de porcicultores de Ecuador (ASPE), 2012; Benzing, 2001, p. 310; Róman et al., 2013). Si un fertilizante se encuentra en el rango de 10 a 12 de relación C/N indica óptima liberación de nitrógeno en el suelo, mientras que valores fuera del rango implican liberación lenta o excesiva del mismo (Boursier, Béline, y Paul, 2005; Castrillón, Jiménez, y Bedoya, 2004, p. 217; ENEEK, 2013). Adicionalmente, las especies de microalgas utilizadas para tratar diluciones de estiércol pre-tratado aeróbicamente y aplicarlos como fertilizantes comúnmente son: *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y su consorcio con resultados de 3 a 33% de mejora en la biodisponibilidad nitrógeno para las plantas (Cañizares et al., 1994; González et al., 2011; Matamoros et al., 2015).

1.2. ALCANCE

En el presente trabajo de titulación se seleccionaron cepas aisladas de microalgas de la Colección de Microalgas para Investigación del Ecuador (CMIE) del Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC) perteneciente a la Corporación para la Investigación Energética (CIE), con potencial para degradar aguas con excretas porcinas y que optimicen la relación C/N en 25 días de experimentación. Las especies obtenidas para la experimentación fueron microalgas y cianobacterias: *Rhabdoderma* sp. y *Pleurococcus* sp. respectivamente, además de su consorcio.

El experimento consistió en un sistema a escala laboratorio, que partió de la recolección del estiércol porcino, para luego procesarse en el BIOTEC con condiciones controladas en reactores de 10 litros de plástico. El género de microalgas y cianobacterias con su respectivo consorcio fueron insertados dentro de estos reactores con estiércol diluido en biodegradación una vez escaladas en su punto óptimo de crecimiento.

Los resultados fueron enfocados en el análisis de la relación C/N del estiércol obtenido al final del proceso y su uso como abono orgánico, además de la especie de microalgas que optimice este proceso.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La problemática es el alarmante crecimiento de la industria ganadera alrededor del mundo, en especial del sector porcino y los impactos que provoca en el suelo (Pinos et al., 2012, p. 360; Salazar, 2014, p. 210 ; Sandefur et al., 2016, p. 310). El estiércol porcino sin tratamiento sobrecarga de nutrientes y contaminantes al suelo, causando degradación y pérdida de fertilidad en los mismos, aumentando la necesidad de aplicar fertilizantes orgánicos (Benzing, 2001, p. 210; ENEEK, 2013). Actualmente, según el último estudio censal en el Ecuador existen disponibles 1'800.000 cabezas de porcinos y en la provincia de Pichincha 360.468 ejemplares, con un promedio de generación de 4,5 kg de excretas por día por cabeza con estancia los mismos en las granjas de 167 días (INEC, 2011).

Los tratamientos disponibles para el estiércol en su utilización como fertilizante son escasos, sin embargo; la mayoría involucra la contaminación o transferencia de la misma a otras matrices ambientales con altos costos, enfocados solo en el estudio de la biodisponibilidad de fósforo y la reducción del exceso de nutrientes al final del tratamiento, más no en la optimización de

la relación C/N para su uso como fertilizante para cultivos (Brennan y Owende, 2009; Serediak 2012, pp. 510-530; Solovchenko et al., 2013). El uso de microalgas y cianobacterias para optimizar la relación C/N resultante del tratamiento de estiércol, es sin duda un proceso innovador en temas de biorremediación, puesto que representan una alternativa viable para combatir la contaminación por estiércol y la carencia del nitrógeno mineral para cultivos en suelos degradados (Boursier et al., 2005; Cañizares et al., 1994; Christenson y Sims, 2011).

A través de la investigación planteada en el presente trabajo, será posible determinar qué especie de microalgas presenta mayor capacidad de optimizar la relación C/N al final de la biodegradación del estiércol porcino. Permitiendo generar una propuesta sobre un sistema de tratamiento natural y sostenible que evite que dicho residuo contamine las matrices ambientales, así como también, contribuir a la mejora de suelos productivos en la biodisponibilidad de nutrientes como el nitrógeno (Franchino et al., 2016; Godos et al., 2010; González et al., 2011).

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo General

Seleccionar e identificar las especies de microalgas que optimicen la relación C/N en el estiércol de cerdo después del proceso de biodegradación.

1.4.2. Objetivos Específicos

Diseñar un sistema a escala de laboratorio que permita la biodegradación de estiércol porcino a partir del uso cultivos de microalgas.

Cuantificar la relación C/N optimizado por las especies de microalgas seleccionadas.

Determinar la especie de microalgas que obtuvo la mejor relación C/N del estiércol.

2. MARCO REFERENCIAL

2.1. Estiércol Porcino

El estiércol es un tipo de abono sólido o líquido, cuya composición es excremento u orina, con presencia o no de residuos de materiales vegetales o camas, proveniente de cualquier tipo de animal (Martínez y Olalde, 2008; Róman et al., 2013). Puede encontrarse en estado fresco o maduro dependiendo del grado de descomposición y los porcentajes de nutrientes están dados por diferentes factores como: alimentación, material de cama, entre otros (Tapia y Fries, 2007, p. 120). Sin embargo; se puede considerar que una tonelada del mismo, seco contiene: 6 kg de nitrógeno, 6 kg de fósforo y 2,6 kg de potasio, además de micronutrientes como manganeso, cobre, zinc, molibdeno y boro (Porta et al., 2011, p. 67; Salazar, 2014, p. 210). Además, es importante considerar que la densidad en estado fresco es aproximadamente $0,84 \text{ kg/L}^{-1}$ y el pH se encuentra en un rango de 6 a 8, siendo completamente neutro (AGROCALIDAD y ASPE, 2012; Benzing, 2001, p. 310; Castrillón et al., 2004, p. 90)

Un factor decisivo en la estructura del estiércol es el método por el cual se recolecta y procesa, si las excretas son recogidas después del lavado se pierden nutrientes al solubilizarse con el agua (Solovchenko et al., 2013; Wildner y Veiga, 1992; Yen et al., 2008).

2.1.1. Manejo del estiércol porcino en Ecuador

En el Ecuador según el censo de 2010 existen 1.737 granjas porcinas, alcanzando un total de 310.607 cabezas, con una tasa de crecimiento de la especie 1,7%, y distribución de: 41% en la Sierra y el 38% en la Costa, compuesto por granjas familiares, comerciales e industriales, dependiendo de su capacidad (Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca (MAGAP), AGROCALIDAD, y ASPE, 2010). En general, la principal fuente de alimentación de los cerdos es el balanceado con el 73% censado, no obstante; el crecimiento acelerado y la falta de regulaciones es el motivo por el cual no se realiza un manejo adecuado de los residuos agrícolas (Christenson y Sims, 2011; ENEEK, 2013; García, Bigeriego, Canales, y Colmenares, 2010, p. 13).

La gestión de los residuos también se ve limitada el tipo de granja y la falta de recursos para tecnificación, según el último censo del MAGAP realizada en 2010 a nivel nacional, solo 1.120 granjas cuentan con asesoramiento técnico en aspectos ambientales y el 44% de los residuos porcinos reciben un tratamiento adecuado, el resto es desechado al alcantarillado público o a ríos y quebradas, contaminando tanto agua como suelo (INEC, 2011). Por otro lado, el tratamiento más utilizado son las lagunas de oxidación, siendo ineficientes puesto que requieren amplios espacios para su ejecución, alta inversión y no se obtienen subproductos aprovechables (ENEK, 2013). Pese a, aún existen granjas esencialmente familiares, que disponen directamente del estiércol en el suelo como abono orgánico, elevando la cantidad de amonio en el mismo y afectando la fertilidad (AGROCALIDAD y ASPE, 2012).

2.1.2. Usos del estiércol porcino

El estiércol tiene diferentes usos de acuerdo al tratamiento suministrado, el estado en el que se recolecta la muestra, pudiendo ser líquido o sólido y los subproductos que se deseen obtener (Solovchenko et al., 2013; Tapia y Fries,

2007, p. 120; Wildner y Veiga, 1992). Entre los principales productos que se pueden obtener se encuentran los abonos orgánicos, donde mediante degradación se disminuye la carga de nutrientes del estiércol dejando disponible el nitrógeno para el suelo (Pinos et al., 2012, pp. 359-370; Porta et al., 2011, p. 67). Las desventajas de este tratamiento son la transferencia de contaminación a otras matrices ambientales como; las emisiones de amonio a la atmosfera y la lixiviación del mismo a fuentes de agua dulce o redes de agua subterránea (Róman et al., 2013; Salazar, 2014, p. 210).

El compostaje obtiene abono orgánico siendo un método de bajo costo, amplio tiempo de retención de cuatro a seis meses y alto grado de mantenimiento (AGROCALIDAD y ASPE, 2012; Benzing, 2001, p. 310; García et al., 2006, p. 13). La dificultad del tratamiento radica en el manejo de la relación C/N inicial de 16:1 del estiércol porcino, que provoca que el proceso sea escaso en carbono disponible para los microorganismos degradadores y conlleve alto riesgo de compactación en su uso en el suelo (Castrillón et al., 2004, p. 90). Sin embargo; existen elementos que mejoran el proceso y acortan el tiempo de compostaje, como la adición de organismos o microorganismos, un ejemplo es la vermicultura (ASPE, 2012; Benzing, 2001, p. 310). La digestión anaerobia por otro lado, busca degradar la materia orgánica mientras se generan gases como el metano y dióxido de carbono, los cuales pueden ser transformados en energía a través de biocombustibles, biogás o incluso bioles (Porta et al., 2011, pp. 67-75). Sin embargo; requiere de alto control y espacio para el biodigestor, con altos niveles de inversión (ENEK, 2013; Kiersch, 2015).

2.2. Abonos orgánicos

Abono orgánico es toda materia orgánica como estiércol, desechos domésticos y vegetales, sometidos a degradación y mineralización con el propósito de reciclar los nutrientes dentro del sistema del suelo (Benzing, 2001, p. 310; Boursier et al., 2005; Cañizares et al., 1994). Estos abonos evitan pérdida e

importación de nutrientes, mejorando así la actividad biológica, contenido de materia orgánica y estructura del suelo, reduciendo a la vez el riesgo de erosión a un bajo costo (Martínez y Olalde, 2008).

Entre las ventajas de los abonos orgánicos frente a los de tipo químico se puede destacar; la estabilidad de nutrientes disponibles para las plantas a mediano o largo plazo, puesto que los abonos mineralizados tienen un tiempo limitado para su uso, antes de volatilizarse o infiltrarse en el suelo (Róman et al., 2013). Otro beneficio, es el bajo riesgo de contaminación a otras matrices ambientales y el bajo impacto en el ecosistema natural, al contrario de los químicos que implican toxicidad con pérdida de calidad en el suelo (Castrillón et al., 2004, p. 90; ENEEK, 2013; García et al., 2010, p. 13).

2.2.1. Abono quelatado orgánico

El uso de abono orgánico quelatado proveniente de estiércol, como el porcino, tiene como ventaja que permite la formación de sustancias húmicas en el fertilizante (Róman et al., 2013; Tapia y Fries, 2007, p. 120; Wildner y Veiga, 1992). Las sustancias húmicas pertenecen al humus y contienen a los ácidos húmicos, fulvicos y huminas, que contribuyen a mejorar; la estructura, permeabilidad, retención de humedad y la fertilidad en el suelo, favoreciendo también al crecimiento de diversas plantas (Benzing, 2001, p. 310). Estos abonos previenen también la erosión natural, sobre todo por escurrimiento, al mejorar la capacidad tampón del suelo y mejorar la biodisponibilidad de micronutrientes como el zinc, sin salificar o acidificar el suelo (ENEK, 2013; Martínez y Olalde, 2008).

La biodisponibilidad de nutrientes depende de la formación de complejos en estos abonos con agentes quelantes como: exudados radiculares, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, zeolita y entre otros (Salazar, 2014, p. 210; Sandefur et al., 2016; Solovchenko et al., 2013). Esta

característica, evita la intercepción innecesaria de los nutrientes por parte de las plantas o su pérdida por lixiviación hacia fuentes de agua, aumentando la capacidad de intercambio catiónico del suelo (García et al., 2006, p. 13). Adicionalmente, los agentes quelantes tienen como beneficio que los micronutrientes como el hierro, cobre, boro y zinc se solubilizan, mientras que los metales pesados tóxicos como el cadmio, plomo incluso pesticidas son inmovilizados impidiendo la salida de los mismos a el ecosistema (Pinos et al., 2012, pp. 359-370; Porta et al., 2011, pp. 67-75; Róman et al., 2013). No obstante, deben tomarse en cuenta factores como presencia de arsénico y patógenos en porcinos sin control veterinario (Salazar, 2014, p. 210; Sandefur et al., 2016).

Finalmente, este tipo de fertilizantes forma grupos funcionales más estables, en mayor cantidad y con mayor peso molecular, gracias a la composición bioquímica del estiércol, que resultan en una degradación más lenta una vez incorporado en el suelo (AGROCALIDAD y ASPE, 2012; Diéz, 1999; Wildner y Veiga, 1992).

2.3. Fitorremediación

Fitorremediación es el conjunto de tecnologías, métodos o técnicas que buscan usar elementos naturales para disminuir, degradar, metabolizar, estabilizar contaminantes, sean orgánicos o metales pesados del ambiente (Franchino et al., 2016). El término proviene del latín *fito* que significa planta o vegetal y *remediare* que significa remediar, los elementos usados pueden ser también microorganismos, como los de la rizosfera de las plantas, microalgas, bacterias y hongos (Núñez et al., 2004; Yen et al., 2008).

Las microalgas y cianobacterias actúan removiendo nutrientes de sustratos orgánicos y metales pesados tanto de agua como sedimentos, incorporando los contaminantes dentro de su metabolismo para la producción de biomasa

(Soha, 2012; Ycaza, 2016). Se caracterizan por tener rápida adaptación a condiciones adversas y se consideran un tratamiento con complejidad media, con ventajas como potencial para obtener subproductos de diverso uso como: biodiesel, cosméticos y fertilizantes (Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Yen et al., 2008). Se pueden encontrar dos tipos de sistemas de tratamiento, cerrados o abiertos, los primeros se utilizan para obtener cultivos axénicos con condiciones ambientales controladas, mientras que los abiertos se utilizan para producción masiva de biomasa o tratamiento de aguas residuales (Franchino et al., 2016).

Las microalgas y cianobacterias utilizadas en estos tratamientos, para lograr mejores resultados deben tener características como; altas tasas de crecimiento, tolerancia a altas variaciones de temperatura y facilidad para su cosecha, los géneros más utilizados para remediación son; *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Botryococcus* sp. y *Spirulina* sp., entre las más relevantes (Hernández y Labbe, 2014, p. 255; Soha, 2012). Los cultivos pueden encontrarse en forma suspendida o inmovilizada, las primeras permiten mayor control de la densidad celular presente, tienen menor capacidad de intercambio de gases produciendo alrededor de 1,5 a 1,7 g/L de biomasa (Bermero y Vargas, 2011, p. 54). Las inmovilizadas tienen menor control sobre la reproducción de las misma, con alto nivel de intercambio de gases con presencia de 70 g/L de biomasa (Franchino et al., 2016; Graham, et al., 2009).

2.3.1. Microalgas

Las microalgas son consideradas organismos unicelulares que forman cadenas o colonias, pudiendo ser eucariotas o procariotas, no obstante, su estructura está compuesta por pigmentos y clorofila que permiten realizar fotosíntesis oxigénica (Gavilanez et al., 2013, p. 455; Graham et al., 2009, p. 25). Para la reproducción celular utilizan como sustratos inorgánicos al dióxido de carbono y agua, cuya función es aportar electrones para sintetizar la materia orgánica,

liberando a su vez oxígeno; resultado de la fotosíntesis estas especies producen carbohidratos, proteínas en 40 a 50% y lípidos de 20 a 30% (Hernández y Labbe, 2014, p. 255; Soha, 2012).

Actualmente se conocen alrededor de 100.000 especies, las cuales se clasifican en; cianofíceas, clorofíceas y diatomeas, entre las más destacadas (Smith, 1950, p. 10; Song, 2013; Spaulding et al., 2010, p. 50; Wehr y Sheath, 2003, p. 120). La microalgas cuentan con orgánulos característicos de las células eucariotas y específicos como; la mancha ocular, que actúa como fotoreceptor primitivo y el perinoide, que cumple con la función de concentrar las enzimas y sustratos, este orgánulo convierte y trasloca los grupos fotosintéticos (Andersen, 2005, p. 320; Sant, 2012, pp. 510-530).

