

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Diseño de un biorreactor para la adaptación y fijación de
microalgas**

Leila Yanina Pérez Véliz

Ingeniería Ambiental

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera Ambiental

Quito, 18 de mayo de 2023

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA**

**Diseño de un biorreactor para la adaptación y fijación de
microalgas**

Leila Yanina Pérez Véliz

Nombre del profesor, Título académico

Nicolás Vela, Ph.D.

Quito, 18 de mayo de 2023

© 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 quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

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

Nombres y apellidos: Leila Yanina Pérez Véliz

Código: 00105255

Cédula de identidad: 1500779994

Lugar y fecha: Quito, 18 de mayo de 2023

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

Se ha demostrado que la ficorremediación es una técnica que consiste en la utilización de consorcios de microalgas y posee un potencial significativo para el tratamiento de efluentes. Varios estudios han evidenciado que los sistemas de microalgas tienen un gran potencial para la eliminación de fósforo y nitrógeno de las aguas residuales, incluso a bajas temperaturas. Una de las técnicas utilizadas es la fijación de consorcios de microalgas en sustratos para que se adhieran a su superficie. Por lo cual, el presente estudio tiene como objetivo diseñar un biorreactor de fijación de biofilm para el tratamiento de las aguas residuales del río San Pedro, con el fin de comparar el crecimiento y fijación de biofilm en tres sustratos diferentes, así como la determinación de la incidencia de la cafeína en el crecimiento celular. Para lo cual se realizó la impresión en 3D de discos y hélices, los cuales fueron los sustratos en los que se adhirió el consorcio de microalgas *Chlorella sp.* provenientes de la Amazonía, con la ayuda de la implementación de un sistema de eje rotativo. Para el análisis del impacto de un contaminante emergente (cafeína), en el crecimiento celular, se montaron bioensayos con una concentración de 35 mg/L de cafeína. Después de 36 días, el sustrato que tuvo el mejor rendimiento fueron los discos tipo rejilla, las condiciones óptimas de crecimiento fueron temperatura ambiente a 23°C, fotoperíodos de 12 horas, e incorporación de un eje de rotación. Con relación a la cafeína, no se evidenció efectos negativos sobre la densidad celular, pero sí una mayor formación de filamentos. El diseño puede ser escalado para su implementación futura en el tratamiento de aguas residuales en ríos.

Palabras clave: microalgas, biorreactor, sustrato, cafeína, biofilm, contaminante convencional, contaminante emergente

ABSTRACT

Phycoremediation is a technique that involves the use of microalgae consortia, and it has a significant potential for effluent treatment. Several studies have shown that microalgae systems have great potential for the removal of phosphorus and nitrogen from wastewater, even at low temperatures. One of the techniques used is the fixation of microalgae consortia on substrates so that they adhere to the surface. Therefore, the present study aims to design a biofilm fixation bioreactor for the wastewater treatment of the San Pedro River, in order to compare the growth and fixation of the biofilm in three different substrates, as well as the determination of the incidence of caffeine on cellular growth. Discs and helices were printed with 3D printing, which was the substrates where the microalgae consortium, *Chlorella* sp., from the Amazon, adhered with the help of the implementation of a rotatory axis system. For the analysis of the impact of an emerging contaminant (caffeine) on cell growth, bioassays were set up with a concentration of 35 mg/L of caffeine. After 36 days, the substrate that had the best performance was the grid-type discs, the optimal growth conditions were room temperature at 23°C, photoperiods of 12 hours, and incorporation of a rotation axis. Regarding caffeine, no negative effects were found on cell density, but there was a greater formation of filaments. The design can be scaled for future implementation in river wastewater treatment.

Keywords: microalgae, bioreactor, substrate, caffeine, biofilm, conventional pollutant, emerging pollutant

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	9
1.1. Antecedentes	9
1.2. Justificación.....	12
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Levantamiento de línea base de contaminantes	16
2.2. Cultivo de microalgas bajo condiciones controladas.	17
2.2.1. Selección de microalgas.	18
2.2.2. Medio de nutrientes.	19
2.2.3. Preparación de inóculos.	22
2.2.4. Preparación de inóculos con cafeína.	23
2.3. Análisis de crecimiento celular.	25
2.3.1. Conteo Celular.	25
2.3.2. Espectrofotometría.	27
2.4. Producción y fijación de biofilm.	27
2.4.1. Diseño y condiciones de operación.	28
3. RESULTADOS	37
3.1. Línea base.....	37
3.2. Cultivo de microalgas bajo condiciones controladas	38
3.2.1. Selección de microalgas	38
3.3. Análisis de crecimiento celular.	39
3.3.1. Conteo celular.	39
3.3.2. Espectrofotometría.	42
3.4. Producción y fijación de biofilm.	44
3.4.1. Diseño y condiciones de operación.	44
3.4.2. Área efectiva de contacto para adhesión de microalgas.	44
3.4.3. Monitoreo de fijación de biofilm.	45
4. CONCLUSIONES	48
5. Referencias bibliográficas	50
ANEXO A.....	0

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. estructura y formación de biofilm microalga-bacteria [21]	12
Figura 2. Estructura molecular de la cafeína [29]	14
Figura 3. Diferentes tipos de sustratos [31].....	15
Figura 4. BBM preparados	22
Figura 5. BBM1, BBM2, BBM3.....	23
Figura 6. Ensayos BBM en el agitador	23
Figura 7. Inóculo microalga y cafeína por triplicado	24
Figura 8. Cámara Neubauer utilizada para el conteo de las microalgas.....	26
Figura 9. Método de conteo con cámara Neubauer [40]	26
Figura 10. Contenedor de acrílico	32
Figura 11. Diseño de las hélices - Sustrato 1. a) Diseño hélice en 3D, b) hélice impresa	33
Figura 12. a) Diseño disco en 3D, b) Disco impreso	33
Figura 13. Planos Biorreactor de eje rotativo a) Corte transversal, b) Vista superior.....	34
Figura 14. Biorreactor armado a) Vista superior, b) Vista frontal	34
Figura 15. BBM3 e inóculos para el biorreactor	35
Figura 16. Reactor con algas suspendidas, día 1.....	36
Figura 17. Pesaje de las hélices con las esponjas a) Vista frontal, b) Vista lateral	36
Figura 18. Microorganismos de la laguna USFQ.....	39
Figura 19. Conteo celular de los ensayos de control y cafeína durante 15 días	41
Figura 20. a) Microalgas control a 40x, b) Microalgas control a 10x, c) Microalgas cafeína a 40x, d) Microalgas cafeína a 10x.....	42
Figura 21. Modelo estadístico obtenido	43
Figura 22. Biorreactor con inóculo	44
Figura 23. Microalgas adheridas a los sustratos.....	46
Figura 24. A) vista frontal disco 1, b) vista frontal disco 2, c) vista frontal hélice (vileda), d) vista frontal hélice (esponja).....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio basal mineral (BBM)[37]	20
Tabla 2. Características de los sustratos	28
Tabla 3. Materiales del biorreactor.....	30
Tabla 4. Dimensiones del contenedor.....	30
Tabla 5. Dimensiones de los discos.....	30
Tabla 6. Dimensiones de las hélices	31
Tabla 7. Resultados línea base.....	37
Tabla 9. Conteo promedio de control y cafeína.....	40
Tabla 10. Medidas de concentración y absorbancia	42
Tabla 11. Concentración celular y absorbancia de los ensayos del 19 de abril.....	43
Tabla 12. Diferencia de pesos de disco y hélices	46

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes

La contaminación de los recursos hídricos es un tema de gran relevancia en la actualidad debido al incremento en la generación de aguas residuales por el crecimiento demográfico, industrialización y urbanización [1]. Según estadísticas publicadas por Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos [2], más del 80% de las aguas residuales a nivel mundial se vierten directamente a los cuerpos hídricos (zonas costeras, lagos y ríos) sin ningún tipo de tratamiento [2][3]. En los países desarrollados se logran tratar alrededor del 70% de las aguas residuales municipales e industriales, mientras que, en países en vías de desarrollo, este porcentaje se reduce a solo el 8% de aguas residuales que recibe algún tipo de tratamiento previo a su descarga [2]. Entre los principales focos de contaminación identificados se encuentran diferentes fuentes tales como: la excreción de humanos y animales, eliminación inadecuada de productos farmacéuticos, desechos de plantas de fabricación, desechos hospitalarios, esorrentía de operaciones agrícolas intensivas, lixiviados de vertederos, drenaje pluvial, y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) [4]. Estas fuentes liberan compuestos como pesticidas, materia orgánica, desechos sólidos, metales pesados, grasa, y efluentes agrícolas a ríos de manera continua [5]. Pese a este conocimiento y la búsqueda de formas de mitigación, las PTAR, principalmente en países en desarrollo, como Ecuador, siguen con deficiencias en sus diseños para reducir los contaminantes convencionales (CC) o eliminar la carga de contaminantes emergentes (CE)[1]. En la ciudad de Quito, las aguas residuales industriales y domésticas sin tratamiento son descargadas principalmente en 4 ríos: Monjas, San Pedro, Machángara y Guayllabamba; aproximadamente un 81% de estos efluentes descargados corresponden a

fuentes domésticas [6]. El río San Pedro es receptor del 5% de las aguas residuales de la zona periférica de la ciudad por el desarrollo urbano y creación de industrias textiles y alimenticias alrededor de la cuenca [7].

