

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Desarrollo de un tratamiento de aguas residuales con microalgas para la
recuperación de nutrientes en Ecuador**

Proyecto de investigación

Alexandra Salomé Román Espinosa

Tesis de grado presentada como requisito
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 22 de diciembre de 2016

Universidad San Francisco de Quito USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Desarrollo de un tratamiento de aguas residuales con microalgas para la
recuperación de nutrientes en Ecuador**

Alexandra Salomé Román Espinosa

Calificación:

Nombre del profesor, título académico:

Valeria Ochoa-Herrera, Ph.D.

Firma del profesor

.....

Quito, 22 de diciembre de 2016

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos: Alexandra Salomé Román Espinosa

Código: 00104280

C. I.: 171831019-4

Fecha: Quito, 22 de diciembre de 2016

Agradecimientos

Agradezco tanto a mi directora de tesis, Valeria Ochoa-Herrera como a mi coordinadora de carrera, Maria de Lourdes Torres por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de este proyecto y en el transcurso de mi carrera. Del mismo modo agradezco a mi familia que siempre estuvo a mi lado en todo momento, especialmente a mi madre, la cual ha sido incondicional conmigo. A mis compañeros de carrera, les tengo una gratitud y cariño único, dado que me siempre me impulsaron a seguir a adelante y me ayudaron cada vez que lo necesite. También a mis profesores que supieron transmitir sus conocimientos y siempre estuvieron para despejar mis dudas. Finalmente, y sin quitarle importancia, agradezco a Dios que siempre estuvo conmigo en cada paso que he dado a lo largo de mi vida, iluminando mi camino para así cumplir mis metas y dándome la fortaleza para culminar una etapa más de mi vida.

RESUMEN

La generación y descarga de aguas residuales son de gran preocupación mundial, especialmente en países en vías de desarrollo como Ecuador donde la mayoría de las aguas residuales no son tratadas y son descargadas en cuerpos de agua, causando problemas en el ecosistema y en la salud pública. El objetivo de este proyecto de investigación fue evaluar la factibilidad de utilizar microalgas locales para la recuperación de nitrógeno y fósforo en bioensayos batch con agua residual sintética. Se montaron bioensayos utilizando una receta de agua residual sintética para evaluar los efectos de la aireación y la aireación forzada y de la variación de la concentración inicial de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en la eficiencia de remoción de nitrógeno y fosforo de un consorcio microalgal. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente con fotoperíodos de 12 horas de luz artificial. Adicionalmente, se realizó una curva de calibración que relaciona la densidad celular obtenida a través del conteo con la cámara de Neubauer y la densidad óptica con un $R^2 = 0.996$. Los resultados obtenidos mostraron efectos negativos al utilizar aireación forzada, con eficiencias de remoción de 53% vs 57% $\text{-NH}_4^+\text{-N}$ y 74% vs 9% $\text{-PO}_4^{3-}\text{-P}$, y de producción de 87% vs 37% $\text{NO}_3^-\text{-N}$ con aireación vs aireación forzada, respectivamente. Respecto a la variación de la concentración inicial de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, las eficiencias de remoción para $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ fueron 53, 48 y 57% y 74, 16 y 31%, respectivamente para concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ de 86.81 (100%), 43.41 (50%), y 21.70 (25%) mg L^{-1} ; siendo la concentración inicial de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ del 100% la óptima para satisfacer el requerimiento de nitrógeno de las microalgas y así demostrar su capacidad de remoción de nutrientes dentro de un tratamiento de aguas residuales.

Palabras claves: microalgas, aguas residuales, remoción, amonio, nitrato, fósforo, aireación, concentración, tratamiento.

ABSTRACT

The generation and discharge of wastewater are of great concern worldwide, specially in developing countries such as Ecuador where the majority of domestic wastewater are not treated and are downloaded in bodies of water, causing problems in the balance of ecosystems and public health. The objective of this project is to evaluate the feasibility of using local microalgae in order to the recover nitrogen and phosphorus in bioassays batches with synthetic wastewater. Bioassays batches were mounted using a recipe of synthetic waste water to evaluate the effects of forced aeration and the change of initial concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in the removal efficiency of nitrogen and phosphorus in local microalgae culture. The experiments weremaintained at ambient temperature with fotoperíodos of 12 hours of artificial light. Additionally, a calibration curve was performed and it relates two methods for the determination of the cell density: the count with the Neubauer chamber, and the optical density of the cultivation algal. Both methods achieved a curve fitting of $R^2 = 0.996$. The results obtained concerning the bioassays showed negative effects by the use of forced aeration, with removal efficiencies of 53% vs. 57% $\text{-NH}_4^+\text{-N}$ and 74% vs. 9% $\text{-PO}_4^{3-}\text{-P}$, and production of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ of 87% vs.37% for aireation and forced aireation, respectively. Regarding the variation of the concentration initial of $\text{NH}_4^+\text{-N}$, their removal efficiencies for $\text{NH}_4^+\text{-N}$ and $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ were 53, 48 and 57% and 74, 16 and 31%, respectively for an $\text{NH}_4^+\text{-N}$ initial concentration of 86.81 (100%), 43.41 (50%), and 21.70 (25%) mg L^{-1} , being the initial concentration of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ of 100% the ideal one to satisfy the request of nitrogen of the microalgae and in this way raise its removal capacity inside a wastewater treatment.

Words key: microalgae, water waste, removal, ammonium, nitrate, phosphorus, aeration, concentration, treatment.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción.....	11
2	Objetivos	16
2.1	Objetivos Específicos	16
3	Justificación	17
4	Área de trabajo.....	19
5	Materiales.....	20
5.1	Reactivos	20
5.2	Medio de cultivo	20
5.3	Microorganismos.....	20
5.4	Bioensayos batch de remoción de nutrientes.....	21
5.5	Técnicas de análisis	21
5.5.1	Equipos comunes.....	21
5.5.2	Medición de amonio	21
5.5.3	Medición de nitrato.....	21
5.5.4	Medición de fosfato	22
5.5.5	Medición de potencial Redox	22
5.5.6	Medición de pH	22
5.5.7	Medición de oxígeno disuelto y temperatura.....	22
5.5.8	Medición de conductividad	22
5.6	Determinación de la densidad celular	23
6	Métodos	24
6.1	Bioensayos de recuperación de nutrientes	24
6.2	Métodos Analíticos.....	24
6.2.1	Medición de amonio y nitrato.....	25
6.2.2	Medición de fosfato	25

6.2.3	Medición de parámetros básicos de operación	26
6.3	Medición de densidad celular	26
7	Resultados	28
7.1	Curva de calibración entre la densidad celular y la densidad óptica	28
7.2	Efectos de la aireación forzada en la capacidad de remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.....	28
7.3	Efecto de la concentración inicial de nitrógeno en la remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.	30
8	Discusión	33
8.1	Curva de calibración entre la densidad celular y la densidad óptica.....	33
8.2	Efectos de la aireación forzada en la capacidad de remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.....	33
8.3	Efecto de la variación de concentración inicial de NH_4^+ -N en la remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.	39
9	Conclusiones	43
10	Recomendaciones	44
11	Referencias.....	45
12	Anexos	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Variación de la eficiencia y tasa de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$; y la variación de la eficiencia y tasa de la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, en bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con microalgas locales.	53
Tabla 2: Analisis de Varianza- ANOVA para los bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con microalgas locales.	54
Tabla 3: Variación de la eficiencia y tasa de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$; y la variación de la eficiencia y tasa de la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, en bioensayos batch aireados durante un periodo de 336 horas con microalgas locales a diferentes concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$	55
Tabla 4: Analisis de Varianza- ANOVA para los bioensayos batch aireados durante un periodo de 336 horas con microalgas locales a diferentes concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$	56

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Curva de calibración final entre la densidad celular de microalgas obtenida por el método de conteo con la cámara de Neubauer y la densidad óptica (absorbancia) del cultivo..... 51
- Figura 2:** Remoción de nutrientes en bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con $3,43E^{+06}$ células mL^{-1} microalgas locales; (A) Remoción de NH_4^+-N , (B) remoción de $PO_4^{3-}-P$ y (C) producción de $NO_3^- -N$. Leyenda: Tratamiento aireado (\circ), tratamiento con aireación forzada (\diamond), control abiótico (\blacksquare) y control heat killed (\blacktriangle). Las barras de error representan la desviación estándar de los bioensayos realizados en duplicados..... 52
- Figura 3:** Remoción de nutrientes en bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con $3,43E^{+06}$ células mL^{-1} microalgas locales; Densidad celular. Leyenda: Tratamiento aireado (\circ) y tratamiento con aireación forzada (\diamond). pH. Leyenda: Tratamiento aireado (\blacksquare) y tratamiento con aireación forzada (\blacktriangle). 53
- Figura 4:** Remoción de nutrientes en bioensayos batch aireados durante un periodo de 336 horas con microalgas locales a diferentes concentraciones iniciales de $NH_4^+ -N$; Densidad celular. Leyenda: densidad celular a una concentración inicial del 100% (\circ), 50% (\diamond) y 25%(\square) de $NH_4^+ -N$ 55

1 Introducción

En los últimos 200 años, la población mundial ha crecido exponencialmente, estimando un ritmo de crecimiento de unos 80 millones de personas al año (United Nation Water-UNESCO, 2015). Dicho crecimiento demográfico, marcado por la urbanización, la industrialización y el aumento de la producción y el consumo han generado una demanda de agua dulce cada vez mayor. Cada año se consumen 990 millones de m³ de agua que son utilizados con propósitos industriales, domésticos y agrícolas. Se estima que el 20% de los acuíferos mundiales está siendo sobreexplotado para abastecer la demanda actual (Gleeson, Wada, Bierkens, & van Beek, 2012), lo que ha provocado problemas graves, como el hundimiento del suelo y la intrusión de agua salada en los acuíferos costeros (United Nation Water-UNESCO, 2015).

Del mismo modo, la disponibilidad de agua enfrenta una contaminación inminente por los diferentes usos de la misma. La utilización de agua para las actividades humanas diarias hacen de este recurso uno de los más demandados alrededor del mundo, en especial en el área urbana (Cosgrove & Rijsberman, 2014). Se estima que para el 2050, la demanda mundial de agua aumentara un 55%, dado al inminente crecimiento demográfico en las zonas urbanas de los países en vías de desarrollo (OECD, 2012).

Por otro lado, el sector agrícola es el área donde más agua es utilizada. Se estima que aproximadamente el 70% de todas las extracciones de agua dulce a nivel mundial son destinadas para esta actividad (WWAP , 2014) y el 43% de las aguas subterráneas que abastecen de agua potable también son destinadas para la misma (FAO AQUASTAT, 2010). Una mala administración y los ineficientes métodos de cultivo hacen que los acuíferos decrezcan y haya una degradación de los hábitats silvestres, dando como consecuencia la salinización del 20% de la superficie mundial de tierras de regadío (FAO, 2011). Toda el agua utilizada para cada actividad humana termina, en su mayoría, como aguas residuales, las

cuales son una fuente de contaminación para los ecosistemas acuáticos por su contenido de patógenos, compuestos orgánicos, productos químicos, nutrientes y metales pesados (Hena , Fatimah , & Tabassum, 2015). Además, las descargas de efluentes no tratados ha provocado, en su gran mayoría, la eutrofización de las aguas superficiales y las zonas costeras debido a que más de la mitad de los ríos del mundo han sido seriamente contaminados con estas descargas, causando una acumulación de nutrientes afectando altamente su calidad y provocando la reducción de fuentes limpias de agua, y problemas en ámbitos de seguridad alimentaria, medioambiente y la salud pública (SASI Group & Mark Newman, 2006).

