

**UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS-ESPE**

**Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura**

**Carrera de Ingeniería en Biotecnología / Biotecnología**

**perfil del plan**

**proyecto de investigación /**

**artículo académico indexado**

**Remoción de contaminantes en un efluente porcino, a nivel de laboratorio, mediante la selección de un consorcio microalgal y evaluación del valor nutricional de la biomasa.**

****





**Autora/autor**

**ÍNDICE**

[1 TÍTULO DEL PROYECTO 4](#_Toc367344924)

[2 UNIDAD ACADÉMICA RESPONSABLE 4](#_Toc367344925)

[3 RESPONSABLE DEL PROYECTO 4](#_Toc367344926)

[4 LÍNEA DE INVESTIGACIÓN 4](#_Toc367344927)

[5 SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN 4](#_Toc367344928)

[6 GRUPO DE INVESTIGACIÓN 4](#_Toc367344929)

[7 COLABORADORES CIENTÍFICOS 4](#_Toc367344930)

[8 LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA 5](#_Toc367344931)

[8.1 Obtención de muestra porcina **5**](#_Toc367344932)

[8.2 Trabajo de laboratorio **5**](#_Toc367344933)

[9 ÁREA DE INFLUENCIA 5](#_Toc367344934)

[10 ANTECEDENTES 6](#_Toc367344935)

[11 PROYECTOS RELACIONADOS O COMPLEMENTARIOS 9](#_Toc367344936)

[11.1 Realizados en el Ecuador **9**](#_Toc367344937)

[11.2 Realizados en el extranjero **9**](#_Toc367344938)

[12 JUSTIFICACIÓN O IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER 10](#_Toc367344939)

[13 OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO 13](#_Toc367344940)

[14 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 13](#_Toc367344941)

[15 MARCO REFERENCIAL 13](#_Toc367344942)

[15.1 generalidades microalgas **13**](#_Toc367344943)

[15.1.1 Chlorella sp. **16**](#_Toc367344944)

[15.1.2 Desmodesmus sp. **17**](#_Toc367344945)

[15.2 Factores que influyen en un cultivo de microalgas **18**](#_Toc367344946)

[15.3 Obtención y aislamiento de cepas de microalgas **20**](#_Toc367344947)

[15.4 Fases de crecimiento de las microalgas **21**](#_Toc367344948)

[15.5 Métodos de determinación de la población microalgas **22**](#_Toc367344949)

[15.6 Separación y post-tratamiento de las algas producidas **23**](#_Toc367344950)

[15.7 Factores que influyen en la eficiencia del proceso de tratabilidad **23**](#_Toc367344951)

[15.8 Ventajas del tratamiento de efluentes con microalgas **24**](#_Toc367344952)

[15.9 Características de los purines de cerdo **24**](#_Toc367344953)

[15.10 Impactos ambientales de los purines de cerdo **26**](#_Toc367344954)

[16 METODOLOGÍA 27](#_Toc367344955)

[16.1 Revisión bibliográfica **27**](#_Toc367344956)

[16.2 Toma de muestra porcina **27**](#_Toc367344957)

[16.3 Procedimiento de la muestra para la obtención de efluente porcino **27**](#_Toc367344958)

[16.4 Proceso de mantenimiento del consorcio microalgal *Chlorella* sp*. y Desmodesmus* sp. 28](#_Toc367344959)

[16.5 Determinación del valor de inóculos para los ensayos 28](#_Toc367344960)

[16.6 Evaluación de crecimiento celular en los ensayos **29**](#_Toc367344961)

[16.7 Determinación de la curva de crecimiento **30**](#_Toc367344962)

[16.8 Determinación de pigmentos **30**](#_Toc367344963)

[16.9 Cosecha y secado de la biomasa **31**](#_Toc367344964)

[17 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 31](#_Toc367344965)

[17.1 Fase uno **31**](#_Toc367344966)

[17.1.1 Diseño experimental **31**](#_Toc367344967)

[17.2 Fase dos **32**](#_Toc367344968)

[17.2.1 Diseño experimental **32**](#_Toc367344969)

[17.2.2 Factores controlables **32**](#_Toc367344970)

[17.2.3 Tratamientos **33**](#_Toc367344971)

[17.2.4 Repeticiones **33**](#_Toc367344972)

[17.2.5 Unidad experimental **33**](#_Toc367344973)

[17.2.6 Variables **33**](#_Toc367344974)

[17.2.7 Modelo estadístico **34**](#_Toc367344975)

[17.2.8 Error aleatorio y error experimental **34**](#_Toc367344976)

[17.2.9 Análisis **34**](#_Toc367344977)

[17.2.10 Interpretación **34**](#_Toc367344978)

[17.2.11 Conclusiones finales **35**](#_Toc367344979)

[18 HIPÓTESIS 35](#_Toc367344980)

[19 OPERATIVIDAD DE LAS VARIABLES 35](#_Toc367344981)

[20 ACTIVIDAD PARA LA EJECUCIÓN 35](#_Toc367344982)

[21 DURACIÓN DEL PROYECTO 36](#_Toc367344983)

[22 BIBLIOGRAFÍA 36](#_Toc367344984)

[23 ANÁLISIS DE COSTOS DEL PROYECTO 42](#_Toc367344985)

[24 FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO 44](#_Toc367344986)

[25 CONTENIDO 44](#_Toc367344987)

[26 CRONOGRAMA 45](#_Toc367344988)

[27 FECHA DE PRESENTACIÓN DEL PROYECTO 48](#_Toc367344989)

[28 FIRMA DEL RESPONSABLE 48](#_Toc367344990)

[29 FECHA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO 48](#_Toc367344991)

[30 FIRMA DE LA AUTORIDAD 48](#_Toc367344992)

# TÍTULO DEL PROYECTO

Remoción de contaminantes en un efluente porcino, a nivel de laboratorio, mediante la selección de un consorcio microalgal y evaluación del valor nutricional de la biomasa.

# UNIDAD ACADÉMICA RESPONSABLE

Universidad de las Fuerzas Armadas − ESPE, Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Carrera de Ingeniería en Biotecnología.

# RESPONSABLE DEL PROYECTO

La responsable del proyecto es **la Srta. (el Sr.)** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_, **egresado/a** de la Carrera de **Ingeniería en Biotecnología/ Biotecnología** de la Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE.

**Teléfonos:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**E-mail:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

# LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

La línea de investigación del proyecto es el medio ambiente.

# SUBLÍNEA DE INVESTIGACIÓN

La sublínea de investigación del proyecto es la prevención y remediación ambiental.

# GRUPO DE INVESTIGACIÓN

El grupo de investigación es la contaminación ambiental GICE.

#  COLABORADORES CIENTÍFICOS

Posible Director del proyecto de investigación / Tutor de artículo académico**:** \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.

Codirector/cotutor y/o colaborador del proyecto: \_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_.

# LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA

El proyecto involucrará dos fases:

## Obtención de muestra porcina

El efluente porcino será recolectado de ¨ Chanchera Colón ¨, cuyo propietario corresponde al Sr. Alex Colón en la Parroquia El Tingo, Cantón Rumiñahui, de la Provincia de Pichincha, ubicado en la Av. Ilaló y Puná al nororiente del país, Latitud: 0°16'48.13"S, Longitud: 78°26'48.57"O, Altura elipsoidal: 2448 m.

## Trabajo de laboratorio

Posteriormente el trabajo de investigación se realizará en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Algal del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) de la Unidad de Biología de la Universidad Central del Ecuador, que se encuentra ubicado en la Ciudadela Universitaria: Jerónimo Leiton y Sobral S/N, Latitud: 99°785’61,3606’’ (m), Longitud: 50°02’78,1484’’ (m). Altura elipsoidal: 2811.647 (m).

# ÁREA DE INFLUENCIA

Esta investigación sobre el estudio de tratabilidad de un efluente porcino obtenido en la parroquia El Tingo, mediante aplicación de un consorcio microalgal, permitirá el mejoramiento de la calidad de efluente porcino a descargar con un mecanismo de bajo costo energético, y aprovechamiento de nutrientes que estaban siendo desechados e incorporados a la biomasa microalgal, lo cual dará paso a estudios en ficorremediación en el Ecuador que evitarán problemas de contaminación colateral y eutrofización e incluso la muerte de algunos sistemas acuáticos, que reciben las descargas de materia orgánica superiores a la capacidad de autodepuración de los ecosistemas. Por lo que resulta de gran importancia el cuidado y recuperación debido a su papel en el ciclo hidrológico y a los efectos dañinos que provocan en el ambiente.

Los porcinocultores estarán beneficiados con los resultados obtenidos, ya que, la biomasa microalgal, según su composición química se puede convertir en fuente productora de suplemento alimenticio animal, lo cual podría ocasionar un ahorro económico en la crianza de porcinos y por ende un aumento de la economía del porcicultor. Además, se beneficiarán los investigadores con miras a la obtención de suplementos alimenticios a bajos costos mediante la reutilización de efluentes de origen animal. Por otra parte, el efluente una vez depurado o tratado cumplirá con la normativa de la calidad química del efluente según el Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundario (TULAS) antes de ser descargado a cuerpos de aguas, tales como ríos o lagunas.

Esta técnica también puede ser aplicada para el estudio de la tratabilidad de otros efluentes de origen animal como avícola, vacuno e incluso en aguas residuales derivadas de restos de pescadería. Adicionalmente, este estudio no sólo implica la biorremediación, sino la evaluación de la calidad de biomasa microalgal en conexión con el tratamiento y su posible aplicación biotecnológica.

# ANTECEDENTES

 Los primeros estudios científicos sobre microalgas comienza a partir de 1890, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck establece los primeros cultivos puros de una microalga de agua dulce denominada *Chlorella vulgaris* (Beijerinck, 1890). Estudios posteriores fueron realizados por Otto Warburg en el año de 1919, el cual obtuvo cultivos densos de *Chlorella* sp., con el fin de estudiar el proceso de la fotosíntesis. Otros estudios que han sido recolectados en bibliografía, hacen referencia desde el año de 1942 durante la II Guerra Mundial en Alemania, se conoce sobre trabajos para producir biocombustible, mediante la producción industrial de lípidos a partir de las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Nitzschia palea* (Harder & Von Witsch, 1942).