Entre las características de estas especies se puede destacar que consumen 183 toneladas de dióxido de carbono y representan el 40% del oxígeno del planeta (Prescott, 1962, pp. 410-420; Prescott et al., 1999, p. 355; Serediak y Huynh, 2011, pp. 510-530). Se las puede encontrar en agua dulce como salada y se desarrollan en efluentes como en medios inorgánicos, siempre que tengan controladas las condiciones de; luz, pH, temperatura y fuente de nutrientes (Patrick y Reimer, 1975, p. 110; Patterson, 1996. p. 120; Patterson y Hedley., 1992, p. 55). Los nutrientes primarios requeridos para cultivo de microalgas son; nitrógeno, carbono y fósforo, los micronutrientes por otro lado son; el sílice, calcio, magnesio, potasio, hierro, manganeso, azufre, zinc, cobre y cobalto (Martínez, 2014; Núñez et al., 2004; Oyadomari, 2011).

2.3.2. Uso de microalgas en Ecuador

La diversidad y funcionalidad de las microalgas y cianobacterias en el país aún no ha sido estudiada, especialmente en las líneas de investigación de biomedicina, biotecnología y biorremediación (Martínez, 2014; Soria y Barba, 2013, p. 12). No obstante, existen proyectos e investigaciones para el

desarrollo de las mismas en términos de su uso potencial (Agencia Iberoamericana para la Difusión de la Ciencia y la Tecnología, 2016; Morales, Martínez, y Suárez, 2014, p. 16; Ycaza, 2016). La CIE, mediante el BIOTEC, actualmente investiga la biodiversidad de las mismas en lagunas naturales, mediante la elaboración de un catálogo nacional y proyectos para la obtención de productos biotecnológicos como el biodiesel (BIOTEC, 2015, p. 3). Morales y colaboradores (2014, p. 16) también han destacado el potencial de algunas especies nativas como: *Anabaena* sp., *Nostoc* sp. y *Chlamydomonas* sp. como acondicionadoras del suelo, a la vez que desarrollan técnicas de cultivo de microalgas y cianobacterias en el área de agroindustria y ambiente.

2.3.3. Especies de microalgas y cianobacterias

Las microalgas procariontas se componen principalmente por cianobacterias o también llamadas algas verde azuladas, que a nivel celular no tienen los orgánulos separados del citoplasma y cuentan con un diámetro de 0,2 a 2 μm (Graham et al., 2009, p. 25; Guiry y Guiry, 2015; Hernández y Labbe, 2014, p. 255). Son consideradas cepas fotoautótrofas obligadas, con reproducción estrictamente asexual por simple división celular y pared celular resistente debido a la presencia de polisacáridos (Andersen, 2005, p. 310; Baker et al., 2012; Bellinger y Sigee, 2010, p. 3). Se caracterizan por tener alta capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, incluso en condiciones de aerobiosis por la presencia de células heterocistas (Miao et al., 2014; Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Sant, 2012, pp. 510-530).

Por otro lado, las microalgas eucariotas están representadas por clorofitas y diatomeas, las clorofitas son las llamadas algas verdes debido a la presencia de cloroplastos en sus células, están caracterizadas por tener forma esférica o alargada de diámetro de 3 a 30 μm (Wehr y Sheath, 2003, p. 120; Ycaza, 2016; Yen et al., 2008) A nivel celular, la pared está compuesta por celulosa y

comparten características con las plantas vasculares o terrestres como la presencia de clorofila a y b, además de la presencia de almidón en el cloroplasto (Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Sant, 2012, pp. 510-530).

2.3.4. Bioabsorción

La fitorremediación enfocada en la remoción de nitrógeno y fósforo utiliza la necesidad de las microalgas y cianobacterias de estos nutrientes para procesos esenciales en el cultivo como la reproducción celular (Song, 2013; Soria y Barba, 2013, p. 12; Spaulding et al., 2010, p. 50). La efectividad de las mismas en los porcentajes de remoción de nitrógeno se debe a que en los sustratos contaminados, como las aguas porcinas, el nutriente se encuentra en forma de amonio y nitratos (Sandefur et al., 2016; Soha, 2012; Solovchenko et al., 2013).

El amonio y nitrato pueden ser asimilados directamente para la producción de aminoácidos, mientras que absorben fósforo en forma de orto fosfatos (Hernández y Labbe, 2014, p. 255; Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Soha, 2012). Otro factor de relevancia, es la relación simbiótica con las bacterias heterotróficas, puesto que, mientras las microalgas y cianobacterias producen oxígeno resultado de la fotosíntesis, las bacterias lo utilizan para degradar materia orgánica (Róman et al., 2013; Serediak y Huynh, 2011, pp. 510-530; Smith, 1950, p. 10).

Adicionalmente, la ventaja de la utilización de este tratamiento es la reincorporación al ecosistema o el sistema edáfico de los nutrientes, mientras que las bacterias desnitrificadoras u otros procedimientos reducen el nitrógeno a nitrógeno elemental por volatilización (Boursier et al., 2005; Cañizares et al., 1994; Christenson y Sims, 2011).

2.4. Relación carbono: nitrógeno

El parámetro relación C/N es un valor expresado en términos de fracción que se usa como referencia para comparar la cantidad de carbono orgánico frente a la de nitrógeno disponible en el suelo para las plantas, el valor numérico se obtiene a partir de la división de los mismos en términos de porcentaje (Pilar et al., 2013; Porta et al., 2011, pp. 67-75; Salazar, 2014, p. 210). Cabe recalcar que, el nitrógeno en el suelo se concentra en un 80 a 97% en la materia orgánica presente, por tanto para cada tipo de suelo existe una relación C/N específica a tomar en cuenta (Benzing, 2001, p. 310).

En el mismo sentido, para que el nitrógeno pueda ser interceptado por las plantas requiere estar mineralizado en forma de NH_4^+ y NO_3^- , este proceso depende varios factores como; la cantidad de carbono fresco disponible para consumo de los microorganismos que mineralizan los complejos, temperaturas altas, humedad, aireación y pH alcalinos (Benzing, 2001, p. 310; Porta et al., 2011, pp. 67-75; Wildner y Veiga, 1992).

2.4.1 Importancia de Relación C/N en el suelo

La relación C/N tiene su importancia en la disponibilidad de nitrógeno y carbono orgánico hacia las plantas, un desequilibrio o una relación no óptima implica el bloqueo natural del nitrógeno y que dentro de la materia orgánica el carbono lo supere (Porta et al., 2011, pp. 67-75). Una deficiencia de nitrógeno conlleva también un retraso en el crecimiento de cultivos y el deterioro en la calidad foliar, por otro lado un exceso del mismo provoca predisposición a la aparición de plagas y enfermedades en los cultivos, además de toxicidad por nitratos y nitritos (Diéz, 1999, p. 110).

Adicionalmente este parámetro es esencial como indicador de calidad de materia orgánica total y del suelo de medios aerobios, una relación C/N mayor

a 25-30 (alta) indica baja capacidad de descomposición, por tanto para mejorar la fertilidad de los suelos se requiere un rango de 10 a 14 de relación C/N para estabilización de la materia orgánica (Benzing, 2001, p. 310; Porta et al., 2011, pp. 67-75; Tapia y Fries, 2007, p. 120). En el caso de tratamientos u obtención de abonos orgánicos este parámetro se puede utilizar para valorar la calidad de un compost especialmente en términos de normativas, para aquellos provenientes de material vegetal, origen animal, estiércol y vegetal, debe situarse en un rango de relación C/N de 10-12 para ser utilizando como abono orgánico (ENEK, 2013; Pilar et al., 2013; Wildner y Veiga, 1992).

Las técnicas para lograr el equilibrio de relación C/N en fertilizantes o en el suelo son; compostaje y degradación aerobia de materia orgánica, aplicando catalizadores del proceso como microorganismos e incluso materia vegetal (Benzing, 2001, p. 310; Castrillón et al., 2004, p. 90). Otros procedimientos son los que utilizan reactores para la remoción de carbono y nitrógeno con denitrificación y nitrificación (ENEK, 2013; García et al., 2010, p. 13; García et al., 2006).

3. METODOLOGÍA

3.1. Recolección de estiércol de cerdo

Se recolectó el estiércol de una granja ubicada en Llano Grande, perteneciente al Distrito Metropolitano de Quito, dentro de ella los animales se encontraron en un corral construido de cemento, con presencia de residuos de aserrín en el piso. El peso de la muestra fue de 4 kg de estiércol porcino seco, proveniente de cuatro adultos y 21 lechones en lactancia, donde los adultos fueron tres hembras y dos machos. La información acerca de la dieta y crianza de los cerdos la cual se encuentra detallada a continuación en la tabla 1:

Tabla 1.

Información de los porcinos muestreados

Dieta diaria adultos	Balanceado y vegetales como lechuga, zapallo.
Dieta diaria lechones	Lactancia y balanceado, inyecciones de hierro
Peso aproximado de los porcinos machos	300 kg
Peso aproximado de los porcinos hembra	270 kg
Uso antibióticos	No

Tomado de (Ortiz, 2016).

La muestra de estiércol una vez recolectada del corral fue depositada en un envase plástico oscuro, hermético y térmico siguiendo la cadena de frío (4 °C) para su transporte (Godos et al., 2010). Éste procedimiento se siguió con el objetivo de conservar la materia fresca y pura hasta la experimentación dentro de dos días (Miao et al., 2014; Solovchenko et al., 2013). En la Figura 1, se puede observar el registro fotográfico de la recolecta y transporte de la muestra.

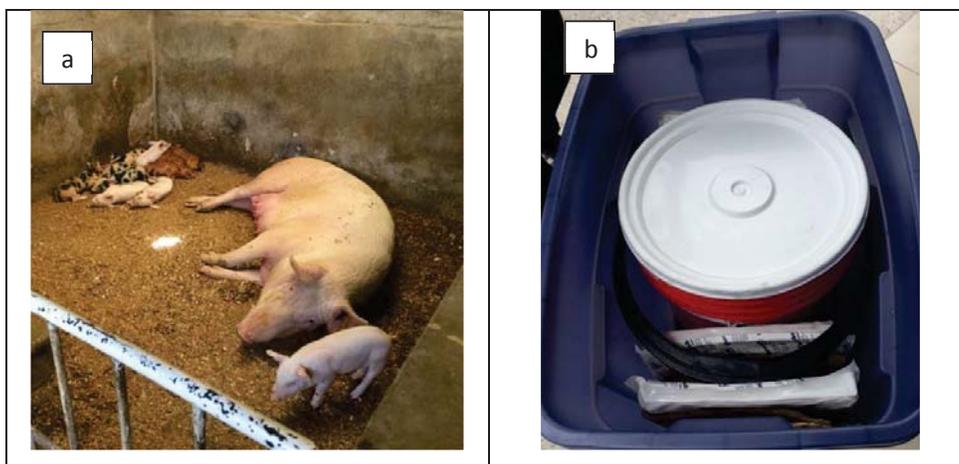


Figura 1. Proceso de recolección y transporte de muestra

(a) granja porcina

(b) envase de transporte de las muestras.

3.2. Sitio de experimentación

Se experimentó en dos días a partir del muestreo dentro de las instalaciones del BIOTEC, ubicado dentro del Centro de Capacitación de la Empresa Eléctrica Quito, en la parroquia de Cumbayá. La presente investigación se la realizó bajo la tutoría científica de las MSc. Cristina Guamán y Nory González, Directora e Investigadora principal de este Laboratorio. El clima en las instalaciones, se caracteriza por ser subtropical, con temperatura mínima registrada de 6 °C durante la noche y máxima de 32 °C durante el día (BIOTEC, 2015, p. 3). Cuenta con una altitud de 2.200 msnm, acompañados de precipitaciones de 71,7 mm anuales, cuyos meses lluviosos son marzo, abril, octubre y finalmente noviembre (GAD Cumbayá, 2012).

Se construyó un invernadero (Figura 2) en el patio exterior del BIOTEC con plástico de invernadero, con el objetivo de conservar la temperatura de los reactores con mínimo de 15 °C durante la noche, evitando shock térmico y permitiendo el paso de luz durante el día, alcanzando la temperatura máxima de 30 °C (Gavilánez et al., 2013; González et al., 2011; Matamoros et al., 2015).

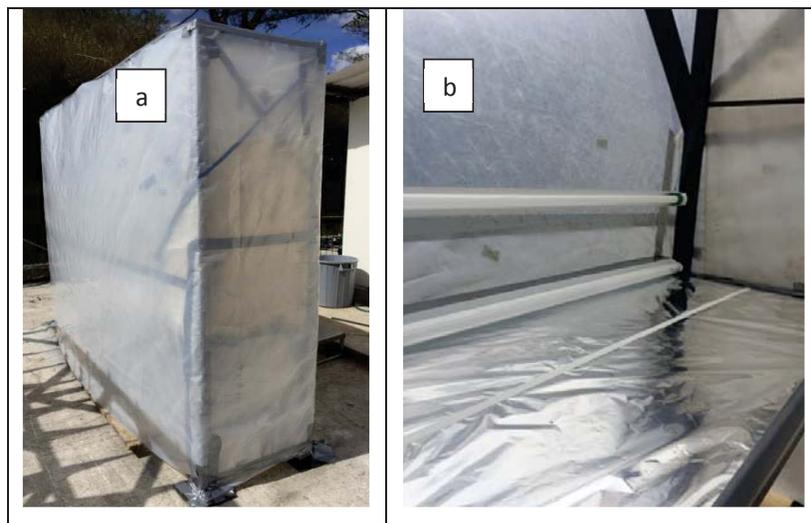


Figura 2. Invernadero

(a) infraestructura

(b) parte interior

3.3. Implementación del sistema de tratamiento

3.3.1. Selección de cepas de microalgas

La investigación inició con una cepa de microalgas aisladas previamente por Guamán y González (BIOTEC) pertenecientes a la CMIE, compuesta por 11 géneros diferentes de distintas Áreas Protegidas del Ecuador; con Permiso de Acceso de Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015.0012 y Permiso de Investigación No. 002-14-IC-MC-DNB/M otorgado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador (BIOTEC, 2015, p.4).

Posteriormente, se seleccionaron dos cepas correspondientes a microalgas y cianobacterias, para identificarlas mediante comparación de caracteres morfológicos en base a bibliografía y claves taxonómicas (Baker et al., 2012; Bellinger y Sigee, 2010, p. 3; Guamán y González, 2016, p. 24; Guiry y Guiry, 2015; Jason, 2011; Patrick y Reimer, 1975, p. 110; Patterson, 1996, p. 55; Patterson y Hedley., 1992, p.110; Prescott, 1962, p. 420; Serediak y Huynh, 2011, pp. 510-530; Smith, 1950, p. 10; Song, 2013; Spaulding et al., 2010, p. 50; Wehr y Sheath, 2003, p. 120). La tabla 2 describe el lugar de donde fueron obtenidas las cepas de microalgas.

Tabla 2

Descripción de las cepas seleccionadas

Género	Lugar de Colecta	Codificación
<i>Rhabdoderma</i> sp.	Francisco de Orellana	CMIE-J1-003
<i>Pleurococcus</i> sp.	Parque Nacional Cajas, laguna de Ilincocha	CMIE-K2-003

Adaptada de (Guamán y González, 2016, p.35).

3.3.2. Purificación de cepas seleccionadas

Para la purificación de las cepas seleccionadas *Rhabdoderma* sp., CMIE-J1-003 y *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003, se utilizó el método de aislamiento en agar con estrías discontinuas (BIOTEC, 2013). Este procedimiento se lo realizó hasta obtener colonias aisladas, con espera de 72 horas de crecimiento para posteriormente, observarlas en el microscopio óptico Sogeresa® y verificar si existen colonias axénicas (Andersen, 2005, p. 310; BIOTEC, 2013, p. 4; Sant, 2012, pp. 510-530). Finalmente, se identificó a la cepa CMIE-J1-003 como *Pleurococcus* sp. en medio de cultivo Bold's Basal Medium (Bold 1949, Bischoff y Bold 1963) y la cepa CMIE-K2-003 como *Rhabdoderma* sp. en medio BG-11 (Rippka et al., 1979). La composición de los medios de cultivo, se detallan en el Anexo 1.