Aunque el tratamiento de aguas residuales se está desarrollando y mejorando continuamente, la mayoría de estos avances se centran en la etapa de pre y post tratamiento [8], siendo procesos de remoción netamente fisicoquímicos.[8] El pretratamiento se enfoca en el desbaste o tamizado para retener sólidos de mayor tamaño mediante filtración, y reducción de sólidos suspendidos por medio de sedimentación, floculación y precipitación; mientras que el post tratamiento se centra en la eliminación de microorganismos y agentes patógenos mediante desinfección con luz ultravioleta y ósmosis inversa [9]. Estos procesos convencionales suponen un alto costo, siendo prácticamente 3 veces más intensivos de capital que un tratamiento biológico y son más usados comúnmente aun cuando los tratamientos biológicos presentan mayores ventajas, como menor cantidad de subproductos y bajo costo [10][11]. Además, estos tratamientos convencionales suponen limitaciones como la remoción de contaminantes en las PTAR Municipales, por eso, descargan efluentes con CC y CE indiscriminadamente[12]. La ciudad de Quito, actualmente, solo tiene una PTAR en el sector de Quitumbe, al sur de la ciudad. Esta PTAR solo puede tratar el 3 % de las aguas residuales de la ciudad y, cuyo sistema de tratamiento se basa en la técnica de lodos activados con aireación extendida (lo que implica altos costos operativos)[3]. Si bien actualmente se encuentra en desarrollo el Proyecto Vindobona como parte del Programa de Descontaminación del río Quito, en el cual se plantea la construcción de dos PTAR que cubriría un 96% de las aguas residuales de Quito, dicho proyecto no será hasta el 2045 que podrá atender a la población[13].

Debido a esto, los tratamientos biológicos con bajo costo como la ficorremediación, se presentan como una atractiva alternativa para el tratamiento de efluentes contaminados, ya que este permite eliminar compuestos nitrogenados, carbonados o de fósforo. Actualmente uno de los tratamientos biológicos más utilizados son los lodos activados, por ser un método aerobio que incorpora microorganismos suspendidos en las aguas residuales con el objetivo de utilizar su actividad metabólica para la degradación de los contaminantes [14]. Sin embargo, como se mencionó previamente, implica altos costos operativos. Otro tratamiento es el Reactor Biológico Secuencial (RBS) cuya particularidad es que posee un sistema de un tanque en el que se realizan tres fases de: aireación, sedimentación y descarga o purga [15]. Adicional a este se utiliza también el reactor biológico de membranas (MBR) el cual es similar al de fangos activados adicionando una membrana fija de ultrafiltración en su interior; así como el reactor biológico aerobio de lecho móvil, el cual consiste en un medio de membrana móvil dentro del reactor [16]. En todos estos tratamientos citados anteriormente se utilizan microorganismos bacterianos tanto aerobios como anaerobios, sin embargo, las microalgas las cuales son microorganismos eucariotas y unicelulares fotosintéticos tienen la capacidad de generar biomasa a partir de luz y dióxido de carbono (CO_2), empleando el agua como donador de electrones y oxidándola a O_2 como un producto.

Por lo que han mostrado un potencial significativo para el tratamiento de efluentes. Varios estudios han evidenciado que los sistemas de microalgas tienen un gran potencial para la eliminación de fósforo y nitrógeno de las aguas residuales, incluso a bajas temperaturas [11]. En este sentido, existen dos tipos de técnicas de cultivo de microalgas; la primera es suspensión, en donde los microorganismos se asocian en flóculos durante su crecimiento, y la otra es la utilización de sustratos, donde los mismos crecen adheridos a una superficie [17].

La técnica de cultivo de microalgas en sustratos surge como una alternativa para remover potencialmente los CC y CE con menores costos operativos, y descarga de efluentes oxigenados en cuerpos de agua receptores [18]. La técnica de cultivo en sustratos hace uso de superficies específicas que actúan como biotransportadores, permitiendo un mayor desarrollo de la concentración de células, debido a que se adhieren con mayor facilidad formando un biofilm, el cual es una estructura compleja que posee diferentes tipos de células o colonias de microorganismos, las cuales se adhieren a la superficie [19] [20]. La biomasa de las algas adheridas a un sustrato logra asimilar de manera más eficiente los nutrientes del agua residual para su crecimiento, lo cual favorece el proceso de tratamiento, como se observa en la Figura 1 [12].

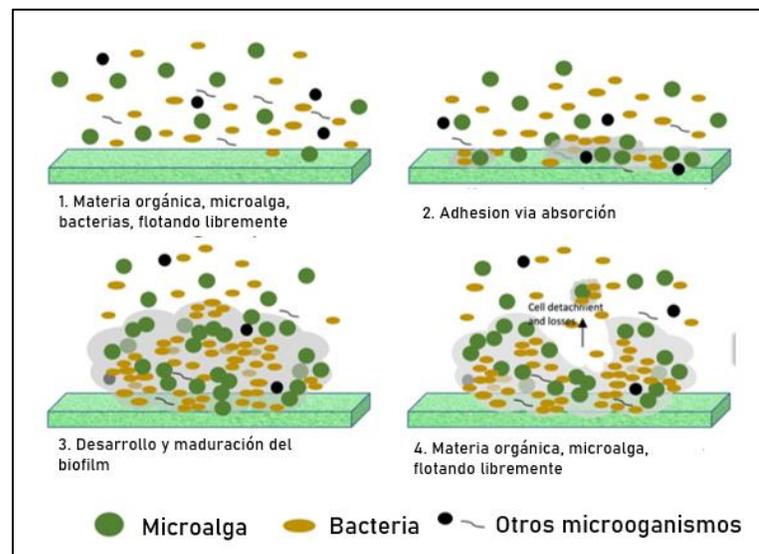


Figura 1. estructura y formación de biofilm microalga-bacteria [21]

1.2. Justificación

La búsqueda de técnicas de remoción eficientes de contaminantes es esencial, ya que la presencia y acumulación de materia orgánica e inorgánica en los cuerpos hídricos produce alteraciones en los procesos biológicos naturales, provocando eutrofización como resultado

del exceso de fosfatos y nitratos, la cual modifica la demanda bioquímica de oxígeno (DQO) y la demanda biológica de oxígeno (DBO) [22]. En base a estudios se han registrado que concentraciones de nitrito superiores a 0.75mg/L en cuerpos de agua, provocan estrés en peces, en concentraciones mayores a 5mg/L llegan a ser tóxicos, y al sobrepasar los 60g/L son peligrosos para la preservación de flora y fauna [22] [23].

En el caso de los CC, cuando entran en contacto con el agua, provocan alteraciones de parámetros físicos y químicos como: salinidad, turbidez, pH, temperatura, entre otros [23], debido a que su flujo constante produce un exceso de nutrientes provocando un incremento de la cantidad de algas, afectando el ecosistema acuático [24].

Además de la identificación de los CC, el río San Pedro presenta concentraciones de DBO y DQO por encima de los límites máximos permisibles establecidos en el Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA), con valores de 34 mg/L y 50 mg/L respectivamente [25]. Además, se ha evidenciado la presencia de CE en este río, tema que ha tomado mayor notoriedad e importancia en los últimos años porque estas sustancias, incluso en concentraciones bajas, pueden perjudicar la vida acuática [26]. Al ser los CE compuestos no regulados que poseen propiedades hidrofóbicas, permiten que sean bioacumulados por los organismos en los tejidos grasos [27]. Entre los principales tipos de CE se encuentran: tintes, metales pesados, compuestos orgánicos e inorgánicos y patógenos, los cuales afectan la calidad del agua, ciclos hidrológicos, y tienen efectos tóxicos en el medioambiente provocando afectaciones al microbiota a largo plazo, causando interferencias en sus sistemas endócrinos, resistencia microbiológica y acumulación en suelo, plantas y animales [28][11]. Un claro ejemplo de CE es la cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) la cual es un alcaloide que pertenece a la familia de las metilxantinas y utilizado como un estimulante e incide en la

fertilidad de los peces [29], su estructura molecular se muestra en la Figura 2., y su presencia se ha reportado en el río San Pedro, con una concentración de 87.0 µg/L [26].

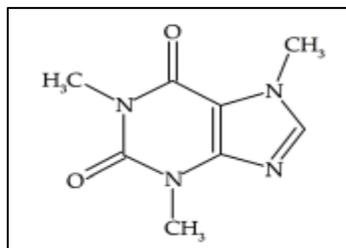


Figura 2. Estructura molecular de la cafeína [29]

Es, por tanto, que como alternativa de remediación para los impactos de CC y CE surgen los tratamientos biológicos de aguas residuales *in-situ*, siendo una mejor opción, frente a desviar un cauce, acción que impacta negativamente a todo el ecosistema acuático de un río. Dentro de los tratamientos in situ se encuentra el cultivo de microalgas en suspensión, sin embargo, este tipo de tratamiento presenta inconvenientes para su puesta en marcha, ya que demanda un alto consumo energético, elevando el costo de operación e instalación [12]. Además de, su baja producción de biomasa, dificultad durante la fase de recuperación y cultivo [17]; se necesita de centrifugación durante el proceso para poder separar los flóculos de células del agua, lo cual produce daño a nivel celular [30].

En consecuencia, la productividad de cultivos en suspensión resulta deficiente tanto en sistemas abiertos (lagunas), como en fotobiorreactores. en comparación con la técnica de fijación en sustratos. Misma cuya producción de biomasa es mayor, debido a que dichos sustratos actúan como biotransportadores (Fig. 3) de los consorcios alga-bacteria para la producción de biomasa, dependiendo de la superficie usada. Razón por la cual, el objetivo de este estudio es diseñar un biorreactor de fijación de biofilm para su posterior uso en el tratamiento de las aguas residuales del río San Pedro, se realiza una línea base de los

contaminantes presentes en el río San Pedro, por su relevancia en el área de estudio; el cultivo del consorcio *Chlorella sp.* bajo condiciones controladas para determinar la incidencia de la cafeína en el crecimiento de este; y la comparación de la adhesión de biofilm en tres diferentes sustratos elegidos, para determinar el sustrato que posee el mejor rendimiento.