La mala gestión ambiental de estas aguas residuales expone a la población mundial a problemas salud que derivan a un retraso en el desarrollo y a un aumento de la pobreza debido a perdidas laborales. En todo el mundo, casi 900 millones personas todavía no tienen acceso a agua potable y unos 2.6 billones, casi la mitad de la población de los países en desarrollo no tiene acceso a un saneamiento adecuado (Corcoran, Nellemann, R., Bos, & Savelli, 2010). Como consecuencia, al menos 1.8 millones menores de 5 años de edad mueren cada año debido al agua; asimismo, unas 2.2 millones de personas mueren cada año por enfermedades diarreicas (Corcoran, Nellemann, R., Bos, & Savelli, 2010).

En países en vías de desarrollo, como es Ecuador, este problema es más evidente; más del 90% de las aguas residuales producidas tienen como destino final ríos, lagos y zonas costeras de alta productividad (UN-Water, 2014). Por ejemplo, en Quito, Ecuador, se estima que la ciudad genera 6500 Ls^{-1} por día de aguas residuales, no hay ninguna planta de tratamiento para las mismas (Business News Americas, 2015). Estas aguas suelen verterse en los cuatro principales ríos de la ciudad: Machángara, Monjas, San Pedro y Guayllabamba. La recuperación de estos ríos es difícil debido a sus estrechas cuencas y la alta concentración de contaminantes (El Comercio, 2010). Actualmente, gracias a los esfuerzos municipales se está construyendo una planta de tratamiento de aguas residuales en el sur de la ciudad en el sector

de Quitumbe. Este proyecto está dirigido a tratar las aguas residuales generadas y depositadas en las 7 corrientes del sector; entre ellas los arroyos Ortega, Monjas y Calicanto. Esta planta tratará 100 L s^{-1} por día equivalente al 2 % de los efluentes generados (El Telégrafo, 2014).

Lo que busca los sistemas de tratamiento de aguas residuales es garantizar la eliminación de la carga de los contaminantes según los requerimientos establecido por la legislación. Entre los contaminantes que se pretenden remover están: sustancias inorgánicas, solidos suspendidos, trazas de metales pesados, DBO, sustancias orgánicas (detergentes/pesticidas), microorganismos patógenos, nitrógeno y fósforo. El tipo de tratamiento utilizado dependerá, principalmente, de la concentración del contaminante y el caudal del efluente (Lopez Valencia, 2013).

Generalmente, las aguas residuales domesticas pasan por un tratamiento primario que busca eliminar mediante sedimentación, aquellas partículas que pueden afectar los procesos subsiguientes. Se estima que alrededor de un 60% de los sólidos volátiles son removidos del agua residual, así como un 40% aproximado del DBO. Al término de este proceso, el agua pasa por otro tratamiento, el secundario, que procura reducir la carga de contaminación orgánica. En este proceso se emplea principalmente procesos físicos y químicos, tales como la filtración, aunque también se suele utilizar procesos biológicos que involucran microorganismos como las bacterias.

Sin embargo, pese a que las aguas residuales domésticas reciben un tratamiento primario y secundario, estas pueden seguir teniendo grandes cantidades de fósforo y nitrógeno, que causan la eutrofización de ríos, lagos y océano (Zhang, et al., 2012). Esto quiere decir que hay un incremento en el crecimiento de plantas acuáticas que originan problemas en la calidad del agua; comienza a existir un decaimiento en la población de peces por falta de comida y un incremento en la turbidez y reducción de la visibilidad debido al crecimiento excesivo de fitoplancton (Abdelaziz, Leite, Belhaj, & Hallenbeck, 2014). Debido a este fenómeno, se han

desarrollado métodos físicos, químicos y biológicos para la eliminación de nutrientes. Entre estos, el uso de microalgas ha demostrado ser una gran alternativa para disminuir los niveles de metales, nitratos y fosfatos (Zahra Mennaa, Arbib, & Perales, 2015).

Las microalgas son un grupo de microorganismos fotosintéticos que tienen 1-50 μm de diámetro y se encuentran en fuentes de agua dulce y salada. Estos microorganismos están involucrados en diversas actividades de balance ecológico para el control de contaminación en el medio ambiente. No solo actúan como removedores de gases del efecto invernadero situados en la atmósfera, pero también pueden ser utilizados para el tratamiento de aguas contaminadas (Jyoti Prakash, Jochen, Chien-Yen, & Prosun, 2014). Esto se debe a que sus procesos metabólicos de microalgas implican mecanismos de recolección, adquisición de carbono mediante la fotosíntesis, asimilación de nitrógeno (N) y fósforo (P) como la formación de metabolitos secundarios únicos utilizados para diferentes aplicaciones (Zhou, 2014). Por esta razón, microalgas no sólo eliminan estos nutrientes del agua, también reciclan el nitrógeno y el fosfato para la producción de nueva biomasa, que podría ser utilizada como una fuente de energía en forma de biocombustible (Beuckels, Smolders, & Muylaert, 2015).

Para lograr su cometido, las microalgas requieren condiciones de cultivos ideales para así mejorar su tasa de crecimiento y la efectividad en su actividad metabólica. Esto dependerá de parámetros primordiales como luz, pH, temperatura y nutrientes. El nitrógeno y el fósforo son nutrientes ideales para el crecimiento de microalgas ya que requieren N y P para producir nueva biomasa. Según Beuckels y otros, la concentración de estos nutrientes en aguas residuales se encuentra entre 15 a 90 mg L^{-1} para el N y entre 4 a 20 mg L^{-1} para el P (Beuckels, Smolders, & Muylaert, 2015). Shen y colaboradores en su estudio “*Characterization of a microalga Chlorella sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production*”, lograron remover el 90% de nitrógeno y fósforo gracias al uso de las microalgas (Shen, y otros, 2015). Del mismo

modo, en el estudio “*Ammonia- nitrogen and orthophosphate removal by immobilized Chlorella sp. Isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment*”, se reportó una remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ del 81-98.9% y de PO_4^{3-}P del 77.4% y 100% usando el género de microalgas *Chlorella sp.* (Endong , y otros, 2012). Otro estudio similar, también demuestra como en condiciones batch, las microalgas puede remover el N y P del agua residual utilizada en un 89.1 y 80.9% (Li, y otros, 2011).

Entre las especies de algas más utilizadas para este tipo de tratamiento se encuentra *Chlorella*. Estas microalgas han probado su habilidad en la remoción de nitrógeno, fosforo y la demanda química de oxígeno (COD), con diferentes tiempos de retención que van desde 10 h hasta 42 días; ya sea, en presencia de bacterias o no, estas han mostrado tener un gran potencial para reemplazar el proceso de lodos activados dentro de tratamientos secundarios o terciarios, debido a su eficaz manera de reducir la concentración de nutrientes y por la producción de biomasa (Liang, y otros, 2010).

En general, las microalgas brindan una alternativa rentable tanto económica como ecológica para esta problemática, dado posee los costos operacionales y de energía bajas, comparados con tratamientos químicos que son más costoso para este tipo de agua; asimismo este proceso no requiere la adición de productos químicos o componentes agresivos (Zahra Mennaa, Arbib, & Perales, 2015), representando un recurso energético sostenible con beneficios ambientales.

2 Objetivos

Evaluar la factibilidad de utilizar microalgas locales para la recuperación de nitrógeno y fósforo en bioensayos batch con agua residual sintética.

2.1 Objetivos Específicos

- a. Generar una curva de calibración entre la densidad celular determinada por el método de conteo con la cámara de Neubauer, y la densidad óptica del cultivo de microalgas.
- b. Evaluar el efecto de la aireación forzada en la capacidad de recuperación de nutrientes de los cultivos de microalgas locales alimentadas con agua residual sintética en bioensayos batch.
- c. Evaluar la capacidad de biorremediación de los cultivos de microalgas locales con diferentes concentraciones de nutrientes en aguas residuales sintéticas en bioensayos batch.

3 Justificación

Las aguas residuales procedentes de las actividades domésticas e industriales contienen una gran cantidad de materia orgánica, metales pesados, sólidos en suspensión, compuestos volátiles, patógenos y otros elementos que, al ser descargadas sin tratamiento previo, conducen a una degradación ambiental (Valencia López, 2013). En países en vías de desarrollo como Ecuador, el 90% de los efluentes domésticos son vertidos directamente sin ningún tipo de tratamiento en cuerpos de agua dulce, alterando su calidad y creando problemas ambientales y afectando a la salud pública.

En América Latina, menos del 6% de la población, tiene un sistema de tratamiento de aguas residuales. En Ecuador, el 6.3 % de las aguas residuales reciben algún tipo de tratamiento, siendo 7% a nivel urbano y el 5% a nivel rural (Moncayo y Ayala, 2011). Cuenca, Manta, Babahoyo y San Cristóbal poseen plantas de tratamiento de aguas servidas. En contraste, Guayaquil y Quito, carecen de tales sistemas, y siguen descargando las aguas residuales no tratadas en los ecosistemas acuáticos. Solo en Quito, aproximadamente el 81% de la contaminación de sus ríos se atribuye a esta actividad, de hecho, casi el 70% del flujo del río Machangara corresponde a aguas residuales no tratadas (Llanos, 2009); (El Comercio, 2010). Desafortunadamente, muy poco se sabe acerca de la calidad de los ríos en el Ecuador, y pocos estudios científicos han sido publicados sobre este tema.

El uso de microalgas para la remoción de nutrientes presentes en las aguas residuales representa una buena alternativa de tratamiento a este problema, dado que estos microorganismos poseen una alta capacidad de remoción de nitrógeno y fósforo; producción de biomasa potencialmente valiosa para la generación de biocombustibles, y costos operacionales relativamente bajos. Por esos motivos, su uso supone una opción sustentable y factible de biorremediación para el Ecuador; tomando en cuenta que las condiciones climáticas, económicas y ecológicas del país son favorables para el crecimiento de microalgas.

4 Área de trabajo

Este trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental (LIA-USFQ) del Colegio de Ciencias e Ingeniería, y en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, en el campus de Cumbayá- Quito. En el LIA-USFQ se evaluaron los parámetros básicos y de operación de los bioensayos batch. Se realizaron los análisis de remoción de nutrientes y las mediciones de densidad celular mediante la utilización de un multiparametros y por espectrofotometría. En el Instituto de Microbiología, se realizó la centrifugación de las muestras obtenidas de los bioensayos batch, para su posterior análisis.

5 Materiales

5.1 Reactivos

Indicador fenolftaleína, cloruro de calcio dihidratado, nitrato de sodio, potasio de hidrogeno fosfato, sulfato de hierro (II), cloruro de zinc, sulfato de cobre (II), sulfato manganeso, glucosa, cloruro de amonio, persulfato de potasio, molibdato de amonio, metavanato de amonio, ácido clorhídrico concentrado, fosfato monopotásico y ácido bórico fueron obtenidos de Reactivos H.V.O , Quito, Ecuador. Por otro lado, el sulfato de magnesio heptahidratada y el carbonato de amonio se adquirieron en Representaciones Vamarth, Quito, Ecuador. Finalmente el Lugol se adquirió en Didacta Reactivos, Quito, Ecuador.