3.3.3. Escalamiento de cepas de microalgas y cianobacterias

Las cepas contenidas en 30 mL fueron inoculadas a 200 ml agregando medio de cultivo correspondiente, hasta llegar a 5 litros por envase (Arredondo, 2007, p. 18; BIOTEC, 2013, p. 7; Sant, 2012, pp. 510-530). En la tabla 3, se presentan las condiciones que se mantuvieron para el crecimiento de biomasa durante la etapa de escalamiento, en cada envase se confirmó periódicamente que existan cultivos axénicos. La composición del fertilizante Nitrofoska® se detalla en el Anexo 2.

Tabla 3

Escalamiento de biomasa de microalgas y cianobacterias

Volumen Inicial (mL)	Volumen Final (mL)	Tiempo	Descripción	Parámetros de crecimiento
30	200	1 semana		<ul style="list-style-type: none"> • Luz: 8000-10500 Luxes • Aireación: Sin aireación • Nutrientes: Medio de cultivo • Sin CO₂
200	600	1 semana		<ul style="list-style-type: none"> • Luz: 8000-10500 Luxes • Aireación: 24 horas mediante bomba • Nutrientes: Medio de cultivo • CO₂: 5 minutos, 3 veces por semana a 3 bares de presión
600	5000	2 semana		<ul style="list-style-type: none"> • Luz: 8000-10500 Luxes • Aireación: 24 horas mediante bomba • Nutrientes: Agua potable y Nitrofoska® • CO₂: 5 minutos, 3 veces por semana

Adaptada de (Andersen, 2005, p. 310; BIOTEC, 2013 y Sant, 2012, pp. 510-530).

3.3.4. Elaboración de curva cinética de crecimiento

Para la elaboración de la curva cinética de crecimiento de las cepas seleccionadas se realizaron conteos celulares diarios por 30 días, y durante 15 días en la etapa de tratamiento en estiércol diluido, a través de la cámara de Neubauer de marca Marienfeld® (Bermero et al., 2011, p. 54; BIOTEC, 2013; Gavilanez et al., 2013, p. 455). Se determinó la densidad celular mediante la ecuación 1 como parte del análisis, donde DC representa la densidad celular, FD representa el factor de dilución y $1 \cdot 10^4$ representa el factor de conversión de 0,1 μL a 1 mL (Andersen, 2005, p. 310; CIE y BIOTEC, 2013; Gavilanez et al., 2013, p. 455):

$$\left(\frac{cel}{\text{mL}}\right) = \frac{DC \cdot FD \cdot 10^4}{1000} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

La elaboración de la curva de cinética crecimiento en la experimentación, permitió determinar en el tiempo las fases de latencia, exponencial, estacionaria y posteriormente muerte de las microalgas y cianobacterias por género, además permitió el cálculo de los parámetros de velocidad de crecimiento expresados en divisiones por día y tiempo de duplicación $T(d)$, las ecuaciones utilizadas fueron (Andersen, 2005, p. 310; Arredondo, 2007, p. 18; BIOTEC, 2013; Gavilanez et al., 2013, p. 455):

$$\mu = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{T_2 - T_1} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$T_2 = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{\mu} + T_1 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Donde (μ) es la velocidad de crecimiento, X_2 es el valor obtenido de mayor densidad celular y X_1 es el de menor valor, dentro de la fase exponencial, T_2

representa los días de X_2 y T_1 el tiempo para el valor para X_1 o inicial (Andersen, 2005, p. 310; Gavilanez et al., 2013, p. 455).

3.4. Implementación del sistema para biodegradación de estiércol de cerdo

En esta etapa de la metodología, se colocaron dos litros de estiércol de cerdo fresco diluido en agua potable con sus respectivos niveles en los reactores de 10 litros de capacidad, con forma cilíndrica por medio de un embudo. Se tomó solo la parte soluble o líquida de la dilución y los envases transparentes con sus tapas fueron previamente esterilizados con radiación UV por 20 minutos en la cámara de flujo laminar marca BIOBASE® modelo BYKG-1. Se implementaron 12 reactores en total, con sus respectivos difusores de aire conectados a la bomba JAD Air Jump S-4000B (Godos et al., 2010; González et al., 2011; Miao et al., 2014; Solovchenko et al., 2013).

Tabla 4

Niveles y diluciones de estiércol

Nivel	Dilución
Alto	1:4
Medio	1:6
Bajo	1:8

3.5. Integración de microalgas y cianobacterias en envases para biodegradación

Una vez contruidos los reactores, se agregó la biomasa de las microalgas y cianobacterias con densidad celular conocida de 1×10^6 cel/mL⁻¹, para este proceso se realizó conteo celular mediante el uso de la cámara de Neubauer y aplicación de la siguiente fórmula (Arredondo, 2007, p. 18; BIOTEC, 2013; Salazar, 2014, p. 210).

(Ecuación 4)

Donde V inóculo, es el volumen total requerido, DC es la densidad celular calculada. En la presente investigación, todos los fotobioreactores fueron aforados hasta 6 litros. Además, se formó el consorcio de microalgas para los tres reactores los cuales están compuestos en proporción 3:1 de *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 y *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 respectivamente (Andersen, 2005, p. 310; Morales et al., 2014, p. 16; Ycaza, 2016).

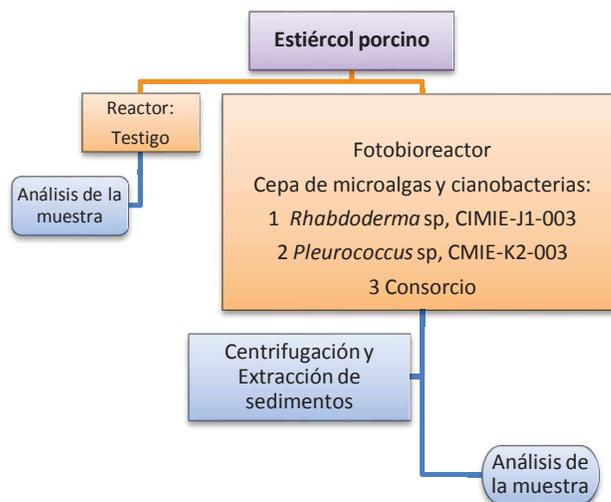


Figura 3. Diagrama de procesos del experimento

3.5.1. Parámetros de funcionamiento de los reactores

a) Temperatura

La temperatura óptima en un reactor de cualquier tipo para lograr cultivar microalgas y cianobacterias es de 15 a 30 °C (Kebede et al., 2006; Sandefur et al., 2016; Soha, 2012). Por tal motivo, se monitoreo este parámetro a diario durante la mañana con un termómetro digital ambiental marca Traceable®

modelo 4371 dentro del invernadero, con el objetivo de mantenerla en el rango deseado (BIOTEC, 2015, p. 13; Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Sant, 2012, pp. 510-530).

b) Luz

La luz es un factor determinante para el desarrollo de microalgas y cianobacterias sobre todo por los procesos de fotosíntesis y absorción de nutrientes (Boursier et al., 2005; Cañizares et al., 1994; Christenson y Sims, 2011). En la presente investigación, el estiércol de cerdo por su color café oscuro dificultó la penetración de la energía lumínica hacia los reactores. Por lo que, para contrarrestar este fenómeno se aplicaron 41500 luxes por medio de 3 lámparas fluorescentes de 40w de potencia blancas durante la noche y se dejó luz natural de día, los luxes se midieron mediante un luxómetro marca SPER SCIENTIFIC® 850007 (Sandefur et al., 2016; Sant, 2012, pp. 510-530).

a) Dióxido de carbono

La cantidad de dióxido de carbono que se requieren para las microalgas y cianobacterias, sobre todo para la producción de biomasa y división celular, fue proporcionado por el estiércol, asimismo los reactores al producir constantemente gases requirieron cobertura con ventilación (BIOTEC, 2015, p. 5; Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Sandefur et al., 2016).

b) Potencial Hidrógeno

El pH es un parámetro que fue monitoreado diariamente mediante tiras reactivas de MACHEREY-NAGEL las cuales funcionan por el método colorimetría, este parámetro se debía controlar para que se mantuviera en un rango de 7 a 8,5 (Andersen, 2005, p. 310; Arredondo, 2007, p. 18; Bermero et al., 2011, p. 54).

c) Nutrientes

La fuente de nutrientes para la reproducción celular de las microalgas y cianobacterias fueron los contenidos en el estiércol porcino (Godos et al., 2010; González et al., 2011; Hidalgo y Marroquín, 2015).

d) Tiempo de retención

El tiempo de retención para la experimentación de los cultivos con el estiércol en el reactor fue de 25 días de medición, con el propósito de experimentar conforme la curva de crecimiento de las microalgas y cianobacterias (Andersen, 2005, p. 310; Cañizares et al., 1994; Godos et al., 2010).

e) Aireación

Las microalgas y cianobacterias en función de oxidar sustancias presentes en el estiércol diluido y como requisito para sus procesos como fotosíntesis requirieron de aireación constante, la cual también brinda agitación o burbujeo, la bomba utilizada fue JAD Air Jump S-4000B y se suministró durante 24 horas diarias con el objetivo de mantener homogénea la mezcla y se distribuya mejor la luz en los reactores (Godos et al., 2010; González et al., 2011; Solovchenko et al., 2013).

3.6. Medición del parámetro relación C/N

3.6.1. Preparación de la muestra

Una vez cumplidos los 25 días de experimentación, se procedió a centrifugar cada uno de los reactores en el equipo Boeco® C-28^a; separando por densidad

las partículas sedimentables, como las microalgas y cianobacterias aún presentes, del sobrenadante o dilución de estiércol biodegradado (Andersen, 2005, p. 310; Bermero et al., 2011, p. 54; Graham et al., 2009, p. 25). Para extraer 500 mL de muestra, se utilizaron tubos de ensayo Falcon® de 50 mL a 3000 rpm durante 10 minutos, adicionalmente, se separó la materia orgánica sobrante del líquido, una vez obtenidos 500 gr de sedimentos se los enviaron al laboratorio certificado para su análisis (Franchino et al., 2016; Godos et al., 2010; González et al., 2011). En el Anexo 7, se evidencia el registro fotográfico del procedimiento, además del equipo utilizado.

3.6.2. Análisis de la muestra

Siguiendo una cadena de frío se enviaron las muestras al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP. En el laboratorio, se utilizaron métodos estándar para su obtención, Nitrógeno Kjeldahl se obtuvo mediante la digestión de la muestra donde se llevó al nitrógeno a una forma mineral para posteriormente, hacer una destilación donde se formó amoníaco y agua para finalmente la valoración. Al final del proceso, se determinó la cantidad de nitrógeno total por medio de la titulación de amoníaco que reacciona con el ácido, para obtener el porcentaje de nitrógeno se aplicó la fórmula de (García, 2004, p. 13; Instituto Nacional de Investigaciones agropecuarias (INIAP), 2015):

(Ecuación 5)

Donde T corresponde a los mililitros de ácido sulfúrico usados en la muestra, B corresponde a los mililitros de ácido sulfúrico usados en el blanco, N es la normalidad exacta del ácido sulfúrico y finalmente S es el peso de la muestra usada, estiércol porcino biodegradado (García, 2004, p. 13). Por otro lado, para la cuantificación del carbono orgánico total, el laboratorio INIAP usó dos métodos; Walkley para la muestra inicial, el cual consistió en oxidar la muestra

para cuantificar el contenido de carbono orgánico oxidable, y Calcinación para muestras finales, en el cual se cuantificó el contenido de materia orgánica directamente, después de someterla a altas temperaturas, 430 °C, por diferencia en el peso, para luego aplicar el factor de Van Bemmelen y determinar el porcentaje de carbono total presente (Eyherabide et al., 2014; INIAP, 2015).

3.7. Diseño experimental

Se elaboró un diseño experimental completamente aleatorio (DCA), para comparar los 12 tratamientos empleados en función de su respectiva variable que es: relación C/N (Gutiérrez y De la Vara, 2008, p. 35). En la tabla 5, las réplicas corresponden a: R1 como nivel bajo, R2 nivel medio y R3 nivel alto.

Tabla 5

Matriz de diseño experimental.

				Factor
Tiempo de retención (días)	Réplica	Tratamiento (Estadística descriptiva)	Tratamiento (Análisis de Muestras)	Género
25	R1	1	1	CMIE- K2-003 <i>Pleurococcus</i> sp.
25	R2	2	1	CMIE- K2-003 <i>Pleurococcus</i> sp.
25	R3	3	1	CMIE- K2-003 <i>Pleurococcus</i> sp.
25	R1	4	2	CMIE- J1-003 <i>Rhabdoderma</i> sp.
25	R2	5	2	CMIE- J1-003 <i>Rhabdoderma</i> sp.
25	R3	6	2	CMIE- J1-003 <i>Rhabdoderma</i> sp.
25	R1	7	3	Consortio
25	R2	8	3	Consortio
25	R3	9	3	Consortio
25	R1	10	4	Testigo
25	R2	11	4	Testigo
25	R3	12	4	Testigo

3.7.1. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizaron los programas Excel e IBM SPSS Statistics Base 23 con los siguientes tipos de análisis:

a) Prueba T para muestras emparejadas

Se empleó una prueba paramétrica de análisis de comparación de medias, tomando en consideración que cada género de microalgas y cianobacterias experimentada, con sus diferentes niveles, fue un tratamiento; la prueba T para muestras emparejadas fue aplicada puesto que los datos pertenecen a los mismos reactores antes y después de una experimentación (Clifford y Taylor, 2008, p. 110). La comparación permitió determinar si la hipótesis nula era aceptada o rechazada, por medio de la comparación del valor p obtenido de cada par con el intervalo de confianza determinado de 95% (Gutiérrez y De la Vara, 2008, p. 35).

Tabla 6

Valores para interpretación de resultados

Valor	Significancia
Si p es $\leq 0,05$	Se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa
Si p es $> 0,05$	Se acepta la hipótesis nula y se rechaza la alternativa
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Tomada de (Clifford y Taylor, 2008, p. 110.)

b) Comparaciones múltiples (Diferencia Mínima Significativa)

Una vez rechazada la hipótesis nula y aceptada la alternativa se procedió a definir la misma al realizar el test de DMS, este análisis permitió conocer que par de medias analizadas causaron una pequeña diferencia significativa (Clifford y Taylor, 2008, p. 110).

d) Análisis estadístico descriptivo

Se aplicó estadística descriptiva a los resultados de los 12 experimentos, con el fin de determinar posibles errores o valores perdidos, además de organizar la información para su comprensión (Ferré, 2004; Matamoros et al., 2015; Solovchenko et al., 2013). Como parte de la descripción, se realizaron diagramas de caja basado en cuartiles para visualizar los valores máximos, mínimos, atípicos y simetría de los resultados de los tratamientos (Clifford y Taylor, 2008, p. 110).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de muestra inicial de estiércol

Se realizó el análisis inicial del estiércol seco fresco obtenido de la granja porcina, y los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7

Análisis inicial estiércol seco 4kg

R C/N	C %	N %	MO %
16,5	1,65	0,10	2,85

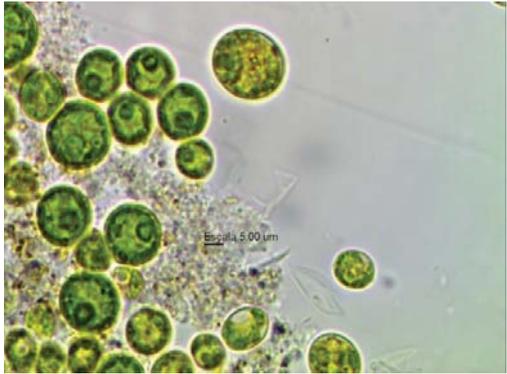
Para la experimentación la relación C/N inicial fue de 16,5, valor que se encuentra dentro del rango esperado de 10 a 20, puesto que un rango inferior hubiese implicado altas emisiones de dióxido de carbono y por tanto pérdidas del mismo, lo que implica reducción de este nutriente para el crecimiento de microalgas y cianobacterias. Por el contrario, un valor superior a 20 hubiese implicado pérdidas de nitrógeno en forma de amoníaco, por tanto falta de nutrientes disponibles para el metabolismo de los microorganismos (ENEK, 2013; Salazar, 2014, p. 210). En el Anexo 3, se encuentra adjunto el documento original enviado por el laboratorio INIAP, con los resultados expuestos.