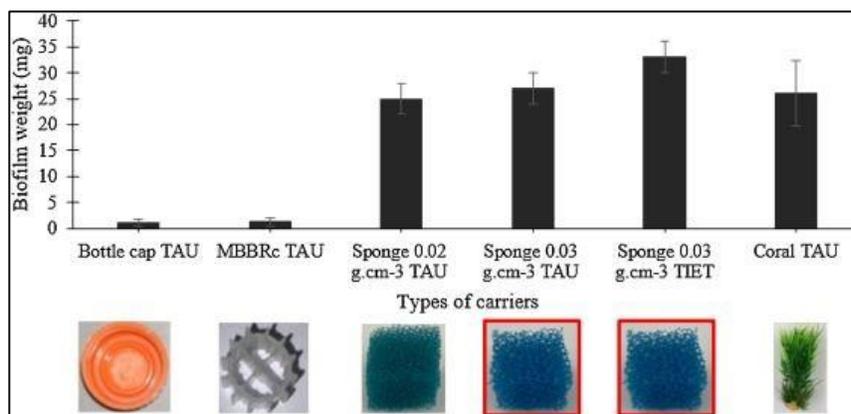


Figura 3. Diferentes tipos de sustratos [31]

2. MATERIALES Y MÉTODOS

En esta sección se presentan de forma exhaustiva y sistemática de los materiales y métodos empleados. El método científico fue usado para la resolución de los planteamientos específicos, usando los principios de ciencias, ingeniería y matemáticas para la consolidación del conocimiento. El estudio planteó el levantamiento de una línea base de contaminantes del río San Pedro ya que es el área de interés, cultivo y escalamiento de microalgas bajo condiciones controladas y la fijación y producción de biofilm.

2.1. Levantamiento de línea base de contaminantes

La línea base, también denominada la caracterización inicial del área donde se busca ejecutar el estudio es una de las principales herramientas en la planificación y diseño de estrategias que contribuyan a mitigar los distintos impactos ambientales. En este caso, se planteó construirla a partir de una visión cualitativa de los distintos indicadores (contaminantes) presentes a lo largo del río San Pedro y contemplarlos en el diseño de este proyecto. A continuación, se describe el proceso técnico para la elaboración de la línea base.

1. Descripción del proyecto, incluyendo el análisis de variables a considerar para el diseño de este
2. Definición del área de influencia preliminar
3. Línea base, caracterizando el medio potencialmente afectado
4. Identificación de los impactos potenciales
5. Caracterización de los impactos potenciales

La técnica empleada para el procesamiento de datos e información fue la de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta Analyses), que es una guía para informar revisiones sistemáticas la cual toma en cuenta principalmente:

- Criterios de elegibilidad
- Fuentes de información y búsqueda
- Proceso de extracción de datos
- Riesgo de sesgo [32]

2.2. Cultivo de microalgas bajo condiciones controladas.

Las microalgas son microorganismos eucariotas y unicelulares fotosintéticos. Es decir, pueden generar biomasa a partir de luz y dióxido de carbono (CO_2), empleando el agua como donador de electrones, oxidándola a O_2 . Uno de los objetivos de este estudio es el cultivo de microalgas para su fijación y subsecuente formación de biofilm. Por lo cual, se ha iniciado con la selección de las microalgas, su cultivo y finalmente, su fijación para dar paso a la generación de biofilm. Los sistemas para el cultivo de microalgas se pueden dividir en dos grupos, de acuerdo con el mecanismo de crecimiento de los consorcios de algas: cultivos inmovilizados y cultivos en suspensión. Al mismo tiempo, ambos sistemas de cultivo se pueden caracterizar como cerrados o abiertos, dependiendo de la interacción entre el medio de cultivo, las microalgas y el aire atmosférico [33].

Los cultivos inmovilizados en una superficie o sustrato que tiene la función de soporte con el objetivo de formar un biofilm continuo. Un biofilm es un ecosistema microbiano complejo y organizado, que se encuentra constituido por una o varias especies de microorganismos incrustado en una matriz polimérica y adheridas a la superficie. El biofilm se forma en superficies que están expuestas a la luz y donde exista disponibilidad de nutrientes. Es una matriz cuyo proceso de formación puede describirse en cuatro etapas: 1) Las células en suspensión se adhieren a la superficie para formar una película, acondicionamiento reversible, 2) secreción de sustancias poliméricas extracelulares que

permite a las células adherirse mediante enlaces de hidrógeno, e adhesión irreversible, 3) concentración en la superficie de moléculas orgánicas para replicación celular, 4) desarrollo de estructura tridimensional [33].

La investigación se realizó en 2 fases: enriquecimiento y fijación del biofilm, y control de crecimiento con y sin cafeína como un acercamiento al tratamiento de aguas residuales contaminadas con este compuesto. En la fase de enriquecimiento y fijación, se inoculó microalgas en Medio Basal Mineral (BBM) durante 15 días y se realizó el diseño del biorreactor para la fijación del biofilm, para la fijación se controló el crecimiento de las microalgas en tres sustratos diferentes en un biorreactor giratorio durante 36 días; para la fase de control de crecimiento en presencia de un contaminante emergente se realizaron ensayos de crecimiento celular por triplicado con medio (BBM), inóculo de microalgas y cafeína, mientras que los controles se realizaron con BBM e inóculo de microalgas para determinar su comportamiento.

2.2.1. Selección de microalgas.

Para este estudio se utilizaron microalgas nativas de Ecuador y de fuentes naturales. Por tal motivo, se seleccionó un consorcio proveniente de la región amazónica (*Chlorella sp.*) disponible en el Departamento de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito (USFQ); y un consorcio recolectado de la laguna sintética del campus Cumbayá de la USFQ.

La especie de algas *Chlorella sp.*, es una de las especies más utilizadas para el tratamiento de aguas residuales por su habilidad de remoción de nutrientes como fosforo,

nitrógeno, DBO y DQO, con tiempos de retención que varían entre 10 horas a 42 días como se establece en estudios realizados de proyectos USFQ [34][35].

La recolección de la muestra se hizo a través de una técnica aséptica, usando recipientes y materiales de muestreo que fueron esterilizados. Los microorganismos de interés se pueden aislar de las muestras para eliminar los contaminantes mediante técnicas de dilución, aislamiento de células individuales mediante una micropipeta y rayado en agar. Una vez que se aíslan estas células, se pueden cultivar en medio fresco [36]. Sin embargo, debido al alcance del proyecto se optó por usar el consorcio proveniente del oriente ecuatoriano ya que la taxonomía es significativamente importante para comprender las condiciones ideales de crecimiento y el consorcio de la Amazonía ya ha sido caracterizado en estudios anteriores. Por otra parte, durante el crecimiento se tomaron muestras periódicas para ser analizada en el microscopio electrónico y verificar las condiciones de la colonia. Para esto se empleó un microscopio OLYMPUS CX23.

2.2.2. Medio de nutrientes.

Un medio de cultivo es una solución concentrada de nutrientes que se utiliza en el cultivo de algas verdes, los elementos traza de su composición promueven la producción de clorofila y el crecimiento. La composición del Medio basal (BBM) utilizado para el cultivo autótrofo de las microalgas, se basó en la receta "*Bold Basal Medium Recipe*", el mismo es utilizado para el crecimiento de varios tipos de microalgas debido a que tiene una concentración específica de nutrientes para su óptimo desarrollo [37]. Para la preparación de 1 litro se utilizó agua destilada para aforar y las siguientes soluciones: la solución stock de boro se preparó con 11 g de ácido bórico (H_3BO), y se aforó hasta 1 litro con agua destilada en envases de vidrio ámbar. Para la solución stock de EDTA se utilizó 31 g de hidróxido de

potasio (KOH), 50 g de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se aforó a 1 litro con agua destilada.

La solución stock de hierro se preparó con 5 g de sulfato de hierro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y se aforó a 1 litro con agua destilada. Para la solución stock traza se utilizó 10 mL de H_2SO_4 , 0.49 g de nitrato de cobalto hexahidratado ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 0.71 g de trióxido de molibdeno (MoO_3), 1.44 g de cloruro de manganeso tetrahidratado ($\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 1.57 g de sulfato de cobre heptahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), 8.82 g de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y se aforó a un litro con agua destilada.

Las botellas que contenían las soluciones stock se envolvieron en aluminio y se guardaron a temperatura ambiente alejadas de la luz, mientras que las demás soluciones se guardaron en el refrigerador. Cada uno de los compuestos fueron pesados en una balanza analítica y fueron disueltos mediante agitación por dos minutos. Luego se preparó 1 litro de BBM (Fig. 4) con las cantidades indicadas en la Tabla 1. Posteriormente, se midió el pH de los 3 medios con un valor promedio de 5.73. Posteriormente el medio fue auto clavado durante 2 horas para garantizar la esterilización.

Tabla 1. Componentes del medio basal mineral (BBM)[38]

Número	Nombre químico	Fórmula química	Cantidad (mL)
1	Nitrato de sodio	NaNO_3	10
2	Fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	10

3	Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10
4	Cloruro de sodio	NaCl	10
5	Hidrógeno-fosfato de potasio	K_2HPO_4	10
6	Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10
7	Solución stock de boro	-	1 gota (0.05 ml)
8	Solución stock EDTA	-	1 gota (0.05 ml)
9	Solución stock traza	-	1 gota (0.05 ml)
10	Solución stock de hierro	-	1 gota (0.05 ml)



Figura 4. BBM preparados

2.2.3. Preparación de inóculos.

Las microalgas se propagaron en el medio nutritivo BBM en ensayos de 1 litro, a una temperatura ambiente de 23°C, con un fotoperíodo de 12 horas para acelerar el crecimiento de las cepas. Se colocó 1 litro de BBM en tres matraces Erlenmeyer para la preparación de los inóculos. Del ensayo 1 (BBM1) se retiró 100 mL de medio, se añadió 40 mL de (microalgas) y 60 mL de agua de la laguna. Del ensayo 2 (BBM2) se retiró 100 mL de medio y se añadió 100 mL de agua de la laguna. Del ensayo 3 (BBM3) se retiró 50 mL de medio y se inoculó 50 mL de microalgas de la Amazonía. Adicionalmente, para cada ensayo se realizó un tapón hecho de algodón y gasa, para permitir la aireación. En resumen, se obtuvo las siguientes 3 soluciones (Fig. 5):

- BBM1 biofilm Laguna USFQ 10% v/v
- BBM2 suspensión Laguna USFQ 10% v/v
- BBM3 suspensión Amazonía 5% v/v



Figura 5. BBM1, BBM2, BBM3

Los tres ensayos Erlenmeyer (Fig. 6) se colocaron en un agitador Actum[®] con luz a 90 rpm durante dos semanas, adicionalmente durante este período, cada frasco se agitó manualmente para evitar la sedimentación de las microalgas.



