



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMEDIACIÓN DE AGUAS
RESIDUALES GRISES MEDIANTE UN SISTEMA BASADO EN MICROALGAS

Autora

Natalia Priscila Merino Padrón

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES
GRISES MEDIANTE UN SISTEMA BASADO EN MICROALGAS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos
para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor guía

Ph.D. Laura Guerrero Latorre

Autora

Natalia Priscila Merino Padrón

Año

2017

DECLARACIÓN DEL DOCENTE GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la 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”

Laura Guerrero Latorre

Doctora en Microbiología Ambiental y Biotecnología

C.I: 1758028896

DECLARACIÓN DEL DOCENTE CORRECTOR

“Declaramos haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación

Mayra Fernanda Chico Terán

Master en Biotecnología

C.I: 1003327044

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos.

Nory Paola González Romero

Magister Scientiarum mención Microbiología

C.I: 0704529189

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”.

Natalia Priscila Merino Padrón

C.I: 0603870692

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios, autor y dueño de mi vida

A mis padres y hermano,

A mis tíos y ñaños Ramiro, Silvana

Christian y Verito. A Nory G. y Cristina G., por la oportunidad de formar parte de BIOTEC.

A SWISSAID Ecuador. A las docentes Laura G. y Fernanda Ch. A mis amigos, Pame, Juan, Nikole, Gaby y Ale. A mis amigos y hermanos mayores de la fe, Diego y Ali.

DEDICATORIA

A mí amado Salvador y amigo fiel, quien me ha tomado de la mano y me ha llevado por su camino, quien con lazos de amor ha atraído mi corazón hacia Él, a quien quiero imitar y servir por el resto de mi vida. Yo te lo debo todo a Ti, bendito

Jesús

RESUMEN

La desmedida e incontrolada descarga de aguas residuales grises al ambiente ha causado graves problemas ambientales y de abastecimiento a nivel mundial. El sector agrícola enfrenta una situación crítica de déficit hídrico, lo cual, en el Ecuador, se presenta con mayores problemas en las provincias de la Sierra central. Ante dicha problemática, se han propuesto varios mecanismos de remediación de aguas, entre los cuales, se destacan los tratamientos biológicos. Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que tienen la capacidad de crecer en medios de aguas residuales y a la vez reducir la carga contaminante. En el presente estudio se evaluó la eficiencia de remediación de aguas residuales grises de la provincia de Cotopaxi mediante un sistema basado en microalgas, colectadas en reservas de la región, con el fin de determinar el tratamiento más eficiente de remediación. Para ello, se evaluaron las cepas *Chlorella* sp, *Pleurococcus* sp, y *Chlorococcum* sp. Se analizó la cinética de crecimiento microalgal (μ y t_d) durante 25 días y los índices de parámetros indicadores de la calidad de agua en cada unidad experimental con agua residual gris con y sin la aplicación del fertilizante foliar Nitrofoska® (1mL/L). Los resultados demostraron que las cepas estudiadas crecen y se replican adecuadamente en un medio de agua residual gris proveniente de la misma región. El estudio de las diferentes cepas no muestra diferencia significativa entre ellas para el tratamiento del agua residual gris. Sin embargo, *Chlorella* sp, exhibió un desarrollo cinético y mayor rendimiento. La adición del fertilizante no mostró un efecto positivo en el crecimiento de ninguna de las cepas estudiadas. Todos los tratamientos microalgales indicaron una reducción significativa de los parámetros: pH, tensoactivos, DQO y coliformes totales incluyendo los controles. No obstante, la conductividad eléctrica demostró una reducción exclusiva en los tratamientos microalgales con la aplicación de Nitrofoska®. El agua residual gris tratada mediante microalgas endémicas cumple con las regulaciones impuestas por el Ministerio del Ambiente para aguas de riego, excepto para los niveles de coliformes totales, indicando la viabilidad de este sistema complementado con técnicas de desinfección.

ABSTRACT

The uncontrolled discharge of gray wastewater into the environment has caused serious environmental and supply problems worldwide. The agricultural sector is facing a critical water deficit situation, which, in Ecuador, presents with greater problems in the provinces of Central sierra. Faced with this problem, several water remediation mechanisms have been proposed, among which biological treatments stand out. Microalgae are photosynthetic microorganisms that have the capacity to grow in wastewater media and at the same time reduce the pollutant load. The present study evaluated the efficiency of remediation of gray wastewater in the province of Cotopaxi through a system based on microalgae, collected in reserves from the region, with the aim to determine the most efficient remediation treatment. For this, the strains *Chlorella* sp, *Pleurococcus* sp, and *Chlorococcum* sp. were analyzed as well as microalgal growth kinetics (μ and t_d) for 25 days. The indexes of water quality parameters in each experimental unit with gray residual water were analyzed with and without the application of Nitrofoska® (1mL/L) foliar fertilizer. The results showed that the studied strains grow and replicate adequately in a medium of gray residual water from the same region. The study of the different strains shows no significant difference between them for the treatment of gray wastewater. However, *Chlorella* sp, exhibited increased kinetic development and yield. The addition of the fertilizer did not show a positive effect on the growth of any of the studied strains. All microalgal treatments indicated a significant reduction of pH, surfactants, COD and total coliforms including controls. However, electrical conductivity demonstrated an exclusive reduction in microalgal treatments with the application of Nitrofoska®. Gray wastewater treated by endemic microalgae fulfills with the regulations imposed by the Ministry of the Environment for irrigation waters, except for total coliform levels, indicating the feasibility of this system once has been supplemented with disinfection techniques.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Planteamiento del problema	4
1.3 Objetivo general.....	6
1.4 Objetivos específicos.....	7
1.5 Justificación de la investigación	7
2. Capítulo II. Marco teórico	8
2.1 Acceso al agua.....	8
2.1.1 Disponibilidad y estrategias	8
2.2 Contaminación del agua	11
2.2.1 Fuentes de contaminación del agua.....	12
2.2.1.1 Contaminación de origen natural.....	12
2.2.1.2 Contaminación de origen artificial	12
2.2.2 Tipos de contaminantes según la naturaleza	13
2.2.2.1 Física.....	13
2.2.2.2 Química.....	13
2.2.2.3 Biológica.....	13
2.3 Aguas residuales	13
2.3.1 Tipos de aguas residuales	14
2.4 Aguas residuales domésticas	14
2.4.1 Aguas residuales negras	16

2.4.2	Aguas residuales grises.....	16
2.5	Reutilización de aguas grises.....	18
2.5.1	Pretratamientos y tratamientos primarios.....	19
2.5.2	Tratamientos secundarios.....	20
2.5.3	Tratamientos terciarios	21
2.6	Microalgas.....	21
2.6.1	Generalidades: clasificación y aplicaciones.....	21
2.6.2	División Chlorophyta.....	23
2.6.3	Género <i>Chlorella</i>	24
2.6.4	Género <i>Chlorococcum</i>	25
2.6.5	Género <i>Pleurococcus</i>	26
2.7	Ficorremediación.....	27
2.7.1	Sistemas de tratamiento.....	29
2.7.1.1	Parámetros de crecimiento.....	29
2.7.1.2	Factores operacionales	31
2.8	Agua para riego agrícola: Parámetros y Normativa	32
2.8.1	Parámetros de calidad	32
2.8.2	Regulación de reutilización del agua residual	33
3.	Capítulo III. Diseño del plan experimental.....	35
3.1	Diseño y variables experimentales.....	35
3.2	Unidades experimentales	36
3.3	Controles experimentales.....	37
4.	Capítulo VI. Procedimientos.....	38

4.1	Población y muestra	38
4.2	Descripción de los materiales y métodos	39
4.2.1	Diagrama de flujo del proceso metodológicos	39
4.2.2	Fase 1: Cultivo de cepas microalgales	41
4.2.2.1	Cinética de crecimiento: cálculo de la densidad celular	41
4.2.2.2	Parámetros cinéticos de crecimiento: velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación	42
4.2.2.3	Escalado del cultivo de microalgas	43
4.2.3	Fase 2. Muestreo de agua gris	44
4.2.3.1	Lugar de colecta	44
4.2.3.2	Proceso de muestreo	45
4.2.4	Fase 3. Caracterización físico-química y biológica del agua residual gris	47
4.2.5	Fase 4. Formulación e instalación de unidades experimentales.....	52
4.2.6	Fase 5. Periodo de ficorremediación.....	54
4.2.6.1	Evaluación de la cinética de crecimiento.....	54
4.2.7	Fase 6. Análisis experimental intermedio.....	54
4.2.7.1	Recuperación del agua residual tratada.....	54
4.2.8	Fase 7. Análisis físico-químico y biológico post-prueba	54
4.3	Evaluación estadística de los resultados	55
5.	Capítulo V. Resultados y Discusión	55
5.1	Cinética de crecimiento y escalado de cepas microalgales .	55
5.1.1	Cepa Pleurococcus sp., CMIE I6-001	56

5.1.1.1	Curva de crecimiento y parámetros cinéticos.....	56
5.1.1.2	Microscopía de células de <i>Pleurococcus</i> sp, en cultivo.....	57
5.1.2	Cepa <i>Chlorococcum</i> sp., CMIE A1-004	58
5.1.2.1	Curva de crecimiento y parámetros cinéticos de <i>Chlorococcum</i> sp.	58
5.1.2.2	Microscopía de células de <i>Chlorococcum</i> sp, en cultivo	59
5.1.3	Cepa <i>Chlorella</i> sp., CMIE I8-003.....	59
5.1.3.1	Curva de crecimiento y parámetros cinéticos.....	59
5.1.3.2	Microscopía de células de células de <i>Chlorella</i> sp, en cultivo ...	61
5.2	Caracterización de la muestra inicial de agua residual gris .	61
5.3	Evaluación de la eficiencia de biorremediación de aguas residuales grises de los tratamientos microalgales.....	63
5.3.1	Cinética y parámetros de crecimiento de las unidades de tratamiento.....	63
5.3.1.1	Tratamientos con la cepa <i>Pleurococcus</i> sp., cepa CMIE-I6-001, con y sin la aplicación de Nitrofoska®	67
5.3.1.2	Tratamientos con la cepa <i>Chlorococcum</i> sp., con y sin la aplicación de Nitrofoska®	69
5.3.1.3	Tratamientos con la cepa <i>Chlorella</i> sp., con y sin la aplicación de Nitrofoska®.....	71
5.3.2	Parámetros indicadores de la calidad de agua para riego	73
5.3.2.1	Conductividad eléctrica (CE).....	73
5.3.2.2	pH.....	77
5.3.2.3	Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	80
5.3.2.4	Carbonatos de calcio.....	84
5.3.2.5	RAS	87

5.3.2.6	Tensoactivos aniónicos	89
5.3.2.7	Coliformes totales.....	93
6.	Conclusiones y recomendaciones.....	98
6.1	Conclusiones	98
6.2	Recomendaciones.....	99
	Referencias.....	100
	ANEXOS	128

1. Capítulo I. Introducción

1.1 Antecedentes

El deterioro de la calidad de agua, escasez y contaminación del medio ambiente se debe principalmente al desarrollo industrial y a la creciente expansión de la población a nivel mundial. Las descargas de aguas residuales contienen una alta concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos, lo cual provoca, entre otros efectos, la eutrofización del ecosistema (Bermeo, 2011). Además, dependiendo del origen del efluente, también pueden presentarse metales tóxicos, los cuales producen un severo impacto sobre la vida acuática, animales y seres humanos (Chalivendra, 2014).

Con el objetivo de dar solución a este apremiante problema de contaminación a lo largo de los años se han desarrollado varias tecnologías de tratamiento para la descontaminación y reutilización de aguas. Los sistemas basados en tratamientos biológicos han sobresalido como los métodos de mayor eficiencia y a la vez amigables con el medio ambiente. Entre los cuales, se ha reportado el empleo de sistemas bacterianos aerobios, anaerobios, nuevas tecnologías como la patente Annamox (Mulder, Graaf, Robertson, & Kuenen, 1995) y también el empleo de microorganismos fotosintéticos, tales como las microalgas, los cuales son capaces de potenciar su crecimiento en aguas residuales, disminuir el exceso de nutrientes y contaminantes (Sydney et al., 2011). El empleo de microalgas, a diferencia del uso de los tratamientos terciarios habituales como los lodos activados, ofrece una mayor eficiencia en la eliminación de metales y nutrientes, una nula generación de subproductos tóxicos, una ventajosa relación costo-beneficio y la biomasa generada puede ser potencialmente aprovechada en la producción de biocombustibles de tercera generación y otras aplicaciones (Hoffmann, 1998).

Los géneros microalgales más estudiados para la biorremediación de aguas residuales son: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Nannochloris*, *Botryococcus* y *Spirulina*, entre otros de la división Chlorophyta. El grado de descontaminación se ha evaluado en base a varios parámetros indicadores de la calidad de agua, los cuales mayormente han sido la reducción de nitrógeno, fósforo y el índice de la demanda química de oxígeno (DQO) (Cho, Luong, Lee, Oh, & Lee, 2011; Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson, 2010a; Zhang, Wang, Wang, Zhang, & Zhao, 2008).

El estudio del tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas no es reciente. En 1957, Golueke, Oswald, & Gotaas, investigaron por primera vez el efecto de la fotosíntesis en la degradación de compuestos de las aguas residuales, instituyendo varias pautas para el adelanto de las investigaciones concernientes con el aprovechamiento de los organismos fotosintéticos como una alternativa de biorremediación. A partir de esta premisa, varios estudios se han orientado en la optimización y desarrollo de técnicas que permitan explotar al máximo la capacidad de las microalgas en la remoción de nutrientes y descontaminación de aguas, tanto a escala de laboratorio como a escala piloto. Los resultados reportados han sido favorables, demostrando reducciones del 90% de nutrientes (Shelef & Soeder, 1982; Zhang et al., 2008; Zhu et al., 2008).

Las microalgas poseen cualidades metabólicas favorables que les permiten asimilar y degradar los compuestos contaminantes de las aguas residuales. Además, debido a su capacidad de detección de compuestos tóxicos han sido consideradas como biosensores ambientales (Olguín, 2003). Wang y colaboradores (2010) evaluaron la remoción de nutrientes de aguas residuales de cuatro localidades municipales empleando cultivos de *Chlorella* sp, concluyendo que este género es eficiente en la remoción de compuestos orgánicos, como fósforo y nitratos. Además, reduce significativamente el índice de DQO.

Kshirsagar (2013) reportó en su estudio un aumento de la tasa de crecimiento de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus quadricauda* en muestras de agua residual doméstica. Con respecto a la remoción de contaminantes, los tratamientos con la cepa *C. vulgaris* reportaron una mejor tasa de crecimiento, mientras que, una reducción más eficiente de la demanda bioquímica de oxígeno se alcanzó en los tratamientos mediante *S. quadricauda*.

Las aguas residuales, principalmente domésticas, contienen un alto índice de surfactantes iónicos y aniónicos, los cuales al ser descargados en el ambiente pueden provocar efectos altamente tóxicos en la vida de los organismos (Oros, Forga, & Cserha, 2002). La remoción de surfactantes se ha concentrado en los tratamientos biológicos, debido a la simplicidad, bajo costo y efectividad en comparación con los sistemas de tratamientos fisicoquímicos de remoción (Oros et al., 2002). Los estudios reportan mayoritariamente el uso de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación de surfactantes (Jeřábková, Králová, & Náhlík, 1999; White & Thomas, 1990). Los sistemas de tratamiento anaerobios de igual forma han sido evaluados en la degradación de tensoactivos y jabones, los resultados obtenidos demostraron que al término de un periodo fermentativo de 28 días se alcanza una degradación del 92 al 97% de estas sustancias (Steber & Wierich, 1987).

Existen estudios con reportes del uso de cianobacterias en simbiosis con bacterias aerobias heterotróficas para la degradación de surfactantes de origen fósil. Tal es el caso del estudio de Abed & Köster (2005), en el cual se pudo concluir que las cianobacterias por sí solas no fueron las responsables de la degradación de los surfactantes, sino que contribuyeron indirectamente con la acción de biodegradación bacteriana. Hasta la fecha no se han reportado estudios que evalúen el potencial de las especies de microalgas de la división Chlorophyta en la degradación de compuestos surfactantes en las aguas residuales, siendo este un aspecto importante en los tratamientos de aguas residuales aún por explorarse.

El género *Pleurococcus* no registra reportes bibliográficos con respecto a su aplicación en tratamientos de aguas residuales. Sin embargo, en el Ecuador, Vela (2016), evaluó el potencial de este género en la remoción de mercurio de aguas provenientes de actividades mineras de la zona costera del país, demostrando una eficiencia del 88% de remoción. La eficiencia de remediación del género *Chlorococcum* ha sido evaluado en consorcio con *Scenedesmus*, dando como resultado índices favorables en la reducción de DBO₅, DQO, sulfatos, nitrógeno y fósforo total (Meneses, 2015b). Además, en estudios enfocados a la masificación de biomasa microalgal en aguas residuales para la producción de biodiesel, *Chlorococcum* sp., presentó la mayor tasa de crecimiento, productividad y acumulación de lípidos con respecto a otras cepas microalgales cultivadas (Mahapatra & Ramachandra, 2013b).

La reutilización de aguas residuales trae consigo múltiples beneficios, especialmente para el abastecimiento del riego en la agricultura. A nivel económico, la reutilización de aguas tratadas propicia un ahorro significativo en la búsqueda y acondicionamiento de nuevas fuentes hídricas para dar abasto a la demanda. Por otro lado, las aguas residuales tratadas al ser vertidas en el suelo de forma controlada pueden tener un efecto fertilizante sobre el mismo debido a su contenido nutricional (FAO, 2015)

1.2 Planteamiento del problema

Entre las principales causas de contaminación del ecosistema a nivel mundial, la descarga de aguas residuales se ha constituido como una de las más invasivas y principal fuente de agentes patógenos y sustancias tóxicas (OMS, 2006a). El mal manejo de los efluentes ha provocado graves problemas de abastecimiento de agua contaminada, ya que estas son eliminadas sin ningún tipo de tratamiento (OMS, 2016). La sobrecarga de contenido nutricional que presentan los efluentes de las aguas residuales también produce un exagerado efecto fertilizante sobre los cuerpos de agua o sustratos ecológicos, dando lugar al fenómeno de eutrofización. Este fenómeno provoca la devastación y

descompensación de los ecosistemas acuáticos, además, debido a la exposición de compuestos químicos peligrosos la salud del ser humano se ve amenazada (Environmental Protection Agency, 2016).

Adicional a ello, debido al surgimiento de varios fenómenos ambientales conexos al cambio climático, expansión demográfica, urbanización y el incremento de la demanda de agua segura, se han pronosticado serios problemas que comprometen aún más la dotación de agua para la población y las pertinentes actividades productivas y económicas a nivel mundial. La OMS (2006b), mediante comunicaciones presentadas, estima que para el año 2025 el 50% de la población mundial sufra de escasez de agua.

En las ciudades de los países en vías de desarrollo, los reportes indican, que menos del 35% de la población dispone de un sistema de alcantarillado conectado a un tratamiento de aguas residuales y en el caso de presentarlo, la mayor parte se enfoca en la reducción de residuos sólidos mas no en la reducción de nutrientes (UNEP, 2007). En el Ecuador, la situación hídrica refleja un considerable desabastecimiento de agua, especialmente en el área rural de la sierra centro del país, trayendo consigo un retroceso económico, social y político (Winpenny, Heinz, & Koo-Oshima, 2010).

Los sectores rurales de las provincias de Cotopaxi, Bolívar y Chimborazo presentan los mayores índices de escasez de agua, a pesar de situarse geográficamente en lugares cercanos a cuerpos de agua, como los páramos y nevados andinos. (GAD Provincia de Cotopaxi, 2015). Adicionalmente, la situación se agrava mucho más durante la estación seca, donde las precipitaciones medias anuales decrecen drásticamente hasta menos de 300mm (FAO-AQUASTAT, 2015). En las zonas rurales de la sierra la principal técnica de riego es por superficie (78%), por lo que se encuentra permanentemente latente la posibilidad de que aguas residuales, no tratadas,

se canalicen hacia el regadío de los cultivos agrícolas (Fao, 2002). La calidad de agua destinada para el riego en esta zona se ha visto amenazada por el vertimiento de aguas residuales, empleo de agroquímicos y la disposición final de desechos sólidos. Dichos problemas se han acentuado más debido al desconocimiento de buenas prácticas ambientales por parte de los pobladores, cuya realidad refleja que solo el 12,84% de los habitantes ha recibido algún tipo de capacitación ambiental y únicamente el 15.33% considera y practica el reciclaje de varios tipos de desechos (CEPAL, 2011).

En el Ecuador, la provincia de Cotopaxi es una de las provincias con mayor actividad agrícola, a pesar de presentar un déficit de riego del 75% de la superficie de fondo productivo provincial, carencia que abarca a 192,867 ha de terreno cultivable según notificaciones de la Secretaria del Agua (2013). En vista de dicha situación la comunidad agrícola ha recurrido al uso totalmente inadecuado de agua residual sin tratamiento para suplir, en parte, la escasez del recurso hídrico.

Esta realidad manifiesta la necesidad de ampliar la investigación de sistemas eficientes de purificación de aguas residuales que permitan tratar y reutilizar los efluentes de aguas residuales en zonas en las cuales el suministro hídrico es carente. De esta forma se brindarán las facilidades para impulsar el desarrollo socio-económico y potencializar las actividades productivas, mejorando la calidad de vida de la población y cuidando la integridad del medio ambiente.

1.3 Objetivo general

Evaluar la eficiencia de remediación de aguas residuales grises empleando microalgas mediante el análisis de la tasa de crecimiento y la evaluación de varios parámetros indicadores de la calidad de agua.

1.4 Objetivos específicos

Evaluar la tasa de crecimiento microalgal mediante el análisis de curvas y parámetros cinéticos de crecimiento.

Establecer el tratamiento más eficiente para la remediación de aguas grises mediante el análisis de los índices de varios parámetros indicadores de la calidad de agua.

1.5 Justificación de la investigación

Los tratamientos de aguas residuales que dan lugar a su reutilización se presentan como la alternativa más factible para contrarrestar la problemática de escasez de agua y contaminación ambiental. El sector agrícola es uno de los principales beneficiarios, teniendo en cuenta los múltiples desafíos de abastecimiento que enfrenta actualmente. La implementación de sistemas de tratamiento contempla el cumplimiento de rigurosos controles de calidad que aseguren su inocuidad e idoneidad para el riego (Parra, n.d.).

La ficorremediación es el tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas. Esta tecnología ofrece ciertos beneficios y ventajas sobre los tratamientos biológicos convencionales empleados para el tratamiento de aguas residuales a nivel descentralizado, como es el caso del tratamiento domiciliario (Han, Zhang, & Yan, 2000). El empleo de microalgas como tratamiento de aguas demanda una menor inversión en la implementación del sistema, generando una favorable relación costo-beneficio (Forero, n.d.). Los tratamientos mediante ficorremediación aún requieren de investigaciones más exhaustivas, de tal forma que se desarrollen sistemas más eficientes de acuerdo a las condiciones y características de los sectores en los cuales se pretenda implementar el sistema de tratamiento.

En el Ecuador, la investigación concerniente al tratamiento de aguas residuales mediante ficorremediación es limitada. Actualmente, no existe ningún sistema

de tratamiento de aguas residuales empleando microalgas con la proyección a ser reutilizadas en el riego acoplado a un procedimiento tecnificado bajo las condiciones de los efluentes de la zona a ser tratados. Este tipo de estudios benefician directamente al sector agrícola y a la población, especialmente la rural, que se sustentan principalmente de las actividades agrícolas como fuente económica. Además, el cuidado y control de la contaminación del medio ambiente favorece el mejoramiento de la calidad de vida del ser humano y su entorno.

2. Capítulo II. Marco teórico

2.1 Acceso al agua

El agua es el recurso natural indispensable para el desarrollo de todos los organismos vivos. Es el elemento más abundante de la tierra, sin embargo, solo el 2,53% corresponde al agua dulce apta para el consumo y empleo del hombre (ONU, 2003). Es un recurso no renovable, cuyo ciclo natural parte de las precipitaciones y desemboca en los cuerpos de agua como los ríos, mares, lagos y humedales (Perlman, 2016). Se considera que las reservas abastecen la demanda de las necesidades de la población mundial, sin embargo, persiste una distribución inequitativa, desperdicio y contaminación debido a una gestión poco eficiente e inapropiada (UNESCO, 2017).

2.1.1 Disponibilidad y estrategias

La población mundial desde el siglo XX hasta el siglo XXI se triplicó dando lugar a que las extracciones de agua se sextuplicaran del tan solo 1% de agua superficial fácilmente accesible. Estos eventos han causado un aumento en el grado de presión sobre los recursos hídricos en todo el mundo. Las regiones que registran una mayor extracción de este recurso son: India, China y Estados Unidos de América, entre los países centro y sur americanos, se destacan:

México y Brasil, ubicados en la octava y décima cuarta posición del ranking de países del mundo con mayor extracción de agua (Agudelo, 2005).

Los usos del agua a nivel mundial se han agrupado en cuatro categorías, las cuales son: agrícola, abastecimiento del sector público, industrial y la generación de energía eléctrica (FAO, 2016). El sector agrícola abarca el 76,7% del uso total de las extracciones del agua a nivel mundial, el cual asigna la mayor parte de extracciones hídricas al riego. En segundo lugar se encuentra el sector público con un 14,1%, tal como se describe en la Figura 1.

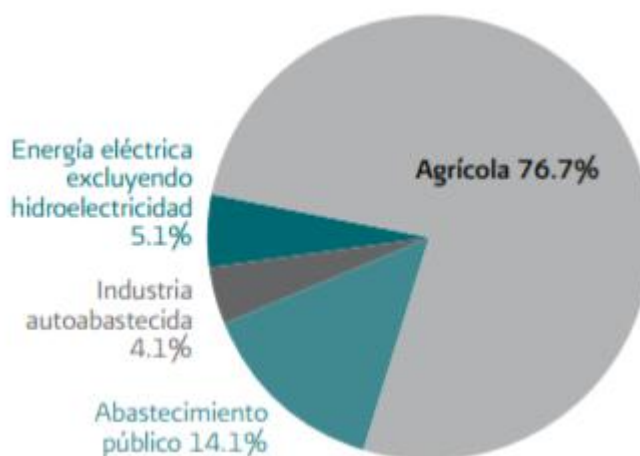


Figura 1: Distribución de los volúmenes concesionados para usos agrupados.

Tomado de: (Comisión Nacional del Agua, 2011)

A pesar, de que el sector agrícola emplea la mayor parte de las extracciones hídricas, en muchos de los casos la oferta no satisface la demanda de riego para el cultivo. Existe un alto déficit de agua apta para el riego en algunos sectores, lo cual se ha generado por varios motivos, tales como: el inclemente crecimiento de la demanda frente a la disponibilidad de recursos hídricos estáticos, la contaminación de los cuerpos de agua por diversas fuentes puntuales y no puntuales y los recurrentes periodos de sequías provocados por fenómenos del cambio climático (FAO, 2015).

En situaciones de escasez de agua para el riego, las autoridades tienden a ejercer políticas que derivan el agua destinada a los agricultores hacia fines con mayor valor económico y social, como son las actividades industriales y urbanas. Es por ello, que se ha catalogado como insostenible la tasa de crecimiento de la demanda agrícola de recursos de agua dulce (UNESCO, 2015, p. 6-8).

Las perspectivas en torno al abastecimiento del agua en el mundo son diversas. En Europa y América del Norte, se ha establecido como estrategia de mitigación, que para el 2020 la extracción de los recursos hídricos será de menos del 20% de la totalidad de recursos renovables disponibles. La situación en Asia presagia una gran amenaza de la sostenibilidad de la producción agrícola, debido a la explotación desmedida de los recursos hídricos subterráneos para el riego (UNESCO, 2015, p. 9).

En América Latina y el Caribe existe una relativa abundancia de agua. Es por ello que las políticas se están direccionando hacia una mejor y más consolidada gobernanza de este recurso, como elemento útil en el desarrollo socioeconómico y reducción de la pobreza. En estas regiones la mayor parte de actividades económicas se basa en el extractivismo, lo cual demanda de una gran cantidad de agua (Jouravlev & Hantke, 2011). En la Figura 2 se presentan los niveles de escasez de agua en América Latina y el Caribe y a nivel mundial por cuenca hidrográfica en función de la demanda para el riego agrícola.

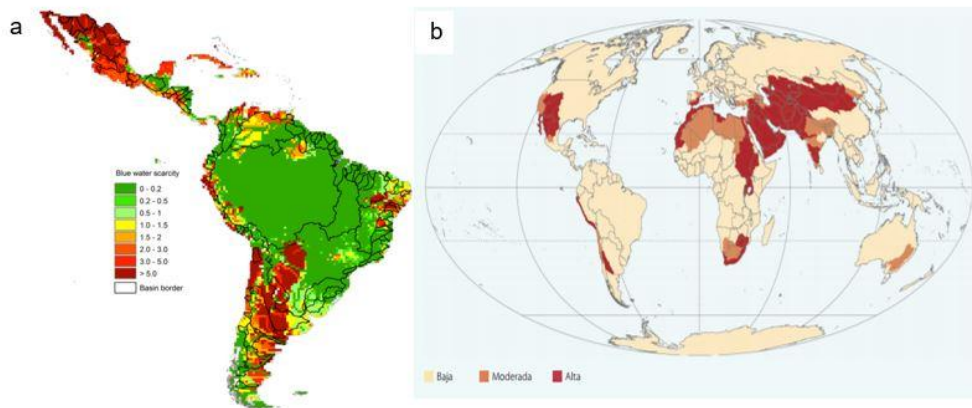


Figura 2. Niveles de escasez de agua.

Tomado de: (FAO & Eathscan, 2011; Herbison, 2014)

(a) América Latina y el Caribe. (b) a nivel mundial en las principales cuencas hidrográficas en función de la demanda agrícola.

En el Ecuador, el abastecimiento de agua se ha convertido en un problema de gran impacto. A pesar, de contar con precipitaciones anuales que en promedio alcanzan los 1200 milímetros, en varios sectores se enfrentan constantes eventos de desabastecimiento y escasez. Esto se debe a una distribución desigual, contaminación de las cuencas hídricas, deforestación, efecto del cambio climático, mal manejo de los efluentes contaminados y desperdicios (U.S. Army Corps of Engineers, 1998). De la totalidad del agua disponible, solo se utiliza el 10%, de los cuales, el 97% se destina para las actividades agrícolas de las regiones de las planicies costeras y de los Andes. El 3% restante, se utiliza en las actividades domésticas e industriales (CEPAL, 2011).

2.2 Contaminación del agua

Se define como contaminación a la acción y el efecto de añadir o introducir cualquier tipo de material o energía calorífica en cantidades que provocan cambios o alteraciones indeseables y perjudiciales en los recursos naturales (Barba, 2002). En el ciclo natural del agua se presentan condiciones que dan lugar a la purificación y regeneración de este recurso. Sin embargo, dichas facilidades y la estimada cantidad de líquido vital, han causado que los cuerpos

hídricos sean los vertederos habituales de toda clase de contaminantes y efluente. Dependiendo del grado de contaminación, en muchos de los casos, puede convertir a las aguas en peligrosas y dañinas para la salud humana y vida.

2.2.1 Fuentes de contaminación del agua

Las fuentes de contaminación se han clasificado bajo dos criterios según su origen: de origen natural y humano o también conocidas como artificiales.

2.2.1.1 Contaminación de origen natural

La contaminación de origen natural es aquella que se produce por emanaciones, generalmente desde la corteza de la tierra, de elementos químicos contaminantes y que tienen contacto con cuerpos de agua como ríos y océanos, por ejemplo: sales minerales, arsénico, magnesio, mercurio, hierro, entre otros. La concentración de las descargas no suelen provocar altos niveles de contaminación y su degradación se lleva a cabo bajo el sistema biológico natural de la zona (Ortega, 2014).

2.2.1.2 Contaminación de origen artificial

Este tipo de contaminación es provocada por la acción antropogénica como resultado de las actividades económicas, tales como:

- **Industriales:** El vertido de efluentes y su contenido contaminante va a depender del tipo de industria. Las principales sustancias provienen de los sectores industriales: de la construcción, minería, energía, siderurgia, química orgánica, inorgánica y papel.
- **Navegación:** De este sector económico se derivan peligrosos contaminantes de origen fósil, los cuales en su mayoría se vierten al ecosistema accidentalmente.
- **Agricultura y ganadería:** Los vertidos procedentes de las actividades agropecuarias contienen: pesticidas, fertilizantes y trazas de materia orgánica. Las descargas se las hacen de forma directa al ecosistema, es decir, sin emplear las redes de saneamiento urbanas.