4.2 Especies seleccionadas de microalgas y cianobacterias

Las cepas seleccionadas y escaladas para la experimentación fueron las mostradas en la tabla 8.

Tabla 8

Resultados obtenidos de densidad celular

Cepa de Microalgas	Densidad celular final (cel/mL ⁻¹)	Medio de Cultivo	Gráfica en lente 100X
CMIE-J1-003 (<i>Rhabdoderma</i> sp.)	3,68E+08	BG-11	
CMIE-K2-003 (<i>Pleurococcus</i> sp.)	3,37E+07	Bold's Basal	

4.3. Curvas de cinéticas de crecimiento y parámetros de las cepas

Etapa de cultivo

Una vez concluidos los 30 días de conteo celular durante la etapa de crecimiento en medio de cultivo, se procedió a analizar los resultados obtenidos:

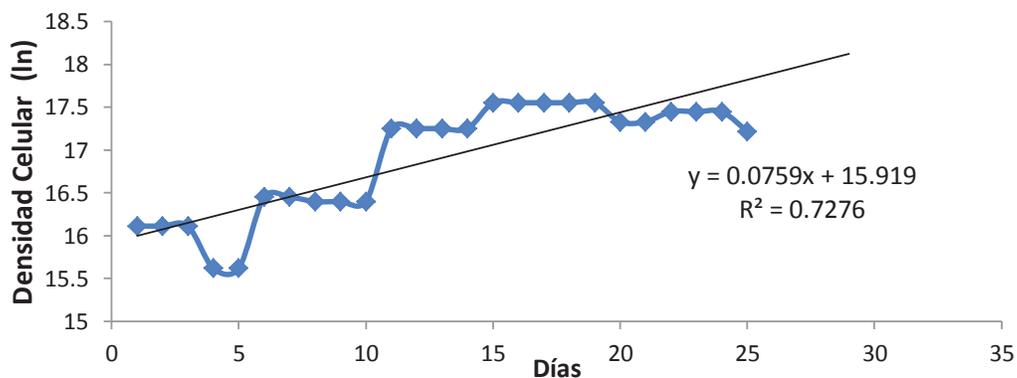


Figura 4. Curva cinética de crecimiento cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003

Como se puede observar en la Figura 4, los picos más altos de crecimiento de la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 se encuentran a partir del día 15, la fase de latencia corresponde desde el día 1 al 5, la fase exponencial se encuentra del día 6 al 15 y la fase estacionaria del 15 al 25. Posteriormente, el modelo de variación de la variable indica un ajuste del 73% a los datos proporcionados lo cual muestra validez de los mismos (Andersen, 2005, p. 310; Arredondo, 2007, p. 18; Gavilanez et al., 2013, p. 455).

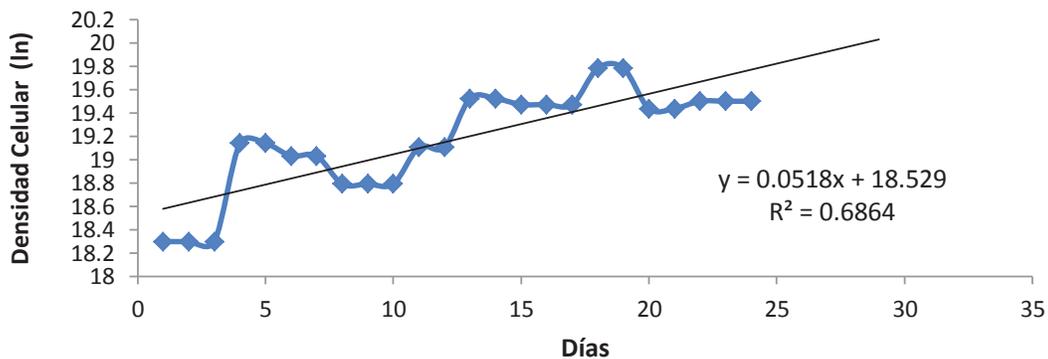


Figura 5. Curva cinética de crecimiento cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003

Como se puede observar en la Figura 5, los picos de crecimiento más altos se encuentran a partir del día 18. La fase de latencia corresponde desde el día 1 al 4, la fase exponencial se encuentra del día 5 al 15 y la fase estacionaria del 15 al 20. Posteriormente, el modelo de variación de la variable indica un ajuste del 68% a los datos proporcionados lo cual demuestra la validez de los mismos (Andersen, 2005, p. 310; Arredondo, 2007, p. 18; Gavilanez et al., 2013).

Etapa de tratamiento

Se realizó la curva de crecimiento a partir del día 15 de experimentación, con el objetivo de confirmar la presencia de microalgas y cianobacterias en los reactores con estiércol obteniendo los siguientes resultados. El registro fotográfico de los mismos se encuentra en el Anexo 5.

En la Figura 6, los resultados obtenidos de densidad celular para el consorcio con dilución al 11,11 % mostraron que la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 obtuvo un valor máximo de densidad celular de $1,52E+07$ cel/mL⁻¹ en el día 20 y $1,11E+07$ cel/mL⁻¹ como valor final. Sin embargo; la cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 se mantuvo presente, aunque no mantuvo su tamaño inicial, por

tanto, se puede concluir que en consorcio con nivel bajo las microalgas dominantes fueron las cepas de *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003.

Con respecto a la curva de crecimiento obtenida, en ambos casos la fase de latencia se presentó hasta el día 18, la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 tuvo una fase exponencial hasta el día 22 para finalmente comenzar el proceso de lisis celular; en el caso de la cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 no se presentó fase estacionaria y pasó directo a la fase de lisis o muerte celular, repitiendo el comportamiento de la misma en medio de cultivo (Soha, 2012; Wehr y Sheath, 2003, p. 120; Yen et al., 2008).

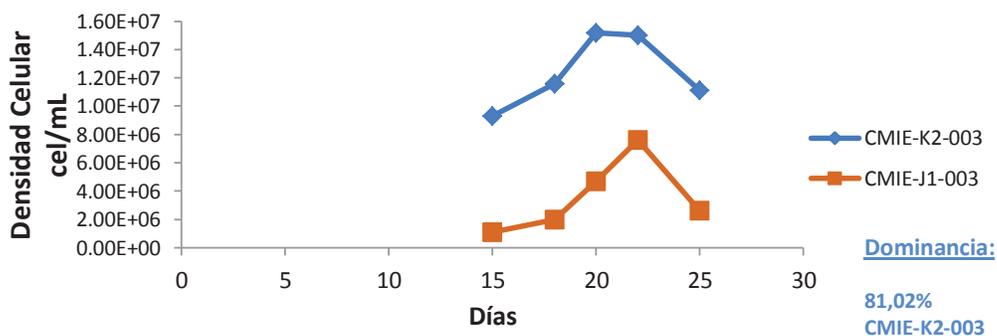


Figura 6. Curva cinética de crecimiento consorcio dilución 1:8

Posteriormente, en este reactor en el día 17 se presenció contaminación con la aparición de una colonia de *Scenedesmus* sp. la cual desapareció en el día 23, esto se debe según Mulbry y colaboradores (2005) a que en fotobioreactores con microalgas en suspensión en conjunto con agua contaminada es difícil de mantener con monocultivos específicos íntegros o sin contaminación por otras cepas puesto que se desarrollan y mezclan colonias naturalmente.

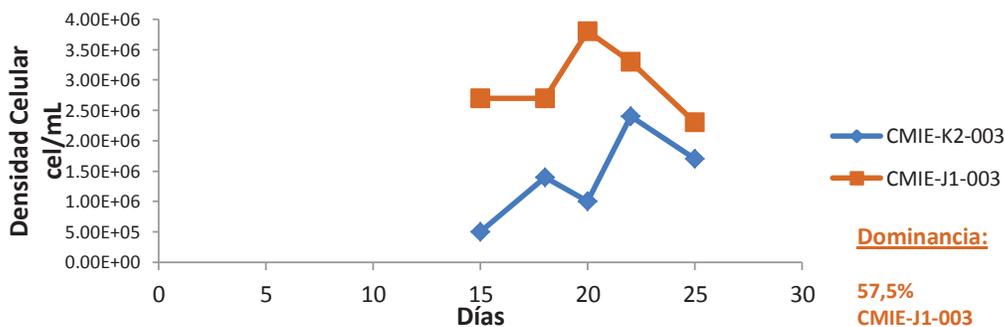


Figura 7. Curva cinética de crecimiento consorcio dilución 1:6

En la Figura 7, los resultados obtenidos de densidad celular para el consorcio con nivel medio mostraron que las cepas cumplieron con la curva cinética de crecimiento hasta la fase de muerte celular. Sin embargo; el crecimiento de la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 se vio inhibida por la concentración de estiércol. La especie predominante fue la *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003; sin embargo, la cantidad de células no fue representativa y en comparación con la curva de crecimiento en medio de cultivo comercial se puede deducir que en estas condiciones no pudo lograr una fase estacionaria (Serediak y Huynh, 2011, pp. 510-530; Smith, 1950, p. 10; Song, 2013).

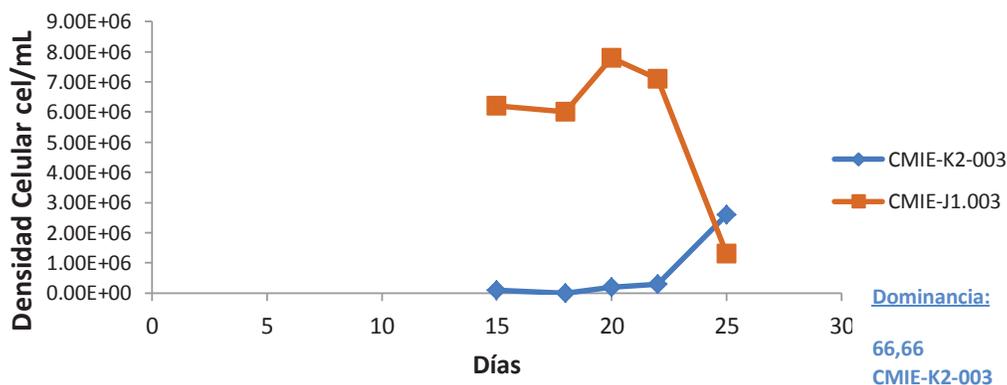


Figura 8. Curva cinética de crecimiento consorcio dilución 1:4

En la Figura 8, los resultados obtenidos de densidad celular para el consorcio con nivel alto mostraron que la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 se vio afectada por la concentración de estiércol en el medio puesto que a pesar de que mantuvo células presentes no cumplió con la curva cinética de crecimiento esperada. La especie *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 no llegó al tamaño ideal pero pudo crecer en concentración 1:4 cumpliendo con la curva cinética de crecimiento como en los demás reactores (Prescott, 1962, pp. 410-420; Prescott et al., 1999, p. 220; Sant, 2012, pp. 510-530).

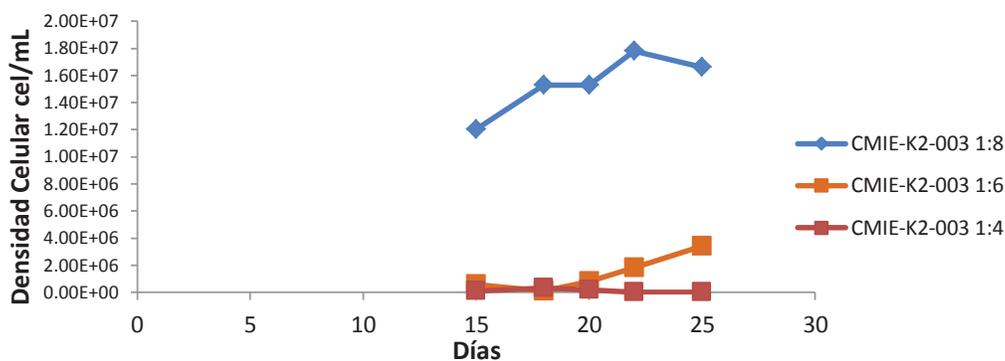


Figura 9. Curva cinética de crecimiento *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003

En la Figura 9, los resultados obtenidos de densidad celular para el tratamiento con cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 confirman la sensibilidad de la especie a altas concentraciones de amonio provenientes del estiércol, el cual inhibe la fotosíntesis en el proceso de transporte de electrones (Graham et al., 2009, p. 25; Guiry y Guiry, 2015; Kebede et al., 2006).

El único tratamiento de los probados que cumple con la curva cinética de crecimiento y se asemeja a la obtenida en medio de cultivo es la de dilución 1:8 con densidad celular de $1,66E+07 \text{ cel/mL}^{-1}$.

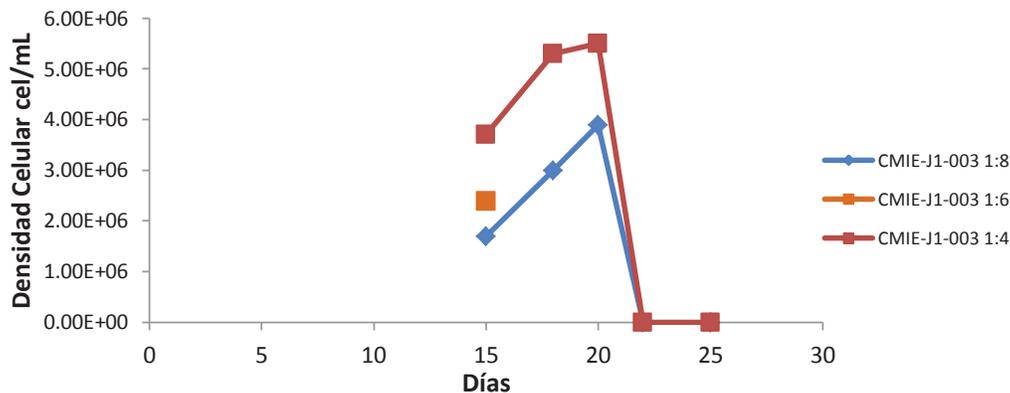


Figura 10. Curva cinética de crecimiento de *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003

En la Figura 10, los resultados obtenidos de densidad celular para el tratamiento con cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 muestran que el crecimiento de la especie en relación a la concentración de estiércol no se ve inhibido, puesto que todas las curvas cinéticas de crecimiento muestran el mismo patrón, es decir, a mayor concentración, mayor densidad celular. Sin embargo, el tamaño de la células no fue óptimo por lo que al final del proceso todas murieron; con respecto a la curva de crecimiento en medio de cultivo ninguna de las experimentadas usando como sustrato estiércol se asemejan la misma (Hernández y Labbe, 2014, p. 255; Martínez, 2014, p. 59; Morales et al., 2014, p. 16).

A continuación, se detalla en la tabla 9 los resultados obtenidos de parámetros de crecimiento cinéticos:

Tabla 9.

Parámetros de crecimiento de consorcio de microalgas en estiércol

	1:08		1:06		1:04		Medio de cultivo	
	(μ) div/día	(td) día						
<i>Pleurococcus</i> sp. CMIE-K2-003 (consorcio)	0,10	7,05	0,34	2,02	0,14	5	0,103	6,73
<i>Rhabdoderma</i> sp. CMIE-J1-003 (consorcio)	0,29	2,38	0,07	10,14	0,08	7,92	0,102	6,79
<i>Pleurococcus</i> sp. CMIE-K2003	0,06	12,31	0,50	1,38	0,37	1,89	0,103	6,73
<i>Rhabdoderma</i> sp. CMIE-J1-003	0,17	4,17	-0,11	-6,29	0,08	8,74	0,102	6,79

Los resultados analizados muestran que las mayores tasas de velocidad menor tiempo de duplicación celular, corresponden a la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 con diluciones 1:6 y 1:8. Sin embargo, en estos reactores la producción de biomasa no fue óptima y después de la fase de aceleración se produjo lisis celular.

En el mismo sentido, si se comparan los resultados de remoción de nutrientes y la producción de biomasa, se puede concluir que para el tipo de tratamiento se deben utilizar tiempos de duplicación bajos para lograr mejores resultados (Gavilanez et al., 2013; Godos et al., 2010; González et al., 2011). Conjuntamente, si se comparan estos parámetros cinéticos con los obtenidos en microalgas creciendo en medio de cultivo, se puede decir que los tiempos de duplicación resultaron menores en estiércol, como en la cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 en consorcio con tiempo de duplicación de 2 días. No obstante, las cepas no se desarrollaron conforme a la curva de crecimiento normal y no se estabilizaron en los reactores (Arredondo, 2007, p. 18; Prescott et al., 1999, pp. 410-420; Sant, 2012, pp. 510-530).