Figura 6. Ensayos BBM en el agitador

2.2.4. Preparación de inóculos con cafeína.

Si bien es cierto que el objetivo principal de este estudio es la fijación de microalgas para la formación de biofilm y posterior uso para el tratamiento de aguas residuales, se incluyó un análisis de la cafeína al ser uno de los CE más comunes y presente en ríos para determinar el impacto en el crecimiento de las microalgas. Para las pruebas de crecimiento en presencia de cafeína, se realizaron ensayos por triplicado (Fig. 7). Para los tres ensayos con cafeína se añadieron 12.5 mL del inóculo, 8.75 mg de cafeína y se aforó con BBM a 250 mL. Se utilizó esta concentración de cafeína ya que en estudios similares en los que se analiza los efectos de la cafeína en microorganismos se alcanzó una remoción del 85.7% con el uso de microalgas *Chlorella vulgaris* [39]. Adicionalmente, se realizaron tres ensayos de control en los que se añadió 12.5 mL de inóculo y BBM en un volumen de 250 mL. Los 6 ensayos Erlenmeyer donde se condujeron los experimentos se colocaron en el agitador Actum con un fotoperíodo de 12 horas.



Figura 7. Inóculo microalga y cafeína por triplicado

2.3. Análisis de crecimiento celular.

2.3.1. *Conteo Celular.*

Para la determinación del crecimiento celular en presencia de la cafeína se hizo uso del método de conteo de células microbianas usando un Microscopio (Olympus, Germany) y un contador de células (Tamaco, Taiwán) y una cámara Neubauer (Boeco, Germany) (Fig. 8), la cual es un portaobjetos grueso hecho de cristal y posee una cuadrícula en el área central donde se realiza el conteo (Fig. 9) [40]. Este método se lleva a cabo bajo condiciones estériles, colocando en el área central de la cámara un volumen conocido de muestra líquida, 0.1 mL del cultivo de algas, se colocó un cubreobjetos sobre la cámara y se dejó en reposo durante 2 minutos para que las células precipiten. El monitoreo de crecimiento se realizó mediante la visualización de las muestras a través del lente objetivo de 40x. Se usaron los 4 cuadros de las esquinas de la cámara Neubauer, iniciando el conteo con el cuadrado de la esquina superior izquierda, las microalgas sobre las líneas superiores y de la izquierda no se contaron, como así lo indica Bertan et al. [40].

Este método es eficaz y de menor costo comparado con otros métodos automáticos y semiautomáticos de cuantificación celular como por ejemplo el contador Coulter, en el cual las partículas se encuentran suspendidas en una solución de electrolitos, el citómetro de flujo, el cual utiliza un láser que es enviado en forma de señal hacia un fotodiodo, entre otros, los cuales son instrumentos más costosos y requieren de mano de obra calificada para su mantenimiento [41].



Figura 8. Cámara Neubauer utilizada para el conteo de las microalgas

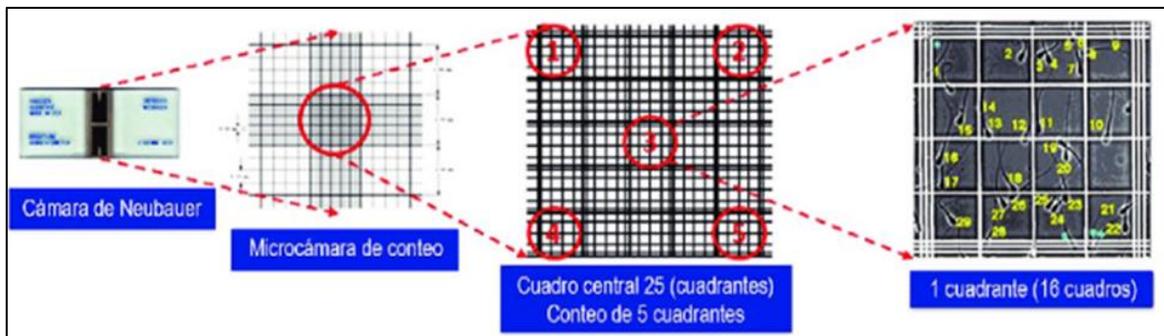


Figura 9. Método de conteo con cámara Neubauer [40]

Una vez contadas la cantidad de microalgas en cada cuadro, se obtuvo un promedio, y este valor se dividió para el volumen del cuadro (0.1 mm^3) y se multiplicó por el factor de dilución (FD). La ecuación para determinar la cantidad de microorganismos por mL es la siguiente:

$$\#Microalgas = \left(\frac{\text{Promedio del número de microorganismos contados}}{\text{Volumen del cuadro (mm}^3\text{)}} \right) \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} \times FD$$

Después de 4 días, se utilizó un factor de dilución de 10 mL, es decir se tomó 1 mL de cada uno de los tres controles y de los matraces con cafeína y a cada uno se lo diluyó en 10 mL de agua destilada para facilitar el conteo.

2.3.2. Espectrofotometría.

Para la determinación de la densidad celular se utilizó el método de espectrofotometría, técnica analítica que permite determinar una concentración al medir la absorbancia de una muestra a una longitud de onda determinada, con el objetivo de obtener una curva de calibración [42]. Para la aplicación de esta técnica se utilizó un espectrofotómetro Spectronic 20D+ (Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA), un Microscopio (Olympus, Germany), cámara de conteo de Neubauer de 1/10 mm (Boeco, Germany), contador manual (Tamaco, Taiwán). Se realizó un barrido de la muestra de la solución madre sin diluir determinando así la longitud de onda, la cual fue de 712 nm.

La curva de calibración permite relacionar los dos métodos de densidad celular empleados en este estudio que son densidad óptica y conteo celular; por lo que se prepararon 5 diluciones de 10, 15, 20, 25, y 30 mL a partir de la solución madre, las cuales pasaron por un proceso de conteo con la cámara de Neubauer en el microscopio con un aumento de 40x, para determinar la cantidad de unidades formadoras de colonias. Después, las diluciones se llevaron al espectrofotómetro para medir su densidad óptica. Finalmente, los valores obtenidos se graficaron en la curva de calibración.

2.4. Producción y fijación de biofilm.

En este estudio se diseñó un fotobiorreactor de disco de eje rotativo, conocido como los fotobiorreactores de células suspendidas, el cual posee ventajas en cuanto a la concentración de microalgas por unidad de volumen de medio, facilidad de recolección de microalgas, reducción de la ausencia de células en el efluente, mayor eficiencia en el uso de la radiación recibida por unidad específica de suelo y menor consumo de energía en el proceso. En este sentido, este diseño representa una opción atractiva para su posterior

implementación en el tratamiento de ríos contaminados con costes de instalación y funcionamiento significativamente menores.

2.4.1. Diseño y condiciones de operación.

I. Metodología elección sustrato

Los sustratos por compararse son tres: esponja (celulosa), vileda (fibra de nylon poliéster) y biotransportador de polietileno; materiales usados en un estudio realizado por Akao et al., en el que se demuestra que entre 4 diferentes tipos de sustratos la esponja y el biotransportador presentan mayor fijación de biomasa debido a su mayor área superficial [43]. La esponja y el vileda fueron adheridos a las hélices, mientras que los biotransportadores fueron diseñados en forma de disco con un patrón de malla. Las características se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características de los sustratos

Sustratos		
Plástico PET [44]	Fibra de nylon poliéster (vileda) [45] [46]	Celulosa (esponja) [47]
Fórmula Química: $(C_{10}H_8O_4)_n$ Alta Dureza y rigidez Densidad a 20°C: 1.38 g/cm ³ Temperatura de fusión: 255°C Conductividad térmica a 20°C: 0.28 W/mK Temperatura de moldeo: 75-79°C Resistividad eléctrica: 7.55×10^{16} Ohm cm Índice de refracción: 1.58 – 1.64 Calor específico: 1200 – 1350	Composición Fibra: Nylon-Poliéster. Resinas: Fenólicas-Acrílicas. Minerales: Cuarzo, silicatos. Grosor: 8 mm (\pm 1mm). Dureza: 98 %. Resistencia a la rotura: Transversal: 50.48 % Longitudinal: 34.36 %	Composición Agua: 25-60 % ww Esponja celulosa: 10-50 % ww Aditivos y pigmentos Densidad seca: 7 g / 100 cm ³ ; Absorción total: 55 g / 100 cm ³

II. *Diseño del reactor.*

Predimensionamiento: Para esta sección se realizaron los diseños preliminares del reactor, tomando en consideración los criterios de diseño.