- **Vertidos urbanos:** Estos efluentes corresponden principalmente a residuos de origen doméstico y también acarrear sustancias presentes en las emisiones de los autos (Barba, 2002)

2.2.2 Tipos de contaminantes según la naturaleza

2.2.2.1 Física

Varios parámetros y agentes como: la temperatura, materiales en suspensión, radiactividad, espumas y conductividad eléctrica, causan alteraciones a nivel biológico, del ecosistema y organoléptico en las aguas. La presencia de sustancias de esta naturaleza dificulta la actividad biológica y por ende la degradación y autodepuración de los efluentes (Junta de Andalucía, n.d.).

2.2.2.2 Química

La presencia de sustancias orgánicas, inorgánicas, detergentes, pesticidas, aniones y cationes en los efluentes causan variaciones drásticas en la comunidad biótica, eutrofización en las líneas tróficas, esterilidad y muerte de las especies. Además, provocan alteraciones en los índices del pH, concentraciones de oxígeno disuelto, entre otros parámetros indicadores de la calidad de agua (Rico, 2003).

2.2.2.3 Biológica

Comprende la presencia de diferentes tipos de microorganismos patógenos: bacterias, protozoos, hongos y virus. Dichos microorganismos indican la contaminación por descargas de residuos fecales y restos orgánicos. Son causantes de enfermedades e incluso de la muerte del ser humano y animales. Una de las formas en las que se evalúa la salubridad de las aguas es a través del análisis de indicadores fecales bacterianos usando el índice de unidades formadoras de colonias fecales por cada 100mL de agua (Barba, 2002).

2.3 Aguas residuales

Las aguas residuales son aguas cuyas propiedades y características han sido modificadas por la actividad del ser humano, las cuales para ser reutilizadas, vertidas a un cuerpo de agua o descargadas a un sistema de alcantarillado requieren de un tratamiento previo. Se derivan del uso del agua a nivel

doméstico e industrial y contienen una alta concentración de sustancias tóxicas y microorganismos que representan un peligro para los seres vivos (OEFA, 2014).

En ciertos casos se han establecido diferencias entre aguas residuales y servidas ya que las aguas residuales corresponden a la mezcla de los efluentes de las aguas domésticas y de las industrias, mientras que, las aguas servidas sólo provienen del uso interno de los domicilios.

2.3.1 Tipos de aguas residuales

Las aguas residuales pueden ser categorizadas de distintas formas, sin embargo, el esquema que se presenta a continuación (Figura 3) lo simplifica de acuerdo al origen de los efluentes:

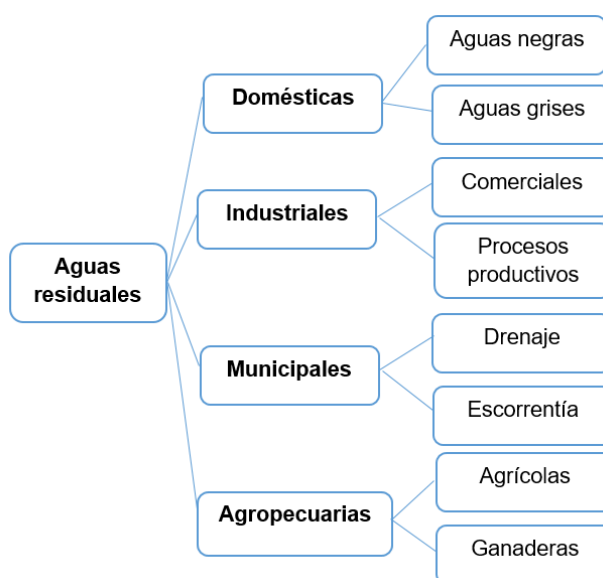


Figura 3. Clasificación de los tipos de aguas residuales según su origen.

Adaptado de: (G. Hernández, 2000)

2.4 Aguas residuales domésticas

Las aguas residuales domésticas son aquellas aguas de origen residencial ya sea de la zona urbana o rural, las descargas incluyen residuos líquidos y desechos sólidos, en un porcentaje inferior al 1% (Henze & Comeau, 2008).

Contienen una gran cantidad de impurezas en suspensión y disueltas, materiales putrescibles orgánicos, nutrientes vegetales, microorganismos patógenos, bacterias, virus y huevos de nematodos. Además, ciertas sustancias químicas empleadas principalmente en actividades de limpieza, como: detergentes, nitrógeno y fósforo (Hamburg Technische Universität, 2017).

Las aguas residuales domésticas resultan de la combinación de los efluentes de las aguas fecales (sanitario) y aguas de lavado y limpieza (cocina, duchas, lavamanos, lavandería) (Orozco, 2005). En la Tabla 1 se describe la composición típica de las aguas residuales domésticas.

Tabla 1.

Composición típica de las aguas residuales domésticas

Parámetros	Unidad	Concentración
Demanda biológica de oxígeno (DBO ₅), 5 días	mg O ₂ /l	350
Demanda química de oxígeno (DQO)	mg O ₂ /l	740
Carbón orgánico total (COT)	g C _{6,0} /m ³	250
Sólidos suspendidos (SS)	g SS/m ³	450
Sólidos suspendidos volátiles	g VSS/m ³	320
Alcalinidad (CaCO ₃)	mg/L	149-198
Conductividad	μS/cm	320-12000
Nitrógeno total	g N/m ³	23
Grasas y aceites	g/m ³	100
Coliformes totales	UFC/mL	1,3X10 ⁵ -2,5X10 ⁸
pH		6,9-8,7

Adaptado de: (Ledin, Eriksson, & Henze, 2001)

Las aguas residuales domésticas a su vez pueden ser clasificadas en dos categorías: las aguas procedentes del inodoro (aguas residuales negras) y las aguas del resto de fuentes (aguas residuales grises) (Environmental Protection Agency, 2017).

2.4.1 Aguas residuales negras

De acuerdo a la conceptualización de Tiller y colaboradores (2017), “las aguas negras están constituidas por una mezcla de orina, heces fecales y agua de lavado. Las heces presentes en el agua negra proporcionan la carga de microorganismos, mientras que, en la orina se encuentran nutrientes”. Este tipo de aguas también son conocidas como aguas cloacales o servidas.

Las aguas negras son fuente de una gran cantidad de agentes patógenos provenientes de las excretas de los seres humanos. Son las causantes principales de las enfermedades infecciosas en zonas con deficientes sistemas de alcantarillado y saneamiento debido a la contaminación de agua de consumo y alimentos. (ESPOL, n.d.)

2.4.2 Aguas residuales grises

Las aguas residuales grises son aquellas que se derivan de los efluentes domésticos de los lavaderos de cocina, lavandería, duchas y lavamanos. Su nombre se debe al aspecto turbio que presentan y a la condición intermedia en la que se encuentran, es decir, entre las aguas residuales negras y las aguas blancas (dulce y potable) (Eriksson, Auffarth, Henze, & Ledin, 2002).

Este tipo de aguas contienen altas concentraciones de sustancias químicas provenientes de los procesos domésticos. A diferencia de las aguas residuales, en general, las aguas grises presentan una menor concentración de nutrientes y materia orgánica. Además, con relación a las aguas negras, la concentración de microorganismos patógenos se reduce hasta la tercera parte (Universidad ICESI, 2017).

- **Características y composición**

La composición de las aguas grises varía de localidad en localidad y depende de varios factores, tales como: el estilo de vida de las personas, costumbres, instalaciones, sistemas de canalización, almacenamiento y productos

utilizados en las actividades domésticas (Water Supplies Department, 2015). La caracterización de las aguas grises se puede realizar en función de distintos parámetros.

- **Parámetros físicos**

Los parámetros físicos más importantes son: la temperatura, el color, la turbidez y el contenido de sólidos. La temperatura, al elevarse, tiene un efecto sobre la proliferación de la microbiota endémica del agua, la precipitación de sales inorgánicas y algunos compuestos (Morel & Diener, 2006). La fracción de materia orgánica de las aguas grises proviene de los restos de alimentos, fluidos animales, fibras y desperdicios de lavandería (Association for Rainwater harvesting and Water Utilisation, 2008).

- **Parámetros químicos y metales pesados**

Las aguas residuales grises presentan un pH básico (8-10) debido al contenido de productos químicos empleados en la lavandería. Los detergentes y jabones también aportan con un gran contenido de sodio y fosfatos (Imhof & Muhlemann, 2005). En cuanto a los parámetros DBO y DQO, las concentraciones dependen netamente del origen del efluente del agua gris (Eriksson et al., 2002). Las aguas grises contienen en ciertos casos inapreciables cantidades de metales pesados, el elemento que mayormente se ha encontrado es el Zinc, el cual está contenido en productos desinfectantes (Lesikar, Melton, Smith, & Neill, 2003).

- **Microorganismos**

Las aguas residuales grises presentan una menor concentración de microorganismos patógenos en comparación con las aguas negras, pero no nula, se encuentran varios tipos de microorganismos que provienen en mayor proporción de los sumideros de la cocina y lavamanos (Lucy Allen, Christian-Smith, & Palaniappan, 2010). Entre los microorganismos patógenos bacterianos predominan *Salmonella typhi* y *Salmonella paratyphi*, los parásitos más abundantes son los nemátodos del filo de vermes pseudocelomados y

algunos tipos de virus como el de la Hepatitis y enterovirus (Feachem, Bradley, Garelick, & Mara, 1983)

2.5 Reutilización de aguas grises

Las aguas grises son efluentes con un alto potencial de reutilización en diferentes aplicaciones, para ello es necesario aplicar sistemas de tratamientos de remediación. Como resultado del tratamiento se obtienen aguas completamente higiénicas, sin embargo, no son consideradas en el mismo nivel de calidad que el agua potable (Marsilli, 2005). Dependiendo del sector o el tipo de reuso que se pretenda dar a las aguas grises se aplicarán distintas estrategias.

La reutilización de aguas grises trae consigo muchos beneficios a nivel económico, preservación del medio ambiente y desarrollo social. El reciclaje de aguas residuales grises permite disminuir el consumo de agua potable del 40% al 16%, contribuyendo en la preservación del suministro de agua potable para satisfacer las necesidades que requieran de agua de más alta calidad (Laura Allen, 2015). A nivel medioambiental, la reutilización de aguas grises favorece la preservación de las cuencas hidrográficas y del ecosistema (Ling & Benham, 2014). Los sistemas de tratamiento de las aguas grises agrupan tres niveles: primarios, secundarios y terciarios.

Las aguas residuales grises presentan una alta concentración de tensoactivos, de los cuales la familia de los tensoactivos aniónicos son los más abundantes y utilizados a nivel industrial y doméstico. Estos compuestos al ser descargados en ecosistemas acuáticos y cuerpos hídricos sin previo tratamiento pueden causar graves daños al medio ambiente, como la alteración de los ciclos de vida de los organismos vivos, alteraciones en los procesos naturales de dilución de oxígeno por la generación de espuma, eutrofización del agua, aumento de compuestos organoclorados, entre otros (Cserhádi, Forgács, &

Oros, 2002). Es por ello que se han desarrollado varias técnicas de tratamiento que permiten remover el contenido de tensoactivos e incrementar la capacidad de biodegradabilidad, de tal forma que dichos efluentes puedan ser reutilizados.

Para el tratamiento de tensoactivos se han empleado varias técnicas basadas en procesos fisicoquímicos, electroquímicos y biológicos. Entre las cuales se destacan las siguientes: coagulación, floculación, oxidación, electrodeposición y empleo de consorcios bacterianos en sistemas de fermentación tanto aerobios como anaerobios (Carvajal Muñoz, 2012). Dichas técnicas se emplean generalmente en la fase de tratamientos secundarios de las plantas de tratamiento, los resultados han sido favorables, demostrando porcentajes de remoción entre el 80-95% (Kong, Wang, Ma, & Gu, 2006; Lin, 2014; Prats, Ruiz, Vazquez, & Rodriguez-Pastor, 1997).

Existen otras técnicas avanzadas de tratamiento, las cuales se han categorizado como procesos de oxidación avanzada (AOP, por sus siglas en inglés). Dichas técnicas son más efectivas ya que incrementan la biodegradabilidad, remoción de los compuestos contaminantes y disminuyen su toxicidad (Demeestere, Dewulf, & Van Langenhove, 2007). Entre dichas técnicas se puede destacar a la fotocátalisis heterogénea, la cual tienen un alto poder de acción en contra los tensoactivos presentes en las aguas residuales grises (Amat, Arques, Miranda, & Seguí, 2004; Oyama et al., 2004).

2.5.1 Pretratamientos y tratamientos primarios

Los procesos de pretratamientos y tratamientos primarios se enfocan principalmente en la remoción o retención de sólidos que puedan precipitar, ya sea que se encuentren suspendidos o flotando hacia la superficie. Existen diversas técnicas y operaciones unitarias que se emplean durante esta fase, las cuales se basan en métodos físicos y algunas reacciones químicas que propician la precipitación y separación de los compuestos (Olivos, 2010). Las

técnicas más utilizadas son: desbaste, cribado, sedimentación, tamizado, desarenación, flotación, coagulación y floculación. En la fase de pretratamiento y tratamiento primarios se pueden aplicar las técnicas de coagulación y floculación para la remoción de tensoactivos, sin embargo, la eficiencia no es significativa (Fallis, 2013).

2.5.2 Tratamientos secundarios

Las unidades de tratamientos secundarios tienen como principal objetivo disminuir la materia orgánica, expresada en el índice de la demanda biológica de oxígeno (DBO), que ha quedado como remanente de los tratamientos primarios. Además, remover los sólidos sedimentables que persistan en las aguas, eliminar organismos patógenos y reducir el contenido de nutrientes, mediante la acción de microorganismos principalmente bacterianos (Sette, 1990).

Durante esta fase existe la presencia de una gran cantidad de microorganismos que utilizan la carga de materia orgánica como su fuente nutritiva de crecimiento (C. Pérez, 2012). Los tratamientos secundarios pueden ser de tipo aerobios, anaerobios o combinados, en las modalidades de: lodos activados, lagunaje, filtros biológicos y biodiscos. La tecnología de lodos activados ha sido la más utilizada, debido a su eficiencia y factibilidad. Se basa en la aireación constante del agua juntamente con el lodo biológico (Perez & Camacho, 2011).

En esta fase de tratamientos secundarios se llevan a cabo la mayor parte de remoción y degradación de tensoactivos presentes en las aguas residuales grises. Las técnicas aplicadas son la de naturaleza electroquímica, biológica y las técnicas avanzadas previamente mencionadas. Los niveles de eficiencia en el tratamiento son muy significativos, alcanzando un porcentaje de remoción entre el 85-90% (Aloui et al., 2009).

Las tecnologías vanguardistas que han surgido en las últimas décadas para el tratamiento secundario de los efluentes de aguas residuales se enfocan principalmente en el empleo de sistemas bacterianos anaerobios y de oxidación, micromembranas biológicas y de cerámica para la filtración y coagulación de micropartículas contaminantes y métodos físicos avanzados que emplean radiaciones de luz ultravioleta (UV) para la eliminación principalmente de agentes patógenos (Heijman & Lier, 2017).

2.5.3 Tratamientos terciarios

Los tratamientos terciarios son procesos complementarios y más rigurosos, tienen el objetivo de eliminar contaminantes específicos, como sustancias tóxicas o no biodegradables. Además, remueven la materia particulada y coloidal que no ha sido completamente eliminada en la fase del tratamiento secundario (Metcalf & Eddy, 1979). Las técnicas de filtración, absorción y desinfección son las más empleadas. Para ello, se pueden emplear capas de granulometría, carbón activado, cloración u otros métodos alternativos, como la radiación UV, filtración por membranas y ozono (Alianza por el Agua, n.d.). En esta fase de tratamiento terciario la mayor parte de tensoactivos ya se encuentran reducidos.

2.6 Microalgas

2.6.1 Generalidades: clasificación y aplicaciones

Se ha definido como microalgas a los microorganismos que poseen clorofila de tipo α que realizan fotosíntesis de tipo oxigénica. Se encuentran distribuidas en todos los tipos de hábitats, tanto terrestres como acuáticos, incluyendo los ambientes extremos. (Richmond, 2004). Fisiológicamente son microorganismos autótrofos, es decir, su metabolismo lo realizan a partir de fuentes de materia inorgánica, compuestos derivados del dióxido de carbono y energía lumínica (Tuchman, 1996).

Este grupo incluye organismos eucariotas y procariotas. Los organismos eucariotas han sido clasificados en función del tipo de pigmentos que sintetizan en: Glaucophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Cryptophyta, Euglenophyta, Chlorarachniophyta Chlorophytas, Rodophytas y Dinophytas. Mientras que, los procariotas agrupan a los Prochlorophytas y Cianophyta (Barsanti & Gualtieri, 2006). En cuanto al número de especies descritas, Elliott y colaboradores (2012) establecieron más de 40000 especies, mientras que Demirbas y Demirbas (2010) consideran que el número puede llegar a sobrepasar las 100000.

Las microalgas presentan diversas formas y se distribuyen de manera independiente o en agregados celulares, pueden o no presentar estructuras flagelares y filamentosas, presentan coloraciones verdosas, azuladas y en tonos marrón (Bellinger & Sigee, 2010). Se pueden reproducir de distintas formas: 1. De manera vegetativa, a partir de una célula o fragmentación de una colonia. 2. Asexual, por la producción de esporas móviles. 3. Sexual, mediante la unión de gametos (Richmond, 2004). Son microorganismos complejos ya que poseen propiedades metabólicas propias de los organismos vegetales y las características más favorables de las células microbianas, entre ellas: la plasticidad, fácil manipulación genética, rápido crecimiento, mínimos requerimientos nutricionales, alta capacidad de síntesis de metabolitos, entre otros (M. Borowitzka, 2013).

Las microalgas tienen diversas aplicaciones a nivel industrial, mediante el uso de la biomasa cultivada. Puede ser aprovechada en el área agrícola como fertilizante de suelos, a nivel ambiental, se la ha utilizado como bioindicadores de ecotoxicidad, detección de contaminantes, producción de biocombustibles de tercera generación y remediación de aguas residuales (García, 2014). Además, debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, carbohidratos y proteínas ha sido utilizada como suplemento nutricional para la

alimentación humana y animal (Spolaore, Joannis-Cassa, Duran, & Isambert, 2005).

Los productos químicos que pueden ser extraídos del metabolismo microalgal incluyen varios tipos de pigmentos como el β -caroteno, la astaxantina y otros extractos aprovechados en la industria cosmética y farmacéutica (Walker, Purton, Becker, & Collet, 2005). Los nuevos estudios están siendo direccionados a la investigación microalgal para la producción de bioplásticos (Balaji, Gopi, & Muthuvelan, 2013), proteínas recombinantes (Potvin & Zhang, 2010) y aumento de la productividad mediante la modificación de las rutas metabólicas (Blatti, Michaud, & Burkart, 2013).

2.6.2 División Chlorophyta

La división Chlorophyta o también llamada de las algas verdes, comprende un grupo de microalgas que producen clorofila de tipo α y β y otros pigmentos en menor proporción como los carotenoides y xantófilas. Es el grupo más diverso de microalgas con alrededor de 17000 especies conocidas (Graham & Wilcox, 2000). Se encuentran distribuidas en ambientes acuáticos, meso, oligo, eutróficos, terrestres e incluso ambientes extremos, (Cubas, 2008).

A nivel celular, esta división puede presentar flagelos, en pares y de igual longitud, variado número, forma y tamaño de cloroplastos. A nivel organizacional se presentan en formas filamentosas, unicelulares, cenobiales y conglomerados celulares. (Hoek, Mann, & Jahns, 1995). Las microalgas Chlorophytas se caracterizan por almacenar productos de reserva en los cloroplastos, a diferencia del resto de las divisiones, que lo hacen en el citoplasma (Lewis & McCourt, 2004). La clasificación taxonómica de esta división estableció cuatro clases, de las cuales se destaca la división Chlorophyceae. Esta división agrupa predominantemente a especies microalgales de agua dulce con varias características fisiológicas y anatómicas específicas (Nuñez, 2008)

La clase Chlorophyceae a su vez deriva nueve órdenes taxonómicos de gran importancia: Volvocales, Tetrasporales, Prasiolales, Chlorellales, Trebouxiales, Sphaeropleales, Chlorosarcinales, Chaetophorales y Oedogoniales (Edward, 2008). El orden Chlorellales agrupa géneros como: *Nephrocytium*, *Franceia*, *Oocystis*, *Geminella*, *Auxenochlorella*, *Chlorella*, *Chlorococcum*, *Pleurococcus*, entre otros (Culture Collection of Autotrophic Organisms, 2017), encontrados únicamente en cuerpos de agua dulce (Wustman, Melkonian, & Becker, 2004).

Las algas verdes tienen aplicaciones muy puntuales en varios sectores, incluyendo el área de la industria farmacéutica, de alimentos, agricultura, ambiental, en el tratamiento de aguas residuales, como bioindicadores en la reducción de las emisiones de CO₂ y producción de energía (Arora & Sahoo, 2015)

2.6.3 Género *Chlorella*

Chlorella sp., es un tipo de alga verde del orden Chlorellales de células elipsoidales u ovoides, se presentan de forma individual o en pequeñas agrupaciones de hasta 64 células (Guamán-Burneo & González, 2016). Contiene altas concentraciones de clorofila, por lo que se la reconoce fácilmente por su marcada tonalidad verdosa y olor a herbaje. Citológicamente poseen un cloroplasto en forma de copa rodeado de gránulos de almidón sin flagelos (Serediak & Huynh, 2011). Dichas cualidades morfológicas se pueden apreciar en la Figura 4. Es uno de los géneros de microalgas más estudiado y cultivado debido a su abundancia, facilidad de cultivo, capacidad para desarrollarse bajo condiciones autróficas y mixótróficas. (F. Y. Feng, Yang, Jiang, Xu, & Kuang, 2005).

Las especies de *Chlorella* han demostrado tener una gran capacidad de remoción de compuestos orgánicos y sustancias contaminantes al aplicarse como tratamiento biológico de aguas residuales, ya sea de forma inmovilizada

o suspendida en matrices sintéticas u orgánicas (Rivera, Garza, Almaguer, & Loredó, 2010). Además, la biomasa cultivada después de los procesos de biorremediación se considera como materia prima para la producción de lípidos (Christenson & Sims, 2011). Varias especies de *Chlorella* sintetizan proteínas, (hasta el 60% de su capacidad celular), vitaminas, sulfuro minerales y aminoácidos esenciales (Infante et al., 2012). Por lo cual, la biomasa cosechada también tiene fines alimenticios como suplemento y fuente nutricional alternativa (Lee & Rosenbaum, 2003).

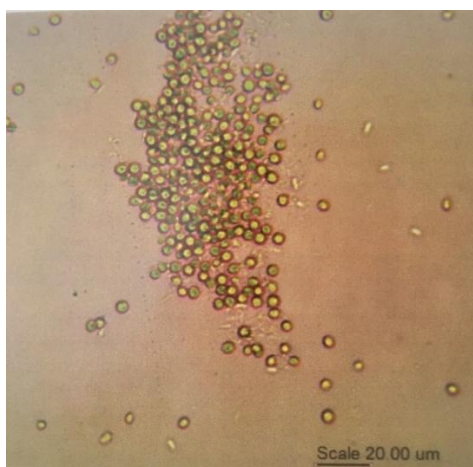


Figura 4. *Chlorella* sp., morfología de células simples

Tomado de: (Guamán-Burneo & González, 2016)

2.6.4 Género *Chlorococcum*

Las microalgas del género *Chlorococcum* del orden Chlorellales son células unicelulares esféricas o elipsoidales lisas, con un tamaño variable de 4 a 11 μm . Poseen flagelos iguales que les dotan de movilidad, se reproducen de manera asexual por zoosporas o de forma sexual a través de isogametos (Blackwell, Cox, & Gilmour, 1991). El cloroplasto en las células jóvenes es de forma parietal con uno o más pirenoides. Pueden presentarse como células solitarias o en agrupaciones temporales de formas indefinidas (M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, 2017). Dichas características morfológicas pueden apreciarse en la Figura 5.

Se han caracterizado varias sustancias de su metabolismo en distintas especies, tales como: ácidos volátiles, compuestos fenólicos, proteínas, polisacáridos y sustancias lipofílicas. Además, extractos antimicrobianos y otros compuestos con actividad biológica con potencial aplicación a nivel clínico (Bhagavathy, Sumathi, & Jancy Sherene Bell, 2011). Tiene la capacidad de sintetizar la enzima hidrogenasa (Ueno, Kurano, & Miyachi, 1999) y concentrar lípidos hasta el 34% de su contenido celular (Ota et al., 2011). Se ha evaluado su eficiencia en la remediación de aguas mediante la remoción de varios compuestos orgánicos, tales como fósforo y nitrógeno total en un porcentaje del 57 y 94%, respectivamente. (Itzel López, 2016; Lv, Guo, Feng, Liu, & Xie, 2017).

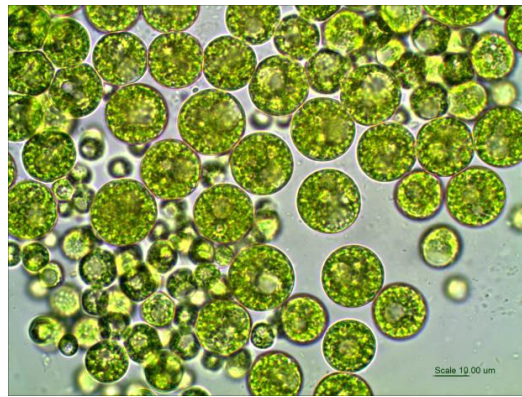


Figura 5. *Chlorococcum* sp., morfología de células individuales, escala 10 μm.

Tomado de: (Guamán-Burneo & González, 2016)

2.6.5 Género *Pleurococcus*

Las microalgas del género *Pleurococcus* del orden Chlorellales son células de formas esféricas o poliédricas que se presentan de manera individual o en familias unidas desde 2 hasta 32 células, tal como se aprecia en la Figura 6. La conglomeración de estas microalgas da lugar a la formación de finos tapetes sobre superficies con alto contenido de humedad (Nägeli, 1849). Se distribuyen en ambientes lacustres, marinos, aguas residuales y suelos, además, pueden colonizar los organismos de los mamíferos y rumiantes provocando la enfermedad de prototecosis (Guamán-Burneo & González, 2016). Se han

descrito 37 especies, también conocidas con los sinónimos: *Protococcus* y *Apatococcus* (Guiry, Michael in Guiry, M.D & Guiry, 2017).



Figura 6. *Pleurococcus* sp. morfología y organización de células individuales
Tomado de: (Guamán-Burneo & González, 2016)

2.7 Ficorremediación

La ficorremediación es el uso de algas, organismos macro y microscópicos, para el tratamiento de aguas u otros desechos en un medio líquido o gaseoso (Souza et al., 2012). Este término fue introducido por John (2003) y describe los dos objetivos principales de la tecnología: la remoción o biotransformación de compuestos contaminantes y la generación de biomasa con aplicaciones comerciales. Entre los agentes contaminantes se encuentran: xenobióticos, nutrientes, metales pesados, hidrocarburos, pesticidas y fijación de CO₂, entre otros (Kwarciak-Kozłowska, Sławik-Dembiczak, & Bańka, 2014).

Las microalgas cumplen un rol natural de auto depuración de los cuerpos de agua, lo cual se replica durante los tratamientos de ficorremediación. El ciclo de descontaminación se basa en la liberación de oxígeno para la degradación aerobia de la materia orgánica juntamente con la acción de otros microorganismos, especialmente bacterianos. A continuación, las microalgas asimilan las sustancias contaminantes del agua como fuente de carbono y las convierten en lípidos y biomasa (Rawat, Ranjith Kumar, Mutanda, & Bux, 2011). En la Figura 7 se diagrama el proceso bioquímico que ejercen las microalgas.

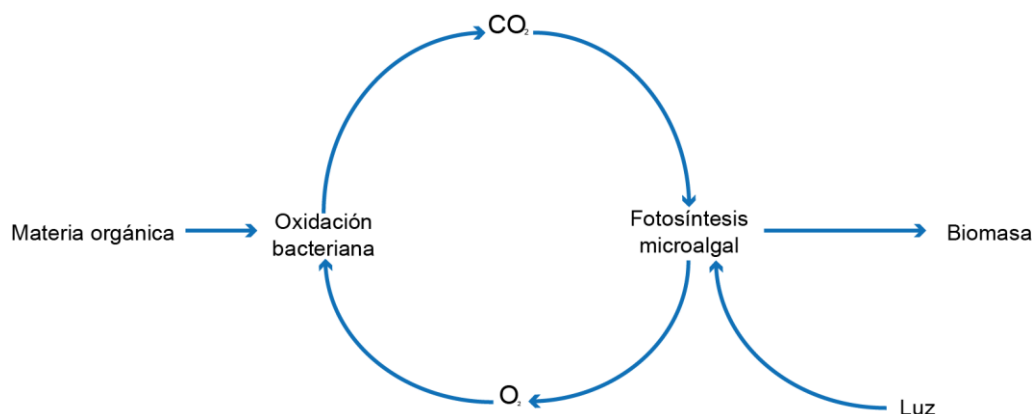


Figura 7. Ciclo de la fotosíntesis de oxidación en el proceso de remoción de la demanda biológica de oxígeno (DBO).

Adaptado de: (Muñoz & Guieysse, 2006).

Las microalgas emplean distintos mecanismos para la asimilación de las sustancias contaminantes, tales como: biosorción, bioconcentración, biotransformación y volatilización (Phang, Chu, & Rabiei, 2015). Los géneros que mejores resultados han demostrado pertenecen a la división *Chlorophyta* y son: *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Desmococcus*, *Neochloris*, *Botryococcus* y *Chlamydomonas*. (Ahmad, Khan, & Yasar, 2013). Además, es importante destacar la acción de remediación en consorcios con cianobacterias (Mustafa, Phang, & Chu, 2012).

La ficorremediación ofrece múltiples ventajas, tales como: mayor capacidad fotosintética en comparación con las plantas superiores, capacidad de conversión de las emisiones de CO_2 , habilidad de crecimiento bajo condiciones extremas y de excesivas concentraciones de nutrientes y una amplia gama de aplicaciones de la biomasa cosechada (Renuka, Sood, Prasanna, & Ahluwalia, 2015). Esta tecnología resulta ventajosa sobre los tratamientos físico-químicos tradicionales, ya que se alcanza la totalidad de la degradación de la materia orgánica sin afectación de la flora y fauna circundante (Latiffi, Maya, Mohamed, Apandi, & Kassim, 2015).

Entre los desafíos que enfrenta, se encuentra la dificultad de proveer las condiciones adecuadas para que se puedan desarrollar sistemas más sustentables y adaptables a mayores escalas de tratamiento. Las proyecciones en este campo se han direccionado a la aplicación de técnicas de biología molecular para el mejoramiento genómico de las cepas. (Pacheco, Hoeltz, Moraes, & Schneider, 2015)

2.7.1 Sistemas de tratamiento

Los sistemas de ficorremediación pueden alcanzar su mayor potencial en la degradación de contaminantes y producción de biomasa cuando se cumplen y mantienen ciertas condiciones operativas y de cultivo (Ruiz-Marin, Mendoza-Espinosa, & Stephenson, 2010b). Los factores operativos más importantes son: la profundidad, el tiempo de retención hidráulico y la turbulencia. Por su parte, las condiciones que se buscan alcanzar en el cultivo son: una alta tasa de crecimiento, satisfactoria capacidad para formar agregados celulares y alta tolerancia a las variaciones estacionales mediante el acondicionamiento de los parámetros adecuados (Chalivendra, 2014).

2.7.1.1 Parámetros de crecimiento

La eficiencia de los sistemas de ficorremediación está directamente relacionada con el crecimiento de las microalgas, es por ello, que el cultivo debe ser manejado bajo los parámetros de crecimiento adecuados. Existen factores físico-químicos, bióticos y abióticos que influyen en la tasa de crecimiento microalgal.

- **Luz**

En condiciones limitantes de nutrientes el proceso de fotosíntesis en las microalgas incrementa su acción con el aumento de la intensidad lumínica que perciba (Park, Craggs, & Shilton, 2011). Cada especie presenta un punto de

saturación por luz, cuando este se sobrepasa se da lugar al fenómeno de fotoinhibición, ocasionando una pérdida de la productividad, disminución de la eficiencia fotosintética e incluso la muerte de las células (Richmond, 2007). En cultivos altamente concentrados se produce un aumento de la turbidez por lo que es necesario incorporar sistemas de mezclado que den lugar a un acceso continuo a la luz a todas las células (Contreras, Peña, Flores, & Cañizares, 2003).