4.4. Mediciones de parámetros

a) Temperatura

La Figura 11, muestra los valores de temperatura medidos, durante el día la temperatura mínima registrada fue de 19 °C por lo que se evitó bajo metabolismo cinético y la máxima fue de 40 °C por lo que pudo haber ocurrido estrés oxidativo (Andersen, 2005, p. 310; Bermero y Vargas, 2011, p. 54; Boursier et al., 2005). Al mismo tiempo, la temperatura del invernadero en comparación con la medida en el ambiente demuestra lo indispensable del mismo en el cultivo, y por tanto en la productividad de las microalgas y la remoción de nutrientes (Matamoros et al., 2015; Sant, 2012, pp. 510-530; Solovchenko et al., 2013).

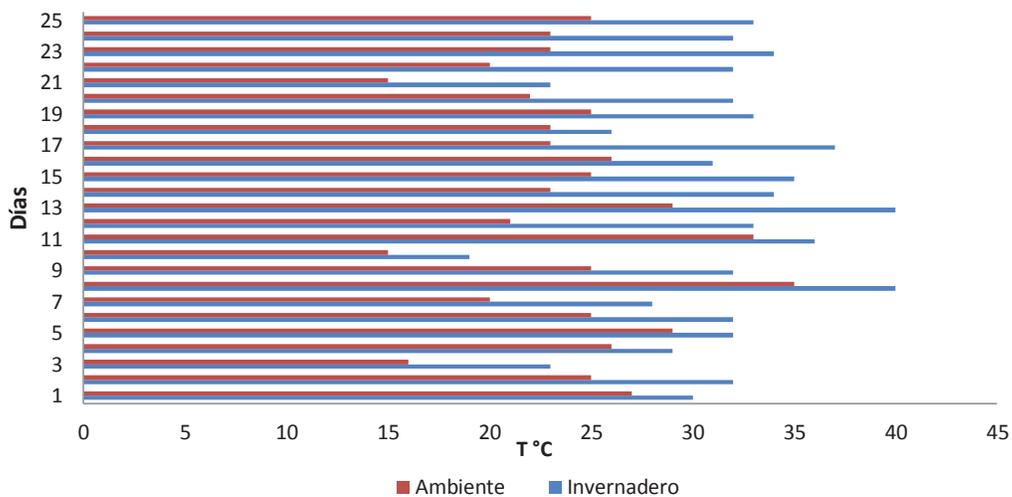


Figura 11. Registros de temperatura

b) Potencial Hidrogeno (pH)

Analizando los datos de manera conjunta se puede decir que autores como Benzing (2008) corroboran los resultados obtenidos en sistemas de degradación aerobia utilizando microorganismos, atribuyendo el pH ácido de los

primeros 3 días a la volatilización del amonio y formación de ácidos orgánicos, los valores altos o salinos a la producción de amoniaco y crecimiento de microalgas, terminando por estabilizarse en 7 por la neutralización del amonio dentro del proceso.

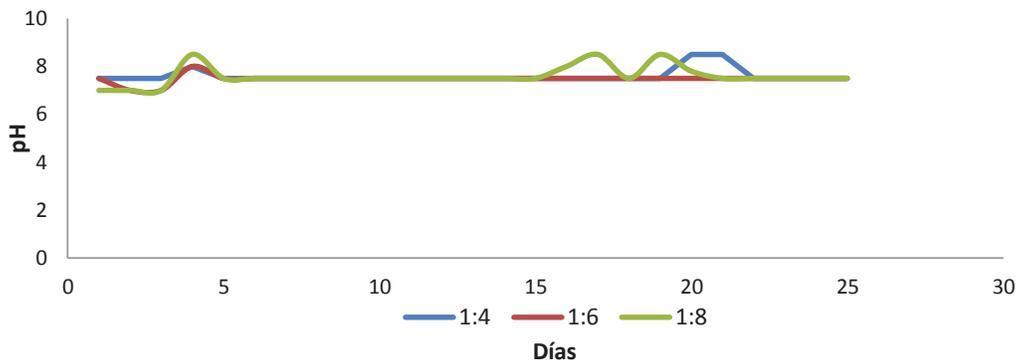


Figura 12. Resultados medidos de pH cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003

En la Figura 12, el pH inicial de 7 a 7,5 en los 3 niveles experimentados está dentro de los pH esperados, puesto que Kebede y colaboradores (2006) obtuvieron un valor de 7,88 en los tratamientos, después de un proceso de separación líquido-sólido del estiércol.

En el reactor utilizado se encontró un pH máximo de 8,5 considerado óptimo para el desarrollo de microalgas, mientras que, en el estudio en comparación, obtuvieron, un pH de 7 a 7,5 con el uso de ácidos para su mantenimiento con microalgas filamentosas. No obstante; el tratamiento propuesto demuestra una ventaja al no requerir adicionar ácidos para regular el pH y pre-tratamientos previos para utilizar el estiércol. El incremento de pH en los últimos 5 días se atribuyó a la aceleración en el crecimiento de las microalgas confirmada en el conteo celular (BIOTEC, 2013; Kebede et al., 2006).

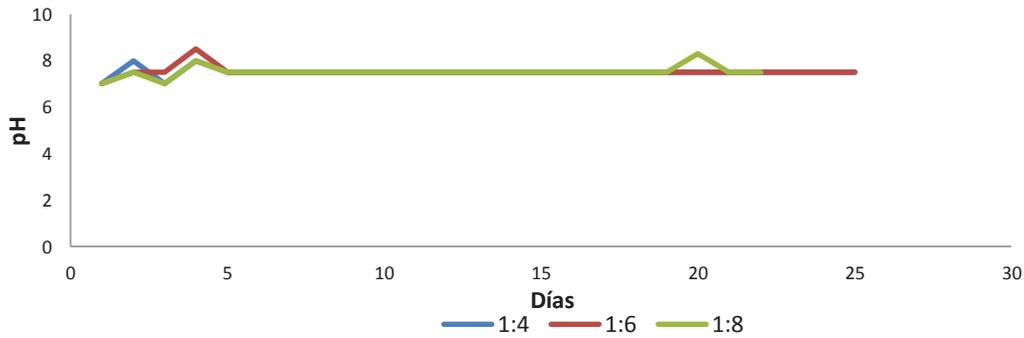


Figura 13. Resultados medidos de pH cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003

De acuerdo con la Figura 13, el pH inicial medido en los tres niveles se registró en 7 siendo el valor recomendable para el cultivo de microalgas, no obstante; en comparación con la experimentación aplicada por Godos y colaboradores (2010) donde los valores de pH se situaron en un rango de 9 a 10,2 para el género *Euglena* sp. El tratamiento propuesto no requirió de regulación de pH y no tuvo periodos de salinidad donde se inhiba la asimilación de nutrientes o disminución de la actividad fotosintética (Kebede et al., 2006; Sant, 2012, pp. 510-530; Solovchenko et al., 2013).

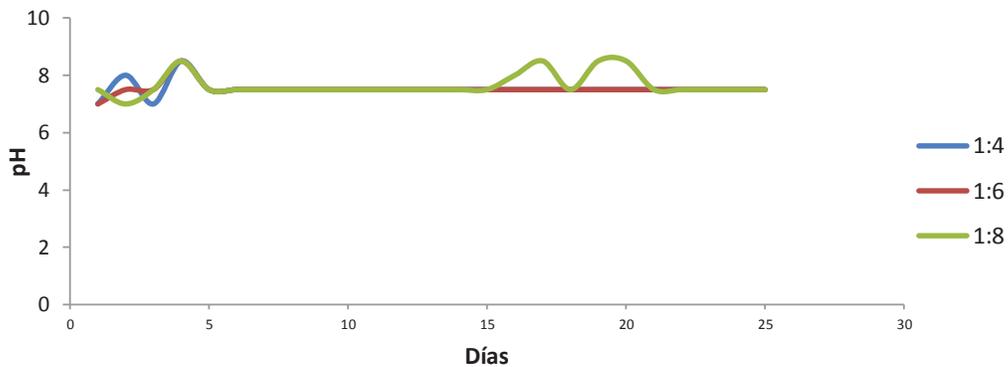


Figura 14. Resultados medidos de pH cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 y *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003.

La Figura 14, muestra que el consorcio de las cepas experimentadas manifiestan los mayores valores de pH encontrándose en el día 4 los tres niveles en 8,5. A pesar de que se encuentra en el rango óptimo para el crecimiento de las microalgas es el límite alcanzado antes de la estabilización en 7,5 de los días posteriores, a excepción del nivel alto dilución 1:8, a partir del día 16 a un rango de 8 a 8,5 siendo el reactor más salino, lo que se le atribuye al mayor concentración celular y densidad de microalgas (BIOTEC, 2013; Kebede et al., 2006). El pH de los consorcios se puede comparar con los experimentados por Godos y colaboradores (2010, pp. 6-9) donde los géneros *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. se mantuvieron en el rango de 8 a 10 durante la experimentación en similares diluciones con estiércol.

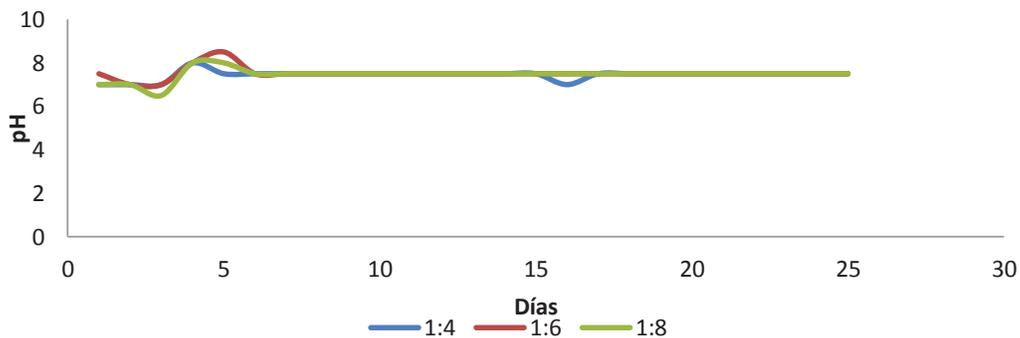


Figura 15. Resultados medidos de pH en reactores testigo o blancos

En la Figura 15, se compara el pH inicial medido en reactores con biomasa de microalgas de los blancos, resultando en que los segundos registraron valores más ácidos durante los 5 primeros días llegando a un mínimo de 6,5, debido a la mayor volatilización de amonio puesto que no estaba siendo consumido por las microalgas (BIOTEC, 2013; Kebede et al., 2006). Por otro lado, los pH registrados menos variables a partir del día 5 fueron de los testigos, demostrando que la dilución o niveles utilizados fueron óptimos para el desarrollo de la experimentación, cumpliendo además con los pH medidos en reactores de degradación aerobia (Sant, 2012, pp. 510-530; Solovchenko et al., 2013).

En general, los resultados obtenidos de pH en los tratamientos mostraron que a partir del día 5 de experimentación se alcanzó una etapa de estabilización tanto en los reactores con microalgas como en los testigos. Siendo así, las condiciones se mantuvieron óptimas para el crecimiento de las microalgas, como se esperaba sin adición de ninguna sustancia (Andersen, 2005, p. 310; Bermero y Vargas, 2011, p. 54; Kebede et al., 2006). Adicionalmente, el pH de las soluciones obtenido al final de los tratamientos, fue de 7,5 lo cual representa que al ser agregado al suelo va a ser neutro, encontrándose dentro del rango de 6.5 a 7,5, por tanto la disponibilidad de nutrientes para los cultivos, movilidad, disolución y precipitación de electrolitos o a su vez contaminantes es ideal, si se evalúa el uso como fertilizante (Benzing, 2001, p. 310; Porta et al., 2011, pp. 67-75; Salazar, 2014, p. 210).

4.5. Sistema de biodegradación de estiércol

Al final de los 25 días de tratamiento, se calculó la biomasa formada mediante conteo celular. Como se puede observar en la Figura 16, la mayor densidad celular se obtuvo con la dilución 1:8 en la cepa de *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 y en su consorcio. Sin embargo; la densidad del segundo pudo verse afectada por la presencia de la otra especie de microalgas como un proceso inhibitorio de crecimiento (González et al., 2011; Solovchenko et al., 2013).

En el caso de las cianobacterias no se pudo desarrollar biomasa debido a la reducción del tamaño de la cepa dentro del reactor por la baja recepción de luz y altos contenidos de amonio (Godos et al., 2010; Sandefur et al., 2016; Sant, 2012, pp. 510-530). Por otro lado, González y Riaño (2011, pp. 3-4) explican que la baja producción de biomasa también se ve influenciada por la falta de agitadores mecánicos en el proceso sumadas a las altas temperaturas, superando los 35 °C en el tratamiento, bajo las condiciones como las antes mencionadas la especie *Scenedesmus* sp. obtuvo una densidad celular de $5,00E+09 \text{ cel/mL}^{-1}$ en 30 días, sin embargo, el propósito de la experimentación

planteada no es la obtención de biomasa para su aprovechamiento. En el Anexo 6 se encuentra el registro fotográfico de los reactores al final de la experimentación.

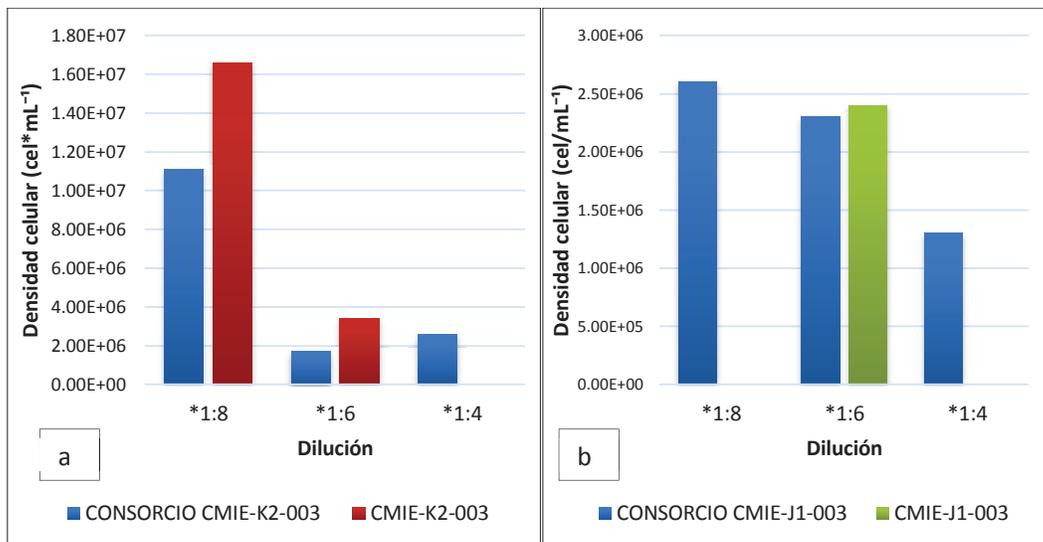


Figura 16. Densidad de biomasa formada por microalgas en biodegradación con el estiércol.

(a) experimentación con cepa *Pleurococcus* sp.

(b) experimentación con cepa *Rhabdoderma* sp.

4.6 Medición del parámetro relación C/N

Los resultados obtenidos del parámetro C/N en la tabla 9, se muestran favorables para los tratamientos con la cepa de *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 dilución 1:8 y 1:6, y el consorcio con dilución 1:8 puesto que el rango ideal u óptimo para un fertilizante es de 10-12, con un buena disponibilidad de nitrógeno para la planta y suficiente carbono para el medio (AGROCALIDAD y ASPE, 2012; Benzing, 2001, p. 310; García et al., 2006, p. 13).