- Se propuso un biorreactor de ejes rotativos, ya que el cual está conformados por 2 discos y un sistema de agitación mecánica con aspas tipo hélice, dicha rotación del sistema permitirá mantener en suspensión a la biomasa y evitar la sedimentación de esta, los materiales del biorreactor se describen en la Tabla 3.
- El biorreactor se compone entonces por 2 hélices que proporcionan la agitación necesaria, 2 discos, un eje de metal, y un motor de 6rpm.
- Conociendo que el crecimiento de microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de luz que reciben el fotobiorreactor se implementó en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Universidad San Francisco de Quito y se iluminó con luz fluorescente (lámparas OSRAM 20W) por fotoperíodos de 12 horas empleando el temporizador Heavy Duty Timer (Intermatic, Illinois, U.S.A), durante 36 días, a una temperatura ambiente de 23°C [48].
- Para la fijación se consideró que el material puede ser de plástico por lo cual el material de los discos es Tereftalato de Polietileno (PET). El PET es el plástico utilizado para la impresión 3D, debido a sus características de menor fragilidad, fácil de procesar y resistente a temperaturas de hasta 80°C [49]
- En base a los criterios de crecimiento y fijación de las microalgas se planteó que el contenedor sea de material translucido rectangular permitiendo el paso de luz por lo cual se propone el uso de acrílico, por ser más resistente y menos frágil que el vidrio, las dimensiones se encuentran descritas en la Tabla 4.

Tabla 3. Materiales del biorreactor

Materiales	
Discos y hélices	Tereftalato de Polietileno (PET)
Contenedor	Acrílico
Motor (microondas)	6rpm
Sustrato hélice	Fibras de nylon (vileda) y Celulosa (Esponjas)

Tabla 4. Dimensiones del contenedor.

Dimensiones del contenedor	Ancho (cm)	15
	Largo (cm)	26
	Altura (cm)	20

- Cada disco se diseñó con un modelo tipo rejilla para proporcionar una mayor superficie de contacto para la adhesión y sujeción de las microalgas. Este diseño permite lograr una mayor porosidad y por ende mayor área superficial para la formación del biofilm, las dimensiones se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Dimensiones de los discos

Dimensiones discos	
Cantidad de discos	2
Diámetro del disco (cm)	12
Espesor (cm)	2
Espacio entre disco y hélice (cm)	1
Diámetro agujero disco (cm)	2.1
Diámetro del tubo	3/4"

Rejillas (cm)	0.5
Peso disco 1 (g)	121.4866
Peso disco 2 (g)	123.4754

Área efectiva de contacto para adhesión de microalgas.

Discos.

$$A_{dt} = \pi * \frac{D^2}{4} \quad (1)$$

Agujero.

$$A_{ag} = \pi * \frac{d^2}{4} \quad (2)$$

Considerando el espesor del disco donde también hubo adherencia, se obtiene

$$P_d = \pi * D \quad (3)$$

$$A_{ed} = P_d * e \quad (4)$$

$$A_{dT} = A_{dt} + A_e - A_{ag} \quad (5)$$

Donde

A_{dt} = Área del disco, D = Diámetro del disco, d = diámetro del agujero, e = Espesor del disco, A_{ed} = Área del espesor del disco, A_{ag} = Área del agujero, A_{dT} = Área del disco total

- Las hélices también se diseñaron de material plástico, sin embargo, se propuso el uso de fibra de nylon poliéster (vileda) y celulosa (esponjas) para aprovechar las superficies existentes, como se detalla en la metodología de elección de sustrato, las dimensiones de las hélices se describen en la Tabla 6.

Tabla 6. Dimensiones de las hélices

Hélices		
	Cantidad de hélices	2

Dimensiones	Cantidad de aspas	6
	Ancho (cm)	4
	Alto (cm)	6

Área efectiva de contacto para adhesión de microalgas.

Hélices.

$$A_h = A_a - A_{ag} \quad (6)$$

$$A_a = \text{Ancho} * \text{Largo} * 6 \quad (7)$$

$$A_{ag} = \pi * \frac{d^2}{4} \quad (8)$$

Donde

A_h = Área de las hélices, A_a = Área de aspas, A_{ag} =Área de agujero, d = diámetro del agujero

III. Elaboración.

- En la Figura 10., se presenta el armado final del contenedor acrílico.

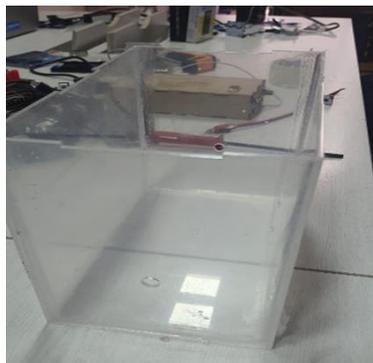


Figura 10. Contenedor de acrílico

- Para las hélices se consideró el diseño de 6 aspas (Fig. 11), las medidas se describen en la Tabla 6.

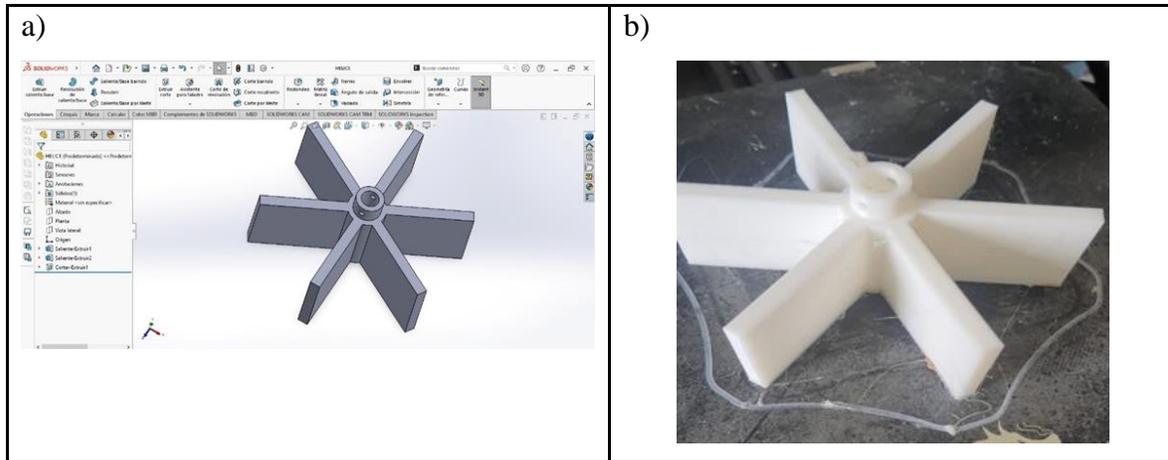


Figura 11. Diseño de las hélices - Sustrato 1. a) Diseño hélice en 3D, b) hélice impresa
 En la Figura 12., se muestra el diseño del disco, las medidas se describen en la Tabla 5.

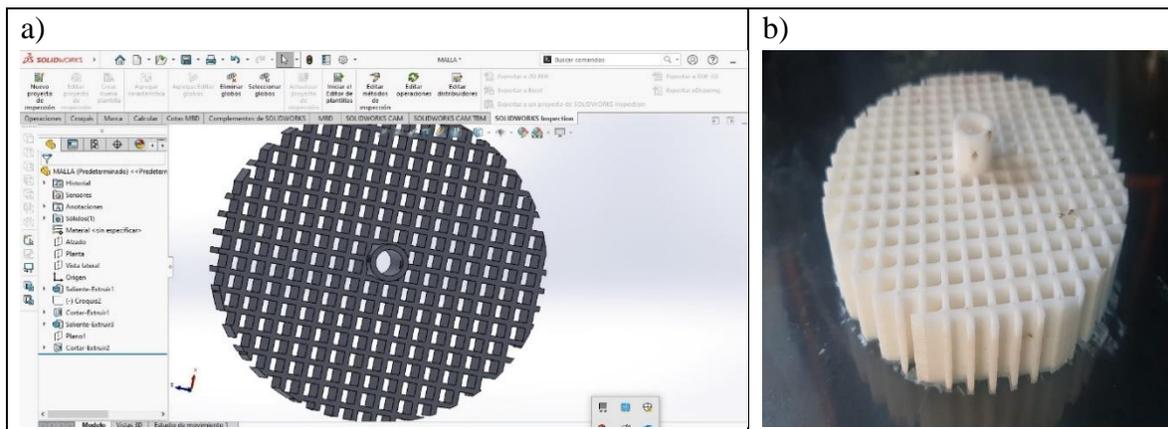


Figura 12. a) Diseño disco en 3D, b) Disco impreso

En la Figura 13., se muestran los planos con las medidas de todos los componentes del biorreactor, se incluye la vista superior y la vista transversal.

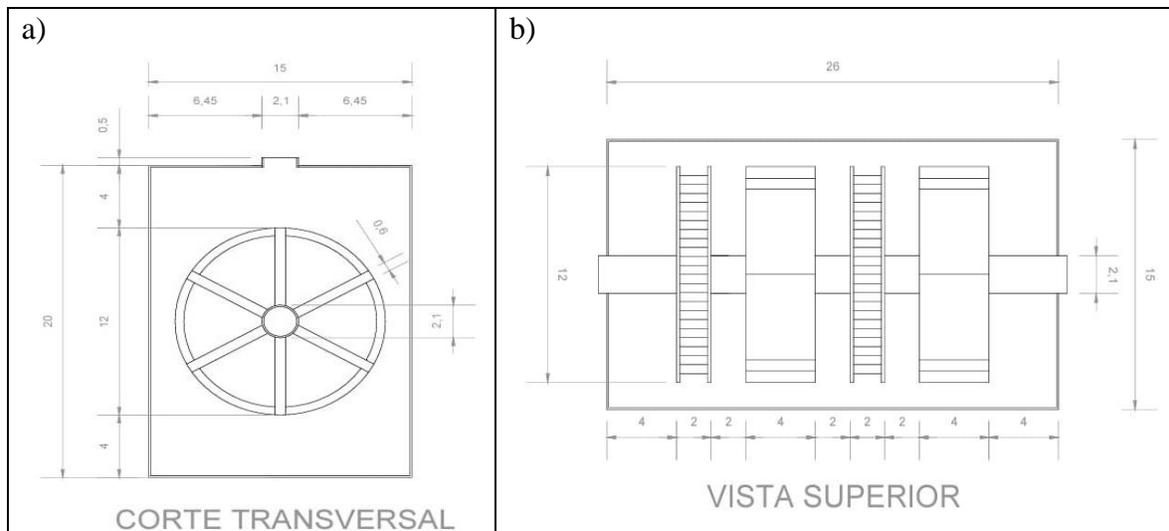


Figura 13. Planos Biorreactor de eje rotativo a) Corte transversal, b) Vista superior

IV. Ensamblaje.

- Para el ensamblaje se colocaron las 4 piezas en el eje, ajustadas con tornillos para facilitar la posterior extracción de los sustratos. Posteriormente, el eje del reactor se acopló un motor de microondas de 6rpm, para que permita girar el sistema.
- En la Figura 14., se muestra el biorreactor armado con todos sus componentes.