- **Temperatura**

El aumento de la temperatura propicia el incremento de la tasa de crecimiento microalgal, siempre y cuando este parámetro se mantenga dentro de los rangos óptimos para cada especie. De manera general, el rango de temperatura adecuado se encuentra entre los 28° y 35 ° C. Dependiendo del sistema de cultivo será necesario aplicar mecanismos para la regulación térmica (Martínez García, 2012).

- **pH y CO₂**

Cada especie requiere de un medio con un pH determinado para su óptimo crecimiento. De manera general, para las especies de hábitats lacustres un pH 8 es el más adecuado (Park et al., 2011). Los cambios drásticos de pH inciden directamente en la tasa de crecimiento y capacidad de remoción, especialmente de nitrógeno (Sialve, B.; Bernet, N.; Bernard, 2009). La adición de CO₂ influye también en la productividad y eficiencia en la remoción de contaminantes, además, puede contribuir en el control del pH óptimo. Sin embargo, su utilización resulta costosa y puede volver insostenible a los sistemas (Berenguel, Rodríguez, Acién, & García, 2004).

- **Nutrientes**

El metabolismo microalgal es autótrofo. Los principales macronutrientes requeridos son: nitrógeno, fósforo, sulfuro, magnesio, potasio y calcio. Entre los micronutrientes están: el manganeso, molibdeno, cobre, zinc, boro, hierro, níquel y cloruros (Ho et al., 2013). Además, es necesaria la presencia de un agente quelante como el EDTA, ya que algunos elementos traza, importantes

para las reacciones enzimáticas y biosíntesis de varios compuestos, son propensos a la unión con otros constituyentes del medio generando la precipitación e indisponibilidad de los mismos (Richmond, 2004). La fuente de carbono se obtiene mediante la fijación del carbono inorgánico a través de la fotosíntesis.

- **Fertilizante foliar comercial Nitrofoska ®**

Nitrofoska es un fertilizante complejo de aplicación foliar. Presenta una composición equilibrada, la cual incluye, macronutrientes: N, P, K y micronutrientes quelatizados con EDTA, tiene un pH de 2 (Compo Expert, 2010). Este producto ha sido empleado como un aditivo nutricional para el cultivo de microalgas a escala piloto. La descripción completa de la composición se presenta en la sección de Anexos.

2.7.1.2 Factores operacionales

El control de los factores de operación de los sistemas de ficorremediación depende de las condiciones de temperatura e intensidad lumínica que se mantengan durante el tratamiento de las aguas (Larsdotter, 2006). La profundidad influye directamente en el alcance que llegue a tener la luz a las células de microalgas y por ende la capacidad fotosintética de las mismas. Debido a la composición de las aguas residuales domésticas es muy común que el medio se torne turbio lo cual dificulta la incidencia de la intensidad lumínica. Es recomendable que los reactores mantengan una profundidad entre 15-50cm, lo cual asegura un buen alcance lumínico hacia las células (Benemann, 1979; Fontes, Angeles Vargas, Moreno, Guerrero, & Losada, 1987).

La generación de turbulencia y agitación asegura que todas las células se distribuyan de manera homogénea en el cultivo y que aquellas que se encuentren en sitios menos iluminados se movilicen a las zonas de mayor intensidad lumínica (Tredici, 2007). Esto puede lograrse mediante varios

métodos, como: burbujeo por aireación, hélices o paletas de mezclado, inyección de CO₂ y N₂. Las velocidades de mezclado deben ser moderadas, ya que si se incrementan de manera desmedida pueden causar el daño de las células (M. A. Borowitzka, 1998). El tiempo de retención hidráulico debe ser mayor a la tasa de generación de las células para que el proceso no se interrumpa ni fracase el sistema (Benemann, 1989).

2.8 Agua para riego agrícola: Parámetros y Normativa

El agua es el recurso vital para el desarrollo de las actividades agrícolas y pecuarias, las plantas realizan todos los procesos metabólicos en un medio acuoso (Moratiel, 2015). Las aguas residuales pueden ser empleadas como recurso para el riego agrícola siempre y cuando cumplan con varios estándares de calidad que avalen la idoneidad y práctica sostenible de la reutilización de este tipo de aguas (Jeong, Kim, & Jang, 2016).

2.8.1 Parámetros de calidad

Existen varios parámetros importantes a tomar en cuenta en la reutilización de aguas residuales en la agricultura, entre los más importantes se encuentran los que se detallan a continuación:

- **Bacterias coliformes**

El índice de bacterias coliformes es uno de los parámetros más controlados debido al riesgo que supone para la salud de los seres humanos al alcanzar cultivos que serán consumidos directamente sin previa cocción (Hamilton, Stagnitti, Premier, Boland, & Hale, 2006). Los límites establecidos en la norma establece un índice máximo de 1000 NMP/100mL.

- **Salinidad**

Los niveles inadecuados de salinidad inciden negativamente en la disponibilidad, sensibilidad e infiltración de agua para los cultivos, afectando su crecimiento (Kiziloglu, 2008). La salinidad usualmente se describe a través de

la conductividad eléctrica y el índice de la Relación de Absorción de Sodio (RAS), el cual indica la relación entre los iones de sodio, calcio y magnesio presentes en el suelo (J. Pérez, 2011). La normativa establece varios rangos de RAS los cuales han sido categorizados en la modalidad Ligero-Moderado y Severo en función del valor de conductividad eléctrica. En la Tabla 3 se especifican dichos rangos.

- **Materia orgánica**

El contenido de materia orgánica se describe mediante los parámetros: demanda bioquímica de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO). Dicho contenido afecta negativamente los procesos de tratamiento y desinfección, debido a la cantidad de nutrientes que contiene, los cuales propician la proliferación de microorganismos patógenos, mal olor y color (US Environmental Protection Agency, 2012). Los parámetros DBO y DQO, no se encuentran contemplados dentro de la normativa de calidad de agua para el riego.

- **pH**

El rango de pH adecuado que se debe mantener está entre los 5.8 a 8.5, los valores de pH menores afectan la movilidad de los metales pesados, lo cual puede ocasionar que se retengan en el suelo, sean absorbidos por los cultivos y contaminen los cuerpos de agua (OMS, 2006b).

2.8.2 Regulación de reutilización del agua residual

La normativa nacional presentada en el Registro Oficial por el Ministerio del Ambiente establece varios parámetros y criterios de calidad de aguas para uso agrícola en riego, los cuales se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Parámetros de los niveles de la calidad de agua para riego

Problema potencial y parámetro	Unidades	Grado de restricción*		
		Ninguno	Ligero-Moderado	Severo
Salinidad				
Conductividad eléctrica (CE)	milliohms/cm	0,7	0,7-3,0	>3,0
Sólidos totales suspendidos (SDT)	mg/L	450	450-2000	>2000
RAS= 0-3 y CE=		0,7	0,7-0,2	<0,2
RAS=3-6 y CE=		1,2	1,2-0,3	<0,3
RAS=6-12 y CE=		1,9	1,9-0,5	<0,5
RAS=12-20 y CE		2,9	2,9-1,3	<1,3
RAS= 20/40 y CE		5,0	5,0-2,9	<2,9
Bicarbonatos (HCO ₃)-Solo aspersion		1,5	1,5-8,5	<8,5
pH	Rango normal		6,5-8,4	
Coliformes fecales	NMP/100 mL	1000		

Adaptado de: (Ministerio del Ambiente, 2015)

La normativa internacional también establece lineamientos de calidad para la reutilización de aguas residuales en el riego, estos presentan ciertas variaciones con respecto a los contemplados en la normativa nacional. Las instituciones y países que mantienen manuales y estándares de calidad más rigurosos son: la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA), la Organización Mundial de la Salud (WHO) y varios países europeos. En la Tabla 3 se presenta una síntesis.

Tabla 3.

Guía y estándares de calidad para la reutilización de aguas residuales en el regadío

Parámetros	WHO	US EPA
Coliformes (/100 mL)	Sin restricción <i>E.coli</i> (ufc) <1000 Restringido <i>E.coli</i> (ufc) <10000	Cultivos de alimentos: ND FC (mediano) Cultivos de alimentos procesados: FC (ufc) <200, mediano.
Turbidez (NTU)	-	Cultivos de alimentos: <2 (promedio) Cultivos de alimentos procesados: -
Sólidos suspendidos (SST) (mg/L)	-	Cultivos de alimentos: - Cultivos de alimentos procesados: SST < 30
DBO (mg/L)	-	Cultivos de alimentos: <10 Cultivos de alimentos procesados: <30
DQO (mg/L)	-	-
Nemátodos intestinales (No/L)	<1	-
pH	-	6,0-9,0
Conductividad eléctrica	-	-

Adaptado de: (Sialve, B.; Bernet, N.; Bernard, 2009)

NOTA: ND= no detectado FC= coliformes fecales

3. Capítulo III. Diseño del plan experimental

3.1 Diseño y variables experimentales

El desarrollo del plan experimental se llevó a cabo mediante la aplicación del Diseño completamente al azar (DCA) con pre y post prueba, el cual se basa en la aleatorización de las variables en la formulación de las unidades experimentales. La evaluación de las variables independientes comprendió mediciones antes (pre prueba) y después de aplicadas las variables dependientes (post prueba) (Hernández Sampieri, Fernández Collado, &

Baptista Lucio, 1991). Las variables independientes y dependientes de experimentación se presentan con sus respectivos grados y niveles en la Tabla 4.

Tabla 4.

Variables independientes y dependientes de experimentación

Variables Independientes		Variables Dependientes	
Variable Independiente # 1	Variable Independiente #2	Variable Dependiente #1	Variable Dependiente #2
Género de microalga:	Fertilizante foliar Nitrofoska ®:	Curvas y parámetros cinéticos de crecimiento	Índices de los parámetros indicadores de la calidad de agua:
1. Cepa CMIE-I6-001- <i>Pleurococcus sp.</i>	Presencia: Concentración estándar (1mL/L)		a) Tensoactivos aniónicos
2. Cepa CMIE-A1-004- <i>Chlorococcum sp.</i>	Ausencia		b) Demanda Bioquímica de Oxígeno (DQO)
3. Cepa CMIE-I8-003- <i>Chlorella sp.</i> y			c) Coliformes totales
			d) Relación de absorción de sodio (RAS)
			e) Carbonatos de calcio
			f) pH
			g) Conductividad eléctrica (CE)

3.2 Unidades experimentales

A partir del diseño experimental empleado la formulación de las unidades experimentales se describe de la siguiente forma en la Tabla 5.

Tabla 5.

Formulación de las unidades experimentales en base a los 6 tratamientos propuestos

Tratamientos	Formulación				Número de repeticiones	Variables dependientes
	Tipo de cepa	Concentración de inóculo	Volumen de agua gris	Fertilizante Nitrofoska ®		
I	1	1x10 ⁶ cel/mL	Aforo hasta los 4 L	No aplica	3	Curva y parámetros cinéticos de crecimiento.
II	2	1x10 ⁶ cel/mL	Aforo hasta los 4 L	No aplica	3	
III	3	1x10 ⁶ cel/mL de cada cepa	Aforo hasta los 4 L	No aplica	3	
IV	1	1x10 ⁶ cel/mL	Aforo hasta los 4 L	Aplica (1mL/L) 1 vez por semana	3	Evaluación de parámetros indicadores de calidad de agua.
V	2	1x10 ⁶ cel/mL	Aforo hasta los 4 L	Aplica (1mL/L) 1 vez por semana	3	
VI	3	1x10 ⁶ cel/mL	Aforo hasta los 4 L	Aplica (1mL/L) 1 vez por semana	3	

3.3 Controles experimentales

Para la validación de los resultados se emplearán dos controles negativos descritos en la Tabla 6.

Tabla 6.

Controles negativos de experimentación

Controles	Formulaciones				Número de repeticiones	Variables dependientes
	Tipo de cepa	Concentración de inóculo	Volumen de agua gris	Fertilizante Nitrofoska ®		
Control negativo #1	No aplica	No aplica	Aforo hasta los 4 L	No aplica	0	Evaluación de parámetros indicadores de calidad de agua.
Control negativo #2	No aplica	No aplica	Aforo hasta los 4 L	Aplica (1mL/L) 1 vez por semana	0	

4. Capítulo VI. Procedimientos

4.1 Población y muestra

Las cepas de microalgas sujetas a experimentación provienen de la Colección de Microalgas para la Investigación del Ecuador (CMIE) del Laboratorio de Biotecnología Energética (BIOTEC), entidad que pertenece a la Corporación para la Investigación Energética (CIE). BIOTEC se encuentra ubicado en las instalaciones del Centro de Capacitación de la Empresa Eléctrica Quito, situado en la parroquia Cumbayá.

Las microalgas de la colección CMIE fueron colectadas en diferentes Áreas Protegidas y Parques Nacionales del Ecuador bajo el permiso de Investigación No.002-14-IC-MC-DNB/MA y con el Contrato Marco de Acceso a Recursos Genéticos MAE-DNB-CM-2015-0012 otorgado por el Ministerio del Ambiente del Ecuador.

La selección de cepas inició con un compendio de 50, de las cuales se aislaron y purificaron 17 cepas en los medios de cultivo comerciales BG-11 (Rippka, Deruelles, Waterbury, Herdman, & Stanier, 1979) y Bold's Basal (Bischoff & Bold, 1963), los cuales contienen los micro y macronutriente necesarios para el crecimiento de las mismas. A partir de dicha pre selección, en base a los reportes bibliográficos y a la tasa de crecimiento, finalmente se seleccionaron 3 cepas de distintos géneros para la experimentación descritas en la Tabla 7.

Tabla 7.

Cepas seleccionadas para la experimentación

Código de la cepa	Género de microalga	Lugar de colecta
CMIE-I6-001	<i>Pleurococcus</i> sp.	Reserva Ecológica Illinizas
CMIE-A1-004	<i>Chlorococcum</i> sp.	Parque Nacional Cotopaxi
CMIE-I8-003	<i>Chlorella</i> sp.	Reserva Ecológica Illinizas

4.2 Descripción de los materiales y métodos

4.2.1 Diagrama de flujo del proceso metodológicos

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de remediación de aguas residuales grises mediante el uso de microalgas provenientes de Áreas Protegidas del Ecuador fue necesario llevar a cabo 8 fases experimentales como parte de la metodología de estudio. Se manejaron dos variables experimentales, tipo de cepa y aplicación o no del fertilizante foliar Nitrofoska® (1mL/L). Mediante el diseño experimental propuesto se determinó el ensamble de 20 unidades de tratamiento, de las cuales, dos correspondieron a controles negativos. El estudio de la eficiencia de biorremediación de aguas grises comprendió el análisis cinético de crecimiento de las cepas microalgales y la evaluación de los parámetros indicadores de la calidad de agua para su uso en el riego agrícola, los cuales son: conductividad eléctrica (CE), pH, DQO, carbonatos de calcio, RAS, tensoactivos y coliformes totales.

Inicialmente se caracterizaron a nivel cinético las cepas seleccionadas (*Pleurococcus* sp., *Chlorococcum* sp. y *Chlorella* sp.), cultivadas en medio de cultivo BG-11, mediante la obtención de la curva y parámetros cinéticos de crecimiento. Dichas cepas fueron escaladas a un volumen de 5 litros para su posterior empleo en el ensamble de todas las unidades de tratamiento. Se realizó el muestreo del agua residual gris de 8 domicilios de la comunidad Salamalag Chico, parroquia rural de la Provincia de Cotopaxi, a partir del cual

se obtuvo una muestra compuesta de 100 litros. A partir de ello, se realizó la caracterización físico-química y biológica del agua gris colectada en base a los 7 parámetros indicadores de la calidad de agua, dicho análisis fue correspondiente al análisis pre-prueba. Se formularon las 20 unidades experimentales preestablecidas y se dio inicio al periodo de remediación, el cual se efectuó durante un periodo de 25 días. Durante dicho periodo se evaluó la cinética de crecimiento de cada tratamiento. Al término del día 15 del periodo de remediación se realizó una evaluación intermedia de los parámetros: tensoactivos, DQO, pH y CE de todas las unidades experimentales.

Al término del periodo de remediación (día 25) se realizó el análisis físico-químico y biológico post-prueba de todas las unidades de tratamiento en base a los parámetros indicadores de la calidad de agua previamente descritos. Finalmente, se realizó el análisis estadístico y descriptivo de los resultados obtenidos. Varios de los parámetros de estudio fueron analizados en el Laboratorio de Ambiental de la Universidad Central del Ecuador. En la Figura 8 se diagrama el flujo de las fases metodológicas empleadas.

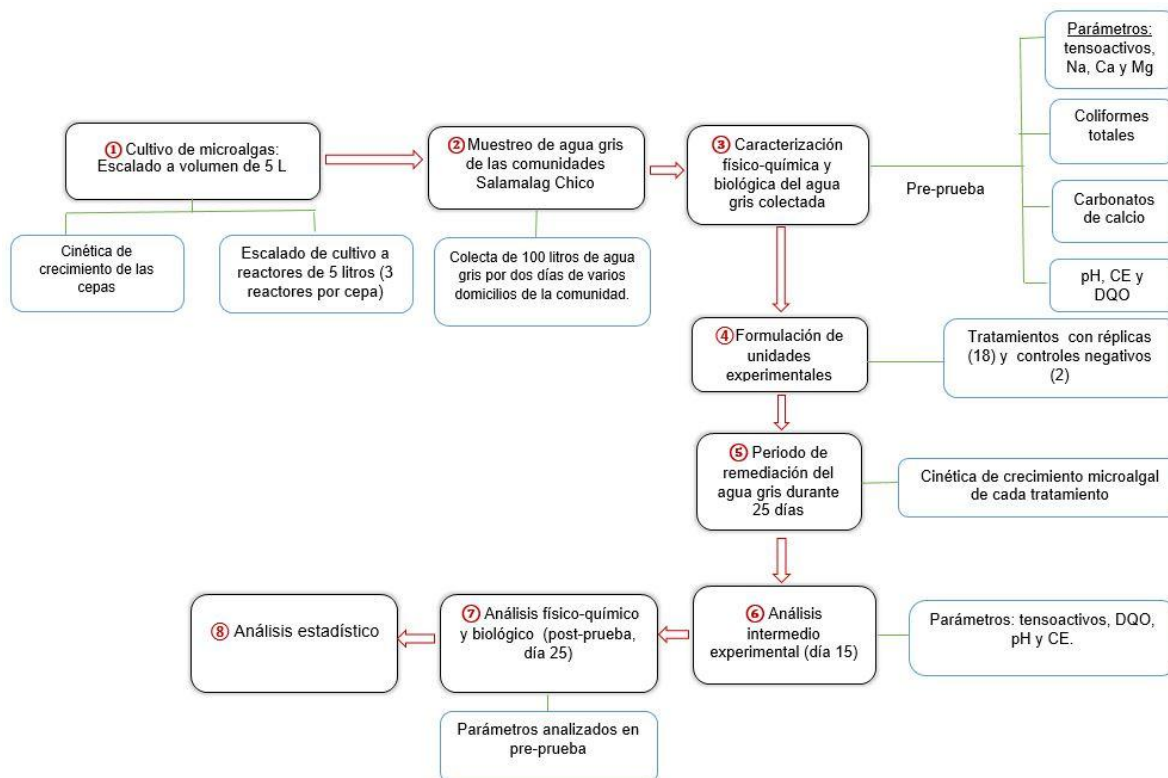


Figura 8. Diagrama de flujo del proceso metodológico

4.2.2 Fase 1: Cultivo de cepas microalgales

4.2.2.1 Cinética de crecimiento: cálculo de la densidad celular

Con el propósito de evaluar la cinética de crecimiento de cada cepa microalgal se estudiaron cultivos de 500 mL en medio BG-11 a partir de los cuales se realizó la evaluación de densidad celular durante un periodo de 30 días, cuantificando cada dos días, mediante la técnica de conteo celular en cámara de Neubauer, de acuerdo al siguiente protocolo:

Se tomó 1 mL de la muestra de cultivo, previamente homogenizado, y se procedió a cargar en la cámara de Neubauer. Se dejó reposar durante 1 minuto y se observó al microscopio óptico BOECO en un enfoque de 40X. (Guillard, 1973). El recuento se realizó en los cuatro cuadrantes externos por triplicado. En la Figura 9 se esquematiza el proceso y cuadrantes de conteo. Para el cálculo de la concentración celular se aplicó la Ecuación 1. En varias ocasiones

fue necesario realizar diluciones para proceder con la evaluación de la densidad celular, en dichos casos la cuantificación celular incluyó el cálculo del factor de dilución empleando la Ecuación 2.

$$DC = N \times 10^4 \times (F. d) \quad (\text{Ecuación 1})$$

Dónde:

DC= Densidad celular (cel/mL)

N= Promedio de células presentas en 1 mm²

10⁴= Factor de conversión de 0,1 µL a 1 mL

F. d= Factor de dilución, de ser necesario

$$F. d = \frac{Vol.inicial + Vol.final}{Vol.inicial} \quad (\text{Ecuación 2})$$

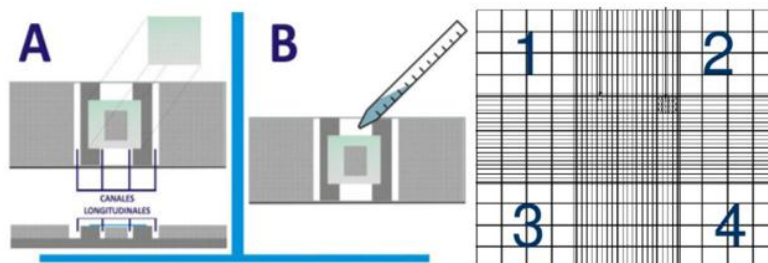


Figura 9. Esquema y cuadrantes de conteo celular en cámara de Neubauer.

Tomado de: (Thakur & Rao, 2014)

4.2.2.2 Parámetros cinéticos de crecimiento: velocidad máxima de crecimiento y tiempo de duplicación

Para la evaluación de los parámetros cinéticos de las cepas microalgales se emplearon los valores de densidad celular obtenidos para el cálculo de los parámetros cinéticos: velocidad máxima de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td) mediante las siguientes ecuaciones, 3 y 4.

$$\mu = \frac{\ln x_f - \ln x_o}{t_f - t_o} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Dónde:

X_f = Densidad de crecimiento final

X_o = Densidad de crecimiento inicial

t_f = Tiempo final

t_o = Tiempo inicial

4.2.2.3 Escalado del cultivo de microalgas

Con el propósito de obtener una cantidad suficiente de inóculo inicial de cada cepa microalgal para el ensamble de las unidades experimentales se escalaron cultivos de 500mL de cada cepa en medio BG-11 a reactores de 2 litros de medio de cultivo de agua potable con el fertilizante foliar Nitrofoska® a una concentración de 1mL/L, el cual se dosifica una vez por semana (BIOTEC, 2013). El sistema de cultivo de los reactores se mantuvo acondicionado con aireación permanente mediante burbujeo a una presión de 0,012 Mpa e iluminación fría artificial a una intensidad de 10000 luxes para los fotoperiodos de luz natural (12 horas) y luz artificial (12 horas). Se fue escalando paulatinamente el volumen de cultivo hasta alcanzar los 5 litros de todos los reactores de las cepas microalgales, manteniendo de 3 a 4 reactores de dicho volumen para la ejecución de la experimentación. La masificación de los cultivos de cada cepa se realizó durante un periodo de 30 días. El esquema de escalado se presenta en el diagrama de la Figura 10.

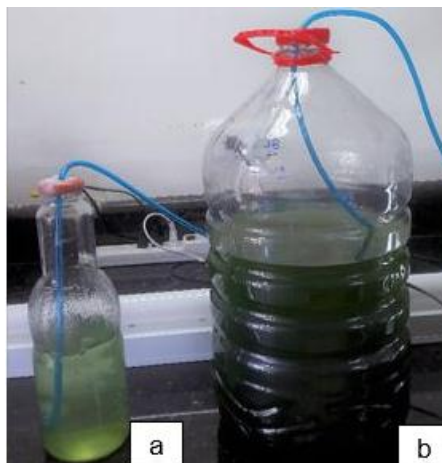


Figura 10. Escalado de cultivo microalgal.

(a) De 500 mL en medio BG-11. (b) Biorreactores de 5 L en medio de agua potable con el fertilizante Nitrofoska®.

4.2.3 Fase 2. Muestreo de agua gris

4.2.3.1 Lugar de colecta

La muestra de agua gris a ser tratada fue colectada en varios domicilios de la comunidad Salamalag Chico perteneciente a la parroquia rural Guangaje, provincia de Cotopaxi. La comunidad Salamalag Chico se encuentra en la zona alta de la parroquia a una altitud de 3655 m.s.n.m, mantiene un estado climático sub húmedo, meso térmico templado frío y una temperatura promedio de 9,5° C. Es una zona que carece de suficientes recursos hídricos para satisfacer las necesidades de los pobladores, esto se debe a que las quebradas se encuentran secas y a la intervención en los páramos lo cual ha causado una disminución de los caudales de agua (GAD Provincia de Cotopaxi, 2015).

Los domicilios seleccionados para el muestreo reportaron en promedio la presencia de entre 5 a 8 miembros familiares. Los efluentes de agua gris se generaron de las descargas de la cocina, lavamanos, ducha y lavandería, la mayor parte de los hogares dispone de un desfogue de cada efluente, mas no

una canalización de evacuación general. Los principales productos de limpieza utilizados para el aseo personal, lavado de ropa y vajilla por los pobladores no son biodegradables.

4.2.3.2 Proceso de muestreo

Se realizó el muestreo del agua gris en 8 domicilios de la comunidad Salamalag Chico, colectando un volumen final de 120 litros en un periodo de 48 horas. La toma de muestra fue de tipo continua a flujos variables y directamente del desfogue de canalización de los efluentes de salida de la cocina, lavandería y en algunos casos ducha y lavamanos de los domicilios. Dadas las condiciones de salida de los efluentes, se acondicionaron los sitios de muestreo de tal forma que las descargas tengan el menor contacto posible con los elementos circundantes, evitando la contaminación por factores externos.

Se colectaron dos sub-muestras (SM) de agua gris por cada domicilio, en recipientes de plástico de 6, 10 y 20 litros. Al término de las 48 horas se colectaron las sub-muestras y se mezclaron en iguales proporciones obteniendo la muestra compuesta a ser empleada en las siguientes fases experimentales. La muestra fue almacenada en un recipiente hermético de polipropileno. En el diagrama de las Figuras 11 y 12 se esquematiza el proceso de muestreo.



Figura 11. Esquema de muestreo de sub-muestras 1 y 2 (SM1 y SM2) y obtención de la muestra compuesta.



Figura 12. Toma de sub-muestras de los efluentes de distintos domicilios.

a) efluente proveniente de la cocina. b) efluente de salida general de aguas grises c) efluente de lavandería.

4.2.4 Fase 3. Caracterización físico-química y biológica del agua residual gris, pre-prueba

La caracterización físico-química y biológica del agua residual gris se realizó en base a los siguientes parámetros: tensoactivos aniónicos, DQO, coliformes totales, pH, conductividad eléctrica (CE), carbonatos de calcio y concentraciones de Na^{+1} , Ca^{+2} y Mg^{+2} para el cálculo del índice de RAS.

- **Tensoactivos aniónicos**

El análisis de la concentración de tensoactivos aniónicos fue evaluado en el Laboratorio de Ambiental OSP de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador. Dicho análisis se realizó mediante el método MAM-74/APHA 5540 C modificado. Este método se basa en la formación de un par iónico entre el anión de las sustancias activas y el catión del azul de metileno. Se lleva a cabo la transferencia del azul de metileno de una solución acuosa a un líquido orgánico hasta llegar al equilibrio (Clesceri, 1998). El protocolo de evaluación en síntesis comprende las siguientes fases:

- **Preparación de la curva de calibración:** A partir de una solución patrón de detergente, 100 ppm, se realizó una separación de fases con cloroformo y la posterior medición espectrofotométrica a 620nm de la fase inmiscible.
- **Análisis de muestras:** De igual manera, las fases acuosas e inmiscibles de la muestra se separaron con cloroformo y se realizó la medida directa de concentración en el equipo E-AM-180 (Laboratorio OSP (UCE), 2016c).

La técnica presenta un límite de cuantificación de 0,014 mg/l y un rango de trabajo de 0,014-0,500 mg/l.

- **Demanda química de oxígeno (DQO)**

La evaluación del parámetro DQO se realizó empleando el kit NANOCOLOR® DQO 1500 de la casa comercial Macherey-Nagel, con un rango de detección

de 100-1500 mg/LDQ, mediante el protocolo provisto por el fabricante, a continuación descrito: Se tomaron 2 mL de la muestra de agua gris (muestra compuesta) y se dispensó lentamente en un tubo de determinación del kit, se agitó levemente y se sometió a digestión por 30 minutos a 160°C en un reactor de digestión (MARCA). Transcurrida la digestión, se dejó enfriar hasta una temperatura de 20-25°C, se limpió el tubo de manera externa y se midió espectrofotométricamente a 620 nm en espectrofotómetro NANOCOLOR®, Macherey-Nagel. En la sección de Anexos se presenta un ejemplo de la reacción de las muestras de análisis.

- **Coliformes totales**

El índice de coliformes totales se evaluó empleando Placas 3M™ Petrifilm™ Aqua para análisis de muestras de agua. La técnica utilizada fue de recuento directo en placa de 1 mL a través del protocolo descrito por el fabricante bajo las siguientes instrucciones: Se colocó una placa 3M™ Petrifilm™ sobre una superficie lisa, se levantó el film y se depositó 1 mL de muestra del agua gris (muestra compuesta). Luego se dejó caer el film sin dejar que se formen burbujas por la introducción de aire, se presionó ligeramente con un aplicador y se incubó por 24 horas a 37 °C en una incubadora Ecocell (Petrifilm 3M, n.d.). Posterior al periodo de incubación se contabilizaron el número de colonias mediante la observación y detección de unidades formadoras de colonias (UFC) de color rojo sobre la matriz del medio de cultivo. En la sección de Anexos se presenta el esquema del protocolo de evaluación.

- **pH y Conductividad eléctrica**

Los parámetros pH y conductividad eléctrica (CE) fueron analizados empleando la sonda multiparamétrica marca Oaklen ®. Para ello se introdujo la sonda, previamente calibrada para ambos parámetros, en la muestra de agua gris (muestra compuesta) a una profundidad a la cual los electrodos quedaron completamente sumergidos y se registraron los valores de pH y CE.

- **Calcio (Ca⁺²)**

Para el cálculo del RAS se realizó la evaluación de la concentración de Ca⁺² en el Laboratorio de Ambiental OSP de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador mediante el método de absorción atómica. Este procedimiento se basa en la aspiración y atomización de la muestra por una llama de óxido nitroso-acetileno. La cantidad de energía absorbida a una longitud de onda característica del elemento será proporcional a la concentración del mismo (Standard Methods, 2016). La técnica tiene un límite de cuantificación de 0,2mg/l y rango de trabajo de 0,2-5,0 mg/l.

El procedimiento en síntesis comprendió las siguientes fases metodológicas:

- **Preparación de la muestra:** Se filtraron los metales disueltos o suspendidos en la muestra y se la digirió con ácido nítrico (HNO₃) y sulfúrico (H₂SO₄).
- **Preparación de la curva de calibrado:** Se realizaron 5 soluciones estándar a partir de una solución madre de Ca⁺² (100 ppm) y se realizó la lectura digital directa de la concentración.
- **Análisis de muestras:** Se atomizó la muestra preparada y se determinó la concentración empleando la curva de calibrado a partir de los valores de lectura medidos (Laboratorio OSP (UCE), 2016b)

En el caso de necesitarse diluciones se empleó la Ecuación 5 para el cálculo y expresión de resultados:

$$\text{Ca} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \text{Lectura} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \text{FD} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Dónde:

FD= Factor de dilución

- **Sodio (Na⁺¹) y Magnesio (Mg⁺²)**

Para el cálculo del índice de RAS se realizó la evaluación de la concentración de Na⁺¹ y Mg⁺² en el Laboratorio de Ambiental OSP de la Facultad de Ciencias

Químicas de la Universidad Central del Ecuador, mediante el método directo de absorción atómica de llama de aire-acetileno. Este método se basa en la medición de la luz absorbida por el elemento, el cual es proporcional a la concentración del elemento en la muestra previamente aspirada y atomizada por una llama que ha incidido sobre un monocromador (Standard Methods, 2016). La técnica para la evaluación de sodio presenta un límite de cuantificación de 0,01 mg/ml y un rango de trabajo de 0,01-100 mg/ml. Mientras que, la técnica de evaluación de magnesio tiene un límite de cuantificación de 0,02 mg/ml y un rango de trabajo de 0,02-10,00 mg/ml.