En comparación con estudios realizados por Miao y colaboradores (2014) en su experimentación con microalgas, en condiciones de agitación mecánicas,

dilución de estiércol con el 0,5 y 0,3% de volumen en sólidos y utilizando un proceso anaerobio, donde obtuvieron parámetros de relación C/N de 11,41, a los 22 días de tratamiento en el líquido y sedimentos resultantes. El tratamiento propuesto obtuvo la misma relación en 3 reactores, sin embargo; no se utilizó energía para agitadores, puesto que se realizó de manera manual y por burbujeo. De esta manera, el proceso fue aerobio, por lo que no se emitieron gases de efecto invernadero como el metano y desaparecieron olores desagradables, no se pre-trató el estiércol haciendo del proceso bajo en costos y uso de energía, además que el proceso desintegro en el mejor caso el material orgánico de mayor diámetro.

Tabla 10.

Resultados de análisis de relación C/N en los tratamientos

Tratamiento	R C/N	N Total %	C total %	N total (g/L)	C total(g/L)
CMIE-K2003 <i>Pleurococcus</i> sp. 1:8	11,6	0,01	0,116	0,001	0,0116
CMIE-K2003 <i>Pleurococcus</i> sp. 1:6	11,6	0,01	0,116	0,001	0,0116
CMIE-K2003 <i>Pleurococcus</i> sp. 1:4	9,28	0,05	0,464	0,005	0,0464
CMIE-J1003 <i>Rhabdoderma</i> sp. 1:8	2,9	0,02	0,058	0,002	0,0058
CMIE-J1003 <i>Rhabdoderma</i> sp. 1:6	8,7	0,02	0,174	0,002	0,0174
CMIE-J1003 <i>Rhabdoderma</i> sp. 1:4	5,8	0,03	0,174	0,003	0,0174
Consorcio 1:8	11,6	0,01	0,116	0,001	0,0116
Consorcio 1:6	5,8	0,02	0,116	0,002	0,0116
Consorcio 1:4	8,7	0,02	0,174	0,002	0,0174
Blanco 1:8	5,8	0,02	0,116	0,002	0,0116
Blanco 1:6	8,7	0,02	0,174	0,002	0,0174
Blanco 1:4	5,8	0,05	0,29	0,005	0,029

Como se observa en la tabla 10, la optimización del parámetro relación C/N a 11,6 del valor inicial de 16,5, sin duda se debió a varios factores como; la utilización de estiércol fresco, las paredes celulares de las microalgas por su estructura fuerte no permitieron la inhibición de las células por la presencia de bacterias existentes en el estiércol, el pH favoreció al crecimiento de microalgas, la temperatura dentro del invernadero mantuvo la productividad celular, entre otras (González et al., 2011; Solovchenko et al., 2013). En el Anexo 4, se encuentra el documento original proporcionado por el laboratorio INIAP.

Por otro lado, en los reactores donde no se optimizó la relación C/N, como con el tratamiento usando la especie *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003, se debió posiblemente a la inhibición del crecimiento celular por parte del estiércol o la concentración de amonio, la falta de agitación mecánica, que permita homogenizar la mezcla y distribuir mejor la luz para procesos como la fotosíntesis, falta de control en la temperatura para evitar superar los 30 °C, entre otros (Godos et al., 2010; Miao et al., 2014; Solovchenko et al., 2013).

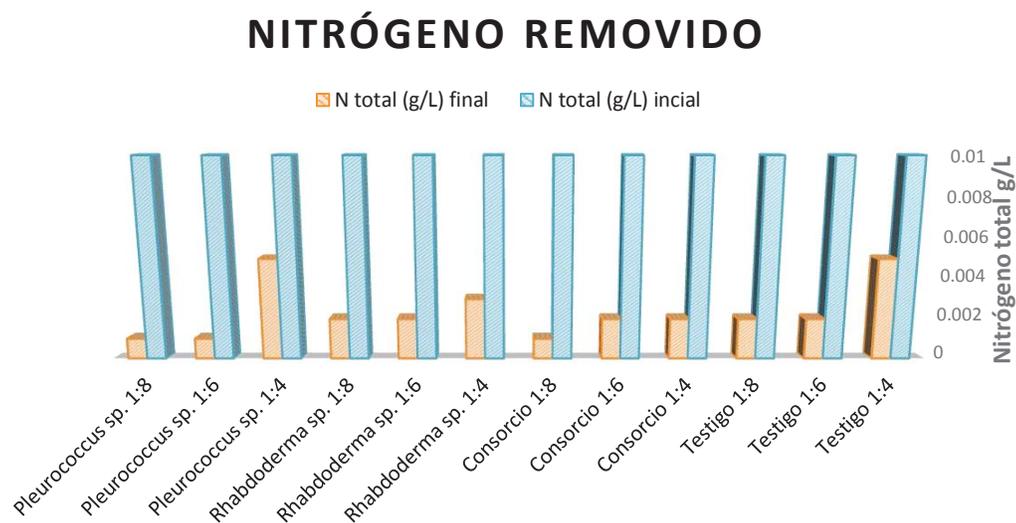


Figura 17. Porcentaje de nitrógeno total removido

Como se puede observar en la Figura 17, los porcentajes de remoción por parte de las microalgas de la especie *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003, fueron de 90 % en nitrógeno en dilución 1:8 y 1:6 donde se confirmó el crecimiento y desarrollo de las mismas, mientras que en el tratamiento donde hubo lisis celular del cultivo la remoción fue de 50 % al igual que el blanco en la dilución 1:4, los resultados a su vez concuerdan con los obtenidos por Kebede et al (2006) donde la remoción de nitrógeno por parte de microalgas filamentosas fue de 98 % en 30 días. En el caso de la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 se puede concluir que estas consumen nitrógeno en el medio en 40 % más que una degradación aerobia, con la ventaja de que estas ponen disponible el nitrógeno para las plantas y no los volatilizan desperdiciándose en el ambiente y cerrando el ciclo (ENEEK, 2013; Pilar *et al.*, 2013; Wildner y Veiga, 1992).

Las cianobacterias por otro lado, en los reactores donde ocurrió muerte de las colonias la remoción fue de 80 % de nitrógeno al igual que los testigos, por tanto su diámetro disminuido sumado a la baja densidad celular, no consumieron el nitrógeno presente evitando la optimización de la relación C/N, además en el reactor de dilución 1:4 donde hubo mayor presencia celular de la cepa, la remoción fue menor a 70 %, por lo que efectivamente la especie no se considera apta para el tratamiento (Benzing, 2001, p. 310; Porta et al., 2011, pp. 67-75; Tapia y Fries, 2007, p. 120).

Posteriormente, en el consorcio donde hubo mayor producción de biomasa es donde hubo mayor remoción alcanzando el 90 % de nitrógeno, atribuyéndose el resultado a la presencia predominante de la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 en un 70 % del resto de diluciones las microalgas fueron inhibidas por las condiciones o la composición del estiércol por lo que la remoción fue igual que los testigos.

CARBONO REMOVIDO

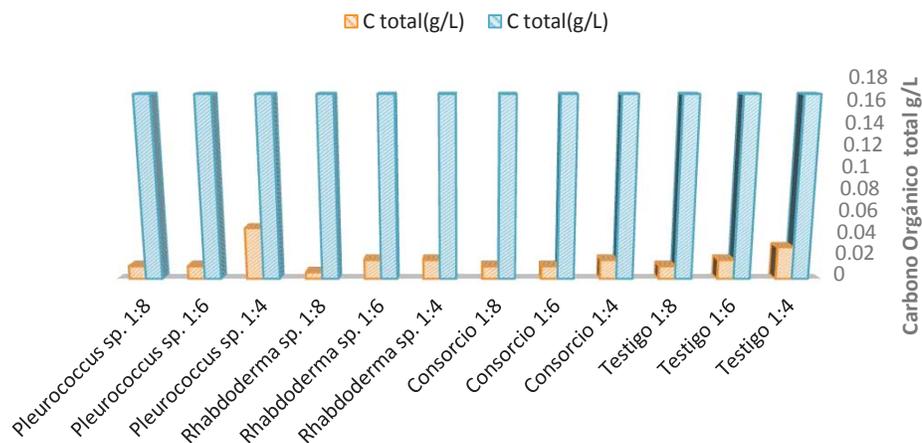


Figura 18. Porcentaje de carbono orgánico total removido

Con respecto al carbono orgánico total en la Figura 18. Los autores Godos y colaboradores (2010, pp. 2-4), explican que altos porcentajes de remoción en todos los reactores explican el bajo crecimiento celular de general de las dos cepas de microalgas experimentadas.

No obstante, los porcentajes de remoción obtenidos en otras experimentaciones fueron de 47 a 59 % en dilución de estiércol 14,29 % a 46 % para el género de *Chlorella* sp. Siendo así, se puede concluir que los valores obtenidos para las cepas de microalgas nativas propuestas consumen el doble de carbono que otras antes estudiadas y que la metodología empleada permite mejor biodegradación que los sistemas antes desarrollados (Andersen, 2005, p. 310; Cañizares et al., 1994; Godos et al., 2010).

4.7. Análisis estadístico

4.7.1. Parámetro relación C/N

a) T de pares

A continuación, en la tabla 11 se muestran las significancias bilaterales entre relación C/N inicial y final de cada tratamiento aplicado.

Tabla 11

Prueba T de muestras relacionadas para los tratamientos

Prueba de muestras emparejadas						
Tratamientos			Diferencias emparejadas	T	Grados de libertad	Sig. (bilateral)
			95 % de intervalo de confianza de la diferencia Superior			
<i>Pleurococcus</i> sp. CMIE-K2-003	Par 1	RC/N inicial	9,0007	7,336	2	0,018
		RC/N final				
<i>Rhabdoderma</i> sp. CMIE-J1-003	Par 2	RC/N inicial	17,904	6,391	2	0,024
		RC/N final				
Consortio	Par 3	RC/N Inicial	15,004	4,659	2	0,043
		RC/N final				
Testigo	Par 4	RC/N Inicial	13,8926	10,069	2	0,01
		RC/N final				

En la tabla 11, los resultados de la comparación de medias muestran que entre la relación C/N inicial y final existe diferencia significativa en todos los tratamientos y niveles utilizados. Siendo el valor p o significancia bilateral menor a 0.05 en todos los casos, por tanto, rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, comprobando que hubo un proceso de optimización del parámetro en todos los reactores.

b) Comparación múltiple DMS

A continuación, en la tabla 12 se muestran las significancias o valor p. obtenidos comparando cada tratamiento.

Tabla 12

Comparaciones múltiples DMS

Variable dependiente: Relación C/N final					
(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%
					Límite inferior
Pleurococcus sp. CMIE-K2-003	Rhabdoderma sp. CMIE-J1-003	5,0267*	1,8893	,029	0,670
	Consortio	2,1267	1,8893	,293	-2,230
	Testigo	4,0600	1,8893	,064	-,297
Rhabdoderma sp. CMIE-J1-003	Pleurococcus sp. CMIE-K2-003	-5,0267*	1,8893	,029	-9,383
	Consortio	-2,9000	1,8893	,163	-7,257
	Testigo	-,9667	1,8893	,623	-5,323
Consortio	Pleurococcus sp. CMIE-K2-003	-2,1267	1,8893	,293	-6,483
	Rhabdoderma sp. CMIE-J1-003	2,9000	1,8893	,163	-1,457
	Testigo	1,9333	1,8893	,336	-2,423
Testigo	Pleurococcus sp. CMIE-K2-003	-4,0600	1,8893	,064	-8,417
	Rhabdoderma sp. CMIE-J1-003	,9667	1,8893	,623	-3,390
	Consortio	-1,9333	1,8893	,336	-6,290

La prueba de comparaciones múltiples de acuerdo con la Figura 13, demuestran que las mínimas diferencias significativas se encuentran entre el tratamiento con la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 y *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 de acuerdo con el valor p. que es menor a 0,05 (Boursier et al., 2005; Cañizares et al., 1994; Christenson y Sims, 2011). La diferencia significativa entre los tratamientos se debió a que en los reactores con *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003, estas alcanzaron su fase de lisis celular antes de culminar la experimentación, al contrario de la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 que se encontraba en una etapa de estabilización (González et al., 2011; Matamoros et al., 2015; Miao et al., 2014).

La comparación entre los testigos, consorcio y cepas de microalgas no arrojaron una diferencia significativa, lo que se atribuye a las diferencias mínimas en los porcentajes de reducción de nitrógeno que contribuyen al parámetro relación C/N. Sin embargo, el enfoque de la experimentación fue la optimización de la relación C/N mediante el uso de microalgas lo que se logró en los tratamientos utilizando *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 en dilución 1:8 y 1:6, y el consorcio 1:8 ubicándose en el rango de 10-12 objetivo.

c) Análisis descriptivo

De acuerdo con los resultados obtenidos de estadística descriptiva, se puede concluir que la media o mediana de la experimentación se encuentra en relación C/N de 8, lo cual no está dentro del rango óptimo. Sin embargo, esto se atribuye a que la a cepa de microalgas *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 no pudo ser cultivada en estiércol, por lo que no interfirió en la optimización del parámetro buscado, e inhibió el crecimiento en consorcio de la otra cepa (Matamoros et al., 2015; Miao et al., 2014; Mulbry et al., 2005).

En la Figura 19, el diagrama de cajas determino que tratamiento que fue efectivo en la optimización del parámetro relación C/N. La cepa *Pleurococcus*

sp. CMIE-K2-003 obtuvo el mejor resultado alcanzando una media de 11,6 con menos dispersión en los resultados y un mínimo de 9,28 perteneciente a la dilución 1:4 donde no hubo crecimiento de las mismas. Por otro lado, el tratamiento con el menor rango de relación C/N fue de la especie *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 debido a la muerte de las mismas dentro de los reactores una vez cultivadas, haciendo dificultosa su aplicación al suelo (Franchino et al., 2016; Godos et al., 2010; González et al., 2011).

El tratamiento testigo o degradación aerobia en relación al tratamiento con la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 demuestra la influencia de las microalgas en el tratamiento mejorando la disponibilidad de nutrientes en 50 % en 25 días como se indica en la Figura 19. (Godos et al., 2010; González et al., 2011; Mulbry et al., 2005).

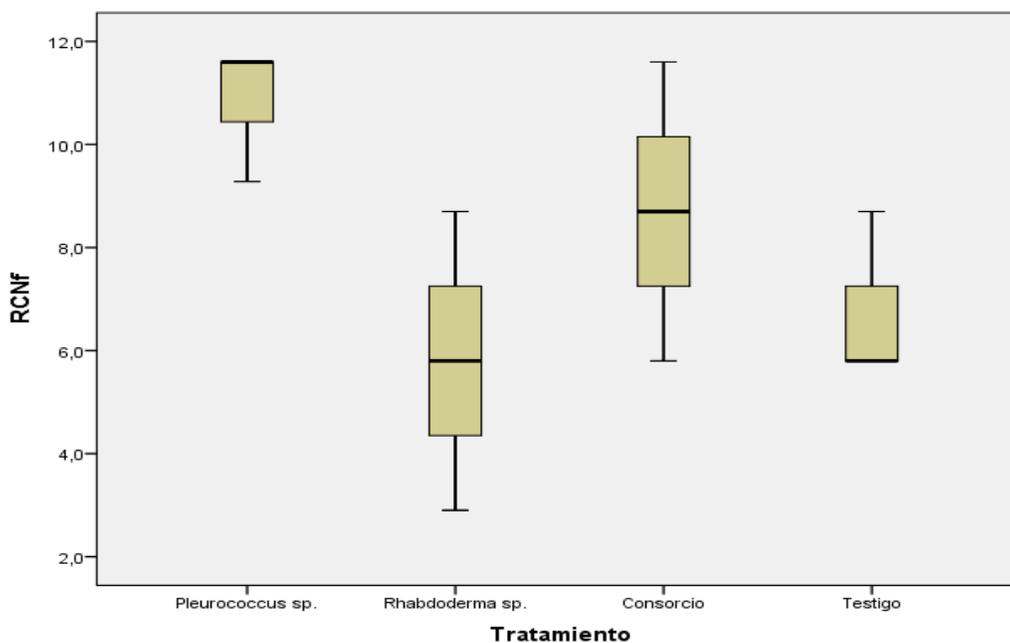


Figura 19. Diagrama de cajas de los tratamientos

Nota: RCNF significa Relación C/N.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

La muestra de estiércol fresco tomado inicialmente para la experimentación fue determinante para el desarrollo del sistema de biodegradación puesto que la relación C/N de 16,5 evitó pérdidas de nutrientes y bajas emisiones de gases de efecto invernadero.