El uso de las microalgas para la depuración de aguas residuales ha sido promovido desde finales de la década de los cincuenta (Oswald & Gotaas, 1957). Desde los años 70 en EEUU se han desarrollado sistemas abiertos de cultivo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales, donde se transformaba la biomasa obtenida en metano (Ugwu & Aoyagi, 2008).

Para los años setenta se inició la comercialización de productos dietéticos de *Chlorella* sp., en Japón y Taiwan, iniciándose además en esta época estudios relacionados en el tratamiento de aguas residuales con microalgas, presentando propiedades nutricionales adecuadas de alimento para el ganado (Langdom & Waldock, 1981).

Las primeras investigaciones sobre el cultivo de microalgas a partir de aguas residuales fueron realizadas por W. J. Oswald y su grupo en la Universidad de Berkeley. La investigación realizada por dicho grupo adicionó al beneficio de la producción de biomasa la depuración del residual, pero el único inconveniente que encontraron fueron las concentraciones bajas que se alcanzaron, y los gastos energéticos en la cosecha de biomasa resultaron ser altos (Manso, 1991). También se han realizado experimentos para la obtención de biomasa de algas del género *Scenedesmus* sp. en la alimentación animal. Dichos trabajos han permitido conocer que se puede sustituir hasta el 10% de la dieta seca suministrada a cerdos en ceba por dicha biomasa (Burlew, 1953).

Se han realizado estudios sobre la aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales debido a la versatilidad de estos microorganismos que pueden crecer en medios completamente inorgánicos, dándoles la capacidad para remover nutrientes y al mismo tiempo producir material celular altamente útil, los estudios comienza desde la década de los cuarenta con los trabajos de Cadwell (Cadwell, 1946) y más tarde Oswald y Gotaas (Oswald & Gotaas, 1957), los cuales demostraron que los cultivos de microalgas a gran escala podrían ser simultáneamente utilizados para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa para la obtención de proteína vegetal, generando nuevos conceptos en lo que es la producción masiva de microalgas.

Las aguas residuales de explotación ganadera y agrícola se caracterizan por presentar muy elevadas concentraciones de nutrientes, y varios estudios han demostrado la capacidad de determinadas especies de microalgas de eliminarlos del medio con gran eficacia. Como ejemplo citaremos *Botryococcus braunii* (An & Sim, 2003), *Microspora willeana, Ulothrix sp*. y *Rhizoclonium hierglyphicum* (Pittman, 2011). Uno de los principales sistemas utilizados en la depuración de aguas residuales con microalgas son las lagunas de estabilización, o sistemas de lagunaje de alta carga (high rate algal ponds o HRAP en inglés), los cuales han demostrado gran eficacia en el tratamiento de agua residual (Ruiz, 2011).

El Centro de Investigaciones de Energía Solar (CIES) en Cuba, durante los últimos veinte años han implementado la tecnología para un cultivo mixotrófico de microalgas del género *Chlorella* sp., la biomasa mixta que se produce tiene por finalidad ser utilizada como suplemento alimenticio en animales debido a su alto contenido proteico y vitamínico (Alfaro, 1991)***.***

En Santiago de Cuba en el cebadero porcino ¨El Brujo¨, existe un cultivador a cielo abierto en funcionamiento de 3500 m2 de película descendente, donde se llega a producir 140 Kg de biomasa mixta de microalgas *Chlorella* sp., por día (Alfaro, 1991). Obtenida de la fracción líquida de los residuales porcinos, la cual es utilizada para la alimentación porcina y se ha llegado a suplir con esta tecnología 100 g de soya por cerdo en cebo al día (Armas, 1992).

Otros estudios se han realizados en Corea del Sur para la depuración de residuales porcinos en concentración de 3%, han empleado *Scenedesmus* sp., combinado con un medio de cultivo denominado KEPI que favorece el crecimiento del alga y modifica la composición bioquímica de sus células, permitiendo que se reduzcan los niveles de ácidos grasos y aumente el de clorofila y carotenoides. Los resultados obtenidos muestran que se reduce el carbono en un 12,9%, el nitrógeno en un 87% y el fósforo en un 83.2%. (Kim & Park, 2007). También en España realizaron un estudio profundo de la biodegradación in vitro del purín por *Chlorella sorokiniana* en distintas condiciones de aireación y de dilución de purín y como resultados obtenidos se destacan la remoción de un 65% del NH4 + inicial(González C. M.-E., 2008)***.***

Para la depuración de aguas residuales se han estudiado con monocultivos y cultivos mixtos de microalgas, lo cual ha llevado a comprobar que un extenso número de especies de microalgas son aptas para la eliminación de contaminantes en aguas residuales y que la eficacia del proceso es prometedora. Los resultados de las investigaciones muestran porcentajes de eliminación que alcanzan hasta el 100% en algunos casos, aunque obviamente varían en función de las condiciones de operación, especies empleadas, y características del agua residual. Otros estudios han trabajado con aguas de elevada carga orgánica, ya sea de ganadería o agricultura, concluyendo asimismo que la depuración mediante microalgas es posible (Ruiz, 2011).

# PROYECTOS RELACIONADOS O COMPLEMENTARIOS

## Realizados en el Ecuador

* Estudio de tratabilidad de un efluente de una planta procesadora de pieles para extracción de gelatina con un consorcio de la microalga *Desmodesmus* sp. y *Chlorella* sp. (Ontaneda, 2013).

## Realizados en el extranjero

* A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation (Godos I. , 2010).
* Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture (Yanyan Su., 2011).
* Effects of Microalgae on the Removal of Nutrients from Wastewater: Various Concentrations of *Chlorella vulgaris* (Hee & Seung-Mok, 2012).
* Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewaters at high loading rates (Godos I. B., 2009).
* Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers (Mulbry, 2008)
* Enhanced production of *Scenedesmus* sp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater (Kim M. P., 2006).
* Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater (Ruiz A. L., 2010).
* Mechanistic Model for the Reclamation of Industrial Wastewaters Using Algal−Bacterial Photobioreactors (Bordel, 2009).
* Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp*.* co-immobilized with Azospirillum brasilense (Hernandez & Bashan, 2005)
* Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus* (Martínez, 1999).
* Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal (Rosales, 2007).
* Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. (Travieso L. B., 2006).
* Ecology of microalgae in a high rate pond for piggery effluent purification in Singapore (Suan & Goh, 1988).
* Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters (González C. M., 2008).
* Production of Biomass (Algae-Bacteria) by Using a Mixture of Settled Swine and Sewage as Substrate (Travieso L. B., 2013).
* High-rate pond for treatment of piggery wastes (Costa, Medri, & Perdomo, 2000)
* Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure (Martin, Noue, & Picard, 1984).

# JUSTIFICACIÓN O IMPORTANCIA DEL PROBLEMA A RESOLVER

Uno de los productos alimenticios más consumidos por la sociedad es la carne de cerdo y todos sus derivados, aprovechándose prácticamente todo a excepción de los purines o excrementos porcinos (Severa, 2011). Los residuos líquidos producidos en granjas porcinas (purines) están produciendo altos niveles de contaminación tanto en aguas superficiales como subterráneas (Figueroa, 2010). La elevada concentración porcina en diferentes puntos del país puede provocar un gran problema medioambiental y de difícil solución debido a los residuales porcinos.

El problema del manejo de los purines puede verse acentuado el momento en qué la explotación de cerdos sea cada vez más grande y exista cada vez menos terreno para poder aplicar el residuo como fertilizante o abono, lo que generalmente realizan los porcicultores del Ecuador, y como consecuencia de ello, los purines pueden alcanzar los receptores de agua contaminándolas por eutrofización, provocar la nitrificación en los suelos y producir gases responsables de malos olores y que pueden llegar a ser peligrosos.

Cabe recalcar que el purín es considerado cien veces más contaminante que las aguas residuales urbanas (Severa, 2011). Es por ello que, nace la preocupación por la correcta gestión de estos residuos, así como la búsqueda de nuevas alternativas aplicando la biotecnología para su reutilización y valorización.

En Ecuador se registraron 1,8 millones de cabezas de ganado porcino en el 2011, lo que implica un 22,9% más que lo reportado en el 2010, según los últimos resultados de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC) del Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC, 2012). En total la existencia de ganado en el país aumentó en un 4,1% al llegar a 8,6 millones de cabezas, predominando el vacuno con 5,3 millones de cabezas, seguido por el porcino con 1,8 millones. En Santo Domingo se encuentra el mayor número de cabezas de ganado porcino con 608.075 cabezas, seguido por Manabí con 157.285 y Chimborazo con 149.606 cabezas de ganado (INEC, 2012). Por lo cual, de no existir un tratamiento adecuado de los residuales porcinos podrían afectar la calidad física, química y microbiológica del agua si es vertido a un cuerpo receptor (arroyo, río, laguna, canal). De igual manera, si son dispuestos en el suelo sin un adecuado control, además de afectar la calidad del sustrato, un excesivo aporte de los mismos puede resultar perjudicial para el rendimiento de los cultivos (Barceló, Pipa, & Huerga, 2010).

Una de las alternativas para dicha problemática es la aplicación de un consorcio de microalgas en el tratamiento de purines, utilizando y transformando los nutrientes que se encuentran en el residual porcino para producir biomasa microalgal. Además de conseguir una disminución de la emisión de metano durante el almacenamiento de los purines, un gas altamente contaminante y de mayor efecto invernadero que el CO2 (1 molécula de metano es 30 veces más perjudicial para el cambio climático que una de CO2) y la remoción principalmente de nitrógeno, fósforo y DQO. (Figueroa, 2010).

El tratamiento de efluentes porcinos ha recibido mayor atención debido al vertido incontrolado de nutrientes, como nitrógeno y fósforo que están provocando graves episodios de eutrofización en los ecosistemas acuáticos y la contaminación de los recursos de las aguas subterráneas (Garret, 1976). Por lo tanto, el desarrollo económico y métodos medioambientales amigables para el tratamiento de efluentes de origen ganadero es obligatorio y de suma importancia.