El procedimiento comprendió en síntesis las siguientes fases:

- **Preparación de la muestra:** Se filtraron los metales disueltos y suspendidos mediante presión y se digirió la muestra con ácido nítrico (HNO_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4), mediante ciclos de calentamiento y evaporación.
- **Preparación de la curva de calibrado:** Se realizó la lectura de 5 concentraciones de la solución madre de Mg^{+2} (100ppm) y Na^{+1} (100ppm), en el equipo de absorción atómica Perkin Elmer AA-100 y equipo asociado.
- **Análisis de muestras:** Se determinó la concentración de la muestra mediante la correlación de la medida digital del equipo y la curva de calibrado (Laboratorio OSP (UCE), 2016d, 2016e)

En el caso de necesitarse diluciones se emplearon las Ecuaciones 6 y 7 para el cálculo y expresión de resultados según corresponda.

$$\text{Na} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \text{Lectura} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \text{FD} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Dónde:

FD= Factor de dilución

$$\text{Mg} \frac{\text{mg}}{\text{L}} = \text{Lectura} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) * \text{FD} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Dónde:

FD= Factor de dilución

- **Carbonatos de calcio (CaCO₃)**

La evaluación de la concentración de carbonatos se realizó en el Laboratorio de Ambiental OSP de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador, mediante el método de titulación con el indicador pH 4.5 verde de bromocresol. Para ello, se ajustó la muestra a temperatura ambiente y se descargó en un matraz erlenmeyer. Se adicionaron 5 gotas de la solución de verde de bromocresol y se tituló hasta un cambio de color persistente característico del punto de equivalencia (Laboratorio OSP (UCE), 2016a). La técnica empleada presenta un límite de cuantificación de 3.1 mg CaCO₃/l y un rango de trabajo de 3.1-100 mgCaCO₃/l.

El cálculo y expresión de los resultados se realizó mediante la Ecuación 8.

$$\frac{\text{mgCaCO}_3}{\text{l}} = \frac{\text{A} \times \text{N} \times 50,08 \times 1000}{\text{ml de muestra}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Dónde:

A= ml ácido estándar usado

N= normalidad del ácido estándar

- **Cálculo de la Relación de Absorción de Sodio (RAS)**

El índice de RAS se calculó a partir de los datos de concentración obtenidos de los elementos: calcio, sodio y magnesio, mediante la Ecuación 9.

$$\text{RAS} = \frac{\text{Na} (\text{meq/L})}{(\sqrt{\text{Ca}(\frac{\text{meq}}{\text{L}}) + \text{Mg}(\frac{\text{meq}}{\text{L}})})/2} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Tomado de: (J. Pérez, 2011)

4.2.5 Fase 4. Formulación e instalación de unidades experimentales

De acuerdo al diseño experimental se formularon 6 tratamientos distintos, por triplicado y dos controles negativos, dando un total de 20 unidades experimentales. El inóculo de cada cepa microalgal, CMIE A1-004, *Chlorococcum* sp., CMIE I8-003, *Chlorella* sp y CMIE I6-001, *Pleurococcus* sp., para todos los reactores tuvo una concentración inicial de 1×10^6 cel/mL y su respectivo volumen de agua residual gris hasta el aforo de 4 litros. A las unidades experimentales que correspondía se les añadió 1 dosis semanal del fertilizante Nitrofoska® (1mL/L) durante los 25 días de experimentación.

Las unidades experimentales fueron ensambladas en recipientes de plástico con su respectivo acondicionamiento de aireación, a través de mangueras desde bombas de presión de 0,012 Mpa, también se incorporó una piedra difusora de piedra pómez para incrementar la agitación por emanación de microburbujas a cada biorreactor. La iluminación artificial acondicionada para los fotoperiodos de luz y oscuridad fue de tipo fría mediante lámparas fluorescentes dispuestas en la parte superior de los reactores, cada lámpara de una intensidad de 10000 luxes.

A la totalidad de la estructura de experimentación se acopló un recubrimiento de plástico, el cual tuvo el objetivo de preservar la temperatura e impedir el acercamiento de insectos atraídos por la luz y evaporaciones propias del tratamiento del agua residual gris en los biorreactores. En la Figuras 13 y 14 se describe el acondicionamiento de los biorreactores experimentales.



Figura 13. Equipamiento de las 20 unidades experimentales, aireación individual e iluminación superior mediante lámparas fluorescentes.



Figura 14. Aforo de las unidades experimentales a volumen de 4 L con agua residual gris (muestra compuesta).

4.2.6 Fase 5. Periodo de ficorremediación

El periodo de tratamiento del agua gris con microalgas fue de 25 días. Los biorreactores se mantuvieron bajo las mismas condiciones de formulación e instalación dispuestas en la Fase 4. Diariamente los biorreactores fueron agitados manualmente para promover la homogenización de todo el cultivo y potencializar la acción de la aireación por burbujeo.

4.2.6.1 Evaluación de la cinética de crecimiento

Se evaluó la cinética de crecimiento de cada biorreactor los 25 días de experimentación con una frecuencia de conteo celular de cada dos días. La evaluación cinética se realizó mediante la técnica de conteo celular en cámara de Neubauer descrita en la Fase 1, apartado 4.2.2.1. Se tomaron de 1 a 2mL de muestra por cada biorreactor, previamente homogenizado. Los parámetros cinéticos fueron evaluados mediante las ecuaciones 3 y 4 descritas en el apartado 4.2.2.2.

4.2.7 Fase 6. Análisis experimental intermedio

Al término de los primeros 15 días de experimentación se analizaron los parámetros tensoactivos aniónicos, DQO, pH y conductividad eléctrica, de acuerdo a la metodología descrita en los apartados correspondientes de la Fase 3.

4.2.7.1 Recuperación del agua residual tratada

Las muestras de agua en tratamiento fueron filtradas para el análisis de los parámetros físico-químicos y biológicos, mediante la recuperación de la biomasa microalgal por centrifugación de acuerdo al siguiente protocolo: se centrifugó 1 litro de muestra de cada unidad experimental a 2000 rpm en ciclos de 7 minutos en una centrífuga BOECO C-28A. La biomasa precipitada fue retornada a cada unidad experimental para evitar la disminución de densidad celular y eficiencia del tratamiento.

4.2.8 Fase 7. Análisis físico-químico y biológico post-prueba

El análisis de todos los parámetros de caracterización de las muestras de agua post-tratamiento se realizó al término de los 25 días de experimentación. La

metodología empleada para cada uno de los parámetros fue descrita en la Fase 3.

4.3 Evaluación estadística de los resultados

El análisis estadístico de los resultados comprendió la evaluación de significancia de las unidades de tratamiento experimental con respecto a los reportes finales de los parámetros indicadores de la calidad de agua, así como, con sus respectivos controles negativos. Dichos análisis se realizaron mediante la Prueba T de muestras relacionadas y la Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, con un nivel de significancia de 0,5, muy significantes de 0,05 en un intervalo de confianza al 95%, para ambos casos. Se empleó el software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versión 24 para dicha evaluación.

5. Capítulo V. Resultados y Discusión

5.1 Cinética de crecimiento y escalado de cepas microalgales

Se realizó la evaluación cinética de cada una de las cepas seleccionadas cultivadas en medio de cultivo BG-11, durante un rango de 26-30 días mediante el método de conteo directo en cámara de Neubauer. De los valores de concentración diarios se obtuvieron las curvas de crecimiento. Además, mediante las ecuaciones de velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td) (apartado 4.2.2.2 de la metodología) se determinaron los parámetros cinéticos de crecimiento. Al término del proceso de escalamiento a un volumen de 5 litros para cada cepa en reactores de 5 litros cultivados en medio de agua potable con el fertilizante Nitrofoska® (1ml/L) se obtuvo una concentración celular final de la cepa *Chlorella* sp de 8400 cel/mL, *Chlorococcum* sp de 310 cel/mL y *Pleurococcus* sp de 420 cel/mL. A partir de dichos cultivos masificados se realizaron observaciones microscópicas de las células.

5.1.1 Cepa *Pleurococcus* sp., CMIE I6-001

5.1.1.1 Curva de crecimiento y parámetros cinéticos

La evaluación cinética de crecimiento de la cepa *Pleurococcus* sp., se realizó durante un periodo de 23 días. La Figura 15 muestra la curva de crecimiento y los valores de velocidad específica (μ) y tiempo de duplicación (td).

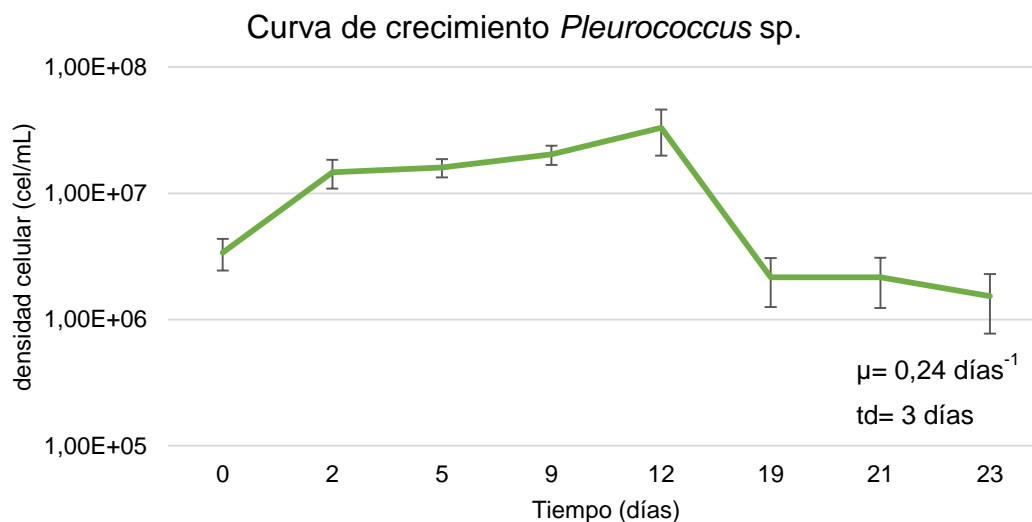


Figura 15. Curva de crecimiento de la cepa *Pleurococcus* sp., CMIE I6-001.

La curva de crecimiento de la cepa *Pleurococcus* sp., indica que la fase exponencial se presentó entre los días 5-12. A partir, del día 13 se registró la fase estacionaria y la disminución de la densidad celular del cultivo. En cuanto a los parámetros cinéticos, se registró una velocidad específica de crecimiento (μ) de $0,24 \text{ días}^{-1}$ y un tiempo de duplicación celular (td) de 3 días. Dichos parámetros fueron evaluados entre los días 2-12, según los datos presentados en la sección de Anexos.

No se registran reportes bibliográficos del cultivo y caracterización cinética de la cepa *Pleurococcus* sp., en el medio BG-11. Sin embargo, Vela, (2016) realizó el cultivo y caracterización de la cepa en el medio de cultivo Bold Basal, registrando una velocidad de crecimiento de $0,88 \text{ días}^{-1}$, la cual es superior a la

obtenida en el medio BG-11. Además, la fase exponencial de crecimiento se presentó durante un mayor periodo de tiempo (18 días) con respecto a la presente evaluación (7 días).

La composición del medio Bold Basal propone ser un mejor medio de cultivo para la microalga *Pleurococcus* sp, debido a su mayor y mejor equilibrado contenido de macro y micro nutrientes (Andersen, 2005), los cuales favorecen el crecimiento de la cepa. Dichas aseveraciones coinciden con los reportes de Ali y colaboradores (2014) y Lewin & Ralph (2006), los cuales demostraron mejores resultados en cuanto a la cinética celular de otras cepas clorofitas cultivadas en medio Bold Basal con respecto a la tasa de crecimiento en otros tipos de medios de cultivo, tales como: BG-11, M4N, N-8 y M-8.

5.1.1.2 Microscopía de células de *Pleurococcus* sp, en cultivo

La observación por microscopía de células de *Pleurococcus* sp., se presenta en la Figura 16. En las células de *Pleurococcus* sp., se puede apreciar la presencia de un núcleo rodeado de cloroplastos a manera de gránulos en el citoplasma.

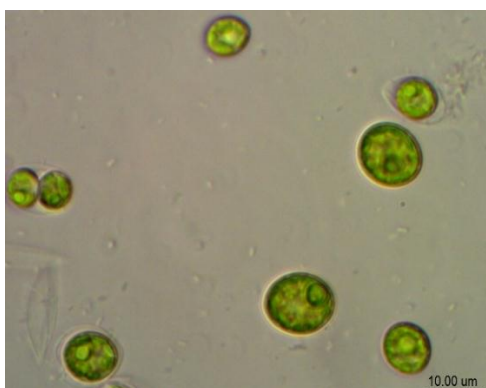


Figura 16. Células individuales de *Pleurococcus* sp. Observación con lente 100X.

5.1.2 Cepa *Chlorococcum* sp., CMIE A1-004

5.1.2.1 Curva de crecimiento y parámetros cinéticos de *Chlorococcum* sp.

La evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa *Chlorococcum* sp., se realizó durante un periodo de 30 días. La Figura 17 presenta los valores de velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (td) evaluados entre los días 5-12 según los datos presentados en la sección de Anexos.

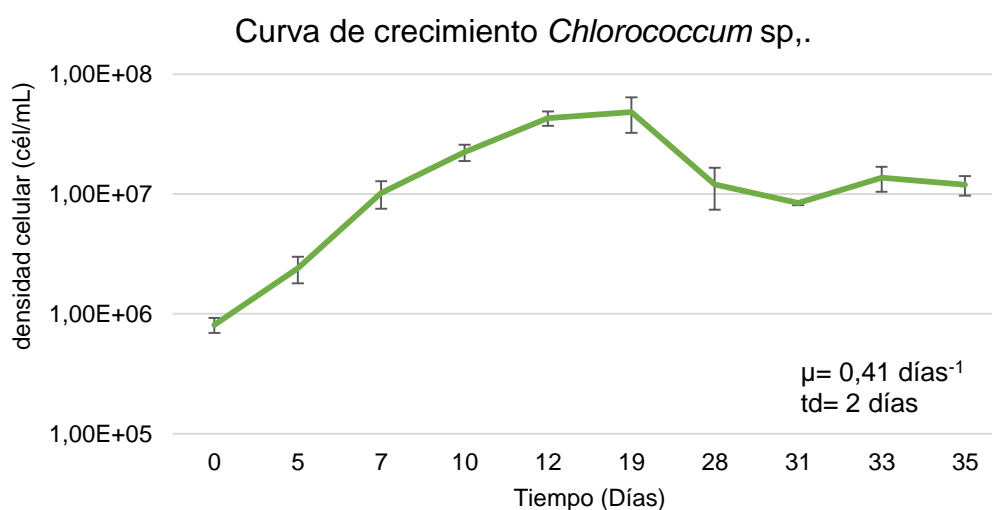


Figura 17. Curva de crecimiento de la cepa *Chlorococcum* sp., cepa CMIE A1-004.

La curva de crecimiento de la cepa *Chlorococcum* sp., describió una fase de crecimiento exponencial de los 0 a 19 días. A partir, del día 20 se registró el inicio de la fase estacionaria y el decrecimiento de la densidad celular. En cuanto a los parámetros cinéticos, se registró una velocidad específica de crecimiento (μ) de $0,41 \text{ días}^{-1}$ y un tiempo de duplicación celular (td) de 2 días.

Varios reportes tales como el presentado por Kirrolia, Bishnoi, & Singh, (2012), demuestran una mayor velocidad de crecimiento y productividad de biomasa de *Chlorococcum* sp., al cultivarse en el medio BG-11 versus el cultivo en otros medios. El comportamiento y cinética de crecimiento descrita de la cepa en el

presente estudio coincide con los reportes presentados por Páez, (2016) , en el cual se reporta una concentración de $1,0E+07$ cel/mL como inicio de la fase exponencial de crecimiento.

5.1.2.2 Microscopía de células de *Chlorococcum* sp, en cultivo

Se observaron células de *Chlorococcum* sp, las cuales se presentaron como células ovals independientes con numerosos gránulos cloroplásticos, el núcleo no se aprecia fácilmente. Además, se observaron agrupaciones celulares posiblemente producto de un proceso de división celular. En la Figura 18 se aprecian las observaciones.

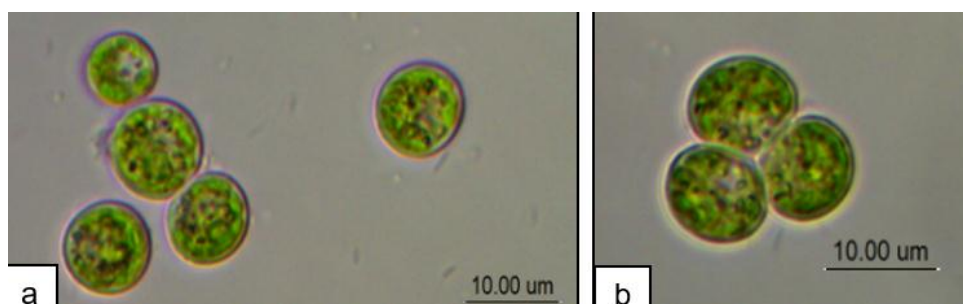


Figura 18. Microscopía de células de *Chlorococcum* sp.

(a) Se muestran células individuales de *Chlorococcum* sp., (b) Se muestra la disposición de conglomerados celulares de *Chlorococcum* sp. Observación con lente 100X.

5.1.3 Cepa *Chlorella* sp., CMIE I8-003

5.1.3.1 Curva de crecimiento y parámetros cinéticos

La evaluación de la cinética de crecimiento de la cepa *Chlorella* sp., se realizó durante un periodo de 27 días. La Figura 19 muestra la curva y los parámetros de velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d), evaluados entre los días 0-7 según los datos presentados en la sección de Anexos.

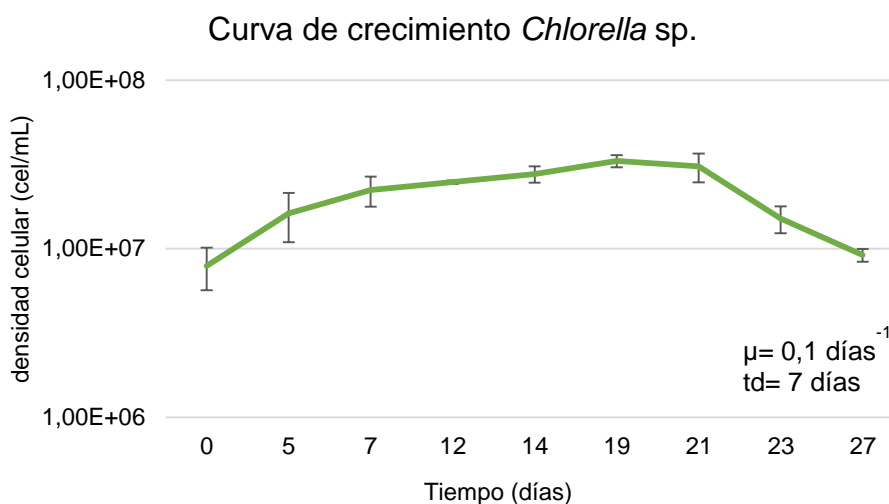


Figura 19. Curva de crecimiento de la cepa *Chlorella* sp., CMIE I8-003.

A partir de la curva de crecimiento se pudo determinar la fase exponencial, la cual se produjo entre los días 0 hasta el día 19. El inicio de la fase estacionaria se registró a partir del día 20. En cuanto a los parámetros cinéticos, se registró una velocidad máxima de crecimiento (μ) de $0,1 \text{ días}^{-1}$ y un tiempo de duplicación celular (td) de 7 días.

Los resultados a nivel cinético obtenidos demuestran una tasa de crecimiento menor con respecto a los reportados por la bibliografía, en la cual se determina un tiempo de duplicación más corto de entre 1 a 2 días y velocidades de crecimiento mayores ($\mu=0,8 \text{ días}^{-1}$) (García, 2014). Por otra parte, Henrard et al., 2015; Kumar, Pradeepta, Sahoo, & Singhal, 2016; Makarevi, Andrulevi, & Skorupskait, 2011 evaluaron la eficiencia del medio de cultivo BG-11, determinando que este es el medio más eficiente para el cultivo de *Chlorella* sp., demostrando altos índices de productividad de biomasa. En vista de ello, se puede considerar que durante el cultivo de la cepa en el presente estudio se presentaron alteraciones en otros factores importantes de crecimiento como la intensidad lumínica y aireación, los cuales pudieron causar una inhibición o retraso del crecimiento de la cepa.

5.1.3.2 Microscopía de células de células de *Chlorella* sp, en cultivo

La observación por microscopía de células de *Chlorella* sp, mostraron células individuales ovoides de aproximadamente 5µm de longitud, las cuales no presentan flagelo pero sí una alta densidad de cloroplastos en el citoplasma, lo cual les confiere una coloración verdosa intensa, tal como se presenta en la Figura 20.

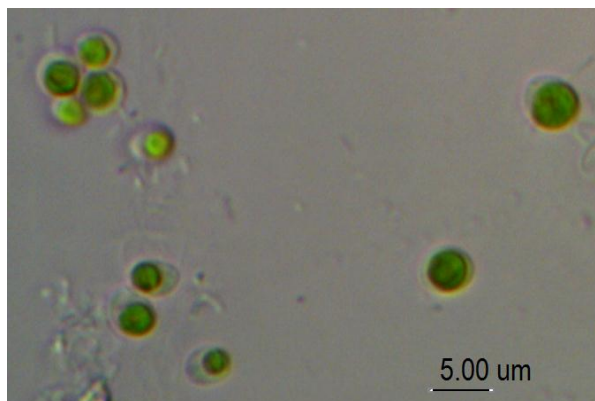


Figura 20. Se muestran las células individuales y conglomerados de *Chlorella* sp. Observación con lente 100X.

5.2 Caracterización de la muestra inicial de agua residual gris

La muestra de agua residual gris fue colectada en 8 domicilios de la comunidad Salamalag Chico durante los días 23 y 24 de Marzo de 2017, de acuerdo al apartado 4.2.3.2 de la metodología. Se realizó la caracterización de la muestra homogénea en base al análisis de 7 parámetros indicadores de la calidad de agua para riego, los cuales se presentan en contraste con los descritos en la bibliografía en la Tabla 8, a continuación:

Tabla 8.

Caracterización de la muestra colectada de agua residual gris y valores frecuentes de caracterización.

Parámetro	Unidades	Índices frecuentes (*)	Resultados
CE	µs/cm	320-1200	609
pH		6,9-8,7	6,1
DQO	mg/LO ₂	740	1550,7
Carbonatos de calcio	mgCaCO ₃ / L	149-198	1187,5
RAS		NE	7,5
Calcio (Ca ⁺²)	mg/L	23-30	26,4
Sodio (Na ⁺¹)	mg/L	92-180	111,25
Magnesio (Mg ⁺²)	mg/L	3,3-7,3	6,0
Tensoactivos aniónicos	mg/L	Detectado	3,292
Coliformes totales	UFC/mL	1,3x10 ⁵ -2,5x10 ⁸	52x10⁵

Adaptado de: (Eriksson et al., 2002)

NOTA: NE: No especifica. (*): Referencia bibliográfica.

En comparación con los parámetros descritos en la caracterización típica de muestras de agua residual gris, la muestra de estudio presentó índices de CE, pH, coliformes totales comprendidos entre los rangos comunes de caracterización. La demanda química de oxígeno (DQO), presentó un índice menor respecto la concentración frecuente. Mientras que, la concentración de Carbonatos de Calcio, se encuentra por debajo del rango frecuente de caracterización. Otros parámetros analizados como el índice de RAS categorizan a la muestra en un rango intermedio con respecto al grado de restricción para el uso de aguas en el riego agrícola. La caracterización típica no especifica el valor de RAS, sin embargo, las concentraciones de los

elementos constituyentes del parámetro, Ca^{+2} Na^{+1} y Mg^{+2} , presentaron índices entre los rangos frecuentes de las aguas residuales.

La concentración de tensoactivos aniónicos sobrepasa el rango máximo permitido para la descarga de efluentes hacia cuerpos de agua dulce o marina, si se diera el caso, según la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes presentada por el Ministerio del Ambiente (2015). No se han reportado índices estándar de dicho parámetro en la caracterización típica de aguas residuales grises, en algunos casos se determina como indetectable (Eriksson et al., 2002).

Se puede considerar que la muestra de agua residual gris a tratar mantiene una muy aproximada caracterización a la mayoría de muestras de agua gris o de origen doméstico. Sin embargo, existen ciertas características especiales, tales como el contenido de tensoactivos, que se deben a particularidades propias de su origen.

5.3 Evaluación de la eficiencia de biorremediación de aguas residuales grises de los tratamientos microalgales

5.3.1 Cinética y parámetros de crecimiento de las unidades de tratamiento

La evaluación de la curva y parámetros cinéticos de crecimiento de cada una de las unidades experimentales se realizó en base al protocolo descrito en los apartados 4.2.2.1 y 4.2.2.2 de la metodología, respectivamente. Se registró un comportamiento cinético variable entre los tratamientos, sin embargo, de manera general se registró una mayor tasa de crecimiento de las cepas microalgales en el medio de agua residual gris sin la aplicación del fertilizante Nitrofoska®. Lo cual se puede apreciar en la Figura 21.

El comportamiento cinético de las unidades de *Pleurococcus* sp., *Chlorococcum* sp., y *Chlorella* sp, sin la aplicación de Nitrofoska®, 1a, 2a y 3a respectivamente, registraron una mayor velocidad específica de crecimiento y densidad celular en comparación con las unidades experimentales de dichas cepas con la aplicación de Nitrofoska®, cuyo crecimiento a nivel cinético se presentó reducido a la mitad. Ante dichos resultados, es posible suponer que la aplicación del fertilizante foliar Nitrofoska® tuvo un efecto perjudicial sobre el crecimiento de la microalga al interactuar con la matriz de cultivo, en este caso el agua residual gris. No existen reportes que correlacionen estos dos factores en el estudio de la eficiencia de remediación de aguas residuales, sin embargo, es posible realizar ciertos planteamientos.

El fertilizante Nitrofoska® es un producto que se emplea para el cultivo de especies de microalgas debido a su balanceado contenido nutricional, el cual satisface las necesidades básicas para el desarrollo microalgal, además su empleo a gran escala de producción es viable económicamente (D. Brito, Milani, Pereira, González, & Morán, 2006). Es posible que se produzca una saturación de nutrientes lo cual puede limitar el crecimiento microalgal, tal como lo plantea Díaz y sus colaboradores (2012), los cuales reportaron una mayor densidad celular de $8,19 \times 10^6$ cel/mL al aplicar a sus experimentaciones una concentración de 1 mL/L de Nitrofoska y una menor densidad de $5,61 \times 10^6$ cel/mL al aplicar 3 mL/L del fertilizante, corroborando la idea de que la mayor cantidad de nutrientes añadidos no asegura una mayor producción de biomasa.

La matriz de agua residual gris intrínsecamente aporta con una alta concentración de nutrientes, los cuales se pueden considerar suficientes para el desarrollo microalgal. Meneses, (2015a) evaluó la capacidad de remoción de contaminantes de una muestra de agua de un reservorio hídrico empleando microalgas y varias concentraciones del fertilizante Nitrofoska® como aditivo nutricional. Los resultados reportados indicaron una mayor tasa y velocidad específica de crecimiento microalgal en el medio formulado con una

concentración de 1,5 mL/L del fertilizante frente a la evaluación con otras concentraciones superiores. La composición del agua de reservorio presenta una menor cantidad de nutrientes y sustancias contaminantes en comparación con las aguas residuales por lo que es posible suponer que a pesar de que en dicho caso fue necesario aplicar una mínima cantidad del fertilizante para suplir la falta nutricional, y bajo concentraciones superiores se presentaron resultados no favorables, en el caso del cultivo en medios de aguas residuales no sería necesaria aplicar ninguna cantidad de Nitrofoska®, ni ningún otro suplemento nutricional.

Es necesario precisar que en esta instancia no es determinante el género microalgal a cultivar. La hipótesis de una limitación de la adaptación de las microalgas al medio de cultivo por altas concentraciones de nutrientes es posible generalizar, por ahora, para las especies de la división Chlorophyta, debido a su semejante fisiología y mecanismos de crecimiento. Los resultados demostrados en este estudio coinciden para las tres cepas experimentales en un comportamiento de crecimiento reducido similar bajo las condiciones en las cuales se aplicó Nitrofoska®. Sin embargo, sería motivo de próximos estudios determinar a nivel fisiológico las causas por las cuales el exceso de nutrientes causa limitaciones de crecimiento en estos organismos o si es posible que el fertilizante genere otro tipo de interacciones con la matriz de agua residual que inhiba el máximo crecimiento microalgal.

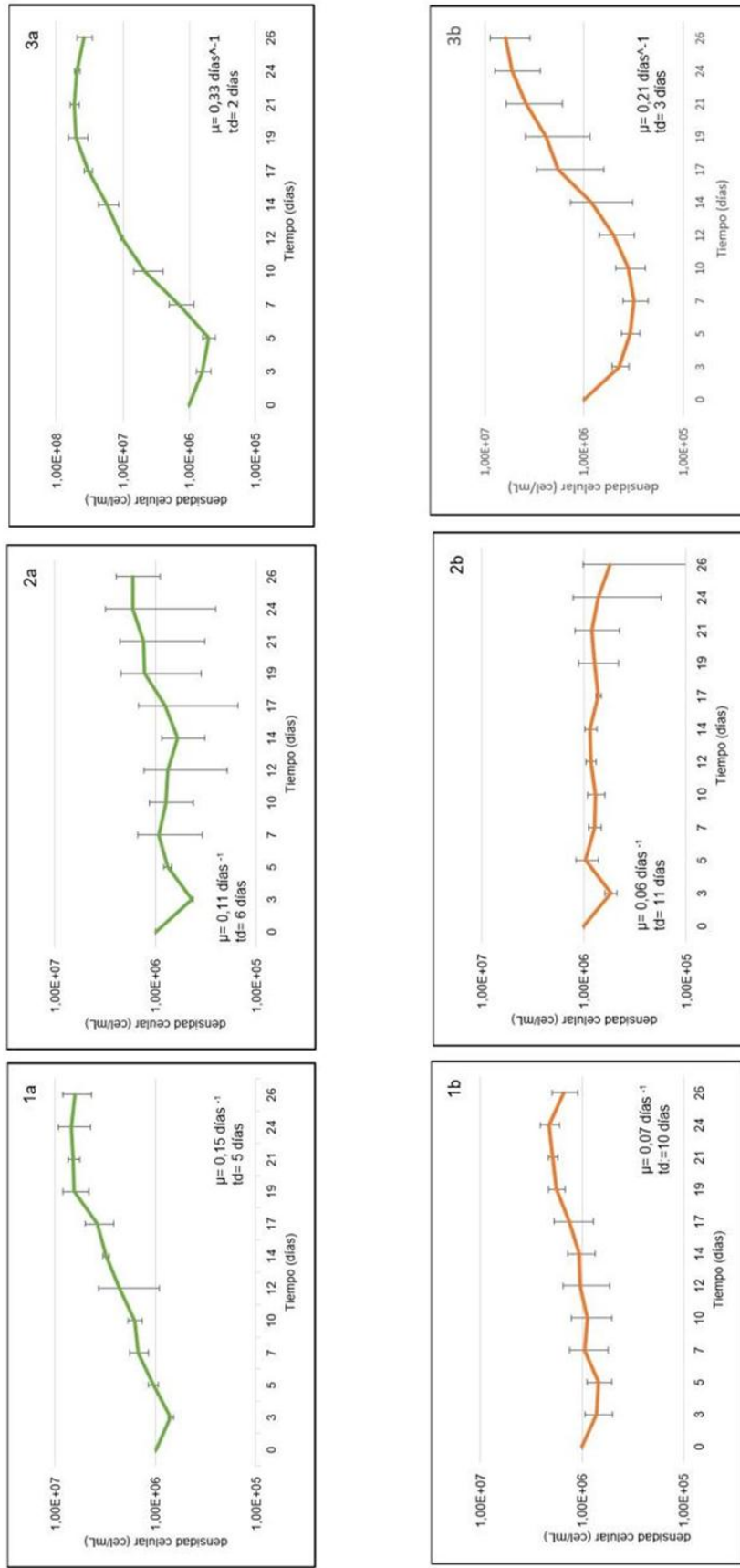


Figura 2.1. Curvas y parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas:

(1) *Pleurococcus* sp. (2) *Chlorococcum* sp.(3) *Chlorella* sp. (a) con Nitrofoska® (b) sin Nitrofoska®.