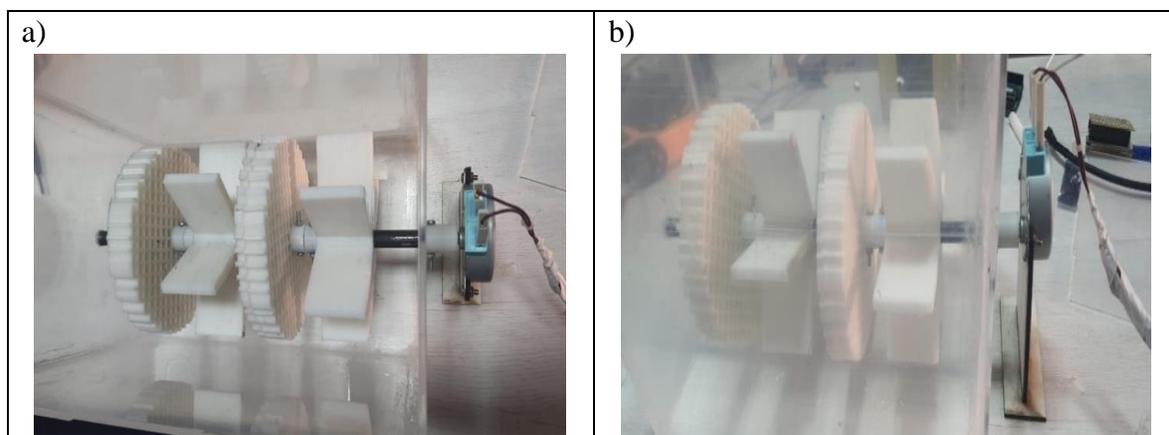


Figura 14. Biorreactor armado a) Vista superior, b) Vista frontal

V. Preparación de inóculo para biorreactor.

Después de 15 días de adaptación en el agitador, se realizó un inóculo de 100 mL de las células suspendidas de la Amazonia en un volumen de 1 litro con 900 mL de BBM, el mismo que fue usado para el reactor de fijación. Se preparó un total de 2 litros (Fig. 15), pero en el biorreactor se colocó 1.62 litros, este volumen se obtuvo al realizar los cálculos de diseño del biorreactor.



Figura 15. BBM3 e inóculos para el biorreactor

VI. *Formación de biofilm.*

- Para la etapa de adaptación y adhesión de las microalgas se puso en marcha el sistema del reactor con los discos y las hélices. De modo que, tras armarse el biorreactor (Fig. 16), se colocó 1.62 litros de BBM con un 10% de inóculo preparado antes. La edad del cultivo fue de 7 días. El volumen colocado en el reactor cumple con el criterio de área sumergida de 40% para facilitar el crecimiento y adhesión de las microalgas en los discos y hélices evitando la sedimentación de microalgas al fondo del reactor. El medio se renovó cada 5 días.

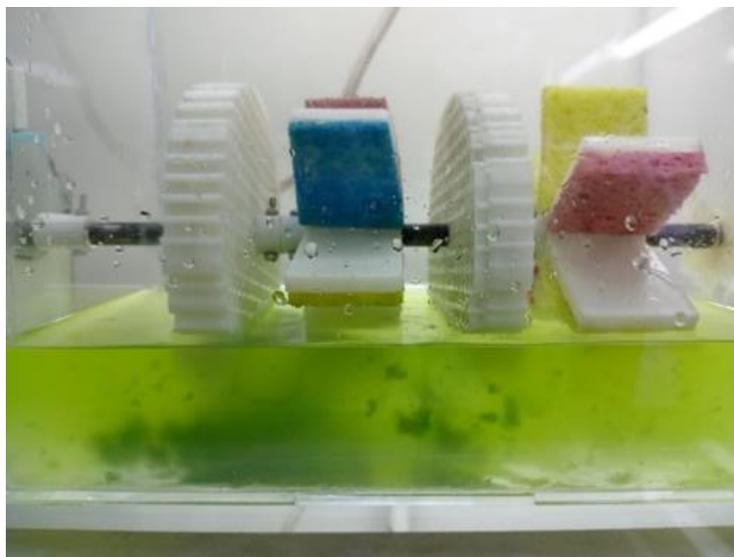


Figura 16. Reactor con algas suspendidas, día 1.

VII. *Medición de adhesión de biofilm de microalgas a sustratos.*

Para determinar la formación del biofilm se empleó la técnica de diferencias de pesos; técnica que consiste en pesar los sustratos, el peso seco de los discos de PET y el peso mojado de las hélices con los sustratos de nylon de poliéster (vileda) y celulosa (esponjas) adheridos (Fig. 17). Para luego de 36 días pesar nuevamente los discos y hélices y obtener la diferencia de peso que representa la cantidad de microalgas fijadas en cada uno de los sustratos.

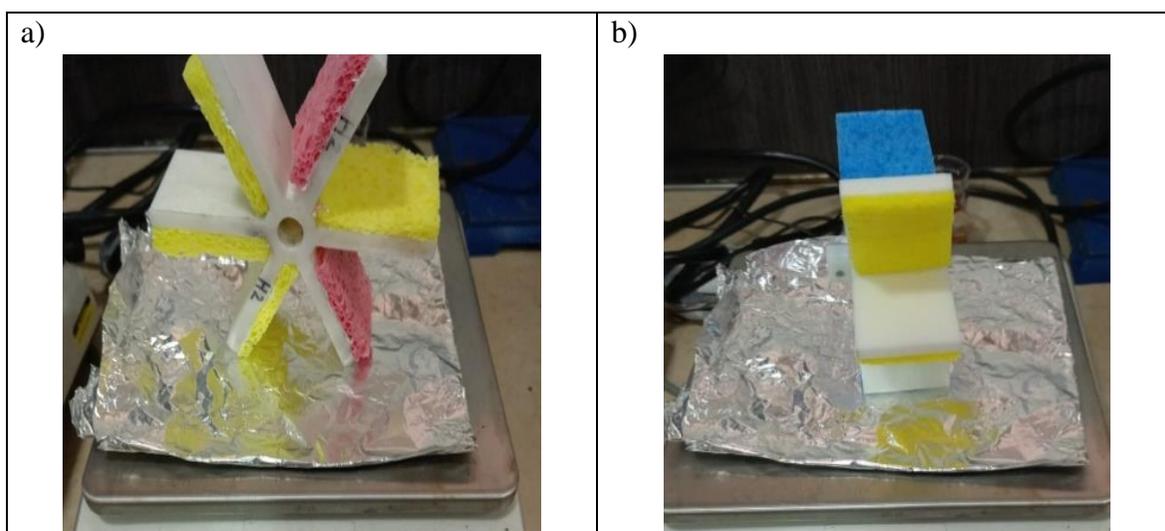


Figura 17. Pesaje de las hélices con las esponjas a) Vista frontal, b) Vista lateral

3. RESULTADOS

3.1. Línea base

Tabla 7. Resultados línea base

Línea Base	Descripción	Ref.
Descripción del proyecto	El presente estudio analiza y compara el efecto que tienen tres diferentes sustratos (PET, celulosa y poliuretano) en la adhesión de microalgas; para la formación de biofilm, además se demuestra el efecto de la cafeína en el crecimiento de un consorcio de microalgas proveniente de la Amazonía.	
Descripción del área	Ubicación: La subcuenca del río Guayllabamba, se extiende desde el valle de Machachi, a través del Valle los Chillos y Cumbayá. Provincia: Pichincha, zona interandina del Ecuador. Área puntual de influencia: Subcuenca del río San Pedro en la zona de Cumbayá	[50]
Contaminantes	Coliformes fecales, DBO ₅ , alteración de pH, nitratos, fosfatos, cadmio, magnesio, DQO _T , conductividad, amonio, sodio, metales pesados elementos traza	[51] – [54]
Afectación de los contaminantes presentes en el río San Pedro según estudios realizados en diferentes años	Índice de calidad del agua “mala” y cercana “muy mala” en el año 2018, nitratos, pH y turbidez se encuentran dentro de los criterios de calidad, sin embargo, con respecto a coliformes fecales, se encontró concentraciones entre 10.000 a 300.000 NMP/100ml y un DBO ₅ de 66 y 200 mg/L; sobrepasando la norma ecuatoriana de calidad	[51]
	Análisis de elementos mayores en el río San Pedro, Cumbayá en el año 2017, se midieron los siguientes parámetros físicos: pH: 8.00± 0.01, T (°C): 13.43 ± 0.06, ORP (mV): 297.13 ± 3.45, OD (mg/L): 8.23 ± 0.20, Cond ($\mu\text{S/cm}$): 529.77 ± 0.06* y Turbidez (NTU): 22.17 ± 3.30. En cuanto a los parámetros químicos se obtuvo: DQO_T = 20 mg/L; DQO_s = 8.87 mg/L; SST = 52.00 mg/L; ST = 470 mg/L; NH₄⁺ = 7.16 mg/L; Cl⁻ = 23.78 mg/L; PO₄³⁻ = 1.19 mg/L; SO₄²⁻ = 65.85 mg/L; NO₃⁻ – N = 6.95 mg/L; DBO₅ = 3.00 mg/L; S²⁻ = <0.05 mg/L; F⁻ = 0.17 mg/L; Mg = 34.21 ± 2.87 mg/L; Na = 73.15±1.26 mg/L y Ca = 29.32±2.79 mg/L.	[52]