5.2 Medio de cultivo

La composición del agua residual (AR) sintética fue (en mg L^{-1}): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (37.4), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (56.7), $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (297.9), NaNO_3 (6.8), KH_2PO_4 (55.8), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3), ZnCl_2 (0.1), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2), $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (9.3) y H_3BO_3 (0.001). El AR sintética fue previamente esterilizada en un autoclave por un periodo de 15 min a 121 °C.

5.3 Microorganismos

Un cultivo de microalgas locales, *Chorella sp.*, fue donada por la Universidad de las Fuerzas Armadas- ESPE, Quito, Ecuador. Esta cepa se cultivó en un fotobioreactor tubular (PBR) con entrada del flujo de aire ascendente; iluminado con luz fluorescente por fotoperiodo de 12 horas dentro del Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito.

5.4 Bioensayos batch de remoción de nutrientes.

Se empleó 6 Erlenmeyers de 1000 mL, 6 tapas de esponja, un shaker orbital alternativo (MAX-Q 2508 Barnstead LabLine, USA), una lámpara OSRAM de luz fluorescente blanca fría de 20 W, timer manual (TN311 Intermatic, México), centrifuga clínica de 50 mL (International Equipment Company, USA). En el caso de los bioensayos con aireación forzada adicionalmente se empleó 3 bombas de pecera (Power™ 200, Taiwan), 6 metros de manguera, 3 Ts metálicas y 6 dispersores de pecera.

5.5 Técnicas de análisis

5.5.1 Equipos comunes

Balanza de precisión (Mettler-Toledo International Inc, USA), agitador magnético (Fisher Scientific, United Kingdom), pipeta BioPette 1-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL y 1-5 mL (Labnet International Inc., USA) y multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA 01915, USA).

5.5.2 Medición de amonio

Electrodo de referencia (Thermo Specific, Orion (Beverly, MA 01915, USA)), electrodo selectivo de amonio (Thermo Specific Ion Selective Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA)) y solución de ajuste de fuerza iónica de amonio (ISA amonio).

5.5.3 Medición de nitrato

Electrodo selectivo de nitrato (Thermo Specific Ion Selective Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA)) y solución de ajuste de fuerza iónica de nitrato (ISA nitrato) (Thermo Scientific Nitrate ISA, Orion 930711 (Beverly, MA 01915, USA)).

5.5.4 Medición de fosfato

Equipo de filtración (kitasato y mangueras), bomba de presión al vacío (Thermo Scientific 420-1901-00FK Vacuum pressure pump (Beverly, MA 01915, USA)), horno (40 GC Lab Oven, Chicago, Illinois, USA), trío de pH (Thermo Specific pH Electrodo, Orion (Beverly, MA 01915, USA)), y espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA).

5.5.5 Medición de potencial Redox

Trío de potencial redox (Thermo Specific ORP triode, Orion (Beverly, MA 01915, USA)) y estándar de potencial redox (Thermo Scientific ORP Standard, Orion 967901 (Beverly, MA 01915, USA))

5.5.6 Medición de pH

Trío de pH (Thermo Specific pH Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA)) y buffers de calibración (pH 4, 7 y 10) (Thermo Scientific (Beverly, MA, 01915, USA)).

5.5.7 Medición de oxígeno disuelto y temperatura

Electrodo de oxígeno disuelto (Thermo Specific Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA)).

5.5.8 Medición de conductividad

Electrodo de conductividad (Thermo Specific Electrode, Orion (Beverly, MA 01915, USA)) y solución de calibración de $1413 \mu\text{s cm}^{-1}$ (Thermo Scientific Conductivity/TDS Standard, Orion 011007 (Beverly, MA, 01915, USA)).

5.6 Determinación de la densidad celular

Microscopio (Leica CME, Germany), cámara de recuento Neubauer de 1/10 mm (Boeco, Germany), contador de células (Tamaco, Taiwan), Vortex Denville 59A (Denville Scientific Inc., USA) y espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA).

6 Métodos

6.1 Bioensayos de recuperación de nutrientes

Se preparó 6 L de agua residual sintética con el objetivo de simular la composición de las aguas residuales domésticas generadas en Quito. A continuación, se colocó 1000 mL del agua sintética auto clavada a 121 °C por 15 min, en 6 Erlenmeyer de 1 L para evaluar la recuperación de nutrientes en bioensayos: tratamiento, control abiótico y control heat killed que fueron realizados por duplicado. Los ensayos tratamiento fueron inoculados con 8-10 mL aproximadamente de microalgas para obtener una densidad celular inicial de 3.5×10^6 UFC mL⁻¹. Adicionalmente, se montaron dos tipos de controles, un control abiótico (sin microalgas) y un control heat killed (con 8-10 mL de microalgas autoclavadas a 121°C por 15 min.) con el objetivo de demostrar que la remoción de nutrientes fue efectivamente catalizada por las microalgas. Los bioensayos fueron realizados por duplicado y fueron incubados en un agitador orbital (Q MAX 2508 Barnstead LabLine, USA) a 100 rpm a temperatura ambiente (23±3°C). Los bioensayos fueron iluminados con lámparas fluorescentes tubulares (OSRAM, 20W) con fotoperíodos de 12 horas durante 17 días. En el caso de los bioensayos batch con aireación forzada, se incorporó un sistema de bombas de pecera, con una capacidad de 500 L h⁻¹, para proporcionar un flujo de aire a cada uno de los 6 Erlenmeyers.

6.2 Métodos Analíticos

Se tomó una muestra de 90 mL de los bioensayos para realizar el análisis de recuperación de nutrientes y densidad celular. Las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos y solamente el sobrenadante fue utilizado para cada análisis. Cada dos días, los parámetros analizados fueron NH₄⁺-N, NO₃⁻-N and PO₄³⁻-P, en contraste con pH, temperatura, oxígeno disuelto, conductividad y potencial redox, que se midieron diariamente.

Los protocolos a seguir fueron establecidos por el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la USFQ, de acuerdo con los Métodos Estándares de Examinación para Agua y Agua Residual (APHA, 2012).

6.2.1 Medición de amonio y nitrato

La medición de amonio y nitrato se realizó empleando un multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA 01915, USA) con electrodos selectivos de amonio y electrodo de referencia y nitrato, respectivamente. se prepararon estándares a partir de una solución madre de $1000 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ con carbonato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, y de una solución madre de $100 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$ con nitrato de sodio NaNO_3 , respectivamente. Se realizaron curvas de calibración de $1\text{-}1000 \text{ mg NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$ y de $10\text{-}100 \text{ mg NO}_3^- \text{ L}^{-1}$. Se tomó 10 mL de los estándares centrifugados y se añadió 1 mL de ISA de amonio y 0.200 mL ISA de nitrato, respectivamente. El potencial fue medido en mV, se generó una curva de calibración y se obtuvo la ecuación de la recta con $R^2 > 0.99$. Las muestras fueron analizadas de la misma manera y a partir de la curva de calibración se determinó la concentración de amonio y nitrato de cada una de las muestras. El análisis se realizó por duplicado.

6.2.2 Medición de fósforo

Se realizó una evaluación colorimétrica a una longitud de onda de 470 nm con un espectrofotómetro, Spectronic 20D+. La curva de calibración se realizó con estándares de 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg P L^{-1} , a partir de una solución madre de 50 mg P L^{-1} con fósforo monopotásico KH_2PO_4 , y la adición del reactivo vanadato molibdato. Se filtró 20 mL de cada muestra con filtros de papel absorbente y filtros Whatman, y se colocó una gota del indicador de pH fenolftaleína. A continuación, se colocó 0.2 g de persulfato de potasio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) y se llevó las muestras a digestión a $150 \text{ }^\circ\text{C}$ durante una hora en un horno 40 GC

Lab Oven. Una vez frías las muestras, se agregó agua destilada hasta alcanzar los 20 mL de la muestra inicial. Nuevamente, se colocó una gota del indicador de fenolftaleína y se comprobó que el pH no supere el valor de 10. En balones de 25 mL, se colocó 5 mL del reactivo vanadato molibdato, 6 mL de las muestras procesadas en el horno y se aforó con agua destilada. Se tomó 6 mL de las muestras aforadas para realizar evaluación colorimétrica. La concentración de fosfatos de cada muestra se calculó utilizando la curva de calibración antes descrita. El análisis se realizó por duplicado.

6.2.3 Medición de parámetros básicos de operación.

El pH, oxígeno disuelto (OD), temperatura, potencial redox (ORP) y conductividad, fueron medidos con el multiparámetro portátil Thermo Scientific Orion 5-Star (Thermo Scientific, Beverly, MA 01915, USA). Estos parámetros fueron monitoreados a diario, en condiciones *in situ*, y por duplicado.

6.3 Medición de densidad celular

Se desarrolló una curva de calibración que describe la relación matemática entre dos métodos de medición de densidad celular, conteo celular en cámara de Neubauer y densidad óptica. En primer lugar, a partir de muestra homogénea de *Chlorella sp.* se preparó diluciones de 20mL (por duplicado), con los siguientes factores de dilución: 0.1, 0.25, 0.5 y 0.75.

Para el método de conteo celular con la cámara de Neubauer, se diluyó 40 μL de cada muestra en 160 μL de lugol para inmovilizar las células. Posteriormente, se colocó 10 μL de la mezcla a cada lado de una cámara de conteo Neubauer. Con un microscopio compuesto LEICA CME, se procedió a realizar el conteo celular con un aumento de 40x. Finalmente, empleando la ecuación 1, para obtener la densidad celular.

$$\text{Densidad celular } [\# \text{ células mL}^{-1}] = \text{promedio de } \# \text{ células} \times \text{factor de dilucion} \times 10^4 \text{ [1]}$$

Por otro lado, la densidad óptica se determinó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 750 nm, usando 6 mL de cada muestra. Con los valores resultantes, se generó la curva de calibración deseada.

7 Resultados

7.1 Curva de calibración entre la densidad celular y la densidad óptica

Una curva de calibración fue construida entre la densidad celular de microalgas a por el método de la cámara de Neubauer y la densidad óptica (absorbancia) como se muestra en la *Figura 1*. El coeficiente de correlación de la curva de calibración fue 0.996, y la recta resultante se describe por medio de la siguiente ecuación:

$$y = 2E^{+07}x + 251947 \quad [2]$$

Donde y es la densidad celular de las microalgas, y x es la absorbancia establecida a 750 nm. Se utilizó la *ecuación 2* para determinar la densidad celular en los posteriores bioensayos batch a partir de las mediciones de absorbancia.

7.2 Efectos de la aireación forzada en la capacidad de remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.

La capacidad de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ de microalgas locales se evaluó empleando agua residual doméstica sintética en bioensayos batch. En las *Figuras 2 (A) y (B)* se presenta la remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ en bioensayos batch con aireación y aireación forzada durante un periodo de 336 horas. La eficiencia de remoción reportada de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ con aireación forzada fue de 57 y 9%, cuando la concentración inicial de ambos nutrientes fue de 46.90 mg N L⁻¹ y 10.82 mg P L⁻¹, respectivamente. En contraste, la eficiencia de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ obtenida en los bioensayos batch con aireación fue de 53 y 74%, con una concentración inicial de 79.92 y 13.92 mg L⁻¹ de nitrógeno y fósforo, respectivamente.