El uso de métodos convencionales para el tratamiento de residuales como el proceso de lodos activados, implica un alto consumo de energía, así como la imposibilidad de reutilizar los valiosos nutrientes en suspensión presentes en los purines de cerdos (Wang, 1996) Por otro lado, los procesos anaeróbicos aunque son energéticamente más favorables que los aeróbicos a menudo se encuentran limitados debido a las bajas temperaturas a las que se exponen y por la escasa disminución de los niveles de nitrógeno y fósforo (Wilkie & Mulbry, 2002).

Una agricultura intensa junto con una elevada concentración de carbono y nutrientes en aguas residuales ganaderas (dos grados mayor de magnitud que las aguas residuales domésticas) han superado la capacidad natural del medio ambiente para hacer frente a dicha contaminación (Boursier & Beliné, 2005). Por ello la aplicación de un consorcio algas-bacterias para la depuración de los efluentes ganaderos proporciona simultáneamente la producción *in situ* de O2 a través de la fotosíntesis de las microalgas y la utilización de nutrientes como N y P para la producción de biomasa algal (Mulbry, 2008), la cual permite la extracción de metabolitos secundarios aprovechables como materia prima en la industria agrícola y como fuente alternativa de energía (Hoffman, 1998).

La capacidad de las algas de eliminar nitrógeno y fósforo del agua las convierte en una posibilidad real para la eliminación de nutrientes del agua residual. De hecho, se ha demostrado que en la eliminación del fósforo pueden ser tan eficientes como el tratamiento químico convencional (Hoffman, 1998). Sus principales ventajas son el menor costo, ya que no son necesarios productos químicos, y la recuperación de los nutrientes en forma de biomasa que puede ser empleada como fertilizante.A pesar de los favorables resultados que se obtiene al aplicar dicha tecnología sólo se han realizado pocas investigaciones sobre el uso de algas-bacterias para la depuración de efluentes ganaderos, ya que la mayoría de investigaciones se han centrado en la producción de biomasa de una sola microalga para la comercialización como proteína o fertilizante (Kim & Park, 2007).

La ventaja de utilizar aguas residuales es que son ricas en todo tipo de compuestos que permiten sostener el metabolismo de ciertos microorganismos fotosintéticos (Khowaja, 2000). Esta es la base de la depuración, donde la digestión aerobia de la materia orgánica mediada por bacterias se mantiene gracias al oxígeno producido por las microalgas, las cuales incorporan los compuestos residuales como producto de esta oxidación generando un proceso depurativo eficaz (Riquelme & Avendaño, 2003).

En el Ecuador no existen muchas investigaciones publicadas sobre tratamiento de efluentes porcinos con un consorcio de microalgas*,* por lo que éste podría ser uno de los primeros estudios, que contribuirá a la depuración de estos efluentes mediante el uso de la biotecnología algal y al cuidado del medio ambiente en el país. Por medio de este estudio también podremos conocer la factibilidad de obtener biomasa algal con una posible aplicación como suplemento alimenticio animal.

Teniendo en consideración las posibilidades que brindan las microalgas en el tratamiento de los residuales de naturaleza orgánica se planteó la presente investigación, con el objetivo de evaluar el crecimiento de un consorcio de las microalgas *Chlorella* sp. y *Desmodesmus* sp*.*, en un efluente porcino de la Parroquia el Tingo como método alternativo para solucionar el problema de contaminación existente, y buscar aplicaciones biotecnológicas para la reutilización de nutrientes presentes en los purines de cerdo.

# OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

* Evaluar la remoción de contaminantes en un efluente porcino a nivel de laboratorio, mediante la selección de un consorcio microalgal y determinar su valor nutricional.

# OBJETIVOS ESPECÍFICOS

* Determinar la factibilidad de crecimiento de diferentes consorcios de microalgas y seleccionar la concentración del efluente porcino con el mayor crecimiento del consorcio.
* Determinar la eficiencia de remoción de DQO, DBO5, sólidos totales, N y P en el efluente porcino por el consorcio microalgal.
* Determinar calidad nutricional de la biomasa microalgal producida con el efluente.

# MARCO REFERENCIAL

##  Generalidades microalgas

Las microalgas corresponden al primer eslabón en la cadena trófica de los sistemas acuáticos por ser organismos fotoautótrofos obligados, es decir, requieren de la energía proveniente de la luz para realizar sus procesos biológicos (Rosas, 2004). Es decir, que son capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas (Abalde, 2004). En esta categoría quedan agrupadas las cianobacterias (conocidas tradicionalmente como algas verdeazuladas) junto con algas eucariotas (tradicionalmente algas verdes, rojas y doradas) (Ruiz, 2011). Su posición taxonómica ha sido de gran polémica entre botánicos y zoólogos, un ejemplo claro de ello es el grupo de los dinoflagelados, conocidos por unos como microalgas y por otros como protozoarios. (Montes, 2010). Por su tamaño reducido y variado (5–50 μm en promedio) son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa del fitoplancton (Abalde, 2004). El tamaño de las algas eucariotas varía entre 0,5–30 μm (Markou & Georgakakis, 2011), mientras que las cianobacterias pueden llegar a medir hasta 200 μm. (Ruiz, 2011)

Las microalgas contienen cloroplastos donde se encuentran los pigmentos fotosintéticos, como clorofilas, xantofilas y carotenoides. La pared celular suele ser de celulosa, como en las plantas superiores, pero en ocasiones se pueden encontrar otras moléculas como pectina, xilanos y mananos. En ocasiones, a los componentes de la pared celular se les añaden sustancias minerales como carbonato cálcico o sílice, que endurecen la cubierta de la célula. Hay también algunas algas unicelulares que carecen de pared celular. Como mecanismos de locomoción tienen los flagelos y el movimiento deslizante (Montes, 2010).

La forma de reproducción de las microalgas puede ser de manera asexual mediante bipartición, mediante esporas o por fragmentación, como es el caso de las algas pluricelulares. La reproducción sexual se ha comprobado en las algas diatomeas, los clorófitos, feófitos y rodófitos. En este último caso se ha comprobado que suele haber alternancia de generaciones, ya que hay individuos de un alga que forman esporas (esporófitos) e individuos que forman gametos (gametófitos). Los esporófitos son diploides y los gametófitos suelen ser haploides (Montes, 2010).

La composición bioquímica de las microalgas varía mucho en función de la especie, pero en condiciones normales de producción se admite que los valores de proteína pueden alcanzar hasta un 60% de su peso seco, los lípidos entre un 7 y un 23% y los carbohidratos entre un 5 y un 23%. Sin embargo, haciendo variar determinados factores como la luz, la concentración de nutrientes, la temperatura y la tasa de crecimiento de las microalgas se pueden manipular de forma considerable la proporción de proteínas, lípidos y carbohidratos en éstas. (Fernández, 2008).

En condiciones normales todas las clases de microalgas poseen invariablemente la clorofila-a que confiere el color verde a las microalgas y al menos un pigmento accesorio, que puede enmascarar en ocasiones a la clorofila-*a*. La clorofila-*b* se encuentra en las plantas verdes. Mientras que, la clorofila *c* en diatomeas, dinoflagelados y algas pardas y la clorofila *d* en las algas rojas. Cuando se las cultiva bajo condiciones adecuadas de iluminación, temperatura, salinidad y concentración de nutrientes, las microalgas representan una excelente fuente de pigmentos carotenoides (Silvia, Lópes, & Barrientos, 2005).

Las microalgas incorporan nitrógeno preferentemente en forma de amonio (Ecuación 1), siendo utilizado para formar aminoácidos por medio de transaminación. Sin embargo también tienen la capacidad de incorporarlo en forma de nitrato (Ecuación 2) (Contreras E. , 1994).

***Asimilación de amonio por fitoplancton***

****** (Ec. 1)

***Asimilación de nitratos por fitoplancton***

******(Ec. 2)

Las microalgas también incorporan fósforo en varias formas (Contreras E. , 1994), como se muestra en las ecuaciones 3 a 7

***Asimilación de formas fosfatada sin iones acompañantes***

****** (Ec. 3)

(Ec. 4)

(Ec. 5)

***Asimilación de formas fosfatadas con iones acompañantes***

******(Ec. 6)

(Ec. 7)

Las microalgas de acuerdo a estas capacidades de incorporación de nutrientes pueden emplearse como una alternativa en la depuración de aguas residuales.

### *Chlorella* sp.

La microalga *Chlorella* sp*.* a fue descubierta y nombrada por el holandés M.W. Beyerinck en 1890, apareció en la tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 millones de años, se caracteriza por ser de color verde, de forma esférica y con un diámetro de 2-10 micras, es propia de agua dulce, se la puede encontrar distribuida en lagos y pantanos de todo el mundo. Su nombre proviene del griego Chloros que significa verde, y del latín ella, que significa cosa pequeña. *Chlorella* sp*.,* posee una alta concentración de clorofila comparada con otras microalgas, por los que su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor que la de otras plantas. *Chlorella vulgaris* puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Kanno & Kazie, 2005).

Las células son redondas o de forma elipsoidal, la pared celular es rígida y contiene glucosamina, posee un cloroplasto lateral con pirenoide carente. Su reproducción es asexual sólo por autoesporas. Tradicionalmente, del género *Chlorella* se conoce más de 100 especies, sin embargo, 10 especies han sido bien establecidas (Garofalo, 2011)

Las investigaciones realizadas sobre esta microalga destacan que su biomasa puede ser usada como alimento para animales, biofertilizantes, alimento de los acuarios o puede ayudar a resolver problemas de salud pública, por medio de la purificación biológica de las aguas negras de las ciudades (Kanno & Kazie, 2005).