	<p>El río San Pedro al ser receptor de aguas servidas y efluentes industriales, presenta los valores más altos de DQO, DBO, pH, fosfato, amonio, magnesio, conductividad, nitrato, sodio y fluoruro entre los 18 ríos comparados. En el caso del Mg, este presenta valores superiores a la normativa europea.</p>	
	<p>El río San Pedro en la parte del valle de Cumbayá como punto de muestreo para determinar la concentración de metales en sedimentos reportando presencia de metales pesados y elementos traza, Aluminio, 9.4 ± 0.1 (%) Bario, 517.95 ± 0.68 ($\mu\text{g/g}$) Calcio, 3.8 ± 0.0 (%) Cromo, 52.92 ± 0.30 ($\mu\text{g/g}$) Cobre, 324.53 ± 1.09 ($\mu\text{g/g}$) Hierro, 3.9 ± 0.0 (%) Magnesio, 1.4 ± 0.0 (%) Molibdeno, <LC Manganeseo, 535.66 ± 0.65 ($\mu\text{g/g}$) Níquel, 15.04 ± 0.07 ($\mu\text{g/g}$) Plomo, 10.26 ± 1.00 ($\mu\text{g/g}$) Titanio, 4245.92 ± 29.60 ($\mu\text{g/g}$) Vanadio, 120.14 ± 0.33 ($\mu\text{g/g}$) Zinc, 318.30 ± 0.33 ($\mu\text{g/g}$).</p>	[53]
	<p>El río San Pedro contiene un Índice de Calidad de Agua NSF de 67.39% valor de calidad medio, evidencia alteraciones por actividades antrópicas y menos diversidad de organismos acuáticos.</p> <p>presencia de aceites, grasas, amoníaco, cobalto, cobre, fenoles, tensoactivos, sólidos suspendidos, TPH, manganeso, mercurio, plata, plomo, selenio, nitratos, zinc, níquel, berilio, cadmio, cianuro, cromo, bario, cuyos valores no sobrepasan la Norma de calidad agua, sin embargo, metales pesados como el aluminio poseen valores de 1.9 mg/L, hierro de 2.7 mg/L, DBO 37 mg/L y DQO 61 mg/L que exceden de los límites permisibles.</p> <p>En cuanto a contaminantes emergentes se ha identificado la presencia de cafeína, siendo su concentración de 87 $\mu\text{g/L}$.</p>	[54]

3.2. Cultivo de microalgas bajo condiciones controladas

3.2.1. Selección de microalgas

A partir de las dos muestras obtenidas (muestra de la laguna y muestras de microalgas de la Amazonía), se analizó cuál de ellas se usaría en el estudio, las recolectadas de la laguna

USFQ se observaron bajo el microscopio con una magnificación de 40x y se evidenció la presencia de microorganismos adicionales a las microalgas, que se muestran en la Figura 18.

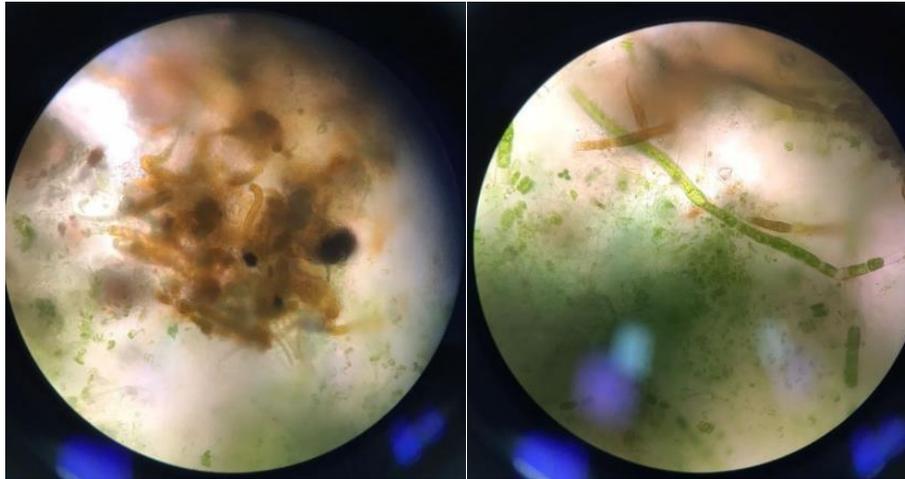


Figura 18. Microorganismos de la laguna USFQ

Debido a la presencia de varios tipos de microorganismos sin identificar, de los cuales se desconoce su comportamiento, la muestra de la laguna no es adecuada para los objetivos de este estudio y se decidió enfocar el proyecto en el uso de un consorcio de microalgas de la Amazonía, ya que estas se encuentran aisladas en el laboratorio y su comportamiento ya se ha estudiado y descrito en investigaciones anteriores.

3.3. Análisis de crecimiento celular.

3.3.1. Conteo celular.

Los resultados del conteo manual realizados con la cámara de Neubauer se resumen en la Tabla 9. Durante los primeros siete días, el número de células en los controles fue mayor que los de la cafeína, sin embargo, a partir del octavo día, el conteo de las células de los Erlenmeyer con cafeína superó a los controles.

Tabla 8. Conteo promedio de control y cafeína

Día	Control Promedio (células/ml)	Cafeína Promedio (células/ml)
1	1.71E+04	1.34E+04
2	2.17E+04	1.90E+04
3	3.04E+04	2.69E+04
4	9.89E+04	9.57E+04
5	1.24E+05	1.44E+05
6	9.80E+04	7.93E+04
7	1.63E+05	1.35E+05
8	3.39E+05	4.21E+05
9	3.16E+05	4.10E+05
10	3.59E+05	3.09E+05
11	4.04E+05	3.72E+05
12	3.21E+05	3.66E+05
13	3.09E+05	3.41E+05
14	3.48E+05	4.49E+05
15	3.41E+05	4.93E+05

En la Figura 19., se muestra el conteo de los ensayos de control y cafeína realizados durante 15 días, se observó que, durante los tres primeros días, los ensayos de control tenían una mayor densidad celular. Los días 4 a 7, el control siguió por encima de los ensayos de cafeína, sin embargo, en el día 8, los mismos desarrollaron una mayor densidad celular, llegando a ser mayor el número de células contadas. Por esta razón, se infiere que la cafeína no presentó un efecto negativo sobre el crecimiento de las microalgas.

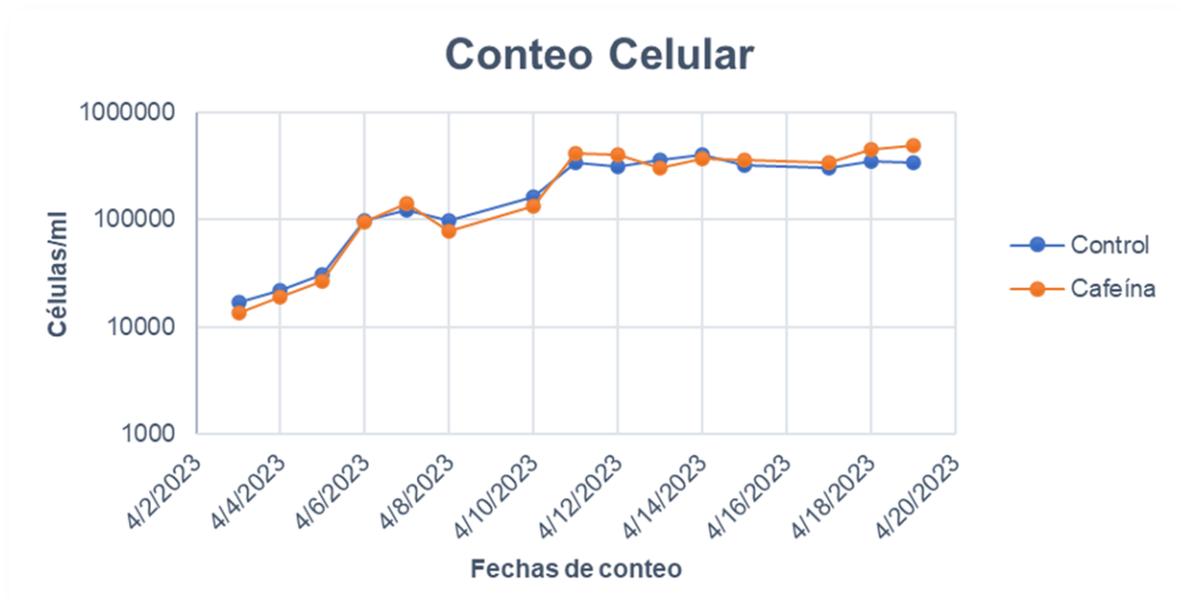
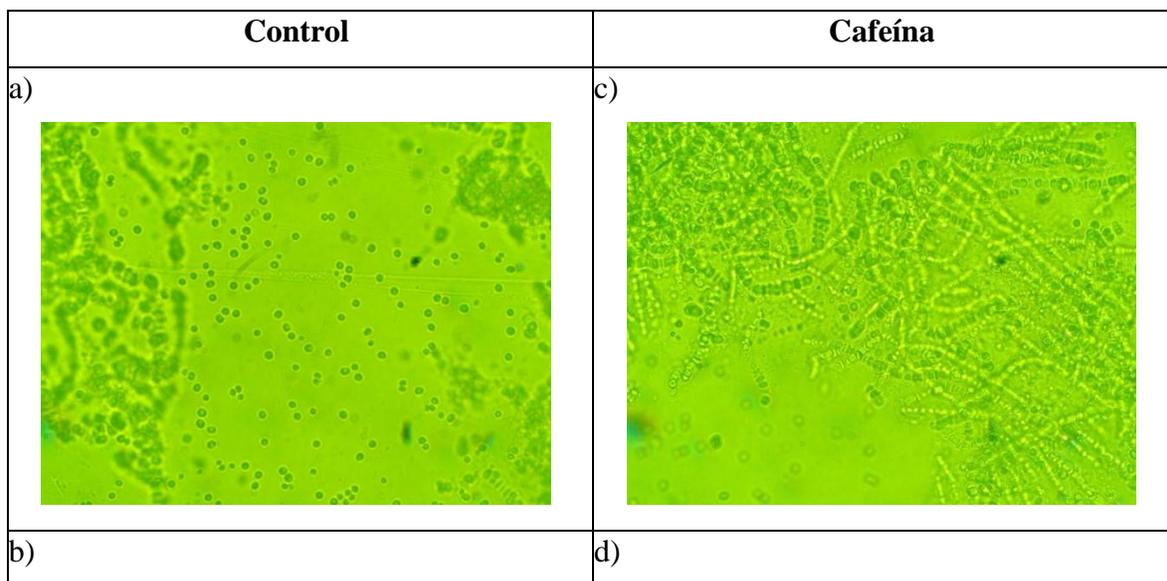