5.3.1.1 Tratamientos con la cepa *Pleurococcus* sp., cepa CMIE-I6-001, con y sin la aplicación de Nitrofoska®

La curva de crecimiento de las unidades de tratamiento sin Nitrofoska® (1a) y con Nitrofoska® (1b) describe el comportamiento cinético de la cepa *Pleurococcus* sp. En ambos casos se registró un notable decrecimiento de la densidad celular a partir del tercer día, tal como se aprecia en las gráficas de la Figura 21. Esta disminución de la densidad celular se debió a la pérdida de biomasa de las unidades ocasionada por la producción de una gran cantidad de espuma durante los primeros días de experimentación, lo cual causó la remoción de las células hacia el exterior. Para contrarrestar la alta producción de espuma se redujo al mínimo la potencia de aireación sometida a los cultivos. Entre el periodo de los días 5-7 se registró un progresivo aumento de la densidad celular.

La curva de crecimiento de la unidad 1a describe una fase de crecimiento exponencial entre los días 3-19 de cultivo, periodo en el cual se realizó la evaluación de los parámetros cinéticos ($\mu=0,15$ días⁻¹ y $t_d=5$ días). Entre los días 21-24 se registró una estabilización de la densidad celular, indicativo de la fase estacionaria. A partir del día 26 se presentó una disminución de la densidad celular. Por otra parte, la curva de crecimiento de la unidad con el fertilizante (1b) describió el desarrollo de la fase exponencial de crecimiento durante el periodo entre los días 10-21, a partir del día 24 ocurrió un decrecimiento de la densidad celular y se registró una $\mu=0,07$ días⁻¹ y $t_d=10$ días. Las curvas de crecimiento presentadas corresponden al compendio de las réplicas realizadas, las cuales se pueden verificar en la sección de Anexos.

Las unidades de tratamiento experimental con la cepa *Pleurococcus* sp, con y sin la adición del fertilizante foliar Nitrofoska® demostraron diferencias a nivel cinético con respecto a la eficiencia del cultivo de la misma cepa en el medio de cultivo BG-11, en el cual se registró una mayor velocidad específica de crecimiento ($\mu=0,24$ días⁻¹) y un menor tiempo de duplicación ($t_d=3$ días).

Dichos resultados se pudieron deber a la pérdida considerable de biomasa suscitada al inicio de la fase experimental a causa de la alta producción de espuma, ocasionada por el contenido de surfactantes aniónicos presente en el agua residual gris, lo cual produjo un desbalance en la concentración de inóculo y su normal desarrollo cinético. La presencia de espuma causa una inmovilización de las células viables y las expulsa hacia el exterior del cultivo. Además, dificulta la transferencia de oxígeno disuelto y luz hacia el medio de cultivo, debido a su opacidad (Mallick, 2002).

Se han reportado estudios en los cuales la densidad y tasa de crecimiento microalgal se redujo a causa de la pérdida de células viables por la retención en matrices de espuma. Tal es el caso del estudio de Robinson y colaboradores (1985), los cuales reportaron una disminución del 30% de la tasa de crecimiento y actividad respiratoria de la cepa *Chlorella* sp. Por otra parte, en el estudio realizado por Bailliez y su equipo (1985), se reportó en menor medida un aumento de la tasa de densidad celular y biomasa microalgal del cultivo de células inmovilizadas en matrices de espuma en comparación con el cultivo de células libres.

Adicionalmente, se puede considerar que la composición de la matriz de agua residual gris no fue completamente adecuada para el desarrollo de esta cepa por lo que su crecimiento con respecto al cultivo en el medio de cultivo BG-11 se redujo prácticamente a la mitad. La cepa *Pleurococcus* sp, es un género sensible y menos tolerante a las condiciones de cultivo, por lo que algunos factores abióticos como, la interferencia de microorganismos endémicos como bacterias y protozoos y la composición química del agua pudo interferir con el crecimiento microalgal (Martínez, 2000). A diferencia de ello, otros géneros como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina*, *Neochloris* entre otros, son más tolerantes y se adaptan mejor a las condiciones propias de las aguas residuales (Ruiz, 2011). No se han registrado reportes de la evaluación de

biorremediación de aguas residuales grises empleando el género *Pleurococcus* sp.

5.3.1.2 Tratamientos con la cepa *Chlorococcum* sp., con y sin la aplicación de Nitrofoska®

La evaluación cinética de las unidades de tratamiento sin Nitrofoska® (2a) y con Nitrofoska® (2b) de la cepa *Chlorococcum* sp., se realizó a partir del análisis de la curva y parámetros de crecimiento. De la misma forma, que en el caso de las unidades 1a y 1b, se registró una disminución de la densidad celular durante los primeros días de cultivo debido a la producción de espuma. En ambos casos se presentó un crecimiento irregular hasta el día 14, el cual corresponde al periodo de adaptación del cultivo posterior a la pérdida de biomasa.

La curva de crecimiento de la unidad experimental sin Nitrofoska® (2a) muestra la fase exponencial desde el día 14 hasta el término de la fase experimental (día 26). Se registró una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0,11 días⁻¹ y un tiempo de duplicación celular de 6 días, evaluados entre el periodo de los días 14-21. Por su parte, la curva de crecimiento de la unidad de tratamiento con Nitrofoska® (2b) no describió una tendencia de crecimiento exponencial, sino que, al contrario se registró una densidad celular constante a lo largo del tiempo de cultivo. En cuanto a los parámetros cinéticos, se registró una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0,06 días⁻¹ y un tiempo de duplicación de 11 días. Las curvas de crecimiento presentadas en la Figura 21 corresponden al compendio de las réplicas realizadas, las cuales se pueden verificar en la sección de Anexos. Cabe señalar que para la curva de la unidad de tratamiento 2a se omitió la réplica 3 debido a la alta dispersión de los datos.

La evaluación cinética de las unidades de tratamiento de la cepa *Chlorococcum* sp., con y sin la aplicación del fertilizante foliar Nitrofoska (2a y 2b) demostraron una menor eficiencia con respecto a los resultados obtenidos en

el cultivo de la cepa *Chlorococcum* sp, en el medio BG-11, en el cual se registró una mayor velocidad específica de crecimiento de: $\mu=0,41 \text{ días}^{-1}$ y un menor tiempo de duplicación de 2 días. Esto pudo deberse, como se detalló para las unidades experimentales de la cepa *Pleurococcus* sp., a la reducción de la tasa de crecimiento a causa de la pérdida de biomasa por la producción de espuma y a las características de la matriz de cultivo de agua residual gris. Dichas aseveraciones se pueden mantener para esta cepa, ya que el principio de crecimiento microalgal es semejante en ambos géneros de microalgas. Sin embargo, el género *Chlorococcum* sp, ha demostrado ser capaz de crecer en sistemas centralizados de tratamiento de aguas residuales municipales y presentar mayores índices de productividad de biomasa frente a otros géneros como: *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* y ciertas especies de *Chlorella*, tal como lo reporta Li y su equipo de colaboradores (2011).

La velocidad específica de crecimiento obtenida en el tratamiento de *Chlorococcum* sp, sin la aplicación de Nitrofoska® ($\mu=0,11 \text{ días}^{-1}$) es cercana a la velocidad reportada por Aravantinou, Theodorakopoulos, & Manariotis (2013) de $0,12 \text{ días}^{-1}$ en el cultivo de la cepa en agua residual sintética. La formulación de aguas residuales mantienen ciertas aproximaciones en comparación al contenido de las aguas “reales”, sin embargo, el efecto de otros parámetros no controlados, como los abióticos, que solo se presentan en las aguas residuales no pueden ser adaptados a las formulaciones. Teniendo en cuenta dichas consideraciones, se puede establecer que la velocidad de crecimiento reportada en el presente estudio resulta favorable en comparación con otras matrices experimentales.

Mahapatra & Ramachandra (2013a), reportó una velocidad específica de crecimiento superior ($\mu=0,75 \text{ días}^{-1}$) a los obtenidos en el presente estudio, la cual fue evaluada a partir de cultivos de *Chlorococcum* sp., en medios de agua residual esterilizada por filtración. Teniendo en cuenta aquello, se puede establecer la razón por la cual en la muestra de agua residual gris a tratar se

presentaron velocidades de crecimiento menores y tiempos de duplicación superiores, tanto en la experimentación con y sin la aplicación de Nitrofoska®, en comparación al estudio referido. El agua residual al ser esterilizada pierde una gran parte de microorganismos nativos, los cuales al interactuar con las microalgas puede secretar sustancias tóxicas, competir por el sustrato e incluso se puede presentar una depredación por organismos protozoos como los rotíferos, lo cual influye directamente en la tasa de crecimiento, inhibiendo su máximo desarrollo (Ruiz, 2011).

5.3.1.3 Tratamientos con la cepa *Chlorella* sp., con y sin la aplicación de Nitrofoska®

La evaluación del comportamiento cinético de la cepa *Chlorella* sp., se realizó mediante el análisis de curvas y parámetros cinéticos de crecimiento. Debido a la alta producción de espuma, previamente reportada, en las unidades de *Chlorella* sp. sin Nitrofoska® (3a) y *Chlorella* sp con Nitrofoska® (3b), de igual manera, se registró un decrecimiento importante de la densidad celular con respecto al inóculo inicial del cultivo desde el primer día de experimentación.

La curva de crecimiento de la unidad de tratamiento 3a describió el desarrollo de la fase exponencial de crecimiento entre los días 5-21, a partir del día 24 se registró un ligero decrecimiento, indicando la llegada de la fase estacionaria. Por su parte, la unidad de tratamiento 3b registró un mayor tiempo de adaptación inicial de aproximadamente 10 días. A partir del día 12 se registró el inicio de la fase exponencial hasta el término de la experimentación, día 26. Dichas observaciones se pueden verificar en las curvas presentadas en la Figura 21, las cuales corresponden a la compilación de las réplicas realizadas disponibles en la sección de Anexos.

Los resultados de la evaluación cinética de las unidades de tratamiento de la cepa *Chlorella* sp., con y sin la aplicación del fertilizante foliar Nitrofoska®,

demonstraron una mayor eficiencia en comparación con el análisis cinético del cultivo de *Chlorella* sp., en el medio BG-11, en el cual se registró una menor velocidad de crecimiento ($\mu=0,1 \text{ días}^{-1}$) y un mayor tiempo de duplicación ($t_d=7$ días), a pesar de ocasionarse una pérdida considerable de biomasa en la fase de tratamiento. Dichos resultados proponen que la cepa *Chlorella* bajo semejantes condiciones de cultivo crece mejor en el medio de agua residual gris que en el medio de cultivo BG-11.

Wang y sus colaboradores (2014) evaluaron la tasa de crecimiento y eficiencia de remediación de aguas residuales municipales de *Chlorella* sp., reportando una velocidad específica de crecimiento de $0,13 \text{ días}^{-1}$, dicha tasa de crecimiento resulta inferior a los índices obtenidos en el presente estudio. La composición del agua residual es determinante para obtener una buena productividad microalgal, en el caso del estudio referido es evidente que la composición del agua de tratamiento no aportó con la suficiente cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado de *Chlorella* sp.

Por otro lado, en uno de los estudios referidos anteriormente, Aravantinou y su equipo de trabajo (2013), reportaron las tasas de crecimiento de dos géneros de *Chlorella* sp, cultivados en agua residual sintética. Dichos índices fueron de: $\mu=0,0869 \text{ días}^{-1}$ y $\mu=0,0997 \text{ días}^{-1}$ para los géneros, *C. protothecoides* y *C. vulgaris*, respectivamente. Como es evidente, la tasa de crecimiento de *Chlorella* sp., en un medio de agua residual sintética disminuye con respecto a su cultivo en medios de agua residual real, lo cual demuestra que *Chlorella* sp es un género microalgal con mayor tolerancia y capacidad de adaptación a las condiciones de cultivo de las aguas residuales, incluso con respecto a aquellos parámetros tales como, la presencia de sustancias tóxicas, microorganismos depredadores, entre otros, que resultan muy desfavorables para otras especies microalgales.

De igual forma, Tafur Alvarez & Estrada Palencia (2015), evaluó la eficiencia de crecimiento de *Chlorella* sp, en medio de agua residual cruda esterilizada, con el afán de eliminar las interacciones de otros microorganismos. Los resultados demostraron una densidad celular inferior ($9,8 \text{ E}+06 \text{ cel/ml}$), la cual es inferior a la máxima densidad obtenida en las experimentaciones realizadas en este estudio, $5,03\text{E}+07 \text{ cel/ml}$. Lo dicho coincide lo concerniente a la capacidad de adaptación y crecimiento de *Chlorella* sp.

5.3.2 Parámetros indicadores de la calidad de agua para riego

La evaluación de los parámetros indicadores de la calidad de agua se realizó en base a la metodología descrita en los apartados de la Fase 3. De acuerdo a lo establecido por cada parámetro, se presentan los resultados de las evaluaciones al tiempo de experimentación inicial y final y en algunos casos se incluye también una evaluación intermedia. La evaluación estadística significativa determinada para varios resultados se refiere al alto efecto en cuanto al aumento o disminución del índice de cada parámetro analizado en el agua tratada entre las distintas formulaciones experimentales o controles negativos respectivos.

5.3.2.1 Conductividad eléctrica (CE)

La evaluación de la CE se realizó en tres periodos (inicio, intermedio y final) de la fase experimental. Los resultados obtenidos demostraron una disminución muy significativa del índice de CE de las unidades de tratamiento: 1b, 2b, 3b (*Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp con Nitrofoska®) y 3a (*Chlorella* sp, sin Nitrofoska®) durante la evaluación inicial y final del periodo de experimentación. En el caso de las unidades 1a y 2a no reportaron resultados significativos en cuanto a la reducción del índice de CE. Por otra parte, la correlación de los tratamientos frente a los controles demostró que las unidades 1a, 2a y 3a (*Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp sin Nitrofoska®) presentaron resultados con alta significancia estadística (muy

significativos) en la disminución de la CE con respecto al control CN1. Mientras que, las unidades 1b, 2b y 3b presentaron resultados con alta significancia estadística con respecto al aumento frente al control CN2. Dichas apreciaciones se verifican en la Figura 22 y Tabla 9.

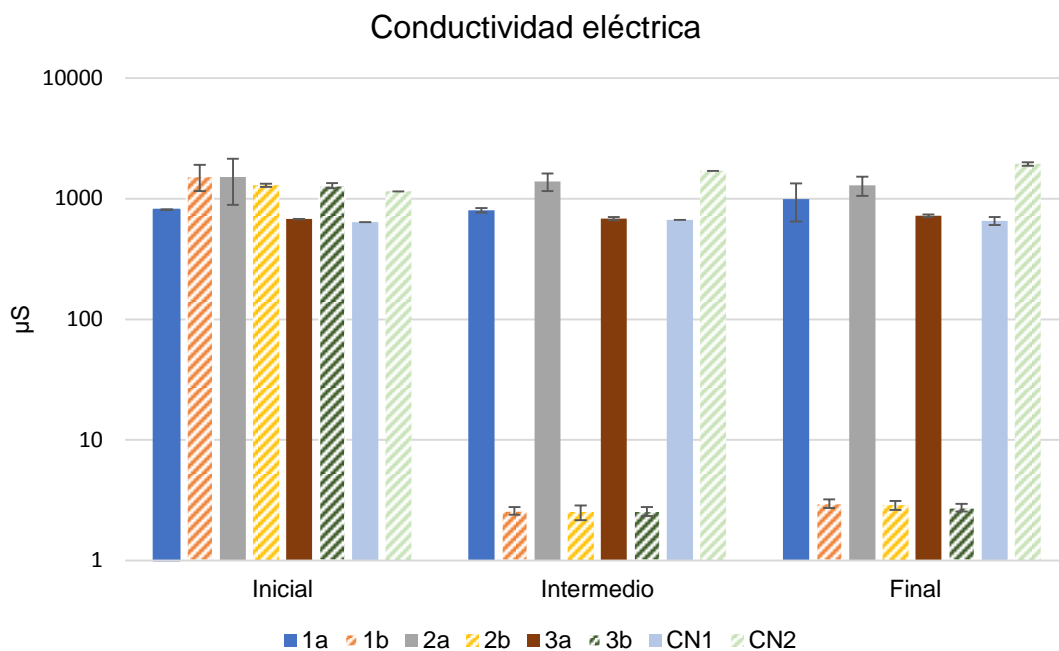


Figura 22. Evaluación de la CE de las unidades de tratamiento según cepas.

(1) *Pleurococcus* sp. (2) *Chlorococcum* sp. (3) *Chlorella* sp. (a) según adición.(b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 9.

Evaluación de significancia estadística de la CE de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

Conductividad eléctrica				
Unidad experimental	Prueba t de muestras relacionadas			
	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	+181	0,462	*
1b	1b i.-1b f.	-1530	0,020	**
2a	2a i.-2a f.	-226	0,421	*
2b	2b i.-2b f.	-1290	0,000	**
3a	3a i.-3a f.	+46	0,034	**
3b	3b i.-3b f.	-1278	0,001	**
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	+337	0,002	**
2a	2a f.-CN1 f.	+635	0,014	**
3a	3a f.-CN1 f.	+69	0,000	**
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	-1933	0,000	**
2b	2b f.-CN2 f.	-1933	0,000	**
3b	3b f.-CN2 f.	-1933	0,000	**

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

Las unidades de tratamiento de cada cepa microalgal (*Pleurococcus* sp., *Chlorococcum* sp. y *Chlorella* sp.) con la aplicación del fertilizante foliar Nitrofoska® presentaron resultados muy significativos en la reducción de la conductividad eléctrica con respecto al control compuesto por agua residual gris con el fertilizante (control CN2). Las unidades de tratamiento sin la aplicación del fertilizante, por su parte, presentaron resultados muy significativos con respecto al incremento del valor de conductividad, el cual en promedio fue del 15%, en referencia a la unidad de control de agua residual gris sin la aplicación de Nitrofoska® (CN1).

La CE es la propiedad que describe la capacidad de una solución líquida para transportar iones y corriente eléctrica. Una buena conducción depende de varios factores como la concentración de los compuestos inorgánicos, valencia, movilidad y temperatura (Yu, Su, Wu, & Yen, 2005). La reducción de la CE en los tratamientos de remediación de aguas residuales con microalgas, se debe a la habilidad de estos organismos en consumir los nutrientes, compuestos orgánicos e inorgánicos, del medio durante su fase de crecimiento. Tal como lo reportan Mostafa, Shalaby, & Mahmoud (2012), los cuales demostraron una reducción del valor de conductividad eléctrica al finalizar el periodo de tratamiento mediante varias especies de microalgas, entre ellas, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina platensis* y cianobacterias, tales como, *Nostoc muscorum*, *Anabaena flos aquae* y *Oscillatoria* sp, entre otras. De igual forma, en el estudio de Hernández, Vásquez, & Álvarez (2016), se reportó una reducción de hasta el 33% del valor de la conductividad eléctrica en el tratamiento de aguas residuales urbanas con consorcios microalgales.

El género de las microalgas utilizadas no tiene marcada influencia sobre la reducción de la conductividad eléctrica, sin embargo, se puede considerar que la aplicación del fertilizante Nitrofoska® como un aditivo nutricional pudo haber tenido cierto efecto sobre el consumo de nutrientes por parte de las microalgas y manifestarse en la reducción de la conductividad eléctrica. Cabe señalar que las unidades analizadas sin la aplicación del fertilizante presentaron una menor tasa de crecimiento.

Es pertinente cuestionarse los resultados que se presentaron en las unidades de tratamiento con los géneros *Pleurococcus*, *Chlorococcum* y *Chlorella* sin la aplicación de Nitrofoska®. La literatura no registra estudios en los cuales al término del tratamiento de aguas residuales con microalgas se produzca un incremento del valor de conductividad eléctrica. La influencia del fertilizante supone ser la causa por la cual las unidades de tratamiento que si percibieron su aplicación, registraron una significativa reducción del valor de conductividad.

El establecimiento del mecanismo fisiológico que comprende dicho fenómeno será sujeto de futuras investigaciones.

5.3.2.2 pH

La evaluación del pH se realizó en tres periodos durante la fase experimental, al tiempo inicial, intermedio y final. Se registró una variación significativa en la disminución del valor de pH en todas las unidades de tratamiento, compuestas por las cepas *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, con y sin la aplicación de Nitrofoska® (1a, 1b, 2a, 2b, 3a y 3b), durante la evaluación inicial y final del parámetro. No se registraron resultados significativos de las unidades de tratamiento con respecto a las unidades control (CN1 y CN2). Dichos resultados se pueden verificar en la Figura 23 y Tabla 10.

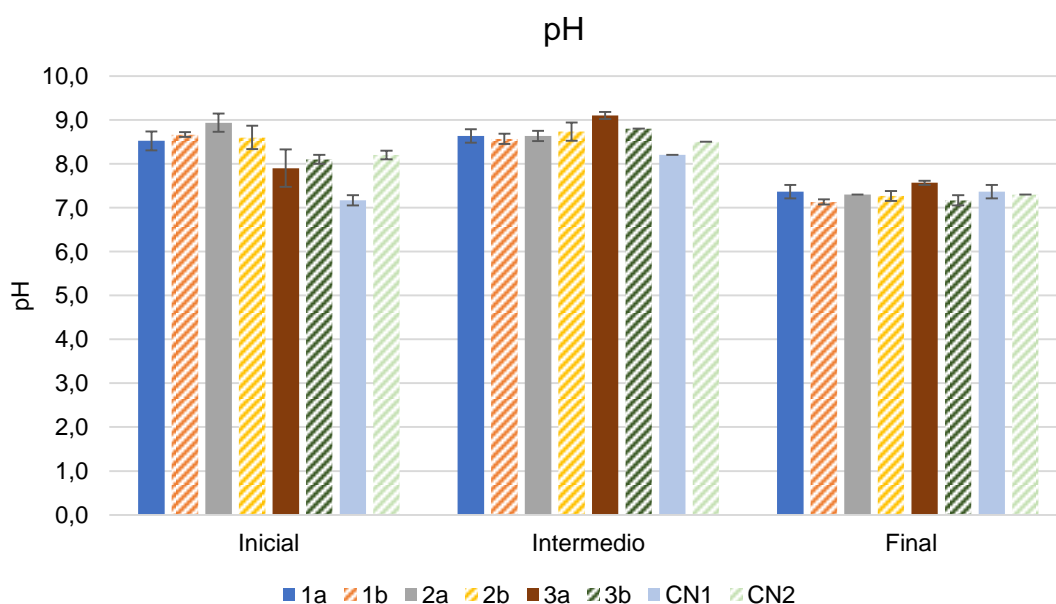


Figura 23. Evaluación de la variación de pH de las unidades de tratamiento según cepas.

(1) *Pleurococcus* sp. (2) *Chlorococcum* sp. (3) *Chlorella* sp. (a) según adición. (b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 10.

Evaluación de significancia estadística de la variación de pH de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

pH				
Prueba t de muestras relacionadas				
Unidad experimental	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	-1,1	0,033	**
1b	1b i.-1b f.	-1,6	0,000	**
2a	2a i.-2a f.	-1,6	0,005	**
2b	2b i.-2b f.	-1,3	0,012	**
3a	3a i.-3a f.	-0,9	0,001	**
3b	3b i.-3b f.	-0,3	0,405	*
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	0	0,963	
2a	2a f.-CN1 f.	-0,1	0,579	
3a	3a f.-CN1 f.	-0,2	0,507	
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	-0,2	0,102	*
2b	2b f.-CN2 f.	0	0,919	
3b	3b f.-CN2 f.	-0,3	0,015	**

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

Todas las unidades experimentales de tratamiento presentaron resultados significativos en la reducción del valor de pH hasta el término del periodo de remediación, el cual se encuentra dentro de la norma establecida de regulación para el uso de aguas en el riego (6,9-8,7). Sin embargo, las unidades control de igual forma demostraron una reducción del valor de pH, por lo tanto no es posible asignar absolutamente la acción de las microalgas a dicho efecto. En vista de ello, la disminución del pH se puede deber a la acción de bacterias nitrificantes nativas presentes en la matriz de agua residual gris. Las bacterias nitrificantes son autótrofas y emplean como fuente de carbono el CO₂ para su mantenimiento celular. Dichos microorganismos también consumen iones amonio y otros compuestos de naturaleza alcalina, proceso que genera una

significativa reducción del valor de pH (Avendaño V., 2011). La reducción del pH se ha discutido en los estudios de Aloui et al., (2009), Amengual-Morro, Moyà Niell, & Martínez-Taberner (2012), concluyendo que también puede atribuirse a la acción degradadora de la microbiota presente en las aguas residuales.

Por otra parte, de manera complementariamente se puede establecer que las microalgas como parte del proceso fotosintético asimilan el ion amonio como fuente de nitrógeno, lo cual acidifica el medio con la disminución del pH por efecto del desprendimiento de hidrógenos como parte de la reacción de asimilación (Ruiz, 2011). La reacción bioquímica se describe en la Figura 24.

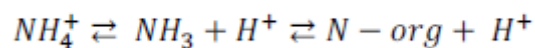


Figura 24. Reacción bioquímica de bioadsorción de amonio.

Tomado de: (Ruíz, 2011).

Las aguas residuales grises contienen niveles considerables de amonio los cuales son susceptibles de ser asimilados por las microalgas durante su proceso fotosintético, a pesar de que dicho parámetro no fue caracterizado para la muestra de agua residual de experimentación en este estudio, la bibliografía reporta la presencia de amonio en los efluentes de agua residual gris, estableciendo una mayor concentración en promedio presente en las descargas procedentes de la cocina, de acuerdo a lo detallado por Eriksson y colaboradores (2002). Li, Chen y su equipo de trabajo (2011), reportaron la remoción de iones amonio de aguas residuales municipales mediante el uso de *Chlorella* sp, en un medio de pH elevado (9), el cual demostró una reducción al final del periodo de tratamiento. Aslan & Kapdan, (2006), de igual forma, reportaron una reducción completa de la concentración de amonio y un valor de pH de 7, el cual se mantuvo estable durante el tratamiento de agua residual sintética con microalgas.

Las aguas residuales representan un medio muy complejo en el cual la interacción biológica de varios tipos de microorganismos da lugar a reacciones bioquímicas que se manifiestan en parámetros cuantificables como el índice de pH. El género de microalga no es determinante en la variación del pH. Todas las unidades de tratamiento registraron un valor entre 7,1-7,6 al término de la fase experimental, el cual es favorable para el crecimiento de los géneros de microalgas de la división Chlorophyta (García, 2014).

5.3.2.3 Demanda Química de Oxígeno (DQO)

La evaluación del parámetro DQO se realizó en tres periodos durante la fase experimental (inicial, intermedia y final). Todas las unidades de tratamiento de las cepas *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp, y *Chlorella* sp, con y sin la aplicación de Nitrofoska® (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b) reportaron resultados estadísticos muy significativos con respecto a la reducción del índice de DQO, entre la medición inicial y final del parámetro. Por otra parte, ninguna de las unidades de tratamiento demostró resultados significativos con respecto a la evaluación de los controles negativos, CN1 y CN2. Dichos resultados se pueden evidenciar en la Figura 25 y Tabla 11.

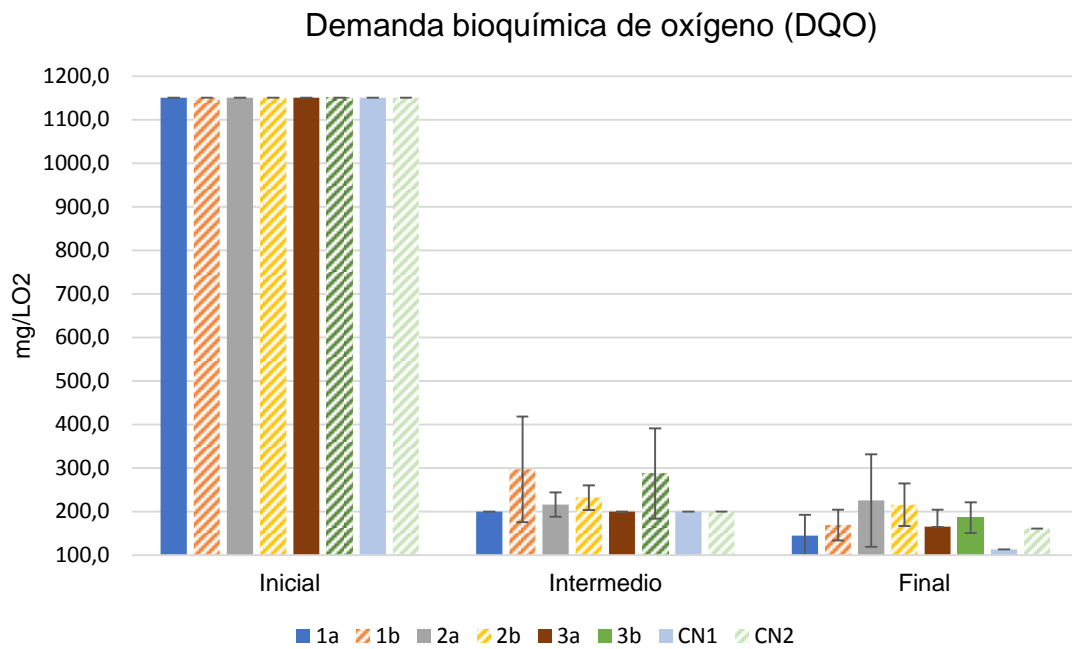


Figura 25. Evaluación de la variación del índice de DQO de las unidades de tratamiento según cepas.

(1) *Pleurococcus* sp., (2) *Chlorococcum* sp., (3) *Chlorella* sp, y (a) según adición o (b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 11.

Evaluación de significancia estadística de la variación del índice de DQO de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

DQO				
Prueba t de muestras relacionadas				
Unidad experimental	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	-1005	0,001	**
1b	1b i.-1b f.	-981	0,000	**
2a	2a i.-2a f.	-925	0,004	**
2b	2b i.-2b f.	-935	0,001	**
3a	3a i.-3a f.	-985	0,001	**
3b	3b i.-3b f.	-965	0,000	**
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	-32	0,896	
2a	2a f.-CN1 f.	-112	0,214	*
3a	3a f.-CN1 f.	-52,7	0,698	
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	-8,3	0,989	
2b	2b f.-CN2 f.	-64	0,696	
3b	3b f.-CN2 f.	-25	0,811	

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

Las unidades de tratamiento de las cepas *Pleurococcus*, *Chlorococcum* y *Chlorella* sp, con y sin el suministro del fertilizante foliar Nitrofoska® demostraron una disminución muy significativa del índice de DQO. Sin embargo, la evaluación con respecto a los controles no demostró un efecto significativo. Partiendo de dicha premisa, se puede establecer que la reducción de DQO se debió a la acción conjunta de la carga microbiana presente en la muestra de agua residual gris con el metabolismo de las microalgas, los cuales desprenden oxígeno, elemento que potencializa la degradación biológica de la materia orgánica presente en el agua residual (A. G. Brito et al., 2007; Hodaifa, Martínez, Órpez, & Sánchez, 2010). En el estudio realizado por Lau, Tam, & Wong, (1995) se reportaron resultados de remoción de DQO similares a los

controles (sin aplicación de microalgas), por lo que se sugirió que dicha reducción se debió a la acción de la microbiota nativa de las aguas residuales tratadas, sin embargo, se resalta la importante interacción de estos microorganismos.

El contenido del agua gris empleada en este estudio es de naturaleza doméstica y de una zona geográfica en la cual existe abundante contacto con materia orgánica por lo que presenta una alta carga microbiana la cual actuó significativamente en la reducción del DQO en conjunto con las microalgas. El contenido de microorganismos de los efluentes depende del contexto en el que se generen, por lo que si se presentan cambios en las actividades que producen las descargas de agua residual gris el contenido de microorganismos también puede variar. En dichas circunstancias la acción de las microalgas sería importante en la reducción del índice de DQO ya que las unidades de tratamiento mantendrían una concentración fija de inóculo inicial el cual no depende de cambios en el contenido de los efluentes a tratar. Algunos estudios demuestran una reducción significativa de DQO por parte del tratamiento con microalgas, sin embargo, en la mayoría de estos estudios se emplean muestras de agua sintética, en las cuales la carga microbiana es mínima e incluso nula. Tal es el caso del estudio presentado por Y. Feng, Li, & Zhang y colaboradores (2011) en el cual se reporta una eficiencia del 86% en la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DQO).