Actualmente *Chlorella* sp.*,* está siendo investigada como un nuevo recurso alimenticio (ya que una célula de *Chlorella* contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos) para utilizarse en las poblaciones humanas pobres de todo el mundo y para proveer comida y oxígeno en viajes al espacio y en submarinos. (Lee, 1995)

**Taxonomía de *Chlorella* sp**. (Garofalo, 2011).

**Reino:** Plantae

**División:** Chlorophyta

**Clase:** [Trebouxiophyceae](http://es.wikipedia.org/wiki/Trebouxiophyceae)

**Orden***:* [Chlorellales](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Chlorellales&action=edit&redlink=1)

**Familia:** [Chlorellaceae](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Chlorellaceae&action=edit&redlink=1)

**Género***:* *Chlorella*

### *Desmodesmus* sp.

El género *Desmodesmus* ha sido conocido y estudiado por casi 200 años. Las primeras observaciones microscópicas realizadas fueron en 1828 por Turpin. Más tarde Meyen describe *Scenedesmus*, que incluye colonias no espinosas y espinosas, en 1829 (NHM, 2011)

En 1999, el uso de análisis molecular, permitió separar los géneros de microalgas por sus formas no espinosas y espinosas. Por lo tanto, las formas espinosas se llaman ahora *Desmodesmus* sp. (Un, Friedl et Hegewald). Y las formas no espinosas conservan el nombre original, *Scenedesmus* sp. (NHM, 2011).

El género *Desmodesmus* se caracteriza por colonias planas o ligeramente curvadas, con células en una fila por lo general agrupadas entre 2 -, 4 -, µ 8, más raramente 16 - o 32. Las células son ovoides o elipsoidales, con ápices redondeados, y presentan espinas o dientes largos, su pared celular es granular, espinoso o dentada, con proyecciones similares a verrugas y / o nervios, presenta un cloroplasto parietal con un solo pirenoide. La reproducción es principalmente asexual por autoesporas, que son liberadas por fractura de la pared celular lateral (NHM, 2011).

**Taxonomía de *Desmodesmus* sp**. (Garofalo, 2011)

**Reino:** Plantae

**División***:* Chlorophyta

**Clase***:* Chlorophyceae

**Orden**: Sphaeropleales

**Familia***:* Scenedesmaceae

**Género***:* *Desmodesmus*

## Factores que influyen en un cultivo de microalgas

Existen diversas variables que afectan el crecimiento y la acumulación de metabolitos en las microalgas. Es importante determinar las condiciones óptimas de crecimiento, debido a que se conoce que la tasa de rendimiento (biomasa) para un mismo género de microalga puede ser diferente de acuerdo a su lugar de origen (Andersen, 2005). Cada especie y subespecie de microalga presenta sus características propias respecto a condiciones óptimas de crecimiento. (Ruiz, 2011). Cabe recalcar que más que la influencia de un solo parámetro es el conjunto de parámetros lo que crea determinadas respuestas en el crecimiento de las microalgas (Cañizarez, 2000). A continuación se presentan los distintos factores que afectan principalmente a los cultivos de microalgas.

**Nutrientes:** El CO2 es la fuente de carbono más utilizada en cultivos de microalgas con la ayuda de una enzima llamada anhidrasa carbónica. Al consumirse el carbono, el oxígeno es producido por fotólisis del agua y este es diluido en el medio de cultivo (Molina G. F., 1999). Puesto que las microalgas pueden vivir bajo altas concentraciones de dióxido de carbono, los gases de invernadero, el dióxido de nitrógeno y contaminantes en la atmósfera (a partir de diversas fuentes) pueden ser nutrimentos suficientes para las microalgas (Van Beilen, 2010). El consumo normal de las microalgas se sitúa entre 200 y 600 mg CO2/L·d, aunque se han recogido datos de eliminación de 800 – 1000 mg/L·d en cultivos de *Chlorella* sp*.,* interesantes sobre todo para aplicaciones de mitigación del efecto invernadero de los gases de escape de diversas industrias.

El Nitrógeno es otro elemento que pueden tomar las microalgas, lo cual lo consumen en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NOx) en algunos casos, el contenido en nitrógeno de la biomasa puede suponer desde un 1% hasta más del 10%, y depende de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno (Ruiz, 2011).

El fósforo es otro de los macronutrientes esenciales en el crecimiento de las microalgas. Es tomado en forma de ortofosfatos (P-PO4-3), cuya concentración en equilibrio con las formas protonadas depende lógicamente del pH del medio. Existen factores que ralentizan la toma de fosfatos por parte de las algas, como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio. La cantidad necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada (Hoff & Snell, 2001).

Diversos autores han concluido que la relación N: P en el medio de cultivo influye en la toma de nutrientes por parte de las microalgas, de modo que cuanto más próxima esté a la composición de los microorganismos, mayor crecimiento y toma de nutrientes tendrá lugar (Ruiz, 2011).

Las microalgas requieren, para su crecimiento, de otros macronutrientes como azufre, calcio, magnesio y potasio, así como de micronutrientes como molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro. En ciertos grupos de algas se requieren nutrientes especiales o característicos (Hoff & Snell, 2001).

**Luz**: Es uno de los factores más importantes para el crecimiento de las microalgas ya que es la única fuente de energía para realizar el proceso de fotosíntesis. Tanto la disponibilidad como la intensidad de la energía luminosa afectan la tasa de crecimiento, volumen celular, actividad enzimática y composición química. Sus periodos de exposición a ésta pueden ser continuos (mediante luz artificial), discontinuos (periodos de iluminación alternados con periodos de oscuridad también con luz artificial) o el ciclo natural día y noche. (Richmond, 1986). La cantidad de luz que incidente en la superficie del cultivo celular, disminuye con la profundidad y además disminuye la disponibilidad de luz en el interior del recipiente conforme aumenta la concentración celular (Brown, 1997).

**Temperatura**: Es otro factor muy importante que está estrechamente relacionado con la luz, ya que las microalgas a elevadas temperaturas pueden tolerar intensidades de luz mucho más altas que a temperaturas menores, existiendo para cada temperatura una tasa máxima de crecimiento asociada a una intensidad de luz óptima. La temperatura también regula las concentraciones de CO2 en el agua, regulando de esta forma el proceso de fotosíntesis que da lugar a la síntesis de materia orgánica (Davison, 1991).

En los cultivos de microalgas las temperaturas óptimas se encuentra generalmente entre los 20 y 24 °C, no obstante, estas pueden variar dependiendo del medio de cultivo, la especie y la cepa utilizada. Comúnmente, los cultivos de microalgas toleran temperaturas de entre 16 y 27 °C, en donde a temperaturas menores a 16 °C disminuyen el crecimiento, mientras que una temperatura mayor a los 35 °C resulta ser letal para un gran número de especies (Mehlitz, 2009).

**pH**: El pH es otro factor importante en el cultivo de microalgas. A niveles de pH alcalinos, la disponibilidad de CO2 puede ser limitante para el crecimiento y la fotosíntesis de microalgas. El rango de pH para la mayoría de los cultivos de microalgas está entre 7 y 9, con un rango óptimo de 8.2 a 8.7. Un pH óptimo en el cultivo generalmente es mantenido gracias a la aeración con aire enriquecido con CO2. (Linden & Hartmut., 2001). El pH puede incrementa conforme la edad del cultivo es mayor, esto es debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de nutrimentos (Martin F. , 2010).

**Aireación**: La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire. (Martin F. , 2010) En cultivos de volúmenes de un litro o menos, la aireación no s necesaria, ya que esta se sustituye con una agitación manual diaria. (Paniagua, 1989) También se conoce que el exceso de la agitación mecánica causa turbulencia, lo que puede originar daños permanentes en la estructura celular afectando el crecimiento y la producción de metabolitos. Por lo contrario, una agitación insuficiente provocará sedimentación y muerte celular. (Contreras, Peña, & Flores, 2003).

**Salinidad**: La tolerancia a la sal varía según las especies, mientras que unas logran tolerar concentraciones milimolares de sal, otras sobreviven en soluciones saturadas, es decir, lo que supone un estrés salino letal para un grupo, es fácilmente tolerado por otro grupo. Las microalgas de acuerdo a su capacidad de adaptación a la salinidad, las algas pueden dividirse en halotolerantes y halofílicas. (Abalde, 2004).Sin embargo, el efecto de la salinidad adquiere más influencia cuando se relaciona con otras variables como: temperatura, luz, fuente de nitrógeno y concentración de nutrientes (Terlizzi & Karlander, 1980).

## Obtención y aislamiento de cepas de microalgas

Los cultivos de Microalgas pueden obtenerse de laboratorios de investigación universitarios o de centros privados especializados, pero lo más habitual es aislarlas del medio natural más próximo, donde se encuentran las especies endémicas. Estas siempre presentan más facilidad de multiplicación y propagación en las aguas locales y se eliminan así los problemas que conlleva el empleo de especies foráneas, como contaminaciones y pérdida del cultivo. (Castello, 2008).

## Fases de crecimiento de las microalgas

Existen siete fases generalmente reconocidas en el crecimiento de población de las microalgas (figura 1), las cuales depende del estado nutricional de las células. La duración de cada fase de crecimiento puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse dependiendo de diferentes factores como son: la intensidad de la luz, temperatura, composición del medio de cultivo, estado fisiológico de la microalga y tamaño del inóculo (Fulks & Main, 1991).

**Fase de latencia:** Las células en el cultivo durante esta fase comienzan absorber los nutrientes que se encuentran en el medio de cultivo disponibles, no llega a registrar un aumento de su densidad celular (número de células), ya que las células viables no se encuentran en condiciones óptimas para dividirse rápidamente debido a que se encuentran en un estado de ajuste bioquímico (Paniagua, 1989).

**Fase exponencial:** En esta fase la reproducción celular es extremadamente rápida y constante, por lo cual el crecimiento celular es de forma exponencial. Si se logra controlar la dilución del cultivo se puede mantener estable esta etapa por varias semanas (Paniagua, 1989). Es importante saber que durante esta fase es recomendable realizar la cosecha de células que pueden ser útiles como inóculos para otros cultivos, debido a que su división celular es más acelerada que en las otras fases, lo que le convierte a esta fase en la manera más viable de obtener inóculos (Fulks & Main, 1991).

**Fase de desaceleración:** La velocidad de crecimiento celular disminuye, es decir que dejan de reproducirse empezando a entrar a la fase estacionaria.

**Fase estacionaria:** Durante esta fase no hay un aumento de densidad celular, ya que el número de células se mantiene constante (Trujillos, 1995).