Dentro del proceso de escalamiento de cepas de microalgas fue indispensable mantener axénicos los cultivos y controladas las condiciones de funcionamiento para una mejor calidad al momento de insertarlas en los reactores de tratamiento.

Se determinó que las cepas seleccionadas para el tratamiento, tienen su máximo crecimiento en 25 días, antes de alcanzar la fase de lisis celular.

El establecimiento de los 3 niveles a experimentar, siendo dilución 1:4, 1:6 y 1:8, permitió determinar la capacidad de adaptación a la concentración de amonio de las especies *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 y *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003.

El género *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 pudo ser cultivada en los niveles medio y alto de estiércol, llegando a la densidad celular de $1,66E+07$ y $3,40E+06$ cel/mL⁻¹ respectivamente.

El género *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 no pudo desarrollarse en ningún nivel aplicado, sin embargo; se presenciaron células de menor tamaño llegando a densidad de $9,70E+06$ cel/mL⁻¹ antes de la muerte celular en concentración 1:4.

El consorcio formado por las cepas seleccionadas se desarrolló en los tres niveles, no obstante, se presenció inhibición del crecimiento de las microalgas *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 por la presencia de la segunda cepa. En

dilución 1:8 se obtuvo densidad celular de *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 de $1,66E+07$ cel/mL⁻¹.

Dentro de los parámetros cinéticos de crecimiento se pudo concluir que la velocidad y tiempo de duplicación del cultivo de *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 en consorcio es similar en medio de cultivo que, en estiércol, mientras que para la cepa *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003 aceleró el proceso y la muerte de las mismas. El comportamiento de *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 resulto en más tiempo para duplicación lo que explica la baja densidad celular.

El pH fue un factor determinante en el proceso de experimentación, el parámetro se mantuvo dentro de los rangos esperados para finalmente registrar 7,5 en todos los reactores. El pH obtenido al final del tratamiento es apto para ser agregado al suelo favoreciendo a la disponibilidad de nutrientes para las plantas y quelación de contaminantes.

La optimización de la relación C/N se logró en 3 tratamientos propuestos, que son; *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 con dilución de 1:6 y 1:8 con el consorcio de 1:8, registrando un valor de 11,6 con la remoción del 90% de nitrógeno total y 92,96% de carbono orgánico total.

Se determinó que la cepa de microalgas óptima para el tratamiento de estiércol porcino fue *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003.

La relación C/N identificada en el estiércol tratado con la especie *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 puede ser empleada con éxito en calidad de enmienda orgánica, de bajo costo y que reemplaza a la fertilización química disminuyendo costos de producción.

5.2. Recomendaciones

Se recomienda experimentar con más réplicas del cultivo de la cepa *Pleurococcus* sp. CMIE-K2-003 y la dilución 1:8 para obtener más información sobre el tratamiento y poderlo aplicar a mayor escala.

Se recomienda continuar la investigación tomando en cuenta otras variables como la intensidad de luz y agitación automática, que podrían contribuir al aumento de biomasa en los reactores.

REFERENCIAS

- Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro(AGROCALIDAD), y Asociación de porcicultores de Ecuador (ASPE). (2012). *Manual de Alternativas de Tratamiento de purines porcinos*. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de https://issuu.com/aspe7/docs/manual_tratamiento_purines.
- Agencia Iberoamericana para las Difusión de la Ciencia y la Tecnología. (2016). *Estudian las propiedades de las microalgas de Ecuador*. Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de <http://www.dicyt.com/noticias/estudian-las-propiedades-de-las-microalgas-de-ecuador>.
- Andersen, R. (2005). *Algal Culturing Techniques* (1ra.). China: Elsevier Academic Press.
- Arredondo, B. (2007). Concentración recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos Y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*.
- Baker, A. (2012). *Phycokey an image based key to Algae (PS Protista), Cyanobacteria, and other aquatic objects*. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de <http://cfb.unh.edu/phycokey/phycokey.htm>.
- Bellinger, W., y Sigeo, D. (2010). *Freshwater Algae. Identification and use as bioindicators*. Wiley-Blackwell, USA.
- Benzing, A. (2001). *Agricultura orgánica Fundamentos para la región andina*. Alemania: Neekar-Verlag.
- Bermero Castillo, L. E., y Vargas Machuca, J. A. (2011). *Estudio Del Cosechado De Cultivos De Microalgas En Agua Residual Mediante Técnicas De Centrifugado*.
- Boursier, H., Béline, F., y Paul, E. (2005). *Piggery wastewater characterisation for biological nitrogen removal process design*. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.03.007>.

- Brennan, L., y Owende, P. (2009). *Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products*. Recuperado el 03 de diciembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>.
- Cañizares, R. O., Rivas, L., Montes, C., Dominguez, A. R., Travieso, L., y Benitez, F. (1994). *Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized Spirulina maxima*. Recuperado el 23 de diciembre de 2016 de [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(94\)90035-3](http://doi.org/10.1016/0960-8524(94)90035-3).
- Castrillón, Jiménez, y Bedoya. (2004). Porquinaza en la alimentación animal. Revista Lasallista De Investigacion.
- Christenson, L., y Sims, R. (2011). *Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts*. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Clifford, B., y Taylor, R. (2008). *Bioestadística* (1era. edic). Naucalpan de Juárez: México: Pearson.
- Corporación para la Investigación Energética (CIE), y Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC). (2013a). *Protocolo de Laboratorio Nro. 1 Recuento celular en la cámara de Neubauer*. Quito, Ecuador.
- Corporación para la Investigación Energética (CIE), y Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC). (2013b). *Protocolo de Laboratorio Nro. 4 Técnicas de Aislamiento para Microalgas y Cianobacterias*. Quito, Ecuador.
- Corporación para la Investigación Energética (CIE), y Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC). (2013c). *Protocolo Nro. 6 Escalamiento para cultivos de microalgas*. Quito, Ecuador.
- ENEK. (2013). *Compostaje De Estiércoles*, 39. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de [http://www.eneek.org/descargas/dteknikoak/GU?A COMPOST_ENEEK_2013.PDF](http://www.eneek.org/descargas/dteknikoak/GU?A%20COMPOST_ENEEK_2013.PDF)

- Eyherabide, M., Saínz Rozas, H., Barbieri, P., y Echeverría, E. (2014). *Comparación de métodos para determinar carbono orgánico en suelo. Ciencia Del Suelo*, 32(1), 1–9. Recuperado el 7 de diciembre de 2016 de <http://www.scielo.org.ar/pdf/cds/v32n1/v32n1a02.pdf>
- Ferré, J. (2004). *El diseño factorial completo 2k. Técnicas de Laboratorio*, 1–10. Recuperado el 13 de diciembre de 2016 de <http://argo.urv.es/quimio/general/doecast.pdf>
- Franchino, M., Tigini, V., Varese, G. C., Mussat Sartor, R., y Bona, F. (2016). *Microalgae treatment removes nutrients and reduces ecotoxicity of diluted piggy digestate. Science of the Total Environment*, 569–570, 40–45. Recuperado el 23 de diciembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.100>
- García, I., Bigeriego, M., Canales, C., y Colmenares, M. (2010). *GUÍA DE MEJORES TÉCNICAS DISPONIBLES DEL SECTOR*. Ministerio de Medio Ambiente España.
- García, M. (2004). *Análisis químico de suelos y aguas. Transparencias y problemas*. Valencia;España: Editorial de la Universidad Politécnica de Valencia.
- García, S. S., Palma-López., D. J., Escobar, R. N., Lagunes-Espinoza., L. del C., Vequia, H. D. de la, y Hernández., R. H. M. (2006). *Manejo De Fertilizantes Y Abonos Organicos*. Revista Europea.
- Gavilanez, F., Morales, E., y Molina, D. (2013). *Determinación de parametros cinéticos en microorganismos fotosinteticos* (Universidad Católica del Ecuador). Quito Ecuador.
- Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial de Cumbayá.(2012). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la Parroquia Cumbaya*. Recuperado el 3 de diciembre de 2016 de <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

- Godos, I. de, Vargas, V. A., Blanco, S., Gonzalez, M. C. G., Soto, R., Garcia-Encina, P. A., Muñoz, R. (2010). *A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.010>.
- González, C., Riaño, B., Molinuevo, B., y Garcia, M. C. (2011). *Effect of operational conditions on the degradation of organic matter and development of microalgae – bacteria consortia when treating swine slurry*, 1147–1153. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1007/s00253-011-3111-z>.
- Graham, J. E., Wilcox, L. W., y Graham, L. E. (2009). *Algae* (2nd Edición). Wisconsin, Estados Unidos: Benjamin Cummings.
- Guamán, M., y González, N. (2016). *Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador*. Quito, Ecuador: Corporación para la Investigación Energética, Laboratorio de Biotecnología Energética.
- Guiry, M. D., y Guiry, G. M. (2015). World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 <http://www.algaebase.org>.
- Gutiérrez, H., y De la Vara, R. (2008). *Análisis y Diseño de Experimentos* (2da.). México: EDITORES, MCGRAW-HILL INTERAMERICANA.
- Hernández, A., y Labbe, J. (2014). *Microalgae , culture and benefits*.
- Hidalgo, D., y Marroquín, J. M. (2015). *Environment, Energy and Climate Change I: Environmental Chemistry of Pollutants and Wastes*. In E. Jiménez, B. Cabañas, & G. Lefebvre (Eds.) (1ra. edici, pp. 341–373). Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de http://doi.org/10.1007/698_2014_268.
- Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC). (2011). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC)*. Quito.

Recuperado el 13 de noviembre de 2016 de http://www.inec.gob.ec/inec/index.php?option=com_content&view=article&id=502:en-ecuador-se-produce-mas-carne-de-cerdo&catid=68%3-Aboletines&Itemid=51&lang=es.

Instituto Nacional de Investigaciones agropecuarias (INIAP). (2015). *ANALISIS FÍSICO DE SUELOS, AGUAS Y TEJIDOS VEGETALES*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.iniap.gob.ec/web/servicio-1/>

Díez, J. (1999). *Edafología*. Revista de La Sociedad Española de La Ciencia Del Suelo, Nro 6, 73–84.

Kebede-Westhead, E., Pizarro, C., y Mulbry, W. W. (2006). *Treatment of swine manure effluent using freshwater algae: Production, nutrient recovery, and elemental composition of algal biomass at four effluent loading rates*. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1007/s10811-005-9012-8>.

Kiersch, B. (2015). *Boletín del Año Internacional de los Suelos América Latina y el Caribe. Organización de Las Naciones Unidas Para La Alimentación Y La Agricultura*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 <http://www.fao.org/3/a-i4885s.pdf>.

Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC). (2015). *LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA ENERGÉTICA*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.biotec.ec/>

Martínez, R. (2014). *Aislamiento y evaluación de la viabilidad de cianobacterias de la rizósfera de las plantas leguminosas cultivadas en la parroquia Poaló, Latacunga-Cotopaxi*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Martínez, R., y Olalde, V. (2008). *Importancia de los abonos orgánicos*, 4(1), 57–67.

Matamoros, V., Gutiérrez, R., Ferrer, I., García, J., y Bayona, J. M. (2015). *Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove*

emerging organic contaminants: A pilot-scale study. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.02.002>

Miao, H., Wang, S., Zhao, M., Huang, Z., Ren, H., Yan, Q., y Ruan, W. (2014). *Codigestion of Taihu blue algae with swine manure for biogas production*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.10.025>

Ministerio de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca (MAGAP), Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro(AGROCALIDAD), y Asociación de porcicultores de Ecuador (ASPE). (2010). Encuesta Sanitaria De Granjas De Ganado Porcino 2010. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de [http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/08/7 Informe Encuesta Nacional Sanitaria de Granjas de Ganado Porcino 2012.pdf](http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/08/7%20Informe%20Encuesta%20Nacional%20Sanitaria%20de%20Granjas%20de%20Ganado%20Porcino%202012.pdf)

Morales, E., Martínez, R., y Suárez, G. (2014). *Biotecnología*. In S. Carlos & B. Sergio (Eds.), *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas (VOLUMEN XX)*. Quito;Ecuador: Quality Print.

Mulbry, W., Westhead, E. K., Pizarro, C., y Sikora, L. (2005). *Recycling of manure nutrients: Use of algal biomass from dairy manure treatment as a slow release fertilizer*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.05.026>

Núñez, L., Meas, V., Ortega, B., y Olguin, J. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*. Recuperado el 2 de noviembre de 2016 de <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Fitorremediación+n:fundamentos+y+aplicaciones#0>

Ortiz, M. (2016). *Información de la Granja*. Quito Ecuador.

Oyadomari, J. (2011). *Keweenaw: Algae. A collection of freshwater algae (and protozoans) from Keweenaw Peninsula, MI. Finlandia University, Hancock, MI, Michigan Technological University, Houghton MI*. Recuperado el 13

de noviembre de 2016 de www.kewee-

Patrick, R., y Reimer, C. W. (1975). *The Diatoms of the United States Exclusive of Alaska and Hawaii* (vol. I & I). Academy of Natural Sciences.

Patterson, D. J. (1996). *Free-Living Freshwater Protozoa, A Colour Guide*.

Patterson, D. J., y Hedley., S. (1992). *Freeliving Freshwater Protozoa: A Colour Guide*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://ucjeps.berkeley.edu/INA.html>

Pinos, J. Rodriguez, J., García, L., Peña, A., Gonzalez, C., y Patiño, J. (2012). *Impactos y regulaciones ambientales del estiércol generado por los sistemas ganaderos de algunos países de américa*. *Agrociencia*, 46, 359–370.

Porta, J., López, M., y Poch, R. M. (2011). *Introducción a la edafología Uso y protección de suelos* (2da edición). Cataluña, España: Ediciones Mundi-Prensa.

Prescott, G. W. (1962). *Algae of the Western Great Lakes Area*. 1951. WMC Brown.

Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. A. (1999). *Microbiología* (4° Edición). Madrid; España: Mc Graw-Hill. Interamericana.

Róman, P., Martinez, M., y Pantoja, A. (2013). *Manual de compostaje del agricultor, Experiencias en América Latina*. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>

Salazar, J. (2014). *UF0161:Operaciones auxiliares de abonado y aplicación de tratamientos en cultivos agrícolas*. Córdoba, España.

Sandefur, H. N., Asgharpour, M., Mariott, J., Gottberg, E., Vaden, J., Matlock, M., y Hestekin, J. (2016). Recovery of nutrients from swine wastewater

using ultrafiltration: Applications for microalgae cultivation in photobioreactors. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.066>

Sant, L. (2012). Atlas de cianobacterias e microalgas de águas continentais brasileiras.

Serediak, N., y Huynh, M. (2011). *Algae identification Lab Guide*. Canada: Agriculture and Agri-Food.

Smith, G. . (1950). *The Fresh-water Algae of the United States*. McGraw-Hill Book Company, Inc. NY.

Soha, M. (2012). Microalgal Biotechnology: Prospects and Applications. In N. K. Dhal y Sudam Charan Sahu (Eds.), *Plant Science*. India: InTech. Recuperado el 13 de noviembre de 2016 <http://doi.org/10.5772/47751.hancement>

Solovchenko, A. E., Lukyanov, A. A., Vasilieva, S. G., Savanina, Y. V, Solovchenko, O. V, y Lobakova, E. S. (2013). Possibilities of Bioconversion of Agricultural Waste with the Use of Microalgae 1, 68(4), 206–215. Recuperado el 12 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.3103/S0096392514010118>

Song, L. (2013). Freshwater Algae Culture Collection at the Institute of Hydrobiology. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://algae.ihb.ac.cn/english/algaeDetail>

Soria, C., y Barba, S. (2013). *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*. Quito, Ecuador: Centro de Publicaciones.

Spaulding, S., Lubinski, D., y Potapova, M. (2010). Diatoms of the United States.

Tapia, M. E., y Fries, A. M. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. Fao; Anpe-Perú.