La reducción del índice de DQO también se debió a la acción de otros factores operacionales del cultivo como la aireación, la cual produce una reacción de oxidación química en el medio de cultivo, promoviendo la reducción del contenido de materia orgánica, indicativo del parámetro DQO, de acuerdo a lo expuesto por Metcalf & Eddy (1993) y Area, Ojeda, Barboza, Bengoechea, & Felissia (2010).

El parámetro DQO no se encuentra contemplado en la normativa de regulación de uso de aguas con fines agrícolas. Sin embargo, en otras normativas concernientes a la descarga de efluentes en cuerpos de agua marina o agua dulce el rango permitido se encuentra entre los 200-400 mg/L (Ministerio del Ambiente, 2015). Los índices de DQO de todas las unidades de tratamiento se encuentran dentro del rango permitido por las normativas indicadas. Lo cual permite considerar viable la descarga del agua tratada en dichos efluentes.

5.3.2.4 Carbonatos de calcio

La evaluación de la concentración de carbonatos de calcio se realizó en el tiempo inicial y final de la fase de tratamiento de las cepas *Pleurococcus*, *Chlorococcum* y *Chlorella* sp, con y sin el suministro del fertilizante foliar Nitrofoska® (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b) demostraron resultados significativos en cuanto al aumento de la concentración de carbonatos de calcio en el medio, cuya media de incremento fue del 35%. Por otra parte, con respecto a la evaluación de los controles negativos, ninguna de las unidades de tratamiento reportó resultados muy significativos. Dichos resultados se pueden evidenciar en la Figura 26 y Tabla 12.

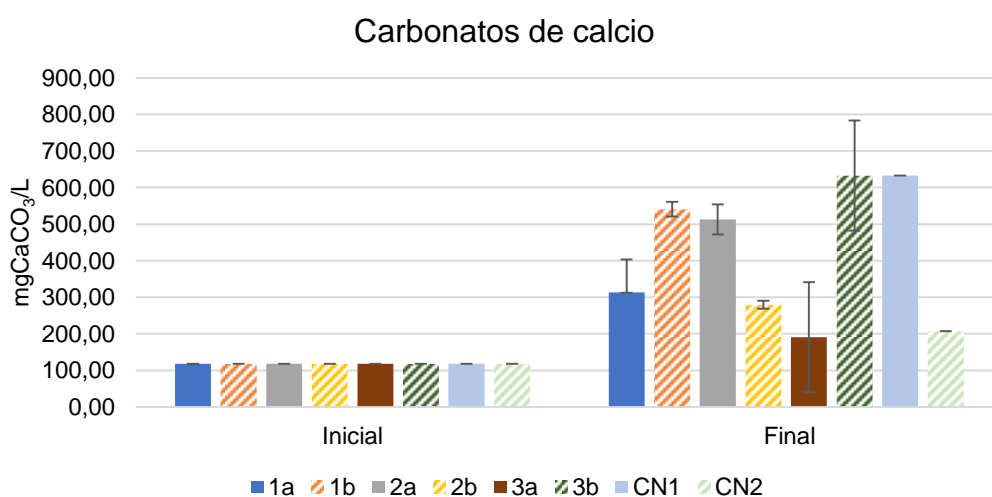


Figura 26. Evaluación de la variación de la concentración de Carbonatos de calcio de las unidades de tratamiento según cepas.

(1) *Pleurococcus* sp., (2) *Chlorococcum* sp., (3) *Chlorella* sp, y (a) según adición o (b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 12.

Evaluación de significancia estadística de la variación de la concentración de Carbonatos de calcio de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

Carbonato de calcio				
Prueba t de muestras relacionadas				
Unidad experimental	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	+195	0,064	*
1b	1b i.-1b f.	+423	0,001	**
2a	2a i.-2a f.	+161	0,021	**
2b	2b i.-2b f.	+395	0,021	**
3a	3a i.-3a f.	+73	0,008	**
3b	3b i.-3b f.	+515	0,027	**
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	-106,33	0,141	*
2a	2a f.-CN1 f.	-72	0,358	*
3a	3a f.-CN1 f.	-16,33	0,969	
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	1b f.-CN2 f.	0,435	*
2b	2b f.-CN2 f.	2b f.-CN2 f.	0,616	
3b	3b f.-CN2 f.	3b f.-CN2 f.	0,110	*

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

Todas las unidades de tratamiento, demostraron un incremento muy significativo de la concentración de carbonatos de calcio en el medio al término de la fase experimental. El aumento de la concentración de carbonatos se puede deber a la acción fotosintética de las microalgas las cuales junto a otras especies de cianobacterias se han catalogado como potenciales microorganismos capaces de producir minerales de carbonatos de calcio en ambientes naturales y adaptados a escala de laboratorio (Obbins, 1998). Existen reportes sobre el potencial de calcificación de varias especies, entre

ellas, las unicelulares algas verdes *Chlorella* y *Chlorococcum* (Hartley, House, Callow, & Leadbeater, 1995; Stabel, 1986).

Obbins (1998), realizó un estudio en el cual evaluó la producción de sedimentos de carbonatos de la cepa de microalga *Nannochloris atomus*, en el cual a partir de la tasa de calcificación demostrada en 4 horas de análisis se estimó que este microorganismo puede producir aproximadamente 0,5g/L de carbonato de calcio en 12 horas por día, demostrando que estos microorganismos fotosintéticos son capaces de generar cantidades significativas de carbonatos.

El análisis con respecto a los controles experimentales no registró resultados significativos, lo cual anularía la acción fotosintética de las microalgas como las responsables de la producción e incremento de carbonatos de calcio. Sin embargo, es pertinente precisar que la producción de dichas sales también se lleva a cabo por microorganismos bacterianos y cianobacterias como *Synechococcus*, los cuales pueden estar presentes en la composición de las aguas residuales grises (Riding, 1991; Thompson & Ferris, 1986). Debido a la poca información actual disponible sobre los mecanismos biológicos de calcificación es necesario profundizar en dicho estudio.

La normativa para el uso de aguas en el riego no especifica la concentración máxima permitida de carbonatos de calcio, sin embargo presenta lineamientos concernientes a la dureza del agua con respecto a la concentración de bicarbonatos, entre un rango de 1,5-8,5 meq/L para riego por aspersión. A partir de ello, se puede establecer que los tratamientos no se ajustan a dichos parámetros, por lo que será necesario emplear otras técnicas que permitan reducir su dureza o disponer un sistema alternativo de irrigación.

5.3.2.5 RAS

La evaluación del índice de RAS se evaluó durante el periodo inicial y final de la fase experimental. Todas las unidades de tratamiento de las cepas *Pleurococcus* sp, con y sin la aplicación del fertilizante Nitrofoska® (1a, 1b), *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, con la aplicación del fertilizante (2b y 3b respectivamente) demostraron resultados muy significativos con respecto al incremento del índice de RAS, el cual en promedio fue del 32%. Por otra parte, la evaluación con respecto al control CN1 demostró un resultado muy significativo de reducción del índice de RAS en la unidad de tratamiento de *Pleurococcus* sp, con y sin la aplicación de Nitrofoska® (1a y 1b). En menor nivel de significancia se registró una reducción del parámetro, del tratamiento de *Chlorella* sp, con y sin el suministro del fertilizante (3a y 3b). Con respecto al control CN2 no se demostraron resultados significativos. Dichos resultados se presentan en la Figura 27 y Tabla 13.

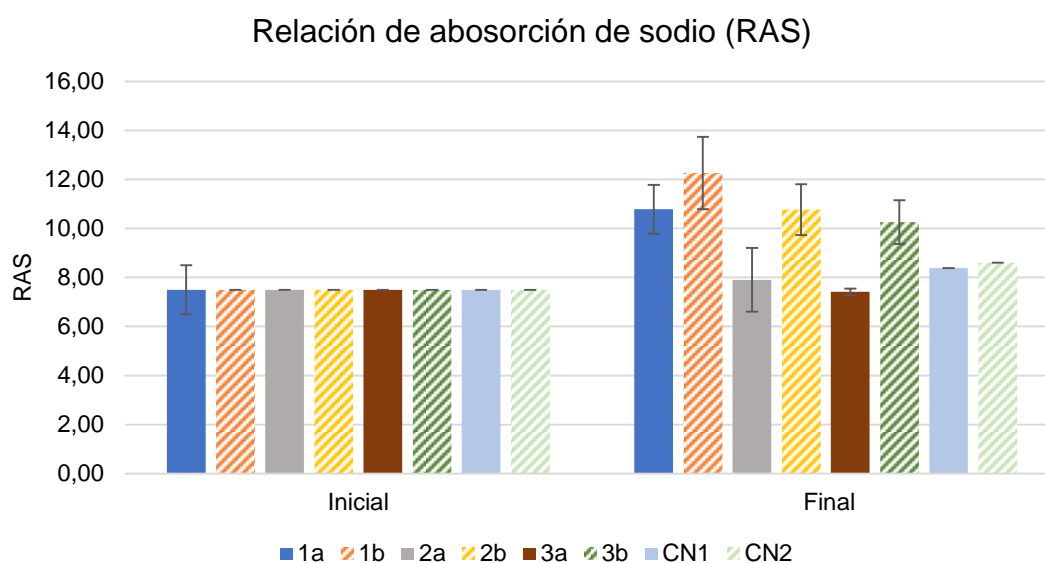


Figura 27. Evaluación de la variación de la concentración de RAS según cepas.

(1) *Pleurococcus* sp., (2) *Chlorococcum* sp., (3) *Chlorella* sp, y (a) según adición o (b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 13.

Evaluación de significancia estadística de la variación del índice de RAS de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

RAS				
Prueba t de muestras relacionadas				
Unidad experimental	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	+3,28	0,037	**
1b	1b i.-1b f.	+4,76	0,031	**
2a	2a i.-2a f.	+0,40	0,647	
2b	2b i.-2b f.	+3,27	0,032	**
3a	3a i.-3a f.	-0,09	0,378	*
3b	3b i.-3b f.	+2,76	0,034	**
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	+2,4	0,023	**
2a	2a f.-CN1 f.	+0,48	0,837	
3a	3a f.-CN1 f.	+0,97	0,424	*
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	+3,66	0,006	**
2b	2b f.-CN2 f.	+2,17	0,73	
3b	3b f.-CN2 f.	-1,66	0,180	*

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

El incremento del índice de RAS se evidenció de una manera más contundente en las unidades experimentales formuladas con la muestra de agua residual gris y la aplicación de Nitrofoska® en los tratamientos con las cepas *Pleurococcus* sp y *Chlorococccum* sp. Dicho incremento comprende a su vez el aumento de la concentración de los elementos: Na⁺¹, Ca⁺² y Magnesio⁺², a partir de los cuales se establece el índice de RAS. Los resultados descritos no demostraron una tendencia en común entre los tratamientos. Por su parte, la revisión bibliográfica no establece reportes en los cuales se haya producido un incremento de estos metales durante el cultivo de microalgas en el tratamiento de aguas residuales, por lo que en esta instancia no es posible declarar una justificación ante el fenómeno de incremento de estos metales. Por el contrario, la literatura reporta la reducción de la concentración de los metales Sodio

(Na⁺¹), Calcio (Ca⁺²) y Magnesio (Mg⁺²), debido a la remoción por acción de las microalgas (Chan, Salsali, & McBean, 2014; Yao et al., 2013).

X. X. Wang y su equipo de trabajo (2016), evaluaron la eficiencia de remoción de metales y otros compuestos orgánicos mediante el uso de las microalgas *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, las cuales fueron inoculadas a una densidad del orden de magnitud de 10⁶, inóculo similar al del presente estudio. En dicho estudio concluyeron que las dos especies pudieron remover del 55,9%-83,7% de Ca⁺² de la muestra, por su parte la remoción de Mg⁺² alcanzó una eficiencia del 56,0% la cual se efectuó posterior a la precipitación del Ca⁺². La remoción de Na⁺² registró una eficiencia entre 28%-56%.

Suresh Kumar, Dahms, Won, Lee, & Shin (2015) , propone que la reducción de los metales se debe a la influencia del pH, el cual al elevarse impulsa la adsorción de los metales por parte de las microalgas, dicho incremento se produce por la acción de crecimiento de las microalgas.

5.3.2.6 Tensoactivos aniónicos

La evaluación de la concentración de tensoactivos aniónicos se realizó durante los periodos: inicial, intermedio y final de la fase experimental. Se registraron resultados muy significativos con respecto a la disminución de la concentración de tensoactivos en todas las unidades de tratamiento con las cepas, *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, sin la aplicación de Nitrofoska® (1a, 2a, 3a) y con la aplicación de Nitrofoska® (1b, 2b y 3b), evaluados en la etapa inicial y final. Los resultados de la evaluación intermedia no fueron sujetos de análisis. Por otra parte, el análisis estadístico con respecto a los controles no demostró resultados significativos de ninguno de los. Dichos resultados se presentan en la Figura 28 y Tabla 14.

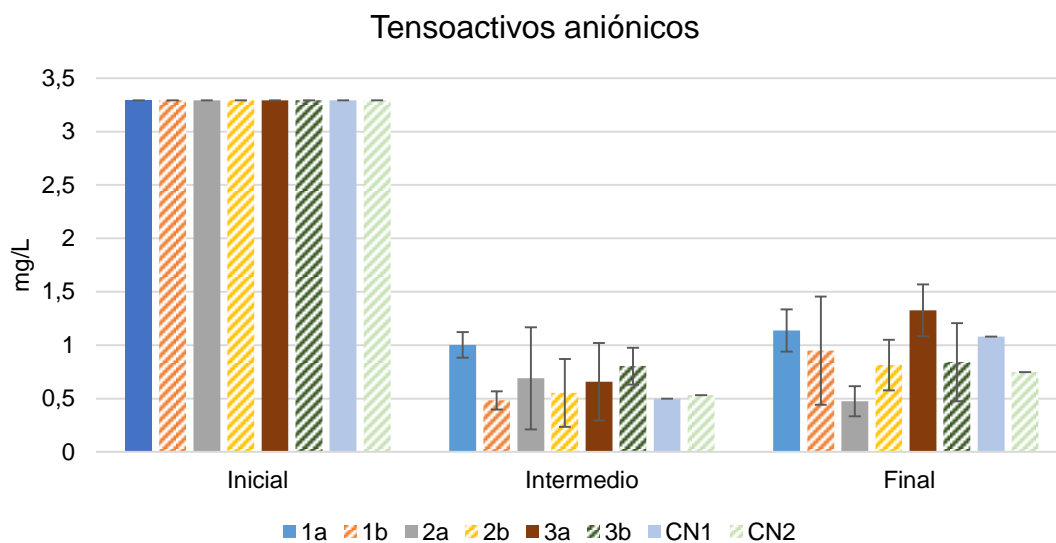


Figura 28. Evaluación de la variación de la concentración de tensoactivos aniónicos en las unidades de tratamiento según las cepas.

(1) *Pleurococcus* sp., (2) *Chlorococcum* sp., (3) *Chlorella* sp, y (a) según adición o (b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 14.

Evaluación de significancia estadística de la variación de la concentración de tensoactivos aniónicos de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

Tensoactivos aniónicos				
Prueba t de muestras relacionadas				
Unidad experimental	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	-2,15	0,003	**
1b	1b i.-1b f.	-2,34	0,015	**
2a	2a i.-2a f.	-2,80	0,001	**
2b	2b i.-2b f.	-2,48	0,003	**
3a	3a i.-3a f.	- 1,99	0,005	**
3b	3b i.-3b f.	-2,45	0,007	**
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	-0,037	0,953	
2a	2a f.-CN1 f.	-0,625	0,007	**
3a	3a f.-CN1 f.	-0,2	0,253	*
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	-0,248	0,807	
2b	2b f.-CN2 f.	-0,114	0,989	
3b	3b f.-CN2 f.	-0,14	0,973	

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

Todas las unidades de tratamiento formuladas con los géneros *Pleurococcus*, *Chlorococcum* y *Chlorella*, tanto con y sin la aplicación de Nitrofoska®, presentaron resultados muy significativos con respecto a la disminución de la concentración de tensoactivos presentes en el medio de agua residual posterior al periodo de remediación. Sin embargo, la evaluación frente a los controles (agua residual sin la aplicación de inóculo microalgal) no demostró resultados significantes, ya que para dichas unidades también se registró una disminución de dichos compuestos. A excepción del tratamiento con *Chlorococcum* sp, sin la aplicación de Nitrofoska®.

A partir de ello, es posible argumentar que la reducción de tensoactivos se debe a la generación de especies oxidativas, las cuales se degradan más fácilmente por acción de la aireación artificial suplementada permanente al medio de cultivo de microalgas (Lin, 2014). Además, se puede establecer que la reducción de tensoactivos también se debió a la acción biológica microbiana presente en el medio la cual asimiló los compuestos aniónicos más fácilmente debido a la oxidación, paralela, que aumentó la biodegradabilidad de las aguas residuales (Crespi, 1996). Aloui y su equipo de trabajo (2009) explican que el principal agente en la degradación de tensoactivos o surfactantes son las bacterias, las cuales de manera individual o en consorcio son capaces de destruir las propiedades de las moléculas de dichos compuestos y emplear los productos liberados como fuente de carbono para su mantenimiento.

Los trabajos científicos no reportan la evaluación de especies de microalgas chlorophytas en la degradación de tensoactivos. Las investigaciones más aproximadas, refieren los estudios en los cuales se evalúa la acción de cianobacterias en la degradación de compuestos de naturaleza semejante a los tensoactivos. Yan, Jiang, Wu, & Yan (1998) evaluaron la degradación del compuesto alquilbenceno lineal, mediante el uso de la cianobacteria *Anabaena* sp. De dicho estudio se determinó que la cianobacteria es capaz de reducir completamente el compuesto tensoactivo en un medio formulado bajo condiciones aerobias de crecimiento. Dicho compuesto es uno de los principales componentes de los productos de limpieza y detergentes de lavandería, debido a sus propiedades como tensoactivo.

Por otra parte, Abed & Köster (2005) evaluaron el rol de bacterias aerobias heterotróficas en asociación con cianobacterias, entre ellas las cepas: *Phormidium*, *Aphanothece halophyletica*, *Dactylococcopsis salina*, *Halothece* sp., *Oscillatoria* sp y *Synechocystis* sp, en la degradación de surfactantes de compuestos derivados del petróleo. Dicho estudio concluyó que la asociación de ambos grupos de microorganismos dio lugar a la degradación de los

compuestos tóxicos, más no la acción independiente de las especies de cianobacterias.

Los tensoactivos no están contemplados como un parámetro a considerar dentro de la normativa para el uso de aguas en el riego. Sin embargo, si se presentan lineamientos de regulación en los criterios de calidad admisibles para la preservación de la vida acuática y silvestre en aguas dulces, marinas, estuarios y aguas con fines recreativos en la Norma de Calidad Ambiental y Descarga de Efluentes: Recurso Agua, sección de Anexos, presentado por el Ministerio del Ambiente en el cual el límite máximo permitido es de 0,5 mg/L de tensoactivos expresados como sustancias activas al azul de metileno.

En promedio las unidades de tratamiento presentaron una concentración final de 0,9 mg/L de tensoactivos al término de la experimentación, índice que se encuentra fuera de lo establecido en la norma de calidad. Sin embargo, se puede resaltar que en relación al valor de concentración inicial caracterizado del agua residual se produjo una reducción del 72%.

5.3.2.7 Coliformes totales

La evaluación de la concentración de coliformes totales se realizó durante los periodos inicial y final de la fase experimental. Se reportaron resultados muy significativos en todas los tratamientos, con las cepas, *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, sin la aplicación de Nitrofoska® (1a, 2a, 3a) y con la aplicación de Nitrofoska® (1b, 2b y 3b), con respecto a la disminución de la tasa de coliformes totales en el medio, la cual en promedio registró una disminución del 81%. Del análisis de significancia estadística con respecto a los controles, no se registraron resultados significativos en la reducción del parámetro. Dichos resultados se presentan en la Figura 29 y Tabla 15.

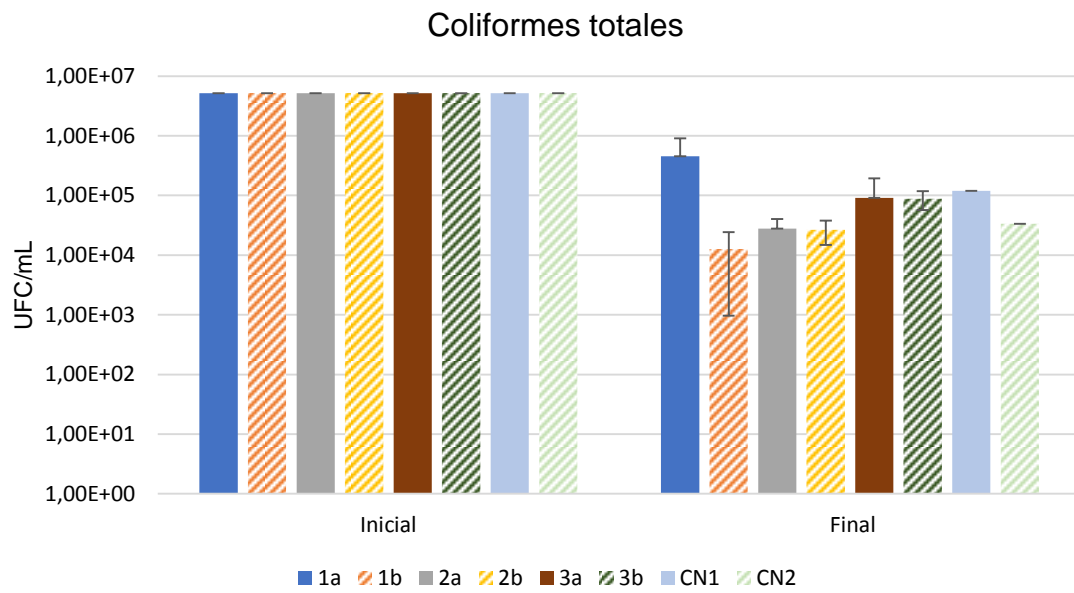


Figura 29. Evaluación de la variación del índice de coliformes totales en las unidades de tratamiento según las cepas.

(1) *Pleurococcus* sp., (2) *Chlorococcum* sp., (3) *Chlorella* sp, y (a) según adición o (b) ausencia de Nitrofoska®. (CN1) control sin inóculo sin fertilizante. (CN2) control sin inóculo con fertilizante.

Tabla 15.

Evaluación de significancia estadística de la variación del índice de coliformes totales de las unidades de tratamiento experimental y controles negativos.

Coliformes totales				
Prueba t de muestras relacionadas				
Unidad experimental	Correlación	Diferencia de variación (i.-f.)	Valor p	Significancia bilateral
1a	1a i.-1a f.	-4,74X10 ⁶	0,003	**
1b	1b i.-1b f.	-5,19X10 ⁶	0,000	**
2a	2a i.-2a f.	-5,17X10 ⁶	0,000	**
2b	2b i.-2b f.	-5,17X10 ⁶	0,000	**
3a	3a i.-3a f.	-5,11X10 ⁶	0,000	**
3b	3b i.-3b f.	-5,11X10 ⁶	0,000	**
Prueba de Dunnett-CN1				
1a	1a f.-CN1 f.	-3,35x10 ⁵	0,259	*
2a	2a f.-CN1 f.	+3,35x10 ⁴	0,930	
3a	3a f.-CN1 f.	+2,89x10 ⁴	0,997	
Prueba de Dunnett-CN2				
1b	1b f.-CN2 f.	+2,08X10 ⁴	0,377	*
2b	2b f.-CN2 f.	+6,90x10 ³	0,928	
3b	3b f.-CN2 f.	+5,43x10 ⁴	0,013	**

NOTA: (*) La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,5. (**) La diferencia de medias es muy significativa en el nivel 0,05. (+) Diferencia promedio de aumento. (-) Diferencia promedio de disminución. (i) inicial. (f) final.

Todas las unidades experimentales de tratamiento con las cepas *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, con y sin la aplicación del fertilizante Nitrofoska®, demostraron resultados muy significativos con respecto a la disminución de la concentración de coliformes totales del medio de agua residual gris. Sin embargo, los resultados en este estudio no demostraron resultados muy significativos en cuanto a los tratamientos con las cepas *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, frente a los controles (agua residual sin inóculo microalgal), tanto con y sin la aplicación de Nitrofoska. Por lo que, la reducción del índice de coliformes totales se deben a factores operacionales complementarios a la acción de las microalgas en las unidades de tratamiento.

Cordero y su equipo de trabajo (2010), discutieron en su estudio que la baja profundidad de los tanques de tratamiento con microalgas favorece la penetración de la luz y radiación ultravioleta, lo cual tiene un efecto sobre la eliminación de las bacterias coliformes. Lo dicho puede justificar la razón por la cual en los controles también se registró una reducción de coliformes, los cuales se mantuvieron en reactores de igual profundidad y características. Esto se confirma con las experimentaciones de Gijzen & Veenstra (2000), los cuales afirman que la remoción de patógenos fue inducida por la penetración de la luz UV e indirectamente por las variaciones de pH y oxígeno disuelto por la actividad fotosintética de las microalgas, contrastando con un menor desempeño en la tasa de remoción de coliformes en estanques de experimentación con la planta acuática *Lemna aequinociales* o también conocida como “lenteja de agua”, las cuales formaron una capa gruesa impidiendo el ingreso de la luz en la columna de agua y por ende la difusión de aire y oxígeno en el medio. León y Chaves (2010), demostraron un abatimiento del 99% de coliformes por parte de las microalgas bajo las mismas condiciones de cultivo precisadas anteriormente frente a una persistente concentración mayor a 1,6E04 de coliformes posterior al tratamiento de residual vacuno con la planta acuática.

Adicionalmente, otro de los factores que pudo influir en la reducción de coliformes fue la aireación suplementado a las unidades de tratamiento como parte del cultivo de las microalgas. Hanajima y colaboradores (2011), reportaron que el burbujeo por aireación puede reducir la población de coliformes fecales, lo cual se corroboró con el análisis de la tasa de reducción de colonias de coliformes en tratamientos sin aireación, la cual fue inferior. Además, en dicho estudio se establece que el empleo de microalgas debería implementarse en las plantas de tratamiento en la fase terciaria, ya que de esta forma se mejoraría la calidad de las descargas y la reducción de coliformes sería más eficiente y sustentable.

Las microalgas son microorganismos que tienen la capacidad de producir sustancias inhibitorias del crecimiento de bacterias, tales como *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (López, Silva, González, & Viramontes, 2016). A través de la fotosíntesis las microalgas generan oxígeno disuelto, lo cual contribuye la degradación de la materia orgánica y la reducción de bacterias coliformes y otros agentes patógenos bacterianos (Kiso et al., 2005; Mayo & Noike, 1994). Las variaciones de pH producidas durante el proceso de cultivo también es uno de los factores que incide sobre la reducción de coliformes, especialmente cuando se producen fluctuaciones muy drásticas como resultado de la fotosíntesis durante la exposición a la luz artificial y respiración durante los ciclos de luz natural (Metcalf & Eddy, 1993).

Los índices de coliformes presentados al término de la fase experimental en las unidades de tratamiento no se encuentran dentro del rango permitido por la normativa para el uso de aguas en el riego agrícola, por lo que será necesario aplicar técnicas complementarias de desinfección previa al empleo del agua tratada.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

Las cepas microalgales, *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp y *Chlorella* sp, crecen y se replican eficientemente en un medio de agua residual gris de la misma región. Sin embargo, *Chlorella* sp., demostró un mayor rendimiento cinético de crecimiento. La aplicación del fertilizante foliar Nitrofoska® no tiene un efecto positivo en el crecimiento de ninguna de las microalgas estudiadas al interactuar con una matriz de agua residual rica en nutrientes.

Los índices de los parámetros: pH, tensoactivos, Demanda Química de Oxígeno (DQO) y coliformes totales se redujeron significativamente debido al efecto del conjunto de la microbiota de la propia muestra de agua, factores operaciones como: la aireación y luz artificial y el inóculo microalgal.

Los parámetros: Relación de Absorción de Sodio (RAS) y carbonatos de calcio incrementaron sus índices debido a la acción metabólica microbiana proveniente de la matriz de agua residual tratada.

La conductividad eléctrica (CE) se redujo exclusivamente en los tratamientos microalgales con la aplicación de Nitrofoska®, efecto sugerido a la potencialización de la absorción de nutrientes de las microalgas por la aplicación del fertilizante.

El agua residual gris se remedió eficientemente y cumple con las regulaciones impuestas por el Ministerio del Ambiente (sección Anexos), excepto para los niveles de coliformes totales (1000 UFC/100mL), por el efecto ligado, mas no exclusivo, del inóculo microalgal junto a la carga microbiana nativa del agua tratada y factores operacionales.

6.2 Recomendaciones

Profundizar en el estudio de la cepa *Chlorella* sp, debido al potencial que demuestra en la generación de biomasa y disminución de contaminantes presentes en las aguas residuales grises. Además, se sugiere evaluar el efecto que pueda presentar al cultivarse en consorcios microalgales bajo las mismas condiciones de tratamiento.

Investigar las posibles interacciones bioquímicas entre la aplicación del fertilizante Nitrofoska® y los componentes de las aguas residuales grises que se puedan presentar y su efecto desfavorable sobre el crecimiento de las microalgas observado.

Tomar medidas de control sobre la alta producción de espuma, proveniente de los tensoactivos, por efecto de la aireación en el sistema de tratamiento que se genera, ya que de lo contrario se provoca la pérdida de una considerable cantidad de biomasa y por ende la eficiencia del proceso disminuye.

Aplicar el tratamiento con *Chlorella* sp, para la remediación de aguas residuales grises en la región estudiada, debido a su buena adaptación del medio, reducción de contaminantes y potencial producción de biomasa con futuras aplicaciones. Los resultados demostrados y técnicas utilizadas pueden ser extrapolables a otro tipo de muestra de agua residual gris. Sin embargo, se requiere un proceso complementario de desinfección para reducir la densidad de coliformes totales en el efluente.

Referencias

- Abed, R. M. M., & Köster, J. (2005). *The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. International Biodeterioration and Biodegradation*, 55(1), DOI: 10.1016/j.ibiod.2004.07.001
- Agudelo, R. (2005). El agua , recurso siglo XXI Water : *strategic resource in the 21 st century. Revista Facultad Nacional de Salud Pública*, 23(1),
- Ahmad, F., Khan, A. U., & Yasar, A. (2013). *The potential of chlorella vulgaris for wastewater treatment and biodiesel production. Pakistan Journal of Botany*, 45(SPL.ISS).
- Ali, H. A. A.-S., Ehsan, A., Najeeb, K. N. A.-S., & Mohd, S. K. (2014). *Growth of Scenedesmus dimorphus in different algal media and pH profile due to secreted metabolites. African Journal of Biotechnology*, 13(16). DOI:10.5897/AJB2013.13455
- Alianza por el Agua. (s.f). *Manual de depuración de aguas residuales urbanas*. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de:<http://alianzaporelagua.org/documentos/MONOGRAFICO3.pdf>
- Allen, L. (2015). *Manual de diseño para manejo de aguas grises*. Recuperado el 21 de mayo de 2017 de:<https://greywateraction.org/wp-content/uploads/2014/11/finalGWmanual-esp-5-29-15.pdf>
- Allen, L., Christian-Smith, J., & Palaniappan, M. (2010). *Overview of Greywater Reuse: The Potential of Greywater Systems to Aid Sustainable Water Management*. Oakland, California: Pacific Institution.
- Aloui, F., Kchaou, S., & Sayadi, S. (2009). *Physicochemical treatments of anionic surfactants wastewater: Effect on aerobic biodegradability. Journal of Hazardous Materials*, 164(1), DOI:10.1016/j.jhazmat.2008.08.009
- Amat, A. M., Arques, A., Miranda, M. A., & Seguí, S. (2004). *Photo-Fenton*

reaction for the abatement of commercial surfactants in a solar pilot plant. Solar Energy, 77(5). DOI:10.1016/j.solener.2004.03.028

Amengual-Morro, C., Moyà Niell, G., & Martínez-Taberner, A. (2012). *Phytoplankton as bioindicator for waste stabilization ponds. Journal of Environmental Management, 95(SUPPL.)*. DOI:10.1016/j.jenvman.2011.07.008

Andersen, R. (2005). *Algal culturing techniques* (1st ed.). Elsevier Inc.