Adicionalmente, en los bioensayos batch se evaluó la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ (*Figura 2C*). Se registró una eficiencia en la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ del 37% cuando la concentración

inicial fue de 2.37 mg N L^{-1} al aplicarse aireación forzada. Por otro lado, la eficiencia en la producción de $\text{NO}_3^- \text{-N}$ con aireación fue del 87% cuando la concentración inicial fue de 3.88 mg N L^{-1} . En la *Tabla 1* se presentan las tasas y eficiencias de remoción de $\text{NH}_4^+ \text{-N}$ y de $\text{PO}_4^{3-} \text{-P}$ y la eficiencia y tasa de producción de $\text{NO}_3^- \text{-N}$. Por otro lado, en la *Tabla 2* se encuentra el análisis estadístico ANOVA para ver la significancia entre los bioensayos de aireación y aireación forzada, donde se obtuvieron valores P de 0.8921, 0.4280, y 0.004 respecto a las tasas de remoción y producción de los nutriente estalecidos anteriormente.

La concentración inicial de microalgas en los dos bioensayos fue calculada con la *Ecuación 2*. El valor inicial obtenido, en la aireación forzada, fue de 3.43E^{+06} células mL^{-1} mientras que el valor máximo de densidad celular obtenido fue 4.98E^{+06} células mL^{-1} . Por otra parte, la densidad inicial en los bioensayos batch con aireación fue de 3.43E^{+06} células mL^{-1} y la densidad máxima obtenida fue de 7.35E^{+06} células mL^{-1} . En la *Figura 3* se presenta el crecimiento de las microalgas con respecto al tiempo expresado en células mL^{-1} en los ensayos batch aireados y en los realizados con aireación forzada.

El pH inicial para los bioensayos batch de aireación y aireación forzada de remoción de nutrientes estuvo en el intervalo entre 8.7- 7.9, respectivamente. Durante las 336 horas de operación, el pH del control abiótico y del control heat killed no mostró fluctuaciones significativas; el rango de pH se mantuvo entre 9.1- 7.9. Sin embargo, los bioensayos correspondientes a los tratamientos para la remoción de nutrientes mostraron un descenso del pH, alcanzando valores de 5.0 en los bioensayos de aireación, y de 5.4 en los bioensayos con aireación forzada. Del mismo modo, para ambos bioensayos, tanto la conductividad del control abiótico como la del heat killed tuvieron una variaciones entre 280 y 520 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Por otro lado, los tratamientos aireados registraron una conductividad inicial de 428.2 $\mu\text{S cm}^{-1}$, y una final de 281.7 $\mu\text{S cm}^{-1}$. En el caso de los tratamientos con aireación forzada, la conductividad inicial fue de 475.7 $\mu\text{S cm}^{-1}$ y la final fue de 398.9 $\mu\text{S cm}^{-1}$. En todos los

bioensayos, se evidenció un descenso de la conductividad. Respecto al potencial redox, todos los bioensayos registraron fluctuaciones significativas en los tratamientos. El rango de variación estuvo entre 180- 460 mV para los de aireación y 310-510 mV en los de aireación forzada. En contraste, los controles abiótico y heat killed de ambos bioensayos, se mantuvieron constantes entre los 292.2 y 396.2 mV. Por otra parte, la temperatura se mantuvo constante en un rango de 23.0 – 26.3 °C, tanto para los bioensayos de aireación como los de aireación forzada. Finalmente, el oxígeno disuelto medido en los bioensayos presentó variaciones que oscilaron entre 4.77- 5.24 mg L⁻¹ para aireación y 3.72- 9.17 mg L⁻¹ para aireación forzada, respectivamente.

Adicionalmente, se realizó una correlación múltiple entre densidad celular “DC” y los parámetros operacionales; y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \log DC = & (8.2348 \mp 0,0529) - (0.1086 \mp 0.0016)pH - (2,5350E^{-4} \mp 0,9236E^{-4})NH_4^+ \\ & - N - (0.2231 \mp 0,0021)OD - (0.0216 \mp 0,0016)T^\circ C \\ & - (3.7959E^{-4} \mp 0,2046E^{-4})ORP \quad [3] \end{aligned}$$

Donde se sacó un factor de coeficiente de correlacion R de 0.99998.

7.3 Efecto de la concentración inicial de nitrógeno en la remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.

La capacidad de remoción de NH₄⁺-N y PO₄³⁻-P de las microalgas locales variando la concentración inicial de amonio fue evaluada en bioensayos batch aireados por un tiempo de operación de 336 horas. Las microalgas reportaron porcentajes de remoción de NH₄⁺-N de 53, 48, y 57%, para concentraciones iniciales de 86.81, 43.41, y 21.70 mg L⁻¹, respectivamente. En la *Tabla 3* se puede observar que para una concentración del 25% de NH₄⁺-N del agua residual sintética (21.70 mg L⁻¹) hay una mayor remoción del nutriente en comparación con concentración del 100 y 50% (86.81 y 43.41 mg L⁻¹) con respecto a la composición del agua

residual sintética. Por otro lado, la eficiencia de remoción de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ fue de 74, 16 y 31% cuando la concentración inicial fue 13.92, 14.07, y 15.08 mg L^{-1} , respectivamente. La mayor eficiencia de remoción del fósforo (74%) se obtuvo cuando la concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fue de (86.81 mg L^{-1}) representando el 100% respecto a la recta de agua residual sintética. Por otro lado, las tasas de remoción $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ fueron 0.101, 0.032, 0.047 $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y 0.030, 0.0117, 0.0121 $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente para las concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ evaluadas que corresponden al 100, 50, y 25%.

Por otro lado, en la *Tabla 3*, la eficiencia en la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ fue de 88, 36 y 36% con concentraciones iniciales de 3.88, 2.33, y 3.32 mg L^{-1} , respectivamente. La mejor eficiencia se reportó cuando la concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fue del 100% (86,81 mg L^{-1}) respecto a la recta de agua residual. Las tasas de producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 0.075, 0.0029, 0.0028 $\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para las diferentes concentraciones evaluadas en estos bioensayos.

Adicionalmente en la *Tabla 4* se encuentra el análisis estadístico ANOVA para los bioensayos de variación inicial de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ que determinó la significancia de las tasas de remoción y producción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, y $\text{NO}_3^-\text{-N}$, donde se obtuvo un valor P de 0.3441, 0.3835, y 0.0458, respectivamente.

En relación con la densidad celular, los bioensayos iniciaron con una concentración de microalgas de 3.43E^{+06} , 3.53E^{+06} , y 3.51E^{+06} células mL^{-1} , respectivamente. Al pasar el tiempo, las concentraciones de 100 y 50% (86.81 y 43.41 mg L^{-1}) registraron un aumento de su densidad hasta el final de los bioensayos. Los valores finales alcanzados fueron del 7.35E^{+06} y 4.53E^{+06} células mL^{-1} para ambas concentraciones. Por otro lado, en la concentración de 25% (21.70 mg L^{-1}), a las 192h se alcanzó una densidad máxima de 4.19E^{+06} células mL^{-1} antes de estabilizarse y decaer como se observa en la *Figura 4*.

Finalmente, el pH inicial para los bioensayos batch aireados con distintas concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ entre 7.7- 9.1. Durante las 336 horas de operación, el

pH del control abiótico y del control heat killed se mostró relativamente constante, en un intervalo de 7.0 y 9.1. Por otro lado, los tratamientos de remoción de nutrientes mostraron un descenso en su pH, alcanzando valores entre 5.0 y 5.62. La conductividad inicial para los tratamientos con 25% (21.70 mg L⁻¹), 50% (43.41 mg L⁻¹), y 100% (86.81 mg L⁻¹) de NH₄⁺-N fue de 308.1, 338.6, y 428.2 μS cm⁻¹, respectivamente. Mientras que, su conductividad final fue de 348.7, 339.7 y 281.7 μS cm⁻¹. Los controles abióticos y los controles heat killed registraron variaciones significativas en su conductividad, situándose entre 283.8 y 504.3 μS cm⁻¹. Solo en el bioensayo de 100% (86.81 mg L⁻¹) de NH₄⁺-N, se evidenció en el tratamiento un descenso de la conductividad hasta el final. Los tratamientos de los bioensayos de 25% (21.70 mg L⁻¹) y 50% (43.41 mg L⁻¹), por otro lado, se mantuvieron relativamente constantes. Respecto al potencial redox, todos los bioensayos registraron oscilaciones, tanto en los tratamientos como en los controles. El rango de variación estuvo entre 170-545 mV. La temperatura, no obstante se mantuvo relativamente constante en un rango de 21.3- 25.5 °C. Finalmente, en los tratamientos con 25, 50, y 100% de NH₄⁺-N, el oxígeno disuelto inicial fue de 3.15, 4.04 y 4.77 mg L⁻¹; mientras que el valor final de OD fue 4.48, 5.08 y 5.24 mg L⁻¹, respectivamente. Por otro lado, tanto los controles abióticos como heat killed tuvieron valores iniciales como finales de OD entre 3.78 y 5.99 mg L⁻¹.

8 Discusión

8.1 Curva de calibración entre la densidad celular y la densidad óptica.

En este proyecto de investigación se generó una curva de calibración entre la densidad óptica y la densidad celular establecida a través del conteo celular con microscopio, con el fin de establecer la concentración de microalgas a lo largo del estudio a partir de las mediciones de absorbancia. El coeficiente de determinación fue de 0.996, lo que implica que existe una relación lineal entre la concentración celular de microalgas y la absorbancia. Esto es de esperarse, dado que la densidad óptica mide la absorbancia del contenido de *clorofila a* en las microalgas (Griffiths, Garcin, van Hille, & Harrison, 2011). Además, se utilizó una longitud de onda de 750 nm, que está fuera del rango de absorbancia de los otros microorganismos como bacterias, que se miden entre 600 y 700 nm (Griffiths, Garcin, van Hille, & Harrison, 2011).

8.2 Efectos de la aireación forzada en la capacidad de remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.

Las eficiencias de remoción de nitrógeno y fosforo de las microalgas varían dependiendo de la composición del medio y las condiciones ambientales tales como la concentración inicial de nutrientes, la relación nitrógeno/fosforo, el ciclo luz/oscuridad, la aireación, entre otras. En este estudio, se evaluaron los efectos de una aireación forzada en la eficiencia de remoción de nutrientes en bioensayos batch por un periodo de 336 horas. La eficiencia de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ bajo condiciones de aireación y aireación forzada fue 53 y 57%, respectivamente (*Tabla 1*). Las eficiencias de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ alcanzadas en el estudio son similares a las de otros estudios relacionados con aireación forzada. Por ejemplo, Aslan y Kapdan en el 2006 reportaron una remoción de 50% del $\text{NH}_4^+\text{-N}$ cuando la

concentración inicial fue de 41.8 – 92.8 mg L⁻¹. No obstante, la eficiencia de remoción de NH₄⁺-N obtenida en condiciones de aireación fue menor a la alcanzada en otros estudios. Liu y colaboradores en estudios realizados en el 2016, con cepas de *Klebsormidium sp.*, *Stigeoclonium sp. LJ*, *Stigeoclonium sp. LJ2*, y un consorcio compuesto por *Chlamydomonas* (8%), *Chlorella* (67%) y varias cianobacterias filamentosas (25%), reportaron eficiencias de remoción de NH₄⁺-N del 59, 79, 99, y 89%, respectivamente (Liu, Danneels, Vanormelingen, & Vyverman, 2016).