**Fase de declinación relativa del crecimiento:** El crecimiento celular en esta fase continúa, pero en una proporción menor, disminuyendo su tasa de crecimiento, lo cual puede deberse a factores como: pH del medio, agotamiento de los nutrientes, reducción de la intensidad de luz y autoinhibición debido a la producción de metabolitos tóxicos, entre otros (Fulks & Main, 1991).

**Fase de muerte:** En esta etapa la población celular disminuye de forma progresiva y muy evidente, y como consecuencia inevitable el fin del cultivo. Al incrementarse el número de células muertas y condiciones desfavorable para las microalgas como el aumento de bacterias, hongos y espuma que son productos de destrucción celular, se genera el colapso total del cultivo (Fogg, 1975).

****

**Figura 1:** Fases de crecimiento de microalgas. (1) fase de latencia, (2) fase de aceleración, (3) fase exponencial, (4) fase de desaceleración, (5) fase estacionaria, (6) fase de declinación, (7) fase de muerte (Cervera, 2011).

En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, en fase exponencial y con los requerimientos necesarios algunas algas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3,5 horas (Brenan & Owende, 2010).

## Métodos de determinación de la población microalgas

Los métodos o técnicas utilizados corresponden a los siguientes: (Castello, 2008).

* Recuento celular al microscopio óptico mediante una cámara de Neubauer.
* Determinación de la turbidez mediante densidad óptica con espectrofotómetro.
* Recuento celular mediante Citometría de flujo
* Determinación cuantitativa de clorofilas
* Determinación de peso seco
* Determinación volumétrica
* Fluorescencia
* Recuento de células y volúmenes comparando con figuras geométricas.

## Separación y post-tratamiento de las algas producidas

Las microalgas debido a su pequeño tamaño generalmente son difíciles de separar algunas cianobacterias sedimentan (decantación espontánea) o flotan, y algunas microalgas forman agregados (biofloculación), lo que facilita su decantación. El separar las microalgas del medio de cultivo implica un 20 y 30% del costo total de producción (Molina & Belarbi, 2003).

La técnica de separación depende de la microalga con la que se trabaje, la densidad del cultivo, el uso posterior y factores económicos como el precio del subproducto obtenido. Por lo general, se da en dos etapas: en la primera se produce una separación donde se alcanza una concentración de microalgas entre el 2 y 7%. Se puede realizar por floculación, sedimentación por gravedad o flotación. En una segunda etapa se realiza un secado más fino y de mayor costo energético, mediante centrifugación, filtración o ultrasonidos (Ruiz, 2011).

Para el post-tratamiento la biomasa, una vez separada del medio de cultivo, suele ser deshidratada para evitar reacciones de descomposición. El proceso de deshidratación suele darse mediante secado al sol, a baja presión, con spray, en tambores, en lecho fluidizado o por congelación. Para el caso de extracción de productos de interés, es común la necesidad de romper las células previamente, para lo cual se emplean homogeneizadores, autoclavado, adición de ácido hidroclórico o NaOH y lisis alcalina. También se llevan a cabo extracciones con disolventes (Molina & Belarbi, 2003).

## Factores que influyen en la eficiencia del proceso de tratabilidad

La eficiencia para el proceso de tratamiento terciario de efluentes con microalgas depende de:

* El tipo de efluente que se tratará: doméstico, agrícola e industrial.
* Las características de operación lo cual incluye la carga orgánica e hidráulica.
* Los contaminantes presentes en el efluente como los organismos depredadores que afectan a la composición de la biomasa, restringiendo las aplicaciones.
* Profundidad de los estanques y de los mecanismos de agitación.
* Variación de temperaturas e intensidad luminosa, que pueden presentarse por el cambio estacionario, así como el fotoperiodo (luz-oscuridad) o luz continúa.

Para una eficiencia en el proceso de tratamiento existen algunos aspectos a considerarse como la adecuada combinación de los parámetros anteriormente mencionados y el mantenimiento del cultivo en óptimas condiciones, para promover una eficiencia de remoción con la finalidad de alcanzar las máximas densidades celulares (González M. , 2005).

## Ventajas del tratamiento de efluentes con microalgas

Un proceso integral de tratamiento terciario con microalgas, tiene ventajas tan importantes como: el mejoramiento de la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético, también el aprovechamiento de nutrientes, que están siendo desechados, al ser incorporados a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno. Lo que provoca como consecuencia directa la remoción de sales (amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos), el aumento del pH de los efluentes (proceso fotosintético), lo cual favorece la precipitación de ortofosfatos, la eliminación de nitrógeno amoniacal por efecto de intercambio gaseoso, la disminución de la demanda biológica de oxígeno, la oxigenación del agua, favoreciendo la oxidación continua de materia orgánica, la acción bactericida, reduciendo la sobrevivencia de organismos patógenos, la recuperación de CO2, liberado en los procesos, mediante su empleo en el proceso fotosintético y un alto rendimiento en la bioconversión de la energía solar (4 y 8%) respecto a algunas plantas agrícolas convencionales (azúcar y sorgo), siendo del 1.5%. (Kojima & Lee, 2001).

## Características de los purines de cerdo

La Real Academia Española de la lengua define purín como el líquido formado por las orinas de los animales y lo que rezuma del estiércol. También se le define como la mezcla de excretas en conjunto con el agua con que se lavan los planteles donde se crían los cerdos, que puede consistir en agua limpia o agua tratada (Belmonte, 2008).

El principal residuo generado por los cerdos lo constituyen los purines de cerdo, constituido por la mezcla de excretas del animal (55% de excrementos y 45% de orina), junto con el agua de lavado utilizado para la limpieza de los planteles. La excreta contiene principalmente sólidos que flotan, sólidos que sedimentan, y sólidos en suspensión (Peralta, 2005). En general, los residuos generados en un sistema de producción porcina están compuestos por una parte sólida, formado principalmente por el estiércol y restos de alimentos; y otra líquida constituida por orina, agua de los bebederos, de lluvia y de lavado (Barceló, Pipa, & Huerga, 2010).

La tasa de producción de excretas y su composición es altamente variable, dado que depende de factores tales como el número de animales existentes en cada plantel de crianza y su estado fisiológico (cría, recría, engorda, gestación, maternidad), el alimento ingerido por los animales en cuanto a calidad y cantidad (que también variará según su estado fisiológico), el volumen de agua consumida e incluso el clima (Babot, 2008). En la tabla 1 se puede observar las principales características físico-químicas de los purines de cerdo (Belmonte, 2008).

**Tabla 1:** Característica físico-químicas de purines de cerdo

******

**Fuente:** (Plaza, 1999). Obtenido de INTA 2011 “Buenas Prácticas Pecuarias (BPP) para la producción y comercialización porcina familiar”

Por ello de no existir un tratamiento adecuado, la presencia de los componentes mostrados en la Tabla 1 podría afectar la calidad física, química y microbiológica del agua si es vertido a un cuerpo receptor (arroyo, río, laguna, canal). De la misma manera, si son dispuestos en el suelo sin un adecuado control (Barceló, Pipa, & Huerga, 2010).

## Impactos ambientales de los purines de cerdo

La cría intensiva de cerdos puede producir variados efectos de impacto ambiental, la necesidad de tratamiento de estas aguas residuales está cobrando cada vez más importancia por las cantidades y concentraciones de los residuos generados por una industria que va en aumento (Belmonte, 2008).

Este residuo se caracteriza por presentar altas concentraciones de materia orgánica evaluada como DQO (Demanda Química de Oxígeno) y/o DBO5 (Demanda Bioquímica de Oxígeno medida a los 5 días) (> 4 g DQO/L, y > 2,5 g O2/L, respectivamente), sólidos totales y volátiles (> 3 g/L para ambos casos), y de nutrientes (> 300 mg/L de nitrógeno total (NH4+) y > 100 mg/L de fósforo total (P)), y otros tipos de compuestos más específicos (Peralta, 2005). Por lo cual, pueden ocasionar problemas ambientales tales como la eutrofización en masas de agua existentes, problemas de saturación de suelos, lo que dificulta el crecimiento e incluso la supervivencia de algunas especies, emisiones de gases causantes del efecto invernadero y descarga de aguas contaminantes a cursos de agua naturales con límites que exceden la normativa vigente en el Ecuador (Belmonte, 2008). La emanación de gases también trae consigo problemas por malos olores en el ambiente, lo que se puede corroborar en terreno. La presencia de insectos que se ven atraídos hacia estos residuos, como las moscas, pueden además afectar en la propagación de microorganismos patógenos a lugares como casas o cultivos para consumo humano.

Una ventaja del tratamiento de purines de cerdo es la reutilización del agua, un bien cada vez más escaso a nivel mundial, por lo tanto se debe reciclar el agua tratada o descargarla a cursos de agua pero cumpliendo las normativas vigentes (Servín & Mantilla, 2008).

Las tecnologías de tratamiento actuales no son suficientes para producir efluentes de purines que permitan minimizar los impactos ambientales. Por las altas concentraciones de Materia Orgánica que poseen los purines de cerdo se ha dado un tratamiento de digestión anaeróbica, siendo uno de los más aplicados (Belmonte, 2008), aunque en algunos casos también se ha dado un tratamiento mediante lodos activados, a fin de mejorar el efluente tratado. Por ello la alternativa del uso de microalgas en el tratamiento de purines está siendo considerada como una valiosa estrategia, las especies de microalgas más comúnmente aisladas en tanques de estabilización de purines, son las pertenecientes a los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* sp*.* Los purines se caracterizan por poseer un adecuado balance de carbono y nutrientes, una elevada concentración de compuestos orgánicos, lo que hace que cumpla con las necesidades para un cultivo de microalgas. Por ello la alternativa del uso de microalgas en el tratamiento de efluentes porcinos está siendo considerada como una valiosa estrategia. Las microalgas más comúnmente aisladas en tanques de estabilización de purines, corresponden a los géneros de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp*.*

# METODOLOGÍA

## Revisión bibliográfica

El desarrollo investigativo se inició con una revisión bibliográfica en el área de ficorremediación, parámetros de crecimiento de microalgas, así como la obtención de biomasa microalgal.