Figura 19. Conteo celular de los ensayos de control y cafeína durante 15 días

Se observó que los ensayos con cafeína presentaban un gran número de microalgas unidas en forma de filamentos, mientras que los ensayos de control, estos filamentos no fueron tan abundantes, como se observa en la Figura 20.



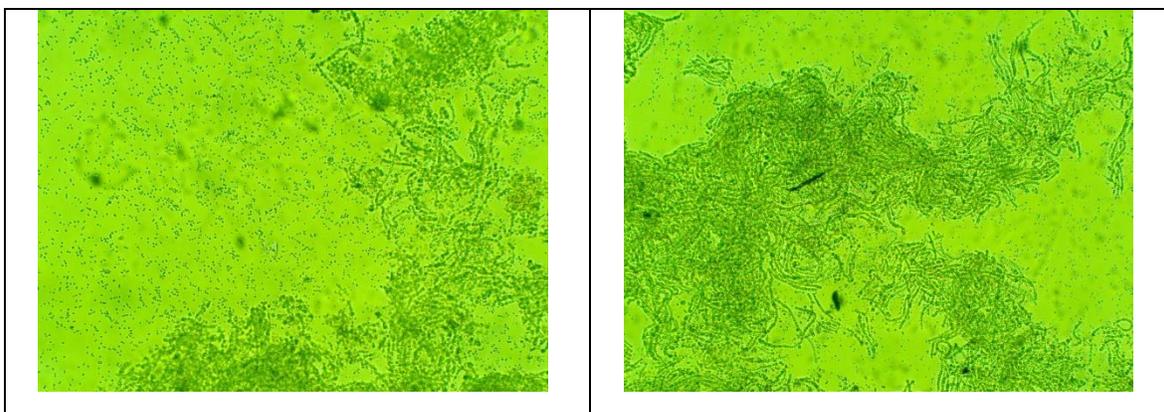


Figura 20. a) Microalgas control a 40x, b) Microalgas control a 10x, c) Microalgas cafeína a 40x, d) Microalgas cafeína a 10x

3.3.2. Espectrofotometría.

Con respecto a la validación del método manual de conteo, se realizó un barrido para conocer la longitud de onda (λ), la cual fue $\lambda=712$ nm. Los resultados del espectrofotómetro se describen en la Tabla 10:

Tabla 9. Medidas de concentración y absorbancia

Concentración (células/mL)	Absorbancia
0	0
162	0.033
116	0.029
101	0.018
70	0.011
63	0.008

De igual manera, se realizó el gráfico de los datos de la Tabla 10., y se obtuvo la ecuación de la recta del modelo estadístico (Fig. 21).

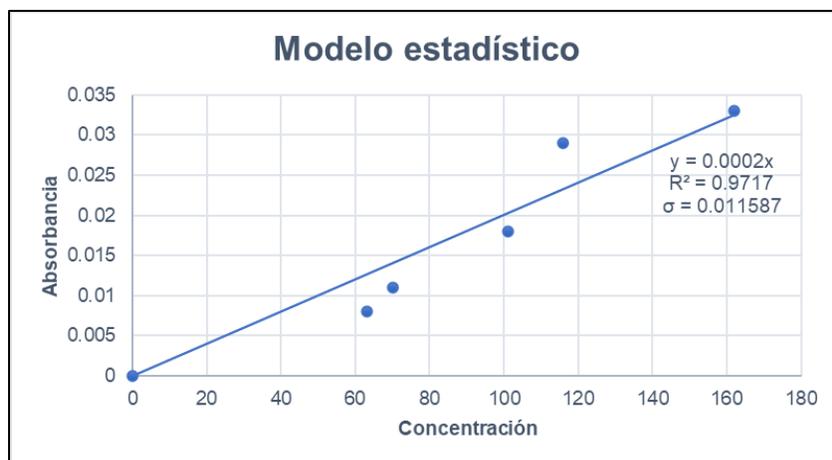


Figura 21. Modelo estadístico obtenido

Con la ecuación $y = 0.0002x$, se calculó la concentración de las células, a continuación, en la Tabla 11., se muestra el conteo manual del día 15 y la verificación con la ecuación obtenida. Los valores experimentales de los ensayos de cafeína se asemejan a la concentración experimental obtenida.

Tabla 10. Concentración celular y absorbancia de los ensayos del 19 de abril

Ensayo	Absorbancia	Concentración de células	Concentración de células
		(teórica)	(experimental)
		(células/mL)	(células/mL)
Control 1	1.21	6.05E+05	3.05E+05
Control 2	1.127	5.64E+05	3.36E+05
Control 3	1	5.87E+05	3.82E+05
Cafeína 1	1.004	5.02E+05	5.16E+05
Cafeína 2	1.002	5.01E+05	4.97E+05
Cafeína 3	1.019	5.10E+05	4.93E+05

Por lo que se infiere que la ecuación obtenida puede ser usada para la cuantificación de crecimiento celular del consorcio microbiano proveniente de la Amazonía, sin la necesidad de realizar el conteo manual.

3.4. Producción y fijación de biofilm.

3.4.1. Diseño y condiciones de operación.

Se obtuvo una estructura de un biorreactor con un volumen de 7.8 L, que contenía 1.62 L de BBM con un 10% de inóculo como se indica en la Figura 22.

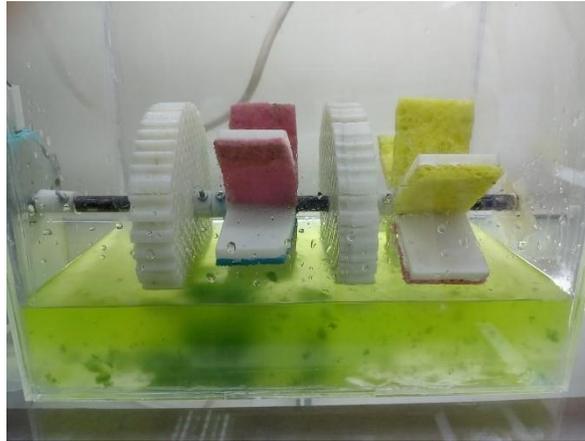


Figura 22. Biorreactor con inóculo

3.4.2. Área efectiva de contacto para adhesión de microalgas.

Se calcula el área efectiva para adhesión disponible de los discos y las hélices con los datos proporcionados en la sección anterior

- Discos

Usando la ecuación 1 citada en la sección de materiales y métodos se obtiene un Área del disco

$$A_d = 133.097 \text{ cm}^2$$

Considerando que el disco posee dos caras que servirían para la adhesión del biofilm se debe multiplicar por dos el área de disco obteniendo un valor de área disponible de:

$$A_{dt} = 266.194 \text{ cm}^2$$

El área del agujero se calculó con la ecuación 2 obteniendo un resultado de:

$$A_{ag} = 3.464 \text{ cm}^2$$

Se calcula el área del espesor del disco con las ecuaciones 3 y 4, ya que también es un área disponible para la adhesión

$$A_{ed} = 75.398 \text{ cm}^2$$

Entonces el área total del disco se obtiene con la ecuación 5:

$$A_{dT} = 338.128 \text{ cm}^2$$

Hélice

Usando las ecuaciones 6, 7 y 8 se obtiene el área efectiva de contacto de las hélices:

$$A_a = 24 \text{ cm}^2$$

$$A_{ag} = 3.464 \text{ cm}^2$$

$$A_h = 123.216 \text{ cm}^2$$

Con estos resultados se puede verificar que el área proporcionada para adhesión de biofilm en el disco resulta ser mayor que el de las hélices con esponja y vileda y se infiere que el disco con rejillas menoraría el espacio ocupado en un reactor proveyendo de mayor área disponible para el crecimiento de las microalgas.

3.4.3. Monitoreo de fijación de biofilm.

La fijación de biofilm se monitoreó por medio de registros fotográficos que se muestran en el ANEXO A para luego utilizar el protocolo descrito previamente en la sección 2, Materiales y Métodos, y obtener el peso del biofilm fijado en cada sustrato analizado, para realizar la comparación respecto a la determinación de cuál es el mejor sustrato para la adhesión de las microalgas. Las diferencias de peso de los discos y hélices con esponjas húmedas se muestran en la Tabla 12., mientras que en la Figura 23., se observa el