En el caso de la remoción de PO₄³⁻-P, los bioensayos con aireación forzada presentaron una eficiencia de remoción solamente del 9%, en comparación a los bioensayos con aireación que tuvieron un 74% de eficiencia. Esta baja eficiencia, también ha sido reportada en otros estudios de la literatura. Un estudio con *Chlorella kessleri*, se obtuvo entre 8-20% de remoción de fósforo cuando la concentración inicial de PO₄³⁻-P fue de 10 mg L⁻¹ (Aslan & Karapinar Kapdan, 2006) Por el contrario, también se han reportado remociones de PO₄³⁻-P del 94 - 98% con aireación, y del 97- 98% con aireación forzada a un rango de temperatura de 20-30 °C (Martinez, Sanchez, Jimenez, Yousfi, & Muñoz, 2000). Una de las posibles razones para los resultados obtenidos es la ausencia de zonas de sedimentación, lo que causa que no haya precipitación del fosforo, llevando a una menor asimilación del fosfato por parte de las microalgas (Larsdotter, 2006).

Las tasas de remoción obtenidas en el presente estudio fueron de 0.0821 mg NH₄⁺-N L⁻¹ h⁻¹ y 0.0325 mg PO₄³⁻-P L⁻¹ h⁻¹ respectivamente, para condiciones de aireación. Por otro lado, con aireación forzada, las tasas de remoción de NH₄⁺ y PO₄³⁻-P obtenidas fueron 0.0422 y 0.0019, respectivamente. Los valores obtenidos en los bioensayos de aireación forzada son menores a los registrados en otros estudios. Lau y colaboradores reportaron tasas de remoción de N entre 0.0525 y 0.336 L⁻¹ h⁻¹ y de P de 0,0175 L⁻¹ h⁻¹ para *Chlorella vulgaris* (Lau, Tam, & Wong, 1998). Del mismo modo, en otro estudio se reportó altas tasas de remoción para

ambos nutrientes (N y P) al usar *S. intermedius* y *Nannochloris sp.*; los valores obtenidos fueron 83 y 56.1 mg N L⁻¹ d⁻¹ y 20.8 y 10.2 mg P L⁻¹ d⁻¹, respectivamente (Jiménez-Pérez, Sánchez-Castillo, Romera, Fernández-Moreno, & Pérez-Martínez, 2004). Por otro lado, las tasas de producción de NO₃⁻-N obtenidas en el presente estudio fueron de 0.0771 mg L⁻¹ h⁻¹ con aireación y 0.032 mg L⁻¹ h⁻¹ con aireación forzada. Asimismo, las eficiencias de producción para los bioensayos de aireación y de aireación forzada fueron 87 y 37%. Se evidenció, como en los casos de remoción, que la aireación fue mejor recibida por las microalgas.

Estos resultados sugieren al flujo de aire administrado pudo afectar la eficiencia como la tasa de remoción de N y P en nuestro estudio. Un estudio con *Scenedesmus obliquus* ha reportado una remoción de N del 80-100% si se suministra al bioensayo un flujo constante de aire (mediante burbujas) de 9.6 L h⁻¹ (Martínez, Sánchez, Jiménez, Yousfi, & Muñoz, 2000). Para nuestro estudio, pese a que el flujo de aire se mantuvo aproximadamente entre 5- 10L h⁻¹, este pudo ser un factor limitante, en especial en la remoción de fósforo, donde realmente se evidenció efectos negativos.

Hay que tomar en cuenta que la aireación incrementa las concentraciones de oxígeno disuelto y de carbono en el medio algal. Los niveles de CO₂ en el medio se deben mantener sobre los requerimientos nutricionales mínimos y bajo los niveles inhibitorios. Si excede estos límites, puede darse una insuficiente transferencia de CO₂ a las células y una escasa remoción de O₂; esto tendrá efectos negativos en la fase exponencial de crecimiento de las microalgas (Guo, Yao, & Huang, 2015), como se pudo evidenciar en nuestro estudio (ver *Figura 3*) y por ende en la capacidad de asimilación de los nutrientes. Por otra parte, una acumulación de O₂ puede ser otro efecto negativo de la aireación forzada; si los niveles de O₂ superan los límites de toxicidad, estos pueden disminuir la actividad enzimática extracelular, y afectando la capacidad fotosintética de las mismas (Christenson & Sims, 2011).

En este estudio, también se evaluó la densidad celular en los bioensayos con aireación y con aireación forzada mediante el uso de la curva de calibración previamente establecida. Se pudo apreciar un incremento de la densidad celular, en especial los bioensayos sin aireación forzada, como se observa en la *Figura 3*. En estos bioensayos se alcanzó una densidad final de $7.35E^6$ células mL^{-1} cuando la densidad inicial fue de $3.43E^6$ células mL^{-1} . Sin embargo, para los bioensayos de aireación forzada, no hay un aumento significativo en la densidad celular. La densidad final registrada fue de $4.98E^6$ células mL^{-1} al iniciar con una concentración de microalgas de $3.43E^6$ células mL^{-1} . Esto se puede atribuir probablemente a la fuente de carbono inorgánico (CO_2) que desempeñó un papel importante en densidad celular de los bioensayos de aireación y aireación forzada. Pese a que la literatura recomienda administrar una fuente extra de CO_2 para optimizar el crecimiento, un excedente del mismo puede elevar los valores de oxígeno disuelto hasta sobrepasar los niveles de saturación del aire (7.2 mg L^{-1}), provocando un posible daño foto-oxidativo de las microalgas, impidiendo que proliferen (Christenson & Sims, 2011). Este fenómeno se evidenció a las 240 horas de operación en los bioensayos de aireación forzada, donde hubo un declive de la densidad celular que coincide con un OD de 9.1 mg L^{-1} . La temperatura no fue un limitante en el crecimiento algal ya se mantuvo en un rango óptimo entre 23 y $26 \text{ }^\circ\text{C}$ (Park, Craggs and Shilton 2011). De igual manera, la intensidad de la luz tampoco generó una afectación en la tasa máxima de crecimiento de algas ya que se contó regulación automatizada de la luz.

El pH de los bioensayos de aireación versus aireación forzada presentó pequeñas oscilaciones mencionadas en la sección anterior. En este estudio, el pH de los tratamientos en ambos bioensayos disminuyó considerablemente, quedando entre un rango de 5 - 5.4 . Se debe tomar en cuenta que el pH del medio alcanzado puede afectar varios procesos bioquímicos asociados al crecimiento de las microalgas, así como también sus rutas metabólicas. Tanto la biodisponibilidad del CO_2 para la fotosíntesis como la disponibilidad y consumo de nutrientes

(Park, Craggs, & Shilton, 2011) pueden verse afectados. La disminución de pH del estudio se le puede atribuir a la fuente de nitrógeno utilizada; cuando el amonio es usado como fuente de nitrógeno, el pH del medio puede disminuir hasta 3, causando una acidificación del mismo, y puede inhibir el crecimiento de las microalgas (Park, Craggs, & Shilton, 2011). Respecto a la temperatura, esta se mantuvo entre los 23 y 26 °C, es decir dentro de los rangos óptimos establecidos por la literatura. En general, para la mayoría de especies de microalgas, el rango de temperatura óptima está entre 15 - 25 °C y 28- 35 °C, respectivamente (Larsdotter, 2006); (Park, Craggs, & Shilton, 2011). Sin embargo, este puede variar cuando la disponibilidad de nutrientes o condiciones de luz es limitada. El OD, varió considerablemente durante el estudio; se registró un OD entre 4.7 -5.2 mg L⁻¹ para los bioensayos de aireación. Sin embargo, se registró una gran variación del OD en los bioensayos batch con aireación forzada con valores entre los 3.7- 9.2 mg L⁻¹, superando la saturación de aire normal, y provocando un posible impacto negativo en la productividad de las microalgas, al causar inhibir actividad fotosintética (Christenson & Sims, 2011). Adicionalmente esto provocó limitaciones en la remoción de nutrientes y producción de biomasa dentro del estudio. El potencial redox, por otro lado, registró oscilaciones entre los 180-510 mV para ambas variables. Finalmente, la conductividad de ambos controles, abiótico y heat kill, se mantuvo relativamente constante ondulando entre los 280 y 520 μS cm⁻¹, así como los tratamientos de remoción de nutrientes de todos los bioensayos se mantuvo entre 280-480 μS cm⁻¹. En general, la conductividad de los tratamientos mostró una tendencia a decrecer a lo largo del tiempo, especialmente en el tratamiento con aireación, que alcanzó un valor final de 281,7 μS cm⁻¹. Esta reducción de la conductividad se debe a la disminución de los electrólitos disueltos en el agua residual sintética, por acción de las microalgas.

Por otro lado, se realizó una regresión lineal múltiple con el programa Origin 8.0, para establecer la manera en la que están correlacionados los diferentes parámetros que fueron

medidos en los experimentos con aireación. En primer lugar, se realizó una matriz de correlación de Pearson entre las variables independientes con la finalidad de eliminar los efectos de colinealidad entre estas, estableciendo que un valor de coeficiente de correlación de Pearson mayor a 0.805 entre dos variables independientes muestran que estas son colineales. Seguidamente, se estableció la densidad celular sería nuestra variable dependiente y los parámetros de pH, $\text{NH}_4^+\text{-N}$, temperatura, oxígeno disuelto y potencial redox las variables independientes. Como se muestra en la *ecuación 3*, existe una correlación lineal múltiple ($R=0.99998$) donde se muestra que los valores de las pendientes son todas negativas, y mayor valor absoluto fue encontrado para el caso del pH, OD, y temperatura, siendo los valores 0.1086, 0.0223, y 0.0216, respectivamente. Estos resultados indican que el pH afecta notablemente el crecimiento algal, donde al disminuir el pH aumenta la densidad celular, lo cual indica que es necesario controlar el pH durante la realización de los experimentos. Para el caso de los experimentos con aireación forzada no se encontró ningún tipo de correlación.

Adicionalmente, el análisis estadístico ANOVA mostró que tanto para los bioensayos de aireación como los de aireación forzada, no hay evidencia estadística para decir que existe una diferencia significativa en la media de las tasas de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$. Esto indica que la aireación y la aireación forzada no tienen una diferencia significativa en la remoción de ambos nutrientes, reflejados en los valores P de 0.8921 ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) y de 0.4280, como se muestra en la *Tabla 2*. Por otro lado, sí se encontró evidencia estadística en el caso de la tasa de producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$. Existe una diferencia significativa en la media de las tasas de producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, implicando que la aireación tiene una influencia significativa en esta tasa en comparación a la aireación forzada.

8.3 Efecto de la variación de concentración inicial de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en la remoción de nutrientes de las cepas de microalgas locales.