## Toma de muestra porcina

Se recolectó el excremento porcino mezclado con orina de ¨Chancheras Colón¨, en dicho establecimiento se encontró quince cerdos distribuidos en tres galpones, la muestra fue recolectada de los tres galpones con ayuda de una pala en baldes industriales plásticos con tapa. La muestra fue transportada al laboratorio de Biotecnología Ambiental y Algal del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) de la Unidad de Biología de la Universidad Central del Ecuador y se dejó airear por un día.

## Procedimiento de la muestra para la obtención de efluente porcino

En un balde industrial plástico se añadió 7Kg de muestra porcina con 28 litros de agua corriente, se mezcló hasta obtener una muestra homogénea. Con una rejilla metálica se procedió a cernir la muestra para remover los sólidos flotantes, después del barrido inicial de desechos sólidos se traslada la muestra a una tina plástica de aproximadamente 60 cm de diámetro para una mejor aireación, durante cinco días se realizó una mezcla manual aproximadamente cada dos horas. Al sexto día se procede a hervir el efluente porcino durante 3 minutos, para ello se emplea una cocina industrial y una olla de acero inoxidable de diez litros de capacidad. Después el efluente porcino será colocado en cilindros de vidrio, para lograr una decantación simple por efecto de la gravedad, y finalmente se medirá el pH del efluente porcino.

## Proceso de mantenimiento del consorcio microalgal *Chlorella* sp. y *Desmodesmus* sp.

La cepa *Chlorella* sp.y *Desmodesmus* sp., son proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Algal del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) de la Unidad de Biología de la Universidad Central del Ecuador, las cuales serán mantenidas en medio de cultivo con Nitrofoska 1ml por litro, el mismo que será colocado periódicamente para enriquecer con nutrientes a la cepas y conservarlas como inóculo para todos los tratamientos de la investigación. Se mantendrá a temperatura ambiente entre 25±9°C, con irradiación y aireación permanente (Morales, 2013).

## Determinación del valor de inóculos para los ensayos

Para determinar el inóculo inicial de cada ensayo primero se realizará un conteo celular con la cámara de Neubauer, para obtener un promedio celular (N) y a partir de ello aplicar la siguiente fórmula:

 (Morales, 2013)

**:** Densidad celular del inóculo (cel/mL.)

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

**:** Factor de conversión de 0.1 µL a 1 ml.

**:** Factor de dilución (cuando es necesario)

.

Posteriormente con el fin de conocer el volumen necesario de inóculo que se empleará en cada ensayo y a dichas condiciones, se aplicará la siguiente fórmula:



Donde:

: Volumen de inóculo necesario para el ensayo

: 5\*106

: Volumen total del ensayo

**:** Densidad celular obtenida del conteo en la cámara Neubauer.



Los ensayos se realizarán a diferentes concentraciones de efluente porcino que son: 10%, 25%, 50% y 75%.

## Evaluación de crecimiento celular en los ensayos

Primero se mezcla o agita el cultivo con el fin de obtener una distribución homogénea de las células en la muestra, después se recolectará un mL de cultivo fresco en un tubo de ensayo previamente lavado y secado con ayuda de una pipeta Pasteur plástica.

***Recuento celular en cámara Neubauer***

Se realizará conteos de cada ensayo cada tres días con la cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad, la cámara será cargada de muestra a través de una pipeta Pasteur de vidrio, los recuentos celulares se harán cada tres días durante 21 días, ya que en ese periodo generalmente los cultivos entran en fase estacionaria. Se aplicará la siguiente fórmula: (Guillard & Sieracki, 2005)



**:** Densidad celular del inóculo (cel/mL.)

**:** Promedio de células presentes en 1 mm2 (0.1 µL). Este número de células se divide de acuerdo al número de cuadrantes contados en la cámara de Neubauer.

**:** Factor de conversión de 0.1 µL a 1 ml.

**:** Factor de dilución (cuando es necesario)



## Determinación de la curva de crecimiento

Para determinar la velocidad de crecimiento  y la tasa de duplicación  se aplicarán las siguientes fórmulas: (Lobban, Chapman, & Kremer, 1998)



Donde:

: Tiempo final e inicial.

: Densidad celular final e inicial en fase logarítmica

El tiempo de duplicación (td) será determinado mediante la siguiente ecuación:(Lobban, Chapman, & Kremer, 1998)

****

## Determinación de pigmentos

La determinación de pigmentos se realizará en la última fase de estudio, cuando se tenga un volumen de cultivo microalgal en efluente porcino de 10 litros.

Se tomará 2mL de muestra en tubos de ensayo con ayuda de una pipeta Pasteur de todos los cultivos incluidas las repeticiones, se añadirá 2mL de acetona-metanol (2:1) a cada muestra, y se las someterá a centrifugación a 15 X 103 revoluciones durante 15 minutos. Posteriormente se retirará el sobrenadante con una pipeta Pasteur, este procedimiento se llevará a cabo en total oscuridad para evitar degradación de las muestra ya que son fotosensibles, después se procederá a congelar las muestras durante 24 horas.

Para la medición de los pigmentos fotosintéticos se empleará un espectrofotómetro y las lecturas serán a tres longitudes de onda diferentes, la muestra será colocada en una celda de vidrio con valores de absorbancia (DO) de 665, 647 y 480 nm.

Se aplicará las siguientes ecuaciones para obtener las concentraciones de clorofila *a* y *b*. (Jeffrey & Humphrey, 1975)





## Cosecha y secado de la biomasa

Una vez que los cultivos de microalgas alcanzan la fase estacionaria se permitirá la decantación simple por efecto de la gravedad y en caso de ser necesario se empleará algún tipo de floculante, después se recolectará el sobrenadante con el fin de recoger la biomasa microalgal en bandejas de vidrio (pirex). Posteriormente su secado en estufa a 50 0C aproximadamente sin sobrepasar los 60 0C., transcurrido el tiempo de secado, la biomasa es retirada de las bandejas de vidrio con ayuda de una espátula y almacenada en frascos de vidrio y sellados totalmente (Sieg, 2008).

# ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el estudio de la tratabilidad de un efluente porcino mediante aplicación de un consorcio microalgal, se establecerá fases de estudio con diseño experimental.

##  Fase uno

Estudio de factibilidad que consiste en valorar la capacidad de crecimiento de diversos consorcios a diferentes concentraciones del efluente porcino.

### Diseño experimental

Se analizarán las curvas de crecimiento densidad celular (cel \* 106 / mL) vs tiempo realizadas en excel, de los consorcios propuestos a tres concentraciones diferentes de efluente porcino que son: 10%, 25% y 50%. Los consorcios planteados son:

Ensayo 1: Consorcio *Chlorella* sp. y *Desmodesmus* sp.

Ensayo 2: Consorcio *Chlorococcum* sp., *Desmodesmus* sp. y *Chlorella* sp.

Ensayo 3: Consorcio *Desmodesmus* sp. y *Chlorella* sp.

Ensayo 4: *Chlorella* sp*.*

Los ensayos 1 y 3 se diferencian por el origen de recolección de las cepas.

Se escogerá los dos consorcios que hayan presentado la mayor adaptabilidad en el efluente porcino, lo cual se ve reflejado en la curva que tenga los valores de densidad celular más altos en cada concentración.

## Fase dos

Selección del mejor consorcio y concentración del efluente que produzca el mayor crecimiento celular.

### Diseño experimental

El diseño experimental que se empleará para los cultivos de 3 L es un diseño factorial de 2X3 ya que se evaluará la combinación de dos niveles: tipo de microalga yconcentración de efluente porcino, frente a tres factores de carácter cuantitativo 25%, 50% y 75% de concentración de efluente y dos factores de tipo cualitativo: *Chlorella* sp.y *Chlorella* sp*.–Desmodesmus* sp*.* en la selección del consorcio, en la tabla 4 se indica la matriz con el arreglo factorial 2X3.

### Factores controlables

***Efluente porcino:*** Efluente con alta carga orgánica en diferentes concentraciones como se indica en la tabla 2.

**Tabla 2:** Factor controlable de concentración de efluente porcino.

|  |  |
| --- | --- |
| Código | Descripción |
| E1 | Efluente porcino al 25% |
| E2 | Efluente porcino al 50% |
| E3 | Efluente porcino al 75% |

***Tipo de consorcio:*** Selección de la microalga *Chlorella* sp*.* o consorcio microalgal *Chlorella sp.–Desmodesmus* sp*.* con la mayor densidad celular, como muestra la tabla 3.

**Tabla 3.** Factor controlable de tipo de consorcio.

|  |  |
| --- | --- |
| Código | Descripción |
| C1 | *Chlorella* sp. |
| C2 | *Chlorella* sp*.–Desmodesmus* sp. |

### Tratamientos

Se llevarán a cabo 6 tratamientos (2X3) debido a la combinación de los niveles de concentración de efluente porcino y tipo de consorcio microalgal.

**Tabla 4.** Tratamientos en la fase dos.

| Tratamiento | Código | Concentración efluente porcino | Tipo de consorcio |
| --- | --- | --- | --- |
| T1 | E1C1 | 25% | *Chlorella* sp. |
| T2 | E2C1 | 50% | *Chlorella* sp. |
| T3 | E3C1 | 75% | *Chlorella* sp. |
| T4 | E1C2 | 25% | *Chlorella* sp*.–Desmodesmus* sp*.* |
| T5 | E2C2 | 50% | *Chlorella* sp.–*Desmodesmus* sp. |
| T6 | E3C2 | 75% | *Chlorella* sp*.–Desmodesmus* sp. |

### Repeticiones

Para este ensayo se realizarán tres repeticiones por cada tratamiento.

### Unidad experimental

Las unidades experimentales para seleccionar la mejor concentración del efluente que produzca el mayor crecimiento del consorcio serán botellas plásticas de 6L con efluente porcino con inóculo microalgal. Se tendrá un total de 18 unidades experimentales.

### Variables

***Variable de respuesta:*** La variable de respuesta será la densidad celular (1x106 cel/mL) que se define como el número de células presentes en cada mililitro de efluente porcino a concentraciones de 25%, 50% y 75%. Para lo cual se utilizará una cámara Neubauer hasta alcanzar la fase exponencial.