Aravantinou, A. F., Theodorakopoulos, M. A., & Manariotis, I. D. (2013). *Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production. Bioresource Technology, 147(January)*. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.08.024

Area, M., Ojeda, S., Barboza, O., Bengoechea, D., & Felissia, F. (2010). *Tratamientos aplicables para la reducción de la DQO recalcitrantes de efluentes de pulpados quimimecánicos y semoquímicos (revisión). Revista de Ciencia Y Tecnología, 13.*

Arora, M., & Sahoo, D. (2015). *Green Algae. In D. Sahoo & J. Seckbach (Eds.)*. Springer Netherlands. DOI: 10.1007/978-94-017-7321-8_4

Aslan, S., & Kapdan, I. K. (2006). *Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological Engineering, 28(1)*. DOI:10.1016/j.ecoleng.2006.04.003

Association for Rainwater harvesting and Water Utilisation. (2008). *Greywater Recycling and Resue. Association for Rainwater Harvesting and Water Utilisation*. Recuperado el 12 de abril de 2017 de: http://www.fbr.de/fileadmin/user_upload/files/Englische_Seite/Greywater_Recycling_Introduction.pdf

Avendaño V., L. M. (2011). *Estudio de la población de bacterias nitrificantes y su relación con los parámetros físico-químicos, biológicos y operacionales en una EDAR con sistema convencional de Fangos Activos. Universitat Politècnica de Valencia.*

- Bailliez, C., Largeau, C., & Casadevall, E. (1985). *Growth and hydrocarbon production of Botryococcus braunii immobilized in calcium alginate gel. Applied Microbiology and Biotechnology*, 23(2). DOI: 10.1007/BF01982724
- Balaji, S., Gopi, K., & Muthuvelan, B. (2013). *A review on production of poly? Hydroxybutyrates from cyanobacteria for the production of bio plastics. Algal Research*, 2(3), 2. DOI: 10.1016/j.algal.2013.03.002
- Barba, L. E. (2002). *Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición*. Universidad del Valle. Recuperado el 10 de marzo de 2017 de: <https://doi.org/http://www.bvsde.paho.org/bvsaar/e/fulltext/gestion/conceptos.pdf>
- Barsanti, L., & Gualtieri, P. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. USA: Taylor & Francis.
- BASF Química S.A. (2003). Nitrofoska Foliar PS. Recuperado el 12 de abril de 2017 de: http://www.bam.com.co/admin_internas/hojas/BASF/N/NITROFOSKA-FOLIAR-PS.pdf
- Bellinger, E., & Sigeo, D. (2010). *Freshwater algae. Identification and use as Bioindicators* (First). Wiley-Blackwell.
- Benemann, J. . (1989). *The future of microalgal biotechnology, in Algal and cyanobacterial biotechnology*. (T. . Rees & N. Shah, Eds.). England: Longman scientific & technical.
- Benemann, J. R. (1979). *Production of nitrogen fertilizer with nitrogen-fixing blue - green algae. Enzyme and Microbial Technology*, 1(2). DOI: 10.1016/0141-0229(79)90103-0
- Berenguel, M., Rodríguez, F., Acién, F. G., & García, J. L. (2004). *Model predictive control of pH in tubular photobioreactors. Journal of Process Control*, 14(4), 377. DOI: 10.1016/j.jprocont.2003.07.001
- Bermeo, L. E. (2011). *Estudio de microalgas en agua residual mediante*

técnicas de centrifugado. (tesis de maestría). Universidad Técnica Particular de Loja.

- Bhagavathy, S., Sumathi, P., & Jancy Sherene Bell, I. (2011). *Green algae Chlorococcum humicola-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity.* *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(1), S1–S7. DOI: 10.1016/S2221-1691(11)60111-1
- BIOTEC. (2013). Escalamiento de cultivos para microalgas. Protocolo de Laboratorio No.6 1-2.
- Bischoff, H. W., & Bold, H. C. (1963). *Phycological Studies IV. Some Soil Algae From Enchanted Rock and Related Algal Specie.* Austin, Texas: University of Texas Publications.
- Blackwell, J. R., Cox, E. J., & Gilmour, D. J. (1991). (Chlorococcales) isolated from a tidal rockpool. *British Phycological Journal*, 26(2). DOI: 10.1080/00071619100650101
- Blatti, J. L., Michaud, J., & Burkart, M. D. (2013). Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel. *Current Opinion in Chemical Biology*, 17(3). DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.04.007
- Borowitzka, M. (2013). High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *Applied Phycology*, 25(3).
- Borowitzka, M. A. (1998). Limits to Growth. In Y.-S. Wong & N. F. Y. Tam (Eds.), *Wastewater Treatment with Algae.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-662-10863-5_12
- Brito, A. G., Peixoto, J., Oliveira, J. M., Oliveira, J. A., Costa, C., Nogueira, R., & Rodrigues, A. (2007). Brewery and Winery Wastewater Treatment: Some Focal Points of Design and Operation. In *Utilization of By-Products and Treatment of Waste in the Food Industry*. Boston, MA: Springer US. DOI: 10.1007/978-0-387-35766-9_7
- Brito, D., Milani, N., Pereira, G., González, M., & Morán, R. (2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce , en dos medios de cultivo Guillard y un

fertilizante comercial Nitrofoska. *Ciencia*, 14(4).

- Carvajal Muñoz, J. S. (2012). Fotocatálisis heterogénea para el abatimiento de tensoactivos aniónicos en aguas residuales. *Producción Más Limpia*, 6(2). Recuperado el 10 de junio de 2017 de: <http://repository.lasallista.edu.co:8080/ojs/index.php/pl/article/view/133>
- CEPAL. (2011). Diagnóstico de la estadísticas del agua en Ecuador. Diagnóstico de la información estadística del agua. Recuperado el 10 de julio de 2017 de: [http://aplicaciones.senagua.gob.ec/servicios/descargas/archivos/download/Diagnostico de las Estadísticas del Agua Producto IIIc 2012-2013.pdf](http://aplicaciones.senagua.gob.ec/servicios/descargas/archivos/download/Diagnostico%20de%20las%20Estadisticas%20del%20Agua%20Producto%20IIIc%202012-2013.pdf)
- Chalivendra, S. (2014). *Bioremediation of wastewater using microalgae* (tesis de doctorado). University of Dayton, Ohio.
- Chan, A., Salsali, H., & McBean, E. (2014). *Heavy Metal Removal (Copper and Zinc) in Secondary Effluent from Wastewater Treatment Plants by Microalgae*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(2). DOI: 10.1021/sc400289z
- Cho, S., Luong, T. T., Lee, D., Oh, Y.-K., & Lee, T. (2011). *Reuse of effluent water from a municipal wastewater treatment plant in microalgae cultivation for biofuel production*. *Bioresource Technology*, 102(18). DOI: 10.1016/j.biortech.2011.03.037
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). *Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts*. *Biotechnology Advances*, 29(6). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.015
- Clesceri, L. S. (1998). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20th ed.)*. American Public Health Association.
- Comisión Nacional del Agua. (2011). *Estadísticas del agua en México*, edición 2011. México.

- Compo Expert. (2010). Ficha técnica, Nitrofoska ® Foliar PS.
- Contreras, C., Peña, J., Flores, L., & Cañizares, R. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*, 28(8).
- Cordero, A., García, M., Herradora, M., Ramírez, G., & Martínez, R. (2010). *Bacteriological characterization of wastewater samples obtained from a primary treatment system on a small scale swine farm. Bioresource Technology*, 101(9). DOI:10.1016/j.biortech.2009.11.072
- Crespi, M. (1996). Depuración de las aguas residuales en la industria de los tensioactivos. Boletín intexter UPC (Vol. 110).
- Cserhádi, T., Forgács, E., & Oros, G. (2002). *Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. Environment International*, 28(5). DOI: 10.1016/S0160-4120(02)00032-6
- Cubas, P. (2008). *Chlorophyta* (algas verdes), 1–5. Recuperado el 18 de julio de 2017 de: https://www.aulados.net/Botanica/Curso_Botanica/Algas_verdes/9_Chlorophyta_texto.pdf
- Culture Collection of Autotrophic Organisms*. (2017). *Chlorococcales*. Recuperado el 25 de febrero de: <http://ccala.butbn.cas.cz/en/type-classis-order/chlorococcales>
- Demeestere, K., Dewulf, J., & Van Langenhove, H. (2007). *Heterogeneous Photocatalysis as an Advanced Oxidation Process for the Abatement of Chlorinated, Monocyclic Aromatic and Sulfurous Volatile Organic Compounds in Air: State of the Art. Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(6). <https://doi.org/10.1080/10643380600966467>
- Demirbas, A., & Demirbas, M. (2010). *Algae Energy*. New York, USA: Springer Science & Business Media.
- Díaz, L., Alexandra, V., Julio, M., Cateryna, A.-M., Beltrán, B., & Ever, M.

(2012). Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta). *Revista de La Universidad Del Zulia*, 6. ISSN 0041-8811.

Edward, R. (2008). *Phycology* (4ta ed.). Colorado, USA: Cambridge University Press.

Elliott, L. G., Feehan, C., Laurens, L. M. L., Pienkos, P. T., Darzins, A., & Posewitz, M. C. (2012). *Establishment of a bioenergy-focused microalgal culture collection*. *Algal Research*, 1(2). DOI:10.1016/j.algal.2012.05.002

Environmental Protection Agency. (2016). *Nutrient Pollution-The effects*. Recuperado el 30 de noviembre de 2016 de:<https://www.epa.gov/nutrientpollution/effects>

Environmental Protection Agency. (2017). *Domestic wastewater advice and guidance*. Recuperado el 25 de diciembre de 2016 de:<http://www.epa.ie/water/wastewater/>

Eriksson, E., Auffarth, K., Henze, M., & Ledin, A. (2002). *Characteristics of grey wastewater*. *Urban Water*, 4. DOI:10.1016/S1462-0758(01)00064-4

ESPOL. (n.d.). Aguas residuales: clasificación, características y composición. Guayaquil. Recuperado el 10 de diciembre de:https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/6087/5/CA_PITULO_2.pdf

Fallis, A. . (2013). *Summary for Policymakers*. In *Intergovernmental Panel on Climate Change (Ed.), Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*. Vol. 53. Cambridge: Cambridge University Press. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004

Fao. (2002). Agua y cultivos. Recuperado el 10 de enero de 2017 de: <http://www.fao.org/docrep/005/y3918s/y3918s00.htm>

FAO. (2015). El uso seguro de las aguas residuales en la agricultura ofrece múltiples beneficios. Recuperado el 15 de mayo

de:<http://www.fao.org/news/story/es/item/44983/icode/>

- FAO. (2016). Base de datos AQUASTAT. Recuperado el 18 de mayo de: <https://doi.org/www.fao.org/nr/water/aquastat/data/query/index.html?lang=es>
- FAO-AQUASTAT. (2015). Informe regional. América del Sur. Recuperado el 17 de abril de: http://www.fao.org/nr/water/astat/countries_regions/ecu/indexesp.stm
- FAO & Eathscan. (2011). *The state of the world's land and water resources for food and agriculture (SOLAW)- Managing systems at risk* (Food and A). Londres. Recuperado el 20 de diciembre de 2017 de: <http://www.fao.org/docrep/015/i1688e/i1688e00.pdf>
- Feachem, R. G., Bradley, D. J., Garelick, H., & Mara, D. D. (1983). *Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management. Journal of the American Water Resources Association*. DOI:10.1111/j.1752-1688.1984.tb04765.x
- Feng, F. Y., Yang, W., Jiang, G. Z., Xu, Y. N., & Kuang, T. Y. (2005). *Enhancement of fatty acid production of Chlorella sp. (Chlorophyceae) by addition of glucose and sodium thiosulphate to culture medium. Process Biochemistry, 40(3)*. DOI:10.1016/j.procbio.2004.06.011
- Feng, Y., Li, C., & Zhang, D. (2011). Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium. *Bioresource Technology, 102(1)*, 101–105. DOI:10.1016/j.biortech.2010.06.016.
- Fontes, A. G., Angeles Vargas, M., Moreno, J., Guerrero, M. G., & Losada, M. (1987). *Factors affecting the production of biomass by a nitrogen-fixing blue-green alga in outdoor culture. Biomass, 13(1)*. DOI: 10.1016/0144-4565(87)90070-9.
- Forero, P. (n.d.). Fundamento teórico sobre tratamiento de aguas residuales

por ficorremediación (tesis de maestría). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá- Colombia.

GAD Provincia de Cotopaxi. (2015). Plan de Desarrollo y ordenamiento Territorial. DOI: 10.1017/CBO9781107415324.004.

García, R. (2014). Producción de biomasa de microalgas rica en carbohidratos acoplada a la eliminación fotosintética de CO₂. Universidad de Sevilla.

Gijzen, H. ., & Veenstra, S. (2000). *Duckweed based wastewater treatment for rational resource recovery and reuse. Environmental Biotechnology and clean bioprocesses*. London: Taylor and Francis. DOI:10.2134/jeq2003.1583.

Golueke, C. G., Oswald, W. J., & Gotaas, H. B. (1957). *Anaerobic digestion of Algae. Applied Microbiology*, 5, 47–55. Jan; 5(1).PMCID: PMC1057253.

Graham, L. ., & Wilcox, L. . (2000). *Algae. Upper Saddle River*. USA.: Prentice Hall. Recuperado el 02 de febrero de 2017 de: <http://www.botany.wisc.edu/cryptogams/graham/algae1.html>

Guamán-Burneo, C., & González, N. (2016). Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador. Corporación para la Investigación Energética. 1era Ed. Quito, Ecuador.

Guillard, R. (1973). *Division rates. In Handbook of Phycological Methods* (pp. 289–312). Cambridge: Cambridge University Press.

Guiry, Michael in Guiry, M.D & Guiry, G. . (2017). *AlgaeBase*. Recuperado el 30 de marzo de 2017 de: <http://www.algaebase.org/about/> .

Hamburg Technische Universität. (2017). *Domestic wastewater sources and its characteristics*. Recuperado el 19 de marzo de 2017 de: https://cgi.tu-hamburg.de/~awwwweb/wbt/emwater/lessons/lesson_a1/lm_pg_1066.html

- Hamilton, A. J., Stagnitti, F., Premier, R., Boland, A.-M., & Hale, G. (2006). *Quantitative Microbial Risk Assessment Models for Consumption of Raw Vegetables Irrigated with Reclaimed Water*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), 32. DOI:10.1128/AEM.72.5.3284-3290.2006.
- Han, S., Zhang, Z., & Yan, S. (2000). *Present situation and developmental trend of wastewater treatment and eutrophication waters purification with alga technology*. *Agro Environmental Development*, 63(1).
- Hanajima, D., Fukumoto, Y., Yasuda, T., Suzuki, K., Maeda, K., & Morioka, R. (2011). *Bacterial community dynamics in aerated cow manure slurry at different aeration intensities*. *Journal of Applied Microbiology*, 111(6). DOI: 10.1111/j.1365-2672.2011.05151.x
- Hartley, A. M., House, W. A., Callow, M. E., & Leadbeater, B. S. C. (1995). *The Role of a Green Alga in the Precipitation of Calcite and the Coprecipitation of Phosphate in Freshwater*. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie*, 80(3). DOI: 10.1002/iroh.19950800302
- Heijman, B., & Lier, J. van. (2017). *Emerging technologies for drinking water and waste water treatment*. Recuperado el 22 de mayo de 2017 de: <http://www.citg.tudelft.nl/en/aboutfaculty/departments/watermanagement/sections/sanitary-engineering/research/emerging-technologies/>
- Henrard, A. A., Martins, G., Moraes, L., Morais, M. G. De, Alberto, J., & Costa, V. (2015). *The cultivation of microalgae Cyanobium sp. and Chlorella sp. in different culture media and stirring setting*. *African Journal of Microbiology Research*, 9(21). DOI:10.5897/AJMR2015.7434
- Henze, M., & Comeau, Y. (2008). *Wastewater Characterization*. Recuperado el 10 de febrero de 2017 de: http://ocw.unesco-ihc.org/pluginfile.php/462/mod_resource/content/1/Urban_Drainage_and_Sewerage/5_Wet_Weather_and_Dry_Weather_Flow_Characterisation/DWF_characterization/Notes/Wastewater_characterization.pdf

- Herbison, I. (2014). La escasez de agua en América Latina. Recuperado el 12 de marzo de 2017 de: <http://speysidecr.com/insights/la-escasez-de-agua-en-america-latina-2/?lang=es>
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 49(2). DOI:10.4067/S0718-19572014000200001
- Hernández, G. (2000). *Manual de depuración Uralita: Depuración de aguas residuales* (3a ed.). Madrid: International Thomson.
- Hernández, I., Vásquez, J., & Álvarez, V. de P. (2016). Remoción biológica de nutrientes en aguas residuales urbanas con fotobiorreactores utilizando microalgas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17. ISSN: 2007-0934
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (1991). *Metodología de la Investigación* (1era ed.). Atlacomulco: McGRAW-HILL INTERAMERICANA DE MÉXICO, S:A.
- Ho, S. H., Huang, S. W., Chen, C. Y., Hasunuma, T., Kondo, A., & Chang, J. S. (2013). *Characterization and optimization of carbohydrate production from an indigenous microalga Chlorella vulgaris FSP-E. Bioresource Technology*, 135(April). DOI:10.1016/j.biortech.2012.10.100
- Hodaifa, G., Martínez, M. E., Órpez, R., & Sánchez, S. (2010). *Influence of hydrodynamic stress in the growth of Scenedesmus obliquus using a culture medium based on olive-mill wastewater. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 49(11). DOI:10.1016/j.cep.2010.08.017
- Hoek, C., Mann, D., & Jahns, M. (1995). *Algae. An introduction to phycology* (First). Press Syndicate of the University of Cambridge.
- Hoffmann, J. P. (1998). *Minireview Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae 1. Journal of Phycology*, 34. DOI:0.1046/j.1529-8817.1998.340757.x

- Imhof, B., & Muhlemann, J. (2005). *Greywater Treatment on Household Level in Developing Countries* –. Eidgenössische Technische Hochschule Zurich. Zurich,. Recuperado el 25 de abril de 2017 de: [https://www.uvm.edu/~ewb/Documents/Grey Water in Developing Countries.pdf](https://www.uvm.edu/~ewb/Documents/Grey%20Water%20in%20Developing%20Countries.pdf)
- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., Florez, J. Z., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). *Cultivation of Chlorella sp. Microalgae in batch culture: cell growth kinetics*. *Avances En Ciencias E Ingeniería*, 3(2). Recuperado el 12 de marzo de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3965767&info=resumen&idioma=SPA>
- Jeong, H., Kim, H., & Jang, T. (2016). *Irrigation Water Quality Standards for Indirect Wastewater Reuse in Agriculture: A Contribution toward Sustainable Wastewater Reuse in South Korea*. *Water*, 8(5), 169. DOI:10.3390/w8040169
- Jeřábková, H., Králová, B., & Náhlík, J. (1999). *Biofilm of Pseudomonas C12B on glass support as catalytic agent for continuous SDS removal*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44(4). DOI:10.1016/S0964-8305(99)00084-0
- John, J. (2003). *Phycoremediation*. In *Modern Trends in Applied Aquatic Ecology* . Boston, MA: Springer US. DOI:10.1007/978-1-4615-0221-0_6
- Jouravlev, A., & Hantke, D. (2011). Lineamientos de política pública para el sector de agua potable y saneamiento. (CEPAL, Ed.).
- Junta de Andalucía. (s.f.). Efectos de la contaminación sobre el agua. Recuperado el 26 de junio de 2017 de: http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/c_3_c_2_medio_ambiente_y_salud/aguas_consumo_publico/contaminacion_nitratos3.pdf.
- Kirrolia, A., Bishnoi, N. R., & Singh, R. (2012). *Effect of shaking , incubation*

temperature , salinity and media composition on growth traits of green microalgae Chlorococcum sp . Journal of Algal Biomass Utilization, 3(3).ISSN:2229-6905.

Kiso, Y., Jung, Y.-J., Park, M.-S., Wang, W., Shimase, M., Yamada, T., & Min, K.-S. (2005). *Coupling of sequencing batch reactor and mesh filtration: Operational parameters and wastewater treatment performance. Water Research, 39(20).* DOI:10.1016/j.watres.2005.05.025

Kiziloglu, F. . (2008). *Effects of untreated and treated wastewater irrigation on some chemical properties of cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) and red cabbage (Brassica oleracea L. var. rubra) grown on calcareous soil in Turkey. Agriculture Water Managment, 95(6).*DOI: 10.1016/j.agwat.2008.01.008.

Kong, W., Wang, B., Ma, H., & Gu, L. (2006). *Electrochemical treatment of anionic surfactants in synthetic wastewater with three-dimensional electrodes. Journal of Hazardous Materials, 137(3).* DOI:10.1016/j.jhazmat.2006.04.037

Kshirsagar, D. A. (2013). *Bioremediation of Wastewater By Using Microalgae : an Experimental Study. International Journal of Life Science Biotechnology and Pharma Research, 2(3).* ISSN:2250-3137.

Kumar, A., Pradeepta, S., Sahoo, K., & Singhal, S. (2016). *Impact of various media and organic carbon sources on biofuel production potential from Chlorella spp. 3 Biotech, 6(2).* DOI:10.1007/s13205-016-0434-6

Kwarciak-Kozłowska, A., Sławik-Dembiczak, L., & Bańka, B. (2014). *Phycoremediation of Wastewater: Heavy Metal and Nutrient Removal Processes. Ochrona Srodowiska I Zasobów Naturalnych, 25(4).* DOI:10.2478/oszn-2014-0026

Laboratorio OSP (UCE). (2016a). *Alcalinidad. Método de titulación. APHA 2320B.4.* Quito, Ecuador.

- Laboratorio OSP (UCE). (2016b). *Evaluación de Calcio. Método directo de llama de óxido nitroso-acetileno APHA 3111-D*. Quito, Ecuador.
- Laboratorio OSP (UCE). Evaluación de detergentes, método APHA 5540 C (2016). Quito, Ecuador.
- Laboratorio OSP (UCE). (2016d). *Evaluación de Magnesio. Método directo de llama de aire-acetileno, APHA 3111-B, modificado*.
- Laboratorio OSP (UCE). (2016e). *Evaluación de Sodio. Método directo de llama de aire-acetileno, APHA 3111-B*. Quito, Ecuador.
- Larsdotter, K. (2006). *Wastewater treatment with microalgae – a literature review*. *Vatten*. Recuperado el 21 de julio de 2017 de: http://www.tidskriftenvatten.se/wpcontent/uploads/2017/04/48_article_2125.pdf.
- Latiffi, N. A., Maya, R., Mohamed, S., Apandi, N., & Kassim, H. (2015). *Application of Phycoremediation using Microalgae Scenedesmus sp. as Wastewater Treatment in Removal of Heavy Metals from Food Stall Wastewater*. *Applied Mechanics and Materials*. DOI:10.4028/www.scientific.net/AMM.773-774.1168
- Lau, P. ., Tam, N. F. ., & Wong, Y. . (1995). *Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater*. *Environmental Pollution*, 89(1). DOI:10.1016/0269-7491(94)00044-E
- Ledin, A., Eriksson, E., & Henze, M. (2001). *Aspects of groundwater recharge using grey wastewater*. Chapter 18. (P. Lens, G. Zeeman, & G. Lettinga, Eds.). London, UK: IWA Publishing.
- Lee, W. H., & Rosenbaum, M. (2003). *Chlorella The sun-powered supernutrient and its beneficial properties*. *Chlorella Europe*. Recuperado el 12 de abril de 2017 de: http://www.terapiaclark.es/Docs/chlorella_natures_perfect_food.pdf
- León y Chaves. (2010). Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas , la lenteja de agua Lemna aequinoctiales y un humedal subsuperficial

- en Costa Rica. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal*, 1(2). Recuperado el 10 de enero de 2017 de: <http://www.ambientalex.info/revistas/vol1n24.pdf>.
- Lesikar, B., Melton, R., Smith, D., & Neill, C. O. (2003). *Graywater*. Texas. Recuperado el 12 de julio de 2017 de: <https://static1.squarespace.com/static/53286fe5e4b0bbf6a4535d75/t/53e54041e4b0e71a10d75f84/1407533121749/Graywater.pdf>.
- Lewin, & Ralph. (2006). Cultivo y elaboración de un producto comestible de *Chlorella vulgaris*. Distrito Federal de Mexico. Recuperado el 14 de marzo de 2017 de: <https://www.yumpu.com/es/document/view/37706563/cultivo-y-elaboracion-de-un-producto-comestible-de-chlorella-vulgaris>.
- Lewis, L., & McCourt, R. . (2004). *Green algae and the origin of land plants*. *American Journal of Botany*, 91(10),
- Li, Y., Chen, Y.-F., Chen, P., Min, M., Zhou, W., Martinez, B., ... Ruan, R. (2011). *Characterization of a microalga Chlorella sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production*. *Bioresource Technology*, 102(8), DOI:10.1016/j.biortech.2011.01.091
- Li, Y., Zhou, W., Hu, B., Min, M., Chen, P., & Ruan, R. R. (2011). *Integration of algae cultivation as biodiesel production feedstock with municipal wastewater treatment: Strains screening and significance evaluation of environmental factors*. *Bioresource Technology*, 102(23). DOI:10.1016/j.biortech.2011.09.064
- Lin, L. (2014). Tratamiento biológico para la contaminación por tensoactivos de la Planta de Tratamiento de aguas residuales del Cantón Salcedo-Chipoaló. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Ling, E., & Benham, B. (2014). *Greywater Reuse*. Virginia. Recuperado el 09 de abril de 2017 de: <http://www.wellwater.bse.vt.edu/files/Greywater-reuse.pdf>

- López, I. (2016). Análisis de efectividad de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. en biorremediación de aguas residuales. Zamorano. Recuperado el 18 de noviembre de 2016 de: <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5733/1/IAD-2016-T024.pdf>
- López, I., Silva, J., González, C., & Viramontes, A. (2016). Monitoreo del funcionamiento del sistema de tratamiento a escala piloto a base de microalgas existentes en la Planta Tratadora Municipal de Torreón. *Ciencia, Ingeniería Y Desarrollo Tec Lerdo*, 1(2), Recuperado el 15 de diciembre de 2016 de: <http://revistacid.itslerdo.edu.mx/coninci2016/Revista%20CID%20Tec%202016.pdf>.
- Lv, J., Guo, J., Feng, J., Liu, Q., & Xie, S. (2017). *Effect of sulfate ions on growth and pollutants removal of self-flocculating microalga Chlorococcum sp. GD in synthetic municipal wastewater. Bioresource Technology*, 234, . DOI:10.1016/j.biortech.2017.03.061
- M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G. . (2017). AlgaeBase. Recuperado el 5 de abril de 2017, de: http://www.algaebase.org/search/genus/detail/?genus_id=37477
- Mahapatra, D. M., & Ramachandra, T. V. (2013a). *Algal biofuel: Bountiful lipid from chlorococcum sp. proliferating in municipal wastewater. Current Science*, 105(1). Recuperado el 16 de noviembre de 2016 de: http://www.jstor.org/stable/24092676?seq=1#page_scan_tab_contents.
- Mahapatra, D. M., & Ramachandra, T. V. (2013b). *Algal biofuel: Bountiful lipid from Chlorococcum sp. proliferating in municipal wastewater. Current Science*, 105(1), 47–55. Recuperado el 15 de febrero de 2017 de: http://www.jstor.org/stable/24092676?seq=1#page_scan_tab_contents.
- Makarevi, V., Andrulevi, V., & Skorupskait, V. (2011). *Cultivation of Microalgae*

Chlorella sp. and Scenedesmus sp. as a Potential Biofuel Feedstock. Environmental Research, Engineering and Management, 3(3). ISSN: 2029-2139

Mallick, N. (2002). *Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N,P and metal removal: A review. BioMetals*, 15. DOI:10.1023/A.

Marsilli, A. (2005). Tratamiento de aguas residuales. Recuperado el 30 de marzo de 2017 de: <http://www.tierramor.org/Articulos/tratagua.htm#tratadomestic>

Martínez, M. (2000). *Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obliquus. Bioresource Technology*, 73(3). DOI:10.1016/S0960-8524(99)00121-2

Martínez García, L. (2012). Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Universidad de León. Recuperado el 29 de junio de 2017 de: <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1414/2008ON-MART%25CDNEZ%20GARC%25CDA%2C%20LORENA.pdf?sequence=1>.

Mayo, A., & Noike, T. (1994). *Effect of glucose loading on the growth behavior of Chlorella vulgaris and heterotrophic bacteria in mixed culture. Water Research*, 28(5). DOI:10.1016/0043-1354(94)90184-8

Meneses, M. (2015a). Evaluación de la capacidad de Remoción de Contaminantes, Productividad de Biomasa y Contenido Lipídico, alcanzados mediante el cultivo de un consorcio microalgal utilizando agua con Nutrientes del Reservorio de Guangopolo de la Empresa Eléctrica Quito-Pic. Escuela Superior Politécnica del Ejército.

Meneses, M. (2015b). Evaluación de la capacidad de remoción de contaminantes, productividad de biomasa y contenido lipídico alcanzados mediante el cultivo de un consorcio microalgal utilizando agua con nutrientes del reservorio de Guango polo de la empresa eléctrica Quito. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Quito-

Ecuador.

- Metcalf & Eddy. (1979). *Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización*. (Mc Graw Hill, Ed.) (Tercera).
- Metcalf & Eddy. (1993). *Wastewater Engineering: Treatment Disposal Reuse*. Boston, MA: McGraw-Hill.
- Ministerio del Ambiente. (2015). *Registro Oficial*. Quito-Ecuador.
- Moratiel, R. (2015). *Operaciones auxiliares de riego en cultivos agrícolas*. España: Paraninfo S.A.
- Morel, A., & Diener, S. (2006). *Greywater Management in Low and Middle-Income Countries*. Duebendorf, Switzerland.
- Mostafa, S. S. M., Shalaby, E. A., & Mahmoud, G. I. (2012). Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production. *Not Sci Biol*, 4(1).
- Mulder, A., Graaf, A. A. Van De, Robertson, L. A., & Kuenen, J. G. (1995). *Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor*. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(3). DOI:10.1016/0168-6496(94)00081-7
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. *Water Research*, 40(15). DOI:10.1016/j.watres.2006.06.011
- Mustafa, E.-M., Phang, S.-M., & Chu, W.-L. (2012). *Use of an algal consortium of five algae in the treatment of landfill leachate using the high-rate algal pond system*. *Journal of Applied Phycology*, 24(4). DOI:10.1007/s10811-011-9716-x
- Nägeli, C. (1849). *Einzelliger Algen*. *Neue Denkschriften Der Allg. Schweizerischen Gesellschaft Für Die Gesamten Naturwissenschaften*, 10(7).
- Nuñez, M. (2008). *Microalgas acuáticas: la otra escala de la biodiversidad en la*

Amazonía colombiana. Chlorophyceae. (M. Nuñez, Ed.) (1era ed.). Bogotá, Colombia: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-Sinchi.

- Obbins, L. I. S. A. L. R. (1998). *Production of carbonate sediments by a unicellular green alga.* *American Mineralogist*, 83, 1998. DOI: 10.2138/am-1998-11-123.
- OEFA. (2014). Fiscalización ambiental en aguas residuales. Lima-Perú. Recuperado el 16 de mayo de 2017 de: https://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827
- Olguín, E. J. (2003). *Phycoremediation: Key issues for cost-effective nutrient removal processes.* *Biotechnology Advances*, 22(1–2). DOI:10.1016/S0734-9750(03)00130-7
- Olivos, O. (2010). *Tratamiento de aguas Capítulo V: Tratamiento primario.* Lima-Perú. Recuperado el 15 de enero de 2017 de: <http://www.uap.edu.pe/intranet/fac/material/24/20102BT240224E10240108011/20102BT240224E1024010801120689.pdf>
- OMS. (2006a). *Guidelines for Drinking-water Quality. Atención Primaria*, 23(Vdv), 7. Recuperado el 15 de febrero de 2017 de: http://201.147.150.252:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1262/Investigao_e_evoluo.pdf?sequence=1
- OMS. (2006b). *Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater* (Vol. 2). France.
- OMS. (2016). Agua nota descriptiva datos y cifras. Recuperado el 15 de marzo de 2017 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
- ONU. (2003). *Agua para todos. Agua para la vida. Onu- Wwap.* Recuperado el 17 de julio de 2017 de: <http://www.un.org/esa/sustdev/sdissues/water/WWDR-spanish-129556s.pdf>
- Oros, G., Forga, E., & Cserha, T. (2002). *Biological activity and environmental*

impact of anionic surfactants. Environmental International, 28. DOI:10.1016/S0160-4120(02)00032-6.