El efecto de la concentración inicial de nitrógeno en la remoción de nutrientes en las cepas de microalgas locales, también fue evaluado en bioensayos batch por un periodo de 336 horas. Como se muestra en la *Tabla 2*, las eficiencias de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ para concentraciones iniciales de 86.81 [100%], 43.41 [50%], y 21.70 [25%] mg L^{-1} fue 53, 48, y 57%, respectivamente. Estos valores son comparables con los obtenidos en otros estudios, donde la variación de la concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en los bioensayos fue similar. En el 2006, Aslan y Kapdan, obtuvieron una remoción total del $\text{NH}_4^+\text{-N}$, cuando su concentración inicial fue entre 13.2 y 21.2 mg L^{-1} ; sin embargo, solo obtuvieron una remoción aproximadamente del 50% cuando la concentración del medio estaba entre 41.8 y 92.8 mg L^{-1} .

Respecto a la remoción de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, en nuestro estudio, se mostró una remoción del 74, 16 y 31% cuando la concentración inicial fue 13.92, 14.07, y 15.08 mg L^{-1} , respectivamente. Por otro lado, al comparar el estudio de Aslan & Karapinar Kapdan del 2006 con el estudio presente, el primero registro una mayor remoción de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ (78%) cuando la concentración de fósforo fue de 7.7 mg L^{-1} , mientras que a concentraciones mayores, la eficiencia remoción se reduce hasta un 30%. Es decir, que hubo una mejor remoción del fósforo cuando las concentraciones iniciales del nutriente son menores. Sin embargo, en nuestro estudio no se varió considerablemente la concentración inicial de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$. Lo que se puede inferir de los resultados es que las microalgas prefirieron consumir en mayor cantidad el $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ cuando las concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ son 100% (86.81 mg L^{-1}).

Asimismo, las tasas de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ disminuyeron el momento de variar las concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ en los bioensayos. Para las concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ del 100, 50, 25%, las tasas de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ fueron 0.101, 0.032 y 0.047 $\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$ respectivamente; mientras que las tasas de remoción de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ fueron de

0.03, 0.0117 y 0.0121 mg L⁻¹ h⁻¹. Al disminuir la fuente de nitrógeno, tanto las eficiencias como las tasas de remoción también disminuyen, lo que quiere decir que la fuente de nitrógeno es un limitante para el desempeño metabólico de las microalgas. Esto también se evidencia en otros estudios de la literatura; Wang y colaboradores, en el 2014, obtuvieron las tasas de remoción de N de 1.9 y 4.4 mg L⁻¹ d⁻¹ para *Micractinium sp.* cultivadas en aguas residuales de efluentes primarios ([TN]_o = 36.1 mg L⁻¹) y aguas residuales de alta resistencia ([TN]_o = 197 mg L⁻¹). Del mismo modo, con la especie de algas verdes, *Chlorella sp.*, se obtuvieron las tasas de remoción de N de 1.8 y 3.8 mg L⁻¹ d⁻¹, respectivamente. Estos resultados muestran claramente que una concentración inicial alta de N conlleva a una mayor tasa remoción (Wang, Kuo-Dahab, Dolan, & Park, 2014).

También se tomó en cuenta las tasas y eficiencias en la producción de NO₃⁻-N para las diferentes concentraciones evaluadas. Como se observa en la *Tabla 3*, hay una mayor producción de NO₃⁻-N cuando la concentración de inicial de NH₄⁺-N es 86.81 mg L⁻¹, es decir del 100%. A medida que hay una disminución de la concentración inicial de NH₄⁺-N, las tasas de producción de NO₃⁻-N son menores, y también la eficiencia de producción disminuye. Si se compara los valores de las tasas de remoción NH₄⁺-N y las tasas de producción de NO₃⁻-N (ver *Tabla 3*), se puede observar claramente que los tratamientos con 25 y 50% de NH₄⁺-N (43.41, y 21.70 mg L⁻¹) no muestran un cambio significativo en la concentración de nitrato. Este fenómeno se pudo dar por el consumo del nitrato cuando la concentración de amonio se encuentra limitada (Rowley, 2010). Pese que las microalgas prefieren consumir NH₄⁺ como fuente de N al ser una fuente energética más eficiente y que requiere menor uso de energía para ser consumido, las microalgas pueden utilizar también el NO₃⁻-N como una fuente alterna.

Respecto al análisis estadístico ANOVA se concluyó que la variación en la concentración inicial de NH₄⁺-N, no posee una diferencia significativa en la media de las

tasas de remoción de NH_4^+ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, pero si en la medio de las tasas de producción de NO_3^- -N al tener un valor P menor a 0.05 (ver *Tabla 4*). Esto quiere decir que la concentración iniciales de NH_4^+ influye significativamente en la tasa de producción de NO_3^- -N.

Asimismo, para estos bioensayos se evaluó la densidad celular mediante el uso de la curva de calibración previamente establecida. En los bioensayos con las concentraciones de 100 y 50%- NH_4^+ -N (86.81 y 43-41 mg L^{-1}), la densidad celular sigue una tendencia exponencial hasta el final de los bioensayos. Por otro lado, en los bioensayos de 25% de concentración (21.70 mg L^{-1}), a las 192h se obtuvo una densidad máxima de 4.19E^{+06} células mL^{-1} antes de entrar a la fase estacionaria y de declive (ver *Figura 5*). Este fenómeno se puede dar ya que tanto el nitrógeno como el fosforo son nutrientes esenciales para el desarrollo metabólico de las microalgas. Cualquier cambio en las concentraciones de estos nutrientes influye en la producción y composición bioquímica de la biomasa. Cuando el N o P están limitados, el contenido de proteína en la célula se reduce y eso causa que la división celular disminuya (Beuckels, Smolders, & Muylaert, 2015). Esto se debe a que en las microalgas, el N es utilizado principalmente en la síntesis proteica, por ende si hay un bajo suministro de N, habrá limitaciones en fabricación de proteínas. Por otro lado, el fosforo es un componente del ARN ribosomal; entonces si hay una menor producción de proteínas por lo antes mencionado, habrá una menor cantidad de ribosomas y por ende también de ARN ribosomal (Beuckels, Smolders, & Muylaert, 2015); (Rhee, 1976). Esto tendrá como consecuencia la disminución de este nutriente a nivel celular y afectara el desarrollo de las microalgas.

En los bioensayos batch aireados con distintas concentraciones iniciales de NH_4^+ -N se evaluó los mismos parámetros de operación que en la sección anterior. Los valores de pH se mantuvieron estables para los controles abióticos y heat killed, en las variantes evaluadas. Los tratamientos de cada variante de concentración mostraron un descenso en el pH, causado

posiblemente por la fuente de nitrógeno utilizada. Del mismo modo, la conductividad fue medida tanto al inicio como al final de cada bioensayo, donde solo el tratamiento con una concentración 100% (86.81 mg L^{-1}) de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ mostró descenso de la conductividad hasta el final, que pudo deberse a que hubo una mayor disminución de los electrolitos del agua residual. Los controles mostraron variaciones significativas que se puede atribuir a la manipulación de las muestras. Por otro lado, el potencial redox, en todos los bioensayos, en cada variable mostró oscilaciones 170- 545 mV. En contraste, la temperatura, no mostró variaciones significativas que puedan inhibir el desarrollo de las microalgas como se mencionó en la sección anterior. En estos bioensayos batch aireados con distintas concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, la temperatura osciló dentro de los rangos óptimos para que las microalgas no experimenten estrés abiótico. Finalmente, el oxígeno disuelto se mantuvo entre 3 y 5 mg L^{-1} en cada variable de los bioensayos, descartando así cualquier inhibición de la actividad fotosintética y un posible efecto negativo en el tratamiento de aguas residuales.

9 Conclusiones

La curva de calibración entre la densidad celular y la absorbancia fue exitosamente desarrollada. La aireación forzada utilizada en el proceso de remoción de nutrientes con microalgas no tuvo un efecto positivo en las tasas de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$. En el caso de la remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y la formación de $\text{NO}_3^-\text{-N}$ se obtuvieron tasas de remoción y producción relativamente menores a las registradas en los bioensayos aireados con un shaker orbital. Mientras que para el $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$, las tasas de remoción fueron mucho más bajas en con aireación forzada con respecto a los ensayos de aireación lo cual sugiere que el flujo de aire aplicado en los bioensayos de aireación forzada provocó un exceso de aireación, y en consecuencia pudo haber un daño a nivel celular de las microalgas afectando su desempeño en la remoción de nutrientes. . Por otro lado, los bioensayos de variación de la concentración inicial de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ mostraron que la tasa de remoción de amonio, fosfato y la tasa de formación de nitrato disminuyen conforme disminuye la concentración inicial de amonio, lo que sugiere que las microalgas tienen un requerimiento de nitrógeno, y que este es un nutriente limitante para el desarrollo de las microalgas. Finalmente, los parámetros operacionales como pH, OD y temperatura, se deben controlar constantemente debido a que influyen en la densidad celular y alteran la capacidad de las microalgas en consumir los nutrientes.

10 Recomendaciones

- La cantidad de aire empleada debe ser controlada mediante el ajuste del flujo de aire entrante y la presión parcial del mismo, para evitar daño celular de las microalgas, un exceso de O₂ en el medio, y un efecto negativo en la tasa de crecimiento, y capacidad de remoción de las microalgas.
- Controlar constantemente de los parámetros operacionales como pH, OD y temperatura, debido a que estos influyen en la densidad celular y alteran la capacidad de las microalgas para remover nutrientes.
- Monitorear la intensidad de luz, porque tiene una gran importancia para el proceso de fotosíntesis.

11 Referencias

- Abdelaziz, A. E., Leite, G. B., Belhaj, M. A., & Hallenbeck, P. C. (2014). Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. . *Bioresource Technology*, 157, 140–148.
- APHA. (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. (E. Rice, R. Baird, A. Eaton, & L. Clesceri, Eds.) (22nd ed.). Washington D.c.
- Aslan, S., & Karapinar Kapdan, I. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from syntheti wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 64-70.
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 98 - 106.
- Business News Americas. (2015). *Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Quito*. Obtenido de <http://www.bnamericas.com/project-profile/es/quito-wastewater-treatment-plant-ptar-quito>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011). Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts. *Biotechnology Advances*, 686-702.
- Converti, A., Casazza, A., Ortiz, E. Y., Perego, P., & Del Borghi, M. (2009). Effect of temperature and nitrogen concentration on the growthand lipid content of and lipid content of for biodiesel production. *Chemical Engineering and Processing*, 1146–1151.
- Corcoran, E., Nellemann, E., R., B., Bos, D. O., & Savelli, H. (2010). *Sick Water? The central role of wastewater*. Obtenido de A Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme, UN-HABITAT, GRID-Arendal: http://www.unep.org/pdf/SickWater_screen.pdf

- Cosgrove, W. J., & Rijsberman, F. R. (2014). *World Water Vision: Making Water Everybody's Business*. New York: Earthscan-Routledge.
- El Comercio. (2010, July 4). *Cuatro ríos soportan la descarga de las aguas residuales de Quito*. Retrieved June 16, 2015, from Periódico, El Comercio, Quito-Ecuador: <http://www.elcomercio.com/actualidad/quito/cuatro-rios-soportan-descarga-de.html>
- El Telégrafo. (agosto de 2014). *Planta de tratamiento de aguas residuales de Quitumbe tiene un avance del 15%*. Obtenido de <http://www.telegrafo.com.ec/noticias/quito/item/planta-de-tratamiento-de-aguas-residuales-de-quitumbe-tiene-un-avance-del-15.html>
- Endong, Z., Bing, W., Shuxiang, N., Huichao, S., Baoling, Y., Mei, J., & Lin, H. (2012). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *African Journal Biotechnology*, 6529-6534.
- EPMAPS. (9 de enero de 2015). UNOS 800.000 QUITEÑOS SE BENEFICIARÁN CON OBRAS QUE EL MUNICIPIO A TRAVÉS DE LA EPMAPS OPTIMIZARÁ ESTE AÑO. Obtenido de <http://www.aguaquito.gob.ec/noticias/unos-800000-quitenos-se-beneficiaran-con-obras-que-el-municipio-traves-de-la-epmaps#sthash.KFwJW>.
- FAO. (2011). *The State of the World's Land and Water Resources for Food and Agriculture: Managing systems at risk*. Obtenido de London/Rome, Earthscan/FAO.: <http://www.fao.org/docrep/017/i1688e/i1688e.pdf>
- FAO AQUASTAT. (2010). *Rome, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*. Obtenido de Online Database Rome : <http://www.fao.org/nr/water/aquastat/main/index.stm>
- Gleeson, T., Wada, Y., Bierkens, M., & van Beek, L. (2012). Water balance of global aquifers revealed by groundwater footprint. *Nature*, 488: 197-200.