### Modelo estadístico

Para un modelo a x b tratamientos que se replican n veces, el diseño está dado por:



Donde es la media general,  es el efecto debido al -ésimo nivel del factor  es el efecto del -ésimo nivel del factor  representa al efecto de interacción en la combinación  y  es el error aleatorio que se supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante  y son independientes entre sí.

Para las variables descritas, la evaluación se realizará durante un mes desde el primer día de inoculación al efluente porcino. El análisis estadístico consistirá en efectuar un análisis de varianza (ANOVA), prueba de significancia según el método de Tukey para diferenciar subgrupos entre tratamientos, y un análisis descriptivo de frecuencias

### Error aleatorio y error experimental

Se considerará error aleatorio a la variabilidad producida por: humedad, temperatura, pH y luz. El error experimental se considerará debido a la manipulación de las unidades experimentales durante el proceso por parte de la investigadora.

### Análisis

El análisis de los resultados se llevará a cabo en el programa estadístico INFOSTAT.

### Interpretación

Se deben interpretar los resultados con el fin de seleccionar el mejor consorcio y concentración del efluente que produzca el mayor crecimiento microalgal. En el caso de observar que los tratamientos no cumplan con el supuesto de normalidad y varianza se deberá aplicar estadística no paramétrica.

### Conclusiones finales

De acuerdo con la eficiencia de la concentración del efluente que produzca el mayor crecimiento del consorcio microalgal, se establecerán las condiciones más apropiadas para obtener una remoción de DQO, DBO5, Nitrógeno, Fósforo y Sólidos Totales considerable.

# HIPÓTESIS

Existe un consorcio microalgal con un adecuado valor nutricional, que remueve significativamente, a nivel de laboratorio, los contaminantes en un efluente porcino.

# OPERATIVIDAD DE LAS VARIABLES

La operatividad de las variables y sus factores a determinar se indican en la tabla5.

**Tabla 5:** Variables y factores a determinar

|  |  |
| --- | --- |
| Variables | Factor a determinar |
| Densidad Celular | Número de células por mililitro |
| Clorofila a | Concentración (μg/mL) |
| Clorofila b | Concentración (μg/mL) |
| Biomasa seca | Gramos de biomasa seca por mililitro |

# ACTIVIDAD PARA LA EJECUCIÓN

1. Revisión bibliográfica de ficorremediación
2. Elaboración del perfil de titulación
3. Toma de muestra porcina
4. Procesamiento de la muestra para la obtención de efluente porcino
5. Mantenimiento del consorcio microalgal
6. Determinación de la concentración del inóculo para los ensayos
7. Evaluación de crecimiento celular en los ensayos
8. Determinación de curvas de crecimiento
9. Determinación de pigmentos
10. Cosecha y secado de biomasa
11. Obtención de resultados
12. Interpretación de los datos obtenidos
13. Redacción del estudiante

# DURACIÓN DEL PROYECTO

El tiempo que se estima para concluir el Proyecto de titulación es de 400 horas.

# BIBLIOGRAFÍA

* Abalde, J. C. (2004). MICROALGAS: Cultivo y Aplicaciones. 111-113.
* Alfaro, O. (1991). Metodología para el cálculo de cultivadores de microalgas del tipo película descendente, Informe Interno del CIES.
* An, J., & Sim, S. (2003). Hydrocarbon production from secundary treated piggery wastewater by the green alga Botrycoccus barunii. Journal of Applied Phycology.
* Andersen, R. (2005). Algal Culturing Techniques. ELSIEVER , Cap 1: 1-12.
* Armas, E. (1992). Evaluación en condiciones de explotación del cultivador de película descendente de 3500 m2. Innforme Interno del CIES.
* Babot, D. T. (2008). Evaluación de factores condicionantes de la producción de purines de porcino en condiciones de campo. Congreso Español de Gestión Integral de deyecciones Ganaderas .
* Barceló, C., Pipa, M., & Huerga, I. (2010). Problemática y oportunidades ambientales de la producción porcina familiar .
* Beijerinck, M. (1890). Kulturversuche mit Zoochlorenllen, Linchenengoniden und anderen niederen Algen.
* Belmonte, M. R. (2008). .: Estudios preliminares de trazabilidad a un purín de cerdo. XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y.
* Bordel, S. G. (2009). Mechanistic Model for the Reclamation of Industrial Wastewaters Using Algal-Bacterial Photobioreactors.
* Boursier, H., & Beliné, F. (2005). Piggery wastewater characterization for biological nitrogen removal process design. Bioresour Technol.
* Brenan, M., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extraction of biofuels and co-products. Renewable and Sustainable Energy Reviews. , 14, 557-577.
* Brown, M. J. (1997). Nutritional properties of microalgae for mariculture. . Aquaculture , 315-331.
* Burlew, J. (1953). Algal culture from Laboratory to Pilot Plant. Washington: Carnegie Institute.
* Cadwell, D. (1946). Sewage oxidation ponds performance, operation and design. Sewage Works.
* Cañizarez, V. C. (2000). En Microalgas en la acuacultura (pág. 44). México: CINVESTAV.
* Castello, F. (2008). En Acuicultura marina: Fundamentos biológicos y tecnología de la producción (págs. 314-315). Barcelona: Universitat Barcelona.
* Cervera, O. (2011). Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal. 11.
* Contreras, C., Peña, J., & Flores, L. (2003). Avances en el diseño conceptual de fitobiorreactores para el cultivo de microalgas. Interciencia , 450-456.
* Contreras, E. (1994). En Manual de técnicas hidrobiológicas (pág. 141 ). México: Trillas.
* Costa, R., Medri, W., & Perdomo, C. (2000). High-rate pond for treatment of piggery wastes.
* Davison, I. (1991). Environmental effects on algal Photosynthesis: Temperature. 2-8.
* Fernández, P. (2008). En En Composición Bioquímica y Crecimiento de Paralarvas de Pulpo (Octopus Vulgaris Cuvier, 1797), Alimentadas con Juveniles de Artemia Enriquecidos con Microalgas y Otros Suplementos Nutricionales (págs. 28-34). Madrid: USC.
* Figueroa, F. J. (2010). Biofiltración de efluentes mediante algas: valorización de la biomasa (alimentos funcionales y biodisel).
* Fogg, G. (1975). Algal cultures and phytoplankton. Ecology. Wisconsin.
* Fulks, W., & Main, K. (1991). The design y operation of live feeds production system. Hawaii: OS-Asia Works.
* Garofalo, R. (2011). Algae and aquatic biomass for a sustainable production of 2nd generation biofuels. AQUAFUELS , 99-101.
* Garret, M. (1976). Photosynthetic purification of the liquid phase of animal slurry.
* Godos, I. B. (2009). Long-term operation of high rate algal ponds for the bioremediation of piggery wastewater at high loading rates. ELSEVIER .
* Godos, I. V. (2010). A comparative evaluation of microalgae for the degradation of piggery wastewater under photosynthetic oxygenation. ELSEVIER .
* González, C. M. (2008). Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewater.
* González, C. M.-E. (2008). Microalgae-based process for the biodegradation of preteated piggery wastewater, Applied microbiology and biotechnology. España.
* González, M. (2005). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. 3-4.
* Guillard, & Sieracki. (2005). Counting cells in cultures with the light microscope. En: Algal Culturing Techniques. . Andersen R.A. (ed.). Elsevier Academic Press , 239-252.
* Harder, R., & Von Witsch, H. (1942). Uber Massenkultur von diatomeen. 60.
* Hee, J., & Seung-Mok, L. (2012). Effects of Microalgae on the Removal of Nutrients from Wastewater: Various Concentrations of Chlorella vulgaris.
* Hernandez, J., & Bashan, L. (2005). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga Chlorella spp. co-immobilized with Azopirillum brasilense. ELSEVIER .
* Hoff, F., & Snell, T. (2001). Plankton culture manaul. Aqua Fram Inc , 162.
* Hoffman, J. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. Journal of Phycology.
* INEC. (27 de junio de 2012). Instituto Nacional de Estadística y Censos. Recuperado el 25 de mayo de 2013, de: http://www.inec.gob.ec
* Jeffrey, S., & Humphrey, G. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c i higher plants, algae an natural phytoplankton. Biochem. Physiol. , 191-194.
* Kanno, T., & Kazie, U. (2005). Chlorella vulgaris: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Woodland Publishing , 63.
* Khowaja, M. (2000). Waste stabilization ponds-design guidelines for Southern Pakistan. Conference: water, sanitation and hygiene: challenges of the millennium.
* Kim, M. P. (2006). Enhanced production of Scenedesmus spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. ScienceDirect .
* Kim, M., & Park, J. J. (2007). Enhanced production of Scenedesmus spp.(green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. Bioresource Technology.
* Kojima, H., & Lee, K. (2001). Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology. Springer-Verlag , 310.
* Langdom, C. J., & Waldock, M. (1981). The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of Crassostrea gigas spat. U.K.
* Lee, R. (1995). Phycology. University Press .
* Linden, J., & Hartmut. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga Haematococcus pluvialis. Plant Physiology , 810-817.
* Lobban, C., Chapman, D., & Kremer, B. (1998). Experimental Phycology: A laboratory manual. Cambridge University Press. Nueva York, EEUU .
* Manso, L. e. (1991). Metodología del cultivo mixotrófico de microalgas a cielo abierto. Primera versión.Informe Interno del CIES.
* Markou, G., & Georgakakis, D. (2011). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obliquus.
* Martin, C., Noue, J., & Picard, G. (1984). Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. ELSEVIER .
* Martin, F. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in Chlorella zofingiensis. Tesis de Maestría en Ingeniería. Nacional University of Singapore .
* Martínez, M. S. (1999). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga Scenedesmus obliquus.
* Mehlitz, T. (2009). Temperature influence and heat management requirements of microalgae cultivation in photobioreactors. . Polytechnic State University, USA.
* Molina, G. F. (1999). Photobioreactors: light regime, mass transfer and scale up. Journal of Biotechnology , 231-247.
* Molina, G., & Belarbi, E. (2003). Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. Biotechnology Advances , 491-515.
* Montes, M. (2010). Desarrollo de un Bioestimulante a Base de Microalgas y Bacterias para el Tratamiento de Influentes Residuales. México.
* Morales, E. (2013). Biotecnología Ambiental, Algal y Producción de Biomasa. UCE .
* Mulbry, W. K. (2008). Treatment of dairy manure effluents using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers. ELSEVIER .
* NHM. (20 de abril de 2011). Recuperado el 28 de mayo de 2013, de Taxonomy and Morfology of Desmodesmus: http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/taxonomy/index.html
* Ontaneda, D. (2013). Estudio de tratabilidad de un efluente de una planta procesadora de pieles para extracción de gelatina con un consorcio de la microalga Desmodesmus sp y Chlorella sp. . Universidad Central del Ecuador .
* Oswald, W., & Gotaas, H. (1957). Microalgae and wastewater treatment.En: Microbial bitechnology. Cambridge University.
* Paniagua, M. R. (1989). Manual de metodologías y alternativas para el cultivo de microalgas. México: CICESE.
* Peralta, J. (2005). Recomendaciones técnicas para la gestión ambiental en el manejo de purines de la explotación porcina. Instituto de Investigaciones Agropecuarias , 17-25.
* Pittman, J. (2011). The potencial of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. Bioresource Technology.
* Plaza, C. G. (1999). Problemática de los purines en España: su aprovechamiento agrícola como solución. Residuos N0 49.
* Richmond, A. (1986). En Cell response to environmental factors (págs. 69-99). USA: CRC Print.
* Riquelme, C., & Avendaño, R. (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura.
* Rosales, N. B. (2007). Gallinaza: un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal.
* Rosas, I. (2004). Microbiología Ambiental. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología , 34.
* Ruiz, A. L. (2010). Growth and nutrients removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. ELSEVIER .
* Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. 39.
* Servín, C., & Mantilla, G. (2008). Reutilización de aguas residuales: nuevo paradigma de sustentabilidad. XXXI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental.
* Severa, O. (2011). Tratamiento de purines para la producción de biomasa microalgal.
* Sieg, D. (2008). Marking Algae Biodiesel at home. Bangkok, Tailandia , 56-69.
* Silvia, J., Lópes, A., & Barrientos, R. (2005). En La colección de microalgas dulceacuícolas y marinas de la Península de Yucatán (págs. 13-14). México: Universidad Yucatán.
* Suan, T., & Goh, A. (1988). Ecology of microalgae in a high rate pond for piggery effluent purification in Singapore.
* Terlizzi, D., & Karlander, E. (1980). Growth of a cocoid nanoplankter from the Chesapeake Bay as a influenced by light, temperature, salinity and nitrogen source in factorial combination. Phycol , 364-368.
* Travieso, L. B. (1982). . Unicellular microalgae growth on Swine Waste. Ciencia y Técnica en la Agricultura. Ganado Porcino. 89-99.
* Travieso, L. B. (2006). Batch mixed culture of Chlorella vulgaris using settled and diluted piggery waste.
* Travieso, L. B. (2013). Production of Biomass (Algae-Bacteria) by Using a Mixture of Settled Swine and Sewage as Substrate. Taylor & Francis .
* Trujillos, M. (1995). La colección de microalgas acuicultura . CICESE.
* Ugwu, C., & Aoyagi, H. (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae.
* Van Beilen, J. (2010). Why microalgal biofuels won’t save the internal combustion machine. Biofuels. Bioproducts and Biorefining , 41-52.
* Wang, B. D. (1996). Experimental study of high rate pond system treating piggery wastewater. Water Sci.
* Wilkie, A., & Mulbry, W. (2002). Recovery of dairy manure nutrients by benthic fresh water algae. Biresour Technol.
* Yanyan Su., M. A. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. ELSEVIER .