- Orozco, A. (2005). *Bioingeniería de aguas residuales*. Asociación Colombiana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Ed. Primera. Colombia.
- Ortega, L. (2014). *La hidrósfera: contaminación. Contaminación de las aguas*. Recuperado el 17 de junio de 2017 de: http://roble.pntic.mec.es/lorg0006/dept_biologia/archivos_texto/ctma_t5_hidrosfera_contaminacion.pdf
- Ota, M., Kato, Y., Watanabe, M., Sato, Y., Smith, R. L., Rosello-Sastre, R., ... Inomata, H. (2011). *Effects of nitrate and oxygen on photoautotrophic lipid production from Chlorococcum littorale. Bioresource Technology*, 102(3), 3286–3292. DOI:10.1016/j.biortech.2010.10.024
- Oyama, T., Aoshima, A., Horikoshi, S., Hidaka, H., Zhao, J., & Serpone, N. (2004). *Solar photocatalysis, photodegradation of a commercial detergent in aqueous TiO2 dispersions under sunlight irradiation. Solar Energy*, 77(5). DOI:10.1016/j.solener.2004.04.020
- Pacheco, M., Hoeltz, M., Moraes, M., & Schneider, C. (2015). *Microalgae: Cultivation techniques and wastewater phycoremediation. Environmental Science and Health*, 50(6). DOI: 10.1080/10934529.2015.994951.
- Páez, S. (2016). Evaluación comparativa del crecimiento de la microalga CMIE-H2 en fotobiorreactores discontinuos de tipo tubular y panel. Universidad de las Américas.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technology*, 102(1). DOI:10.1016/j.biortech.2010.06.158
- Parra, J. (n.d.). Depuración y reutilización de aguas residuales para riego. España: Estación Experimental de Cajamar “Las Palmerillas.”
- Pérez, C. (2012). Diseño y cálculo del tratamiento secundario mediante

aireación prolongada de una Edaru. Universidad Carlos III de Madrid. Escuela Politécnica Superior.

- Perez, F., & Camacho, K. (2011). Tecnología para el tratamiento de aguas servidas. Universidad Veracruzana.
- Pérez, J. (2011). Manual para determinar la calidad del agua para riego agrícola, 49. Recuperado el 16 de marzo de 2017 de: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/31418/1/josemanuelperzl eon.pdf>.
- Perlman, H. (2016). El ciclo del agua: *The water cycle*. Recuperado el 31 de marzo de 2017 de: <https://water.usgs.gov/edu/watercyclespanish.html>
- Petriefilm 3M. (s.f.). Placas alta sensibilidad para Recuento de Coliformes. Recuperado el 16 de abril de 2017 de: <http://multimedia.3m.com/mws/media/374241O/3m-petriefilm-high-sensitivity-coliform-count-plate-interpretation-guide-spanish.pdf>.
- Phang, S.-M., Chu, W.-L., & Rabiei, R. (2015). *Phycoremediation*. In D. Sahoo & J. Seckbach (Eds.), *The Algae World*. Springer Netherlands. DOI: 10.1007/978-94-017-7321-8_13.
- Potvin, G., & Zhang, Z. (2010). *Strategies for high-level recombinant protein expression in transgenic microalgae: A review*. *Biotechnology Advances*, 28(6). DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.08.006.
- Prats, D., Ruiz, F., Vazquez, B., & Rodriguez-Pastor, M. (1997). *Removal of anionic and nonionic surfactants in a wastewater treatment plant with anaerobic digestion. A comparative study*. *Water Research*, 31(8). DOI:10.1016/S0043-1354(97)00040-7.
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). *Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production*. *Applied Energy*, 88(10). DOI:10.1016/j.apenergy.2010.11.025.

- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R., & Ahluwalia, A. S. (2015). *Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. International Journal of Environmental Science and Technology*, 12(4), DOI:10.1007/s13762-014-0700-2.
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Orton.Catie.Ac.Cr, 472. DOI: 10.1002/9780470995280.
- Richmond, A. (2007). *Biological Principles of Mass Cultivation. In Handbook of Microalgal Culture*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. DOI:10.1002/9780470995280.ch8.
- Rico, E. L. A. de P. (2003). Contaminación de agua. Recuperado el 16 de febrero de 2017 de: <https://www2.pr.gov/agencias/jca/areasprogramaticas/Biblioteca/Documents/contaminacionAgua.pdf>.
- Riding, R. (1991). *Classification of Microbial Carbonates. In Calcareous Algae and Stromatolites*. Springer Berlin Heidelberg. DOI:10.1007/978-3-642-52335-9_2.
- Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., & Stanier, R. Y. (1979). *Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Journal of General Microbiology*, 111(1), DOI:10.1099/00221287-111-1-1.
- Rivera, J., Garza, M. T., Almaguer, V., & Loredó, J. (2010). Bioingeniería ambiental aplicada a una columna empacada con *Chlorella* sp. inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UANL*, XIII(2). ISSN 1405-9177.
- Robinson, P. K., Dainty, A. L., Goulding, K. H., Simpkins, I., & Trevan, M. D. (1985). *Physiology of alginate-immobilized Chlorella. Enzyme and Microbial Technology*, 7(5),. DOI:10.1016/S0141-0229(85)80004-1

- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010a). *Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology*, 101(1). DOI:10.1016/j.biortech.2009.02.076
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G., & Stephenson, T. (2010b). *Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology*, 101(1). DOI:10.1016/j.biortech.2009.02.076
- Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. *Universidad Politécnica de Valencia*. Recuperado el 16 de julio de: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>.
- Serediak, N., & Huynh, M.-L. (2011). *Algae Identification Field Guide: An illustrative field guide on identifying common algae found in the Canadian praries*. Canada: Agriculture and Agri-Food. Recuperado el 18 de febrero de 2017 de: http://publications.gc.ca/site/archivee-archived.html?url=http://publications.gc.ca/collections/collection_2011/agr/A125-8-1-2011-eng.pdf
- Sette, R. (1990). *Tratamiento de aguas residuales*. Quebec: Reverte, S.A.
- Shelef, G., & Soeder, C. (1982). *Algal Biomass: production and use*. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press.
- Sialve, B.; Bernet, N.; Bernard, O. (2009). *Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgae biodiesel sustainable. Biotechnology Advances*, 27. DOI:10.1016/j.biotechadv.2009.03.001.
- Souza, P. O., Ferreira, L. R., Pires, N. R. X., S. Filho, P. J., Duarte, F. A., Pereira, C. M. P., & Mesko, M. F. (2012). *Algae of economic*

importance that accumulate cadmium and lead: a review. Revista Brasileira de Farmacognosia, 22(4). DOI:10.1590/S0102-695X2012005000076

Spolaore, P., Joannis-Casssa, C., Duran, E., & Isambert, A. (2005). *Commercial Applications of Microalgae. Bioscience and Bioengineering*, 101. DOI: 10.1263/jbb.101.87.

Stabel, H. (1986). Calcite precipitation in Lake Constance: chemical equilibrium, sedimentation, and nucleation by algae I. *Limnology and Oceanography*, 31(5).

Standard Methods. (2016). *Metals by Flame Atomic Absorption Spectrometry*. Recuperado el 17 de mayo de 2017 de: <https://www.standardmethods.org/store/ProductView.cfm?ProductID=206>.

Steber, J., & Wierich, P. (1987). *The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with 14C-labelled model surfactants. Water Research*, 21(6). DOI:10.1016/0043-1354(87)90076-5

Suresh Kumar, K., Dahms, H.-U., Won, E.-J., Lee, J.-S., & Shin, K.-H. (2015). *Microalgae—A promising tool for heavy metal remediation. Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113. DOI:10.1016/j.ecoenv.2014.12.019.

Sydney, E. B., da Silva, T. E., Tokarski, A., Novak, A. C., de Carvalho, J. C., Woiciechowski, A. L., ... Soccol, C. R. (2011). *Screening of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. Applied Energy*, 88(10). DOI:10.1016/j.apenergy.2010.11.024

Tafur Alvarez, J. E., & Estrada Palencia, L. (2015). Tratamiento de aguas residuales in vitro por medio de la microalga *Chlorella* sp. en el Municipio De Barrancabermeja, Colombia. *Citecsa*, 6(10). Recuperado el 15 de febrero de 2017 de:

<http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/issue/view/18>

- Thakur, S., & Rao, S. N. (2014). Protocolo de Microalgas-Centro Regional De Investigación Pesquera. *Igarss 2014*, (1). DOI: 10.1007/s13398-014-0173-7.2
- Thompson, J. ., & Ferris, F. . (1986). *Cyanobacterial precipitation of gypsum, calcite and magnesite from natural alkaline lake water. Limnology and Oceanography*, 31(5).DOI:10.1130/0091-7613(1990)018<0995:CPOGCA>2.3.CO;2.
- Tilley, E., Ulrich, L., Lüthi, C., Reymond, P., Schertenleib, R., & Zurbrügg, C. (2017). *Compendium of Sanitation Systems and Technologies. (S. federal I. of A. S. of T. (Eawag), Ed.) (2nd Revise)*. Duebendorf, Switzerland.
- Tredici, M. R. (2007). *Mass Production of Microalgae: Photobioreactors. In Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell. DOI:10.1002/9780470995280.ch9
- Tuchman, N. (1996). *The role of heterotrophy in algae*. (A. Ecology, Ed.) (In Stevens). New York, USA. PMID: PMC242773.
- U.S. Army Corps of Engineers. (1998). Evaluación Recursos de Agua del Ecuador. Recuperado el 17 de mayo de 2017 de: http://www.cepal.org/deype/noticias/noticias/6/44576/04_EC-evaluacion-recursos-agua.pdf.
- Ueno, Y., Kurano, N., & Miyachi, S. (1999). *Purification and characterization of hydrogenase from the marine green alga, Chlorococcum littorale. FEBS Letters*, 443(2). DOI:10.1016/S0014-5793(98)01699-8
- UNEP. (2007). *Approaches To the Assessment of Eutrophication in Mediterranean Coastal*, 12–14. Recuperado el 09 de noviembre de 2016 de: http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/5709/07wg32_1_inf6_eng.pdf?sequence=1.

- UNESCO. (2015). Agua para un mundo sostenible. Datos y cifras. Recuperado el 16 de diciembre de 2016 de:http://www.unesco.org/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/images/WDR2015Facts_Figures_SPA_web.pdf
- UNESCO. (2017). Abordar la escasez y calidad de agua. Recuperado el 31 de marzo de 2017 de: <http://www.unesco.org/new/es/office-in-montevideo/ciencias-naturales/water-international-hydrological-programme/escasez-y-calidad-del-agua/>.
- Universidad ICESI. (2017). Aguas grises. Recuperado el 21 de marzo de 2017, de:<http://eduteka.icesi.edu.co/gestorp/recUp/229d6a7ec227b9d604c5818237c04c93.pdf>
- US Environmental Protection Agency. (2012). *Guidelines for Water Reuse. Development*. Recuperado el 26 de septiembre de 2016 de: <https://watereuse.org/wp-content/uploads/2015/04/epa-2012-guidelines-for-water-reuse.pdf>.
- Vela, F. (2016). Remoción de mercurio en aguas residuales de la actividad minera con el uso de microalgas. Universidad de las Américas, Quito, Ecuador.124p.
- Walker, T. L., Purton, S., Becker, D. K., & Collet, C. (2005). *Microalgae as bioreactors*. *Plant Cell Reports*, 24(11). DOI:1007/s00299-005-0004-6.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., ... Ruan, R. (2010). *Cultivation of Green Algae Chlorella sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4). DOI:10.1007/s12010-009-8866-7
- Wang, M., Kuo-Dahab, W. C., Dolan, S., & Park, C. (2014). *Kinetics of nutrient removal and expression of extracellular polymeric substances of the microalgae, Chlorella sp. and Micractinium sp., in wastewater treatment*. *Bioresource Technology*, 154. DOI:10.1016/j.biortech.2013.12.047

- Wang, X. X., Wu, Y. H., Zhang, T. Y., Xu, X. Q., Dao, G. H., & Hu, H. Y. (2016). *Simultaneous nitrogen, phosphorous, and hardness removal from reverse osmosis concentrate by microalgae cultivation*. *Water Research*, 94. DOI:10.1016/j.watres.2016.02.062
- Water Supplies Department. (2015). *Technical Specifications On Grey Water Reuse And Rainwater Harvesting*. Hongkong. Recuperado el 16 de marzo de 2017 de: http://www.wsd.gov.hk/filemanager/en/content_1177/technical_spec_grey_water_reuse_rainwater_harvest.pdfWhite, G. F., & Thomas, O. R. T.
- Winpenny, J., Heinz, I., & Koo-Oshima, S. (2010). *The Wealth of Waste: The Economics of Wastewater Use in Agriculture*. *FAO Water Report*, (35). Recuperado el 18 de diciembre de 2017 de: <http://www.fao.org/docrep/012/i1629e/i1629e.pdf>
- Wustman, B. A., Melkonian, M., & Becker, B. (2004). *A study of cell wall and flagella formation during cell division in the scaly green alga, Scherffelia dubia (Chlorophyta)*. *Journal of Phycology*, 40(5), DOI:10.1111/j.1529-8817.2004.04056.x
- Yan, G., Jiang, J., Wu, G., & Yan, X. (1998). Disappearance of linear alkylbenzene sulfonate from different cultures with *Anabaena* sp. HB 1017. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(2).
- Yao, Z., Ying, C., Lu, J., Lai, Q., Zhou, K., Wang, H., & Chen, L. (2013). *Removal of K⁺, Na⁺, Ca²⁺, and Mg²⁺ from saline-alkaline water using the microalga *Scenedesmus obliquus**. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 31(6). DOI:10.1007/s00343-013-2116-0
- Yu, I. ., Su, J. ., Wu, J. ., & Yen, H. . (2005). *Dietary Modification for Reducing Electrical Conductivity of Piggery Wastewater*. *Animal Sciences*, 18(9). DOI:10.5713/ajas.2005.1343
- Zhang, E., Wang, B., Wang, Q., Zhang, S., & Zhao, B. (2008). *Ammonia-*

nitrogen and orthophosphate removal by immobilized Scenedesmus sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. Bioresource Technology, 99(9).
DOI:10.1016/j.biortech.2007.07.011

Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., & Wang, S. (2008). *Biological Removal of Nitrogen from Wastewater. In In Reviews of environmental contamination and toxicology.* Springer New York.
DOI:10.1007/978-0-387-71724-1_5

ANEXOS

Medios de cultivo y suplementos nutricionales

Tabla 16.

Composición del fertilizante foliar Nitrofoska®

Composición	Concentración
Nitrógeno (N)	10%
Fósforo (P ₂ O ₅)	4%
Potasio (K ₂ O)	7%
Magnesio (MgO)	0,2%
Azufre (S)	0,8%
Manganeso (Mn)	17ppm
Hierro (Fe)	140ppm
Cobre (Cu)	25ppm
Zinc (Zn)	2ppm
Boro (B)	22ppm
Molibdeno (Mo)	3ppm

Tomado de: (BASF Química S.A., 2003)

Tabla 17.

Composición del medio BG-11

Component	Stock Solution (g · L ⁻¹ dH ₂ O)	Quantity Used	Concentration in Final Medium (M)
<i>Fe Citrate solution</i>		1 mL	
Citric acid	6	1 mL	3.12×10^{-5}
Ferric ammonium citrate	6	1 mL	$\sim 3 \times 10^{-5}$
NaNO ₃	—	1.5 g	1.76×10^{-2}
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	40	1 mL	1.75×10^{-4}
MgSO ₄ · 7H ₂ O	75	1 mL	3.04×10^{-4}
CaCl ₂ · 2H ₂ O	36	1 mL	2.45×10^{-4}
Na ₂ CO ₃	20	1 mL	1.89×10^{-4}
MgNa ₂ EDTA · H ₂ O	1.0	1 mL	2.79×10^{-6}
Trace metals solution	(See following recipe)	1 mL	—

Tomado de: (Andersen, 2005)

Tabla 18.

Composición del medio Bold's Basal

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

Tomado de: (Andersen, 2005)

Evaluación del parámetro DQO mediante muestras del kit NANOCOLOR® DQO 1500



Figura 30. Preparación y digestión de muestras para la evaluación del DQO.

Evaluación del índice de coliformes totales mediante el kit Petrifilm #M

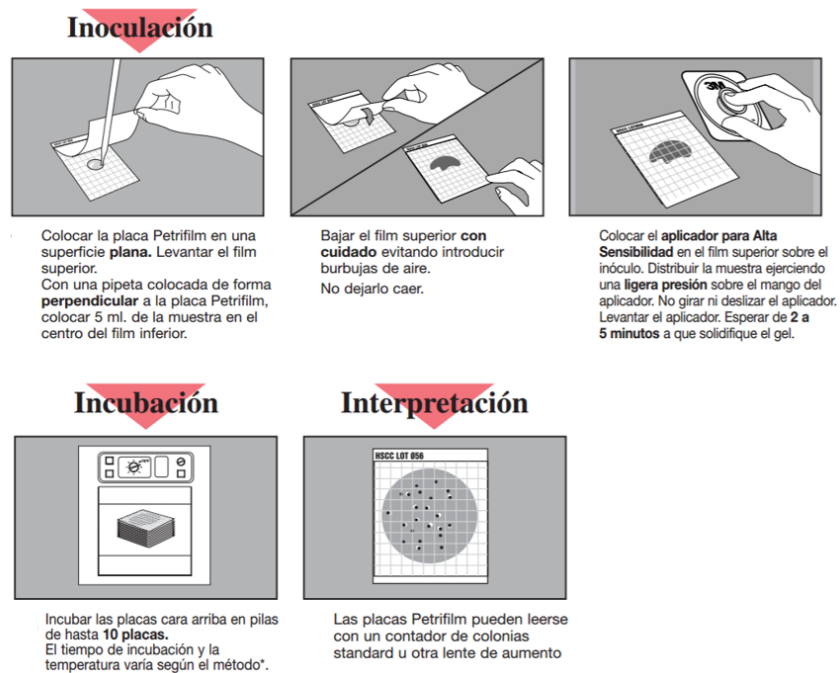


Figura 31. Esquema del protocolo de análisis de Coliformes totales.

Adaptado de: (Petrifilm 3M, s.f.)

Datos de la evaluación de las curvas y parámetros cinéticos de las cepas *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp, y *Chlorella* sp en medio de cultivo BG-11.

Los datos presentados en la Tablas 19,20 y 21 corresponden al valor de las réplicas de los conteos celulares y densidad celular realizados cada dos días del cultivo de las cepas *Pleurococcus* sp, *Chlorococcum* sp, y *Chlorella* sp en medio de cultivo BG-11. Dichos valores se emplearon para el cálculo de los parámetros cinéticos, μ y td.

Datos para la evaluación cinética de la cepa *Pleurococcus* sp.

Tabla 19.

Datos del conteo celular y densidad celular para la evaluación cinética de la cepa Pleurococcus sp, cultivada en medio BG-11.

Tiempo (días)	Réplicas del conteo			Promedio	Densidad celular (cel/m)
	R1	R2	R3		
0	35,0	24,0	43	34	3,40E+06
2	12,0	19,0	13	14	1,47E+07
5	15,0	14,0	19	16	1,60E+07
9	24,0	20,0	17	20	2,03E+07
12	48,0	24,0	27	33	3,30E+07
19	12	23	30	21	2,17E+06
21	26	28	11	21	2,17E+06
23	24	12	10	15	1,53E+06

Datos para la evaluación de la cepa *Chlorococcum* sp.

Tabla 20.

Datos del conteo celular y densidad celular para la evaluación cinética de la cepa Chlorococcum sp, cultivada en medio BG-11.

Tiempo (días)	Réplicas del conteo			Promedio	Densidad celular (cel/m)
	R1	R2	R3		
0	90	68	85	81	8,10E+05
5	300	240	180	240	2,40E+06
7	720	1210	1120	1017	1,02E+07
10	2200	2600	1900	2233	2,23E+07
12	4900	4300	3700	4300	4,30E+07
19	3000	5900	5600	4833	4,83E+07
28	1300	1600	700	1200	1,20E+07
31	820	880	820	840	8,40E+06
33	1020	1650	1430	1367	1,37E+07
35	980	1180	1420	1193	1,19E+07

Datos para la evaluación de la cepa *Chlorella* sp.

Tabla 21.

Datos del conteo celular y densidad celular para la evaluación cinética de la cepa Chlorella sp, cultivada en medio BG-11

Tiempo (días)	Réplicas del conteo			Promedio	Densidad celular (cel/mL)
	R1	R2	R3		
0	650	1050	675	792	7,92E+06
5	2150	1600	1100	1617	1,62E+07
7	1725	2600	2350	2225	2,23E+07
12	2425	2475	2550	2483	2,48E+07
14	2900	3000	2425	2775	2,78E+07
19	3450	3000	3500	3317	3,32E+07
21	2875	2600	3750	3075	3,08E+07
23	1200	1600	1725	1508	1,51E+07
27	950	975	825	917	9,17E+06

Curvas de crecimiento de las réplicas de cada unidad de tratamiento

Réplicas de la unidad de tratamiento de *Pleurococcus sp*, sin la aplicación de Nitrofoska® (1a)

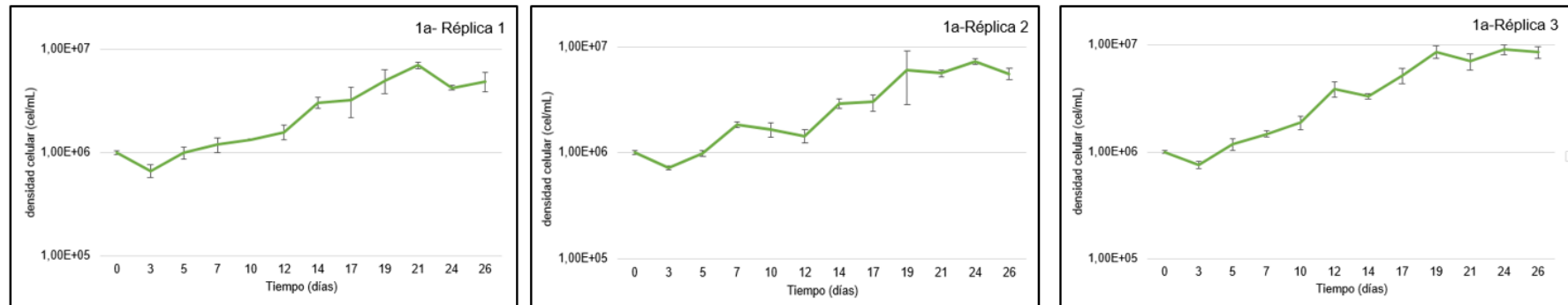


Figura 32. Curvas de crecimiento de las réplicas de tratamiento de la cepa *Pleurococcus sp*, sin la aplicación de Nitrofoska®

Réplicas de la unidad de tratamiento de *Pleurococcus sp*, con la aplicación de Nitrofoska® (1b)

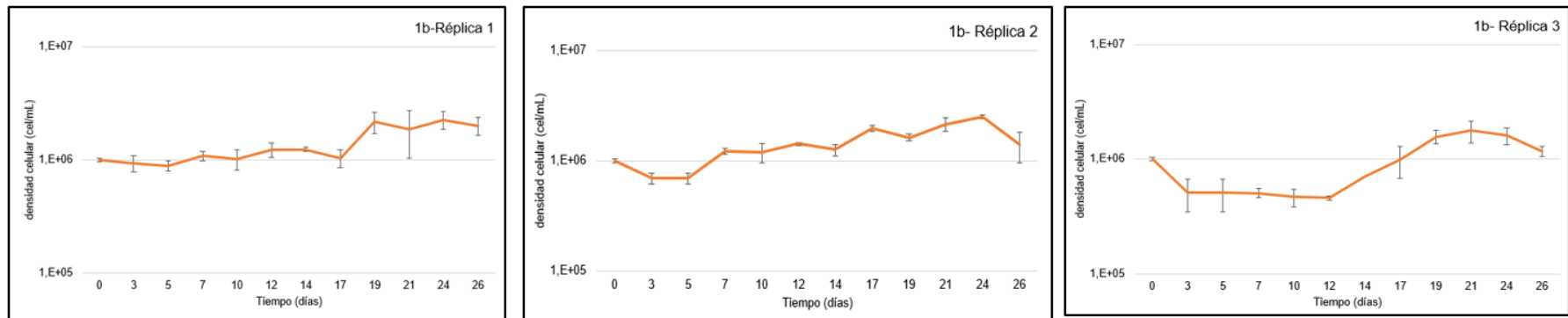


Figura 33. Curvas de crecimiento de las réplicas de tratamiento de la cepa *Pleurococcus sp*, con la aplicación de Nitrofoska®

Réplicas de la unidad de tratamiento de *Chlorococcum* sp, sin la aplicación de Nitrofoska® (2a)

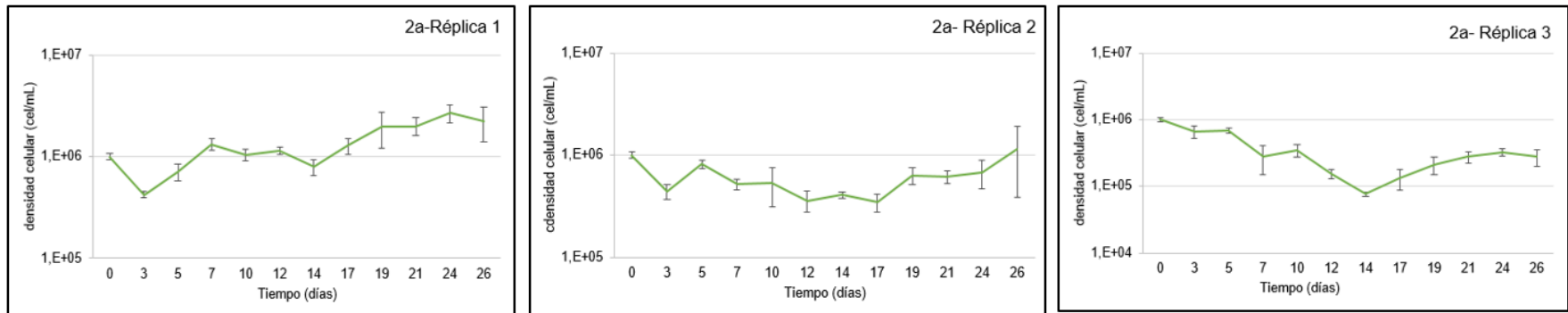


Figura 34. Curvas de crecimiento de las réplicas de tratamiento de la cepa *Chlorococcum* sp, con la aplicación de Nitrofoska®

Réplicas de la unidad de tratamiento *Chlorococcum* sp, con la aplicación de Nitrofoska® (2b)

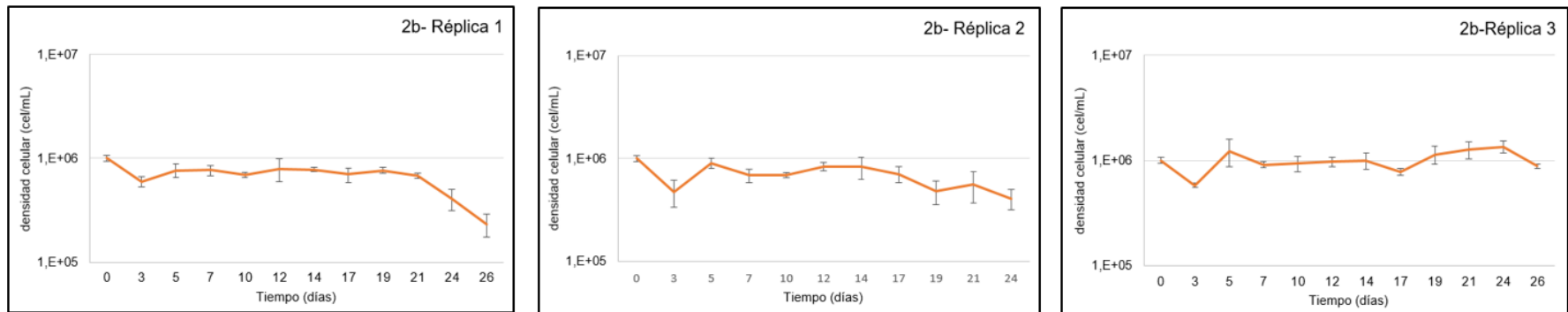


Figura 35. Curvas de crecimiento de las réplicas de tratamiento de la cepa *Chlorococcum* sp, con la aplicación de Nitrofoska.

Réplicas de la unidad de tratamiento *Chlorella* sp, sin la aplicación de Nitrofoska® (3a)

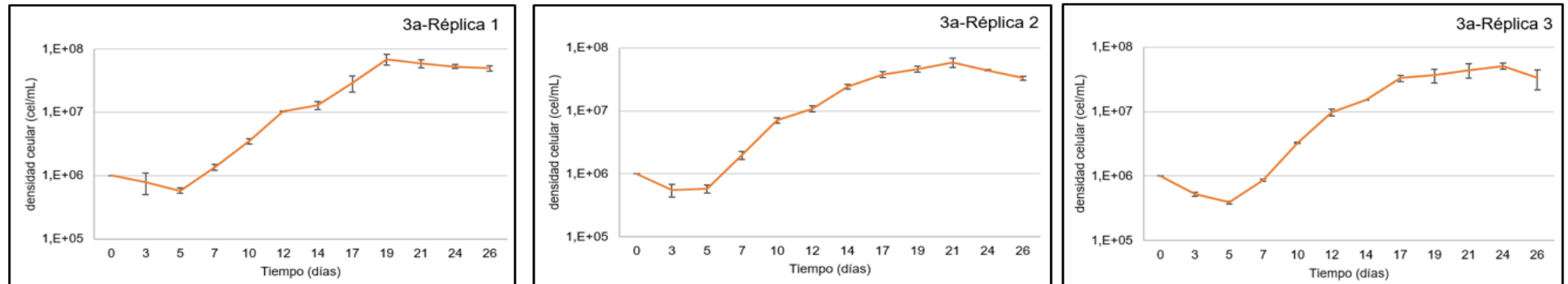


Figura 36. Curvas de crecimiento de las réplicas de tratamiento de la cepa *Chlorella* sp, con la aplicación de Nitrofoska.

Réplicas de la unidad de tratamiento *Chlorella* sp, con la aplicación de Nitrofoska® (3b)

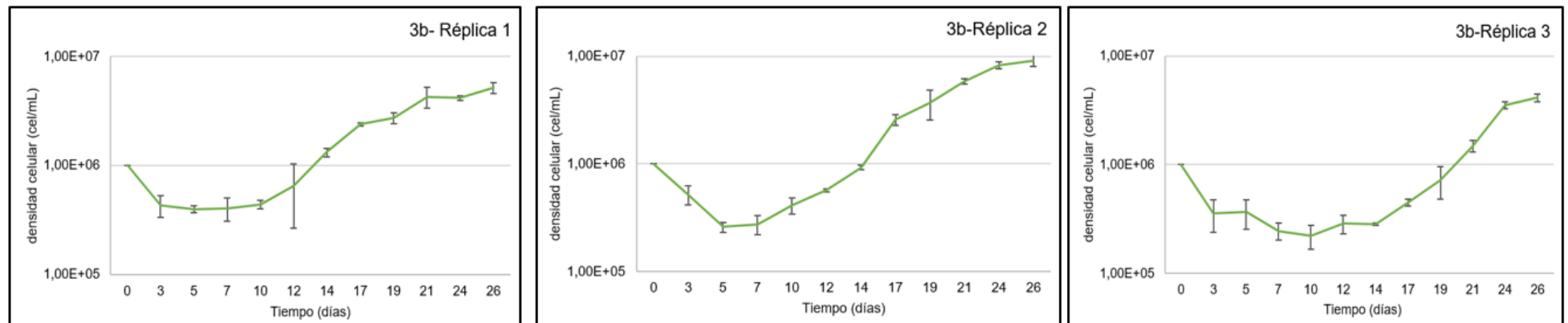


Figura 37. Curvas de crecimiento de las réplicas de tratamiento de la cepa *Chlorella* sp, con la aplicación de Nitrofoska