- Griffiths, M., Garcin, C., van Hille, R., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by. *Journal of Microbiological Methods* , 119–123.
- Guo, X., Yao, L., & Huang, Q. (2015). Aeration and mass transfer optimization in a rectangular airlift loop photobioreactor for the production of microalgae. *Bioresource Technology*, 189-195.
- Hena , S., Fatimah , S., & Tabassum, S. (2015). Cultivation of algae consortium in a dairy farm wastewater for biodiesel production. *Water Resources and Industry*, 1-14.
- Jiménez-Pérez, M., Sánchez-Castillo, P., Romera, O., Fernández-Moreno, D., & Pérez-Martinez, C. (2004). Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology* , 392–398.
- Jyoti Prakash, M., Jochen, B., Chien-Yen, C., & Prosun, B. (2014). Microalgae for third generation biofuelproduction, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: present and future perspectives- A mini Review. *Energy*, 104-113.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae – a literature review. *VATTEN*, 31–38.
- Lau, P., Tam, N., & Wong, Y. (1998). Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. . *Bioresour Technol*, 15–21.
- 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*, 5138-5144.

- Liang, W., Min, M., Yecong, L., Paul, C., Yifeng, C., Yuhuan, L., . . . Roger, R. (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Appl Biochem Biotechnol*, 1174-1186.
- Llanos, K. (2009). Diagnóstico de la Situación Ambiental Actual de Manejo del Sistema de Agua Potable y Aguas Residuales de la ciudad de Quito.
- Liu, J., Danneels, B., Vanormelingen, P., & Vyverman, W. (2016). Nutrient removal from horticultural wastewater by benthic filamentous algae *Klebsormidium* sp., *Stigeoclonium* spp. and their communities: From laboratory flask to outdoor Algal Turf Scrubber (ATS). *Water Research*, 61-68.
- Lopez Valencia, A. (2013). *Diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales de la cabecera parroquial de San Luis' provincia de Chimborazo*. Riobamba: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.
- Martinez, M., Sanchez, S., Jimenez, J., Yousfi, F., & Muñoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 263-272.
- Moncayo, I., & Ayala, D. (2011). Estudio de tratabilidad biológica de aguas residuales domesticas para optimizar resultados a escala real. Obtenido de http://www.espe.edu.ec/portal/files/sitio_congreso_2011/papers/V3.pdf
- OECD. (2012). *Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction*. Paris : Preliminary Report (Organisation for Economic Co-operation and Development).
- Park, J., Craggs, R., & Shilton, A. (2011). Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresources Technology*, 35-42.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 11-36.

- Rhee, G.-Y. (1976). Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake' . *Environmental Health Center, Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany* .
- SASI Group & Mark Newman. (2006). *Industrial Water Use*. Obtenido de World mapper: http://www.worldmapper.org/posters/worldmapper_map325_ver5.pdf
- Shen, Q.-H., Wei Jiang, J., Chen, L.-P., Cheng, L.-H., Xu, X.-H., & Chen, H.-L. (2015). Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresources Technology* , 257-263.
- United Nation Water-UNESCO. (2015). *Informe de las Naciones Unidas sobre los recursos hídricos en el mundo 2015*. Obtenido de UNESCO: http://www.unesco.org/new/fileadmin/MULTIMEDIA/HQ/SC/images/WWDR2015Facts_Figures_SPA_web.pdf
- UN-Water. (2014, october 07). *Statistics detail*. Retrieved june 16, 2015, from United Nations inter-agency coordination mechanism for all freshwater and sanitation related matters: <http://www.unwater.org/statistics/statistics-detail/en/c/211793/>
- Valencia Lopez, A. (2013). *Diseño de un sistema de tratamiento de aguas residuales de la cabecera parroquial de San Luis' provincia de Chimborazo*. Riobamba: Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.
- Vidyarthna, N. K., Fiori, E., Lundgren, V. M., & Graneli, E. (2014). The effects of aeration on growth and toxicity of *Prymnesium parvum* grown with and without algal prey. *Harmful Algae*, 55-63.
- 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 , 131–137.

WWAP . (2014). *The United Nations World Water Development Report 2014: Water and Energy*. Paris : UNESCO.

Zahra Mennaa, F., Arbib, Z., & Perales, J. (2015). Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. *Water Resources*, 42-51.

Zhou, W. (2014). *Potential Applications of Microalgae in Wastewater Treatments*. Obtenido de Center for Biorefining, Bioproducts and Biosystems Engineering Department, University of Minnesota: <http://www.esciencecentral.org/ebooks/recent-advances-in-microalgal-biotechnology/potential-applications-of-microalgae-in-wastewater-treatments.php>

12 Anexos

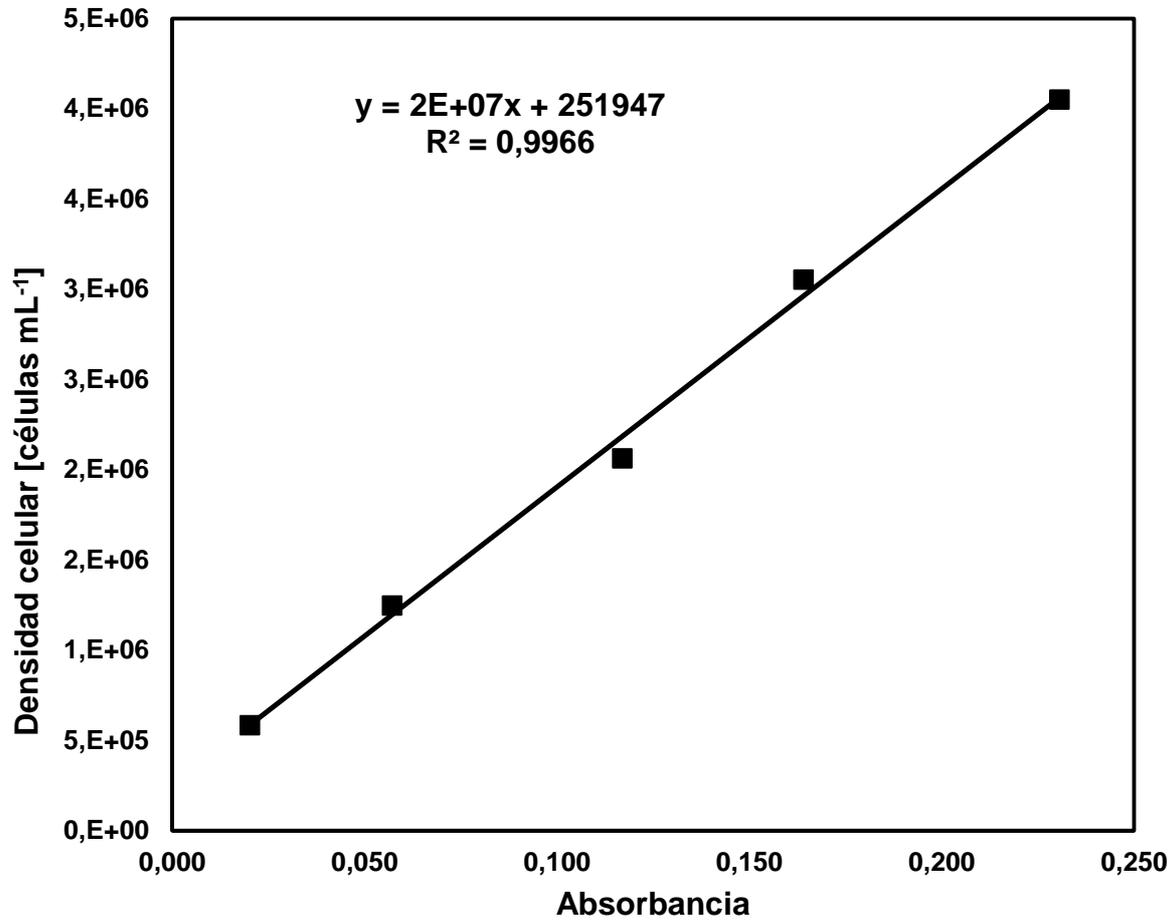
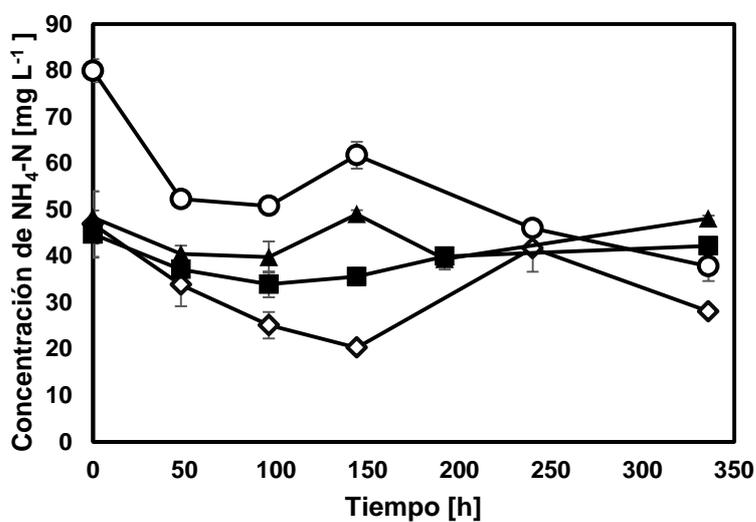
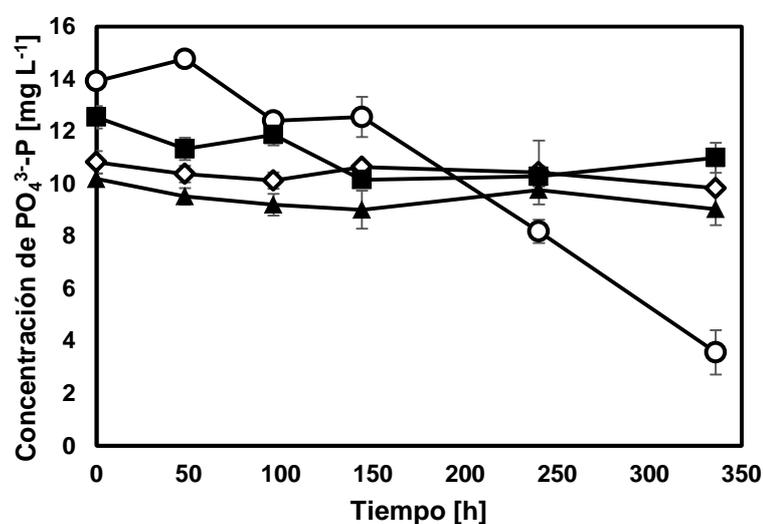


Figura 1: Curva de calibración final entre la densidad celular de microalgas obtenida por el método de conteo con la cámara de Neubauer y la densidad óptica (absorbancia) del cultivo.