# ANÁLISIS DE COSTOS DEL PROYECTO

Para el análisis de costos del proyecto se especifican los materiales, reactivos, equipos y gastos varios para la realización de la investigación planteada. En la tabla 20.1 se observa la contribución por parte del laboratorio de Biotecnología Ambiental y Algal del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) de la Universidad Central del Ecuador, y en la tabla 20.2 consta el aporte del estudiante.

**Tabla 6:** Aporte de la Unidad de Biología de la Universidad Central para el proyecto planteado (materiales, equipos y reactivos).

| Materiales, equipos y reactivos provistos por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Algal |
| --- |
| Ítem | **Detalle** | **Cantidad** | **Descripción** |
| 1 | Pipetas Pasteur de 5 mL y 1 mL | 20 | **Materiales** |
| 2 | Probetas de 500 mL, 1000 mL | 3 |
| 3 | Vasos de precipitación de 250 mL, 500 mL | 3 |
| 6 | Porta y cubre objetos | 100 |
| 7 | Cámara de Neubauer | 1 |
| 8 | Pipetas Pasteur de vidrio | 5 |
| 9 | Algodón | 1 |
| 10 | Tubos de ensayo | 20 |
| 11 | Gasa | 20 |
| 12 | Piola | 1 |
| 13 | Picetas | 2 |
| 14 | Gradilla de plástico | 3 |
| 15 | Refrigeradora | 1 |
| 16 | Estufa | 1 |
| 17 | Cocina industrial | 1 |
| 18 | Microscopio óptico | 1 |
| 19 | Lugol | 1 | **Reactivos** |
| 20 | Agua destilada | 1 |  |

**Tabla 7:** Aporte del estudiante para la consecución del proyecto planteado (materiales, equipos y gastos varios).

| **Ítem** | **Detalle** | **Cantidad** | **Descripción** | **Valor unitario (USD)** | **Valor total (USD)** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **1** | Bombas de aireación | 2 | Material | 7.50 | 15 |
| **2** | Aireador de cuatro vías | 1 | 6.00 | 6.00 |
| **3** | Cernidor plástico | 1 | 1,10 | 1,80 |
| **6** | Impresiones, copias y papelería | - | Elaboración de proyecto de titulación | 125 | 125 |
| **7** | Internet | 12 | 25 | 300 |
| **8** | Movilización | - | Gastos varios | 300 | 300 |
| **9** | Alimentación | - | 2.5 | 675 |
| **10** | Imprevistos | - | 100 | 100 |
| **TOTAL** | **567,10** | **1522,80** |

# FINANCIAMIENTO DEL PROYECTO

El presente proyecto será financiado por el Laboratorio de Biotecnología Ambiental y Algal del Instituto de Ciencias Básicas (ICB) de la Universidad Central del Ecuador y por la estudiante.

# CONTENIDO

1. PARTE INTRODUCTORIA
2. CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN
	1. Formulación del Problema
	2. Justificación del Problema
	3. Objetivos de la Investigación
		1. Objetivo General
		2. Objetivos Específicos
	4. Marco Teórico
		1. Generalidades de las microalgas.
			1. *Chlorella* sp.
			2. *Desmodesmus* sp.
		2. Factores que influyen en un cultivo de microalgas.
		3. Obtención y aislamiento de cepas de microalgas.
		4. Fases de crecimiento de las microalgas.
		5. Métodos de determinación de la población microalgas.
		6. Separación y post-tratamiento de las algas producidas.
		7. Factores que influyen en la eficiencia del proceso de tratabilidad.
		8. Ventajas del tratamiento de efluentes con microalgas
		9. Características de los purines de cerdo
		10. Impactos ambientales de los purines de cerdo
	5. Hipótesis
3. CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS
	1. Participantes
	2. Zona de estudio
	3. Periodo de tiempo de investigación
	4. Diseño experimental
	5. Procedimientos.
		1. Revisión bibliográfica de ficorremediación
		2. Toma de muestra porcina
		3. Procesamiento de la muestra para la obtención de efluente porcino
		4. Mantenimiento del consorcio microalgal *Chlorella* sp. y *Desmodesmus* sp.
		5. Determinación del valor inóculo para los ensayos
			1. Recuento celular en cámara Neubauer
		6. Determinación de curvas de crecimiento
		7. Determinación de pigmentos
		8. Cosecha y secado de biomasa
4. CAPÍTULO 3: RESULTADOS
5. CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN
6. CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES
7. CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES
8. CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA
9. ANEXOS

# CRONOGRAMA

El cronograma de actividades para el proyecto se especifica en la figura 2

| **Meses** | **Julio** | **Agosto** | **Septiembre** | **Octubre** | **Noviembre** |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Actividades** | **1** | **2** | **3** | **4** | **1** | **2** | **3** | **4** | **1** | **2** | **3** | **4** | **1** | **2** | **3** | **4** | **1** | **2** | **3** | **4** |
| **Elaboración plan de proyecto de titulación** |   |  |  |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Realización del primer bioensayo a 3L |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Conteo de densidad celular del primer bioensayo |   |  |  |  |  |  |  |  |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Análisis estadístico de los resultados del primer bio-ensayo |   |  |   |   |  |   |   |   |  |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Selección de la concentración con el mayor crecimiento del consorcio |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Toma de muestra porcina para el segundo bio-ensayo |   |   |   |   |   |   |   |  |   |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Preparación de efluente porcino |   |   |   |   |   |   |   |   |  |   |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Realización del segundo bioensayo a 15 L |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Conteo de densidad celular del segundo bioensayo |   |   |   |   |   |   |   |   |  |   |   |  |  |  |  |  |   |   |   |   |
| Análisis estadístico de los resultados del segundo bioensayo |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |   |  |  |   |   |   |
| Extracción de pigmento del segundo bioensayo |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |  |  |  |
| Cosecha de biomasa del consorcio |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |  |
| Elaboración del documento final de grado |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |  |   |

**Figura 2:** Cronograma de actividades

# FECHA DE PRESENTACIÓN DEL PROYECTO

25 de Marzo de 2021

# FIRMA DEL RESPONSABLE

Nombre completos del estudiante

C. I. ………………..

# FECHA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO

**………………………………………**

# FIRMA DE LA AUTORIDAD

Karina Ponce Loaiza M. Sc.

Director de la Carrera Ingeniería en Biotecnología / Biotecnología

Posible Director del Proyecto

Mat. Pedro Romero

Posible Codirector y/o colaborador y/o cotutor del Proyecto