- Wehr, J., y Sheath, R. (2003). *Freshwater Algae of North America*. USA: Ecology and Clasification. Aca- demic Press. Elsevier Science.
- Wildner, L., y Veiga, L. (1992). *Erosión y pérdida de fertilidad del Suelo*. In *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO] (Ed.), Erosion de suelos en America Latina* (1. ed.). Santiago, Chile. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.fao.org/docrep/t2351s/T2351S00.htm#Contents>
- Ycaza, I. (2016). *Microalgas Lo que hacemos con estos organismos*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://www.yachaytech.edu.ec/conectate/noticias/detalle/articulo/las-microalgas/>
- Yen, S. H., Jeng, F. T., y Horng, J. (2008). *Journal of Environmental Science and Health . Part A: Environmental Science and Engineering and Toxicology : Toxic / Hazardous Substances and Environmental Engineering Adsorption of methyl - ethyl ketone vapor onto zeolites*. Recuperado el 23 de noviembre de 2016 de <http://doi.org/10.1080/10934529909376856>

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo empleados en el cultivo de microalgas

Medio Bold Basal (Bold 1949, Bischoff and Bold 1963)			
Component	Stock Solution (g/L⁻¹dH₂O)	Quantify Used	Concentration in Final Medium (M)
Macronutrients			
NaNO ₃	25	10 mL	2,94x10 ⁻³
CaCl ₂ *2 H ₂ O	2,50	10 mL	1,70x10 ⁻⁴
MgSO ₄ *7H ₂ O	7,50	10 mL	3,04x10 ⁻⁴
K ₂ HPO ₄	7,50	10 mL	4,31x10 ⁻⁴
KH ₂ PO ₄	17,50	10 mL	1,29x10 ⁻⁴
NaCl	2,50	10 mL	4,28x10 ⁻⁴
Alkaline EDTA Solution		1 mL	
EDTA	50		1,71x10 ⁻⁴
KOH	31		5,53x10 ⁻⁴
Acidified Iron Solution		1 mL	
FeSO ₄ *7H ₂ O	4,98		1,79x10 ⁻⁵
H ₂ SO ₄		1 mL	
Boron Solution		1 mL	
H ₃ BO ₃	11,42		1,85x10 ⁻⁴
Trace Metals Solution		1 mL	
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,82		3,07x10 ⁻⁵
MnCL ₂ *4H ₂ O	1,44		7,28x10 ⁻⁶
MoO ₃	0,71		4,93x10 ⁻⁶
CuSO ₄ *5H ₂ O	1,57		6,29x10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ *6H ₂ O	0,49		1,68x10 ⁻⁶

Medio BG-11 (Rippka <i>et al.</i>, 1979)			
Component	Stock Solution (g/L⁻¹dH₂O)	Quantify Used	Concentration in Final Medium (M)
Fe Citrate solution		1 mL	
Citric acid	6	1 mL	3.12×10^{-5}
Ferric ammonium citrate	6	1 mL	3×10^{-5}
NaNO ₃	-	1,5 g	$1,76 \times 10^{-2}$
K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O	40	1 mL	$1,75 \times 10^{-4}$
MgSO ₄ *7H ₂ O	75	1 mL	3.04×10^{-4}
CaCl ₂ *2 H ₂ O	36	1 mL	$2,45 \times 10^{-4}$
NaCO ₃	20	1 mL	$1,89 \times 10^{-4}$
MgNa ₂ EDTA*H ₂ O	1.0	1 mL	$2,79 \times 10^{-6}$
Trace metal solution	(See following recipe)	1 mL	-

Anexo 2. Fertilizante aplicado durante la etapa de cultivo en envases de 5 litros

Nitrofoska ®foliar	
Fertilizante complejo 10-4-7-0,2 MgO	
Ingredientes:	Contenido Neto 1 L
Nitrógeno	10%
Fósforo	4%
Potasio	7%
Magnesio	0,20%
Azufre	0,80%
Manganeso	17 ppm
Hierro	140 ppm
Cobre	25 ppm
Zinc	5 ppm
Boro	22 ppm
Molibdeno	3 ppm

Anexo 3.- Análisis inicial de estiércol fresco



ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DE SUELOS, PLANTAS Y AGUAS
Km 1, Panamericana Sur, Apdo... 17-01-340
Telf. -Fax. 3007284
QUITO – ECUADOR

NOMBRE DEL PROPIETARIO: C.I.E
NOMBRE DEL REMITENTE:
NOMBRE DE LA GRANJA: S/N
LOCALIZACIÓN: Llano Grande Quito Pichincha
PARROQUIA CANTÓN PROVINCIA
FECHA DE MUESTREO : 18/09/2016
FECHA INGRESO AL LABORATORIO: 22/09/2016
FECHA DE SALIDA DE RESULTADOS: 30/09/2016

INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS DE ABONOS ORGÁNICOS

No. Laborat.	Identificación	dS/m		R	g/100ml (%)							mg/l (ppm)						
		pH	C.E		C/N	C	N TOTAL	P	K	Ca	Mg	S	M.O	B	Zn	Cu	Fe	Mn
1032	MUESTRA 1			16.5	1.65	0.10						2.85						

METODOLOGÍA USADA:

PH y CE: Medición Directa
Materia Orgánica por WALKLEY BLACK

C.E. = Conductividad eléctrica dS/m = decisiemens/metro
M.O. = Materia orgánica

J. M. Berzosa
RESPONSABLE LABORATORIO

[Signature]
LABORATORISTA

Anexo 4. Análisis final de relación C/N a los tratamientos

Meat 25/10/16
(5-76)



ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA
DE SUELOS, PLANTAS Y AGUAS
Km 1, Panamericana Sur, Apdo... 17-01-340
Telf.-Fax 3007284
QUITO - ECUADOR

NOMBRE DEL PROPIETARIO: Johanna Herdoiza
NOMBRE DEL REMITENTE: ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA DE SUELOS, PLANTAS Y AGUAS
NOMBRE DE LA GRANJA: Lab. Biot. Energética BIOTEC
LOCALIZACIÓN: Cumbayá Quito Pichincha
CANTÓN QUITO PROVINCIA PICHINCHA

FECHA DE MUESTREO : 16/10/2016
FECHA INGRESO AL LABORATORIO: 17/10/2016
FECHA DE SALIDA DE RESULTADOS: 21/10/2016

INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS DE ABONOS ORGÁNICOS

No. Laborat.	Identificación	pH	dS/m	R		N TOTAL	P	K	Ca	Mg	S	mg/l (ppm)					
				C/E	C/N							MLO	B	Zn	Cu	Fe	Mn
1039	K2 003-1:8			11.60	0.01							0.2					
1040	K2 003-1:6			11.60	0.01							0.2					
1041	K2 003-1:4			9.28	0.05							0.8					
1042	J1 003-1:8			2.90	0.02							0.1					
1043	J1 003-1:6			8.70	0.02							0.3					
1044	J1 003-1:4			5.80	0.03							0.3					
1045	K2 003+J1 003-1:8			11.60	0.01							0.2					
1046	K2 003+J1 003-1:6			5.80	0.02							0.2					
1047	K2 003+J1 003-1:4			8.70	0.02							0.3					
1048	Bianco 003-1:8			5.80	0.02							0.2					
1049	Bianco 003-1:6			8.70	0.02							0.3					
1050	Bianco 003-1:4			5.80	0.05							0.5					

METODOLOGÍA USADA:

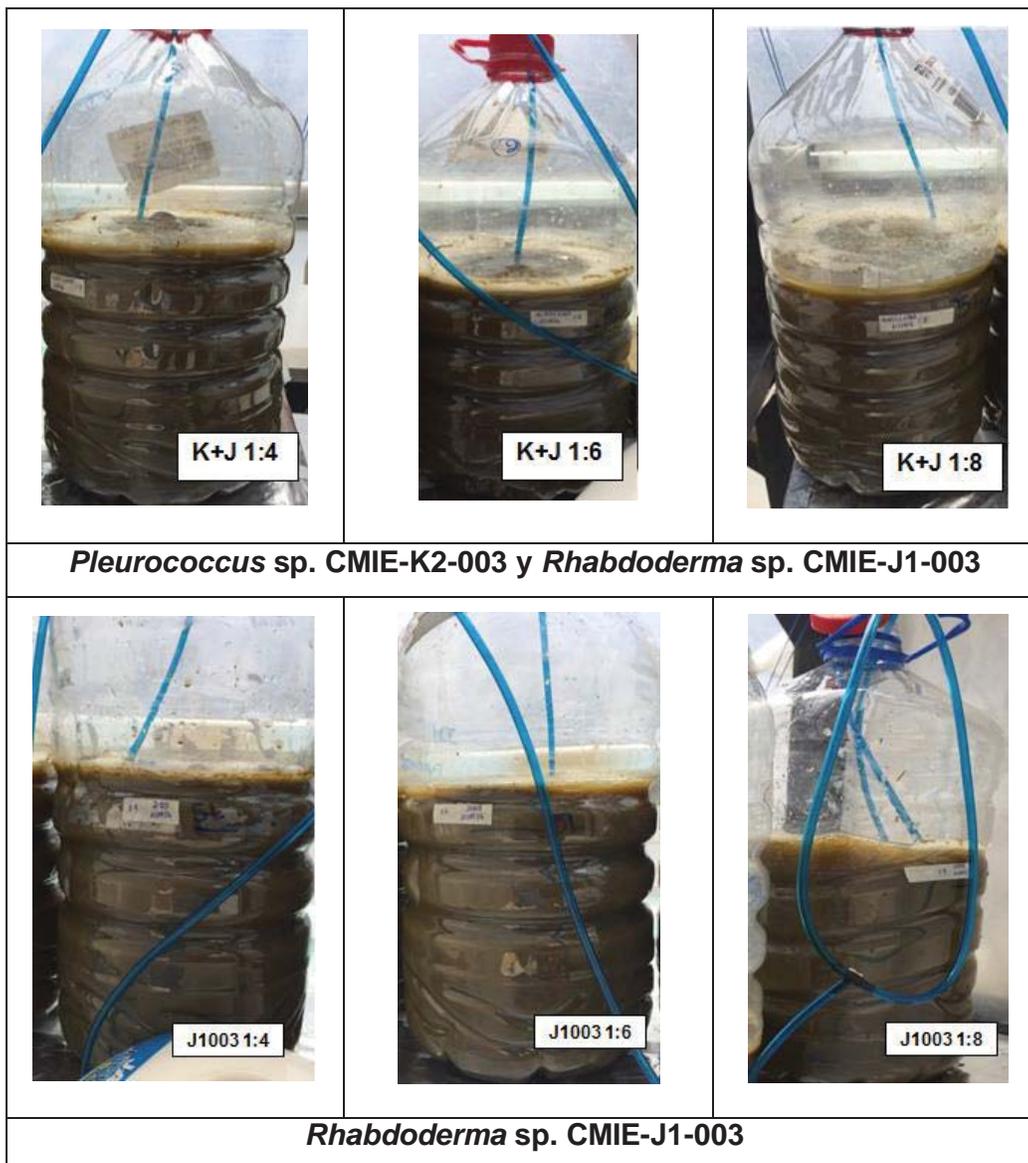
PH y CE: Al 20%

MO: POR CALCINACIÓN

[Signature]
RESPONSABLE LABORATORIO

[Signature]
LABORATORISTA

Anexo 5.- Reactores día 15 de experimentación





K2003 1:4



K2003 1:6



K2003 1:8

Pleurococcus sp. CMIE-K2-003



Blanco 1:4



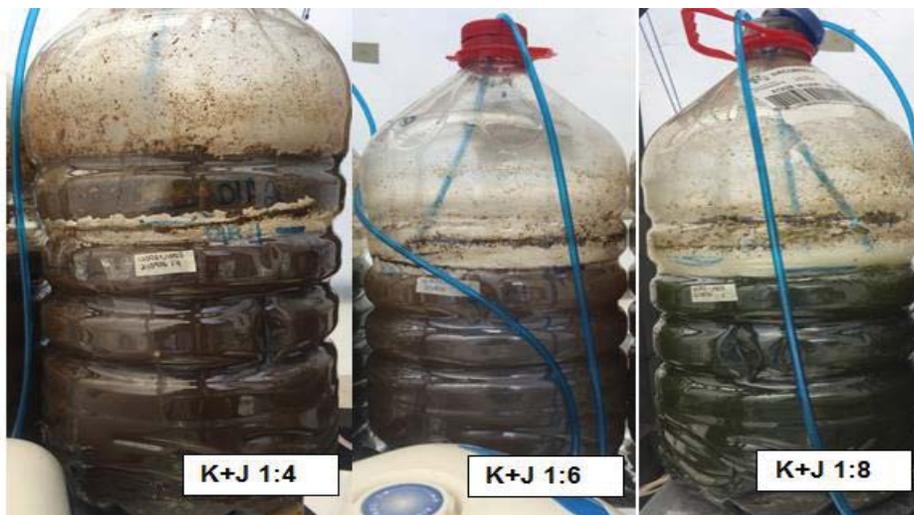
Blanco 1:6



Blanco 1:8

Blanco

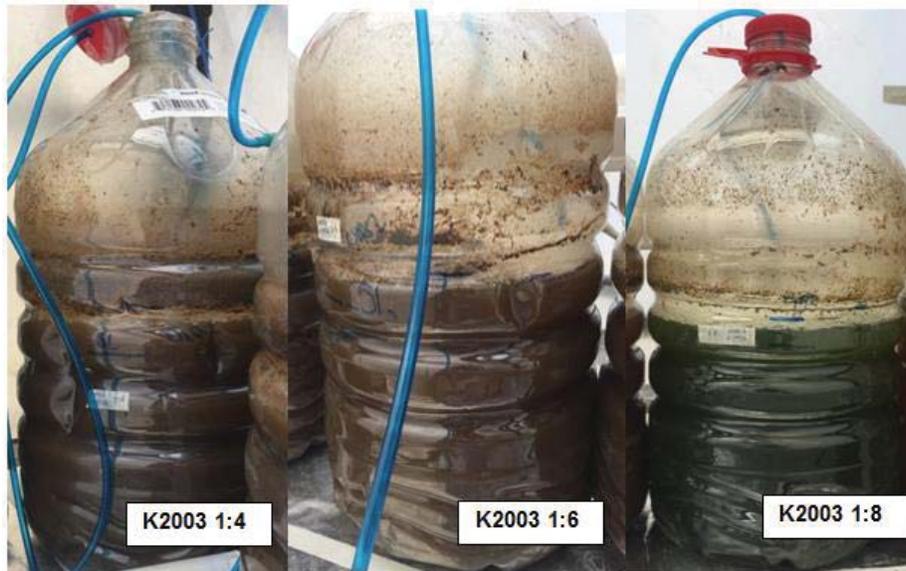
Anexo 6.- Reactores día 25 de experimentación



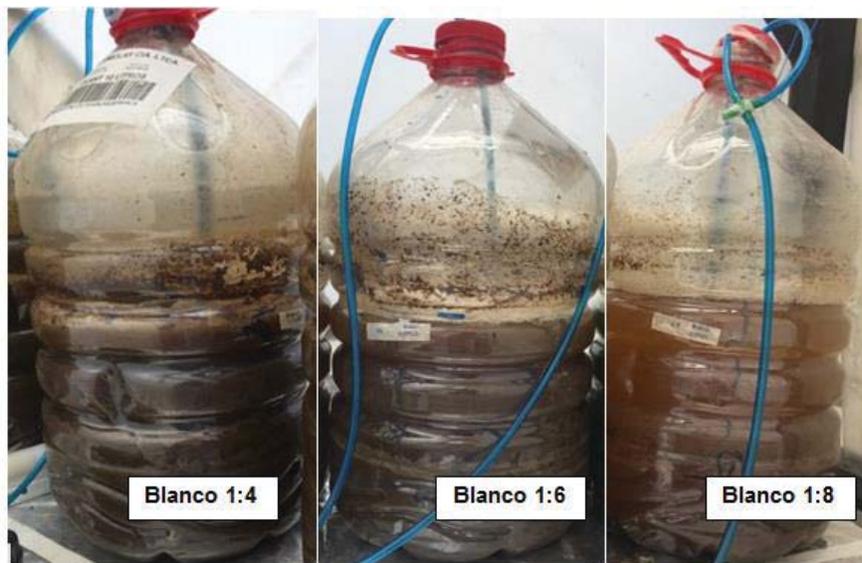
Pleurococcus sp. CMIE-K2-003 y *Rhabdoderma* sp. CMIE-J1-003



Rhabdoderma sp. CMIE-J1-003



Pleurococcus sp. CMIE-K2-003



Blanco

Anexo 7. Obtención de muestras



Centrifugación de las muestras



**Muestras con presencia de
Microalgas**



**Muestras sin presencia de
microalgas**



**Muestras sin presencia
microalgas**



**Muestras con presencia
microalgas**



Muestras para analizar en Laboratorio INIAP