(A)



(B)



(C)

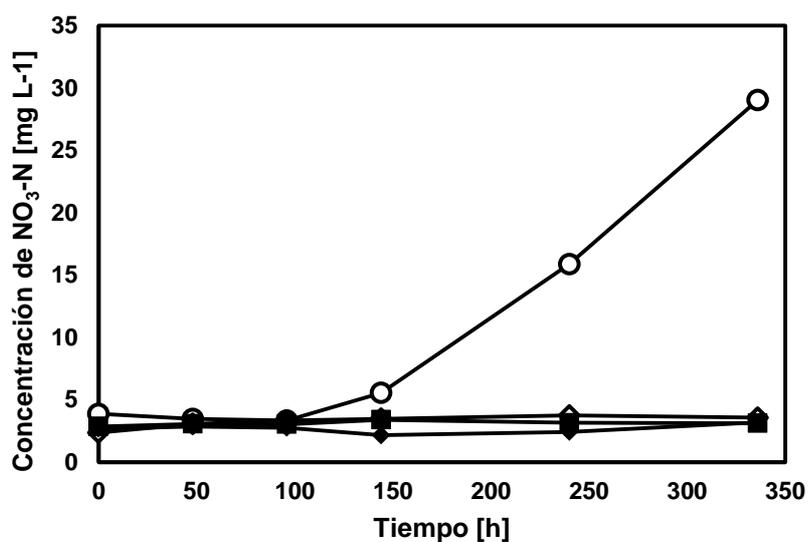


Figura 2: Remoción de nutrientes en bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con $3,43\text{E}^{+06}$ células mL^{-1} microalgas locales; (A) Remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$, (B) remoción de $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ y (C) producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$. Leyenda: Tratamiento aireado (○), tratamiento con aireación forzada (◇), control abiótico (■) y control heat killed (▲). Las barras de error representan la desviación estándar de los bioensayos realizados en duplicados.

Tabla 1: Variación de la eficiencia y tasa de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$; y la variación de la eficiencia y tasa de la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, en bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con microalgas locales.

		Unidades	Aireación	Aireación forzada
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	Tasa de remoción	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0.0821	0.0422
	Eficiencia de remoción	%	52.7 ± 2.84	56.8 ± 3.52
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	Tasa de remoción	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0.0325	0.0019
	Eficiencia de remoción	%	74.1 ± 0.33	9.4 ± 0.31
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Tasa de producción	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0.0771	0.0032
	Eficiencia de producción	%	86.6 ± 0.08	36.7 ± 0.03

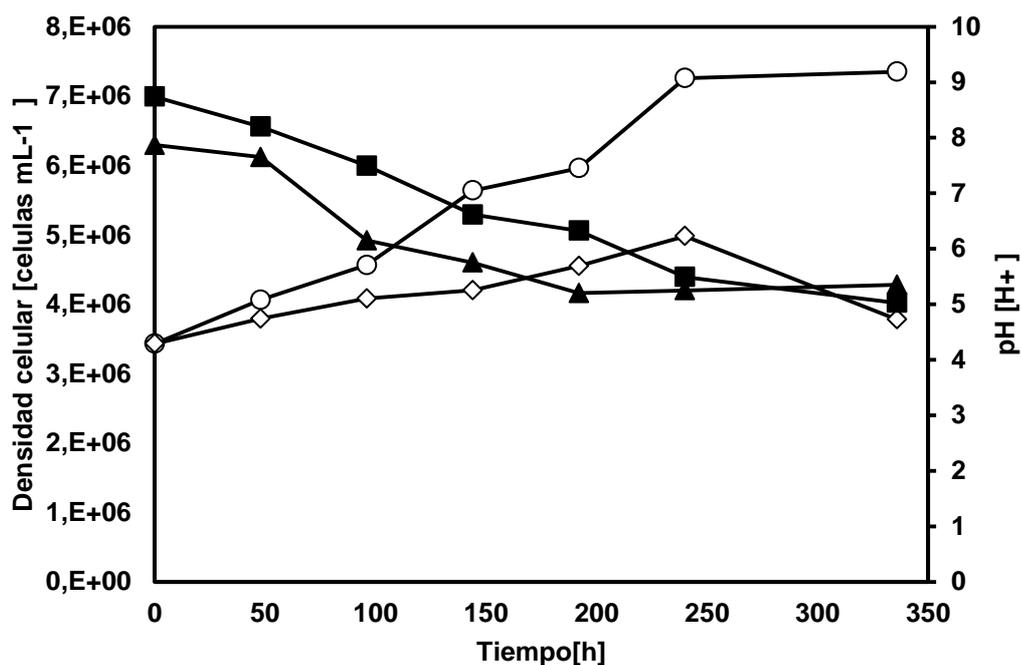


Figura 3: Remoción de nutrientes en bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con $3,43\text{E}^{+06}$ células mL^{-1} microalgas locales; Densidad celular. Leyenda: Tratamiento aireado (\circ) y tratamiento con aireación forzada (\diamond). pH. Leyenda: Tratamiento aireado (\blacksquare) y tratamiento con aireación forzada (\blacktriangle).

Tabla 2: Analisis de Varianza- ANOVA para los bioensayos batch aireados y con aireación forzada durante un periodo de 336 horas con microalgas locales.

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
$NH_4^+ - N$	<i>Entre grupos</i>	0.04675	3	0.0156	0.2041	0.8921	3.2389
	<i>Dentro de los grupos</i>	1.2217	16	0.0764			
	<i>Total</i>	1.2684	19				
$PO_4^{3-} - P$	<i>Entre grupos</i>	0.0030	3	0.0010	0.9664	0.4280	3.0984
	<i>Dentro de los grupos</i>	0.0209	20	0.0011			
	<i>Total</i>	0.0239	23				
$NO_3^- - N$	<i>Entre grupos</i>	0.0176	3	0.0059	5.9755	0,0044	3.0984
	<i>Dentro de los grupos</i>	0.0197	20	0.0010			
	<i>Total</i>	0.0373	23				

Tabla 3: Variación de la eficiencia y tasa de remoción de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ y $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$; y la variación de la eficiencia y tasa de la producción de $\text{NO}_3^-\text{-N}$, en bioensayos batch aireados durante un periodo de 336 horas con microalgas locales a diferentes concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

		Unidades	Concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ [100%]	Concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ [50%]	Concentración de $\text{NH}_4^+\text{-N}$ [25%]
$\text{NH}_4^+\text{-N}$	Tasa de remoción	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0.101	0.032	0.047
	Eficiencia de remoción	%	52.7 ± 2.84	48.1 ± 4.50	57.3 ± 0.62
$\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$	Tasa de remoción	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0.03	0.0117	0.0121
	Eficiencia de remoción	%	74.4 ± 5.58	15.6 ± 0.21	30.9 ± 0.23
$\text{NO}_3^-\text{-N}$	Tasa de producción	$\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$	0.075	0.0029	0.0028
	Eficiencia de producción	%	88.0 ± 0.08	36.4 ± 0.13	36.4 ± 0.26

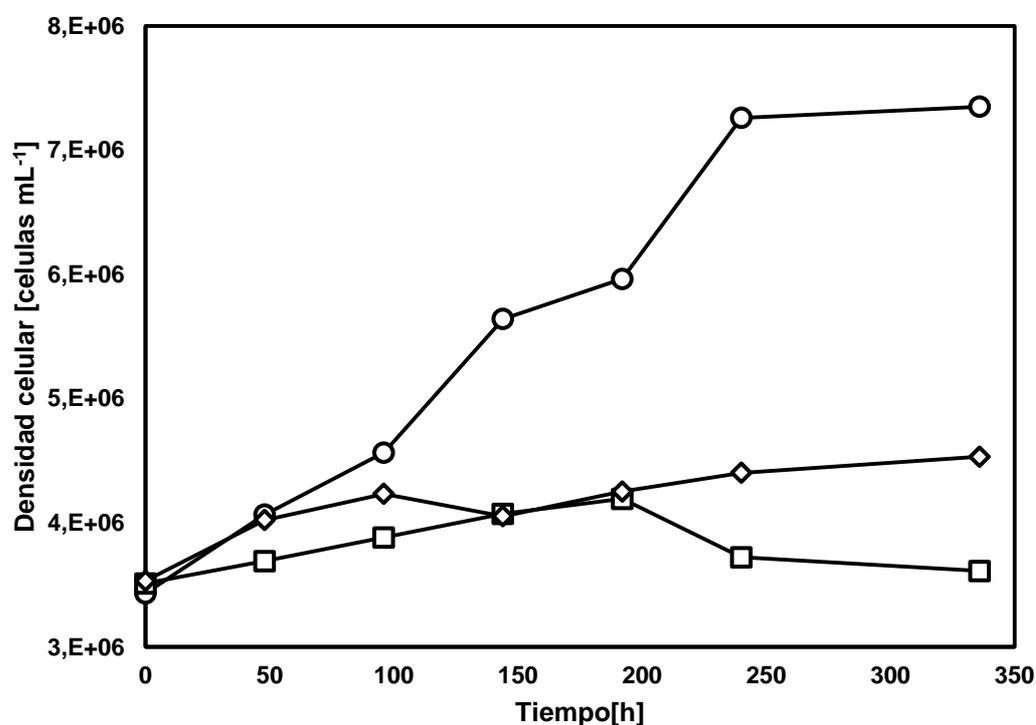


Figura 4: Remoción de nutrientes en bioensayos batch aireados durante un periodo de 336 horas con microalgas locales a diferentes concentraciones iniciales de $\text{NH}_4^+\text{-N}$; Densidad celular. Leyenda: densidad celular a una concentración inicial del 100% (\circ), 50% (\diamond) y 25% (\square) de $\text{NH}_4^+\text{-N}$.

Tabla 4: Analisis de Varianza- ANOVA para los bioensayos batch aireados durante un periodo de 336 horas con microalgas locales a diferentes concentraciones iniciales de NH_4^+ -N.

	Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
NH_4^+ -N	<i>Entre grupos</i>	0.0866	4	0.0216	1.1938	0.3441	2.8661
	<i>Dentro de los grupos</i>	0.3626	20	0.0181			
	<i>Total</i>	0.4492	24				
PO_4^{3-} -P	<i>Entre grupos</i>	0.0043	4	0.0011	1.1005	0.3835	2.8661
	<i>Dentro de los grupos</i>	0.0195	20	0.0010			
	<i>Total</i>	0.0238	24				
NO_3^- -N	<i>Entre grupos</i>	0.0139	4	0.0035	2.9466	0.0458	2.8661
	<i>Dentro de los grupos</i>	0.0236	20	0.0012			
	<i>Total</i>	0.0375	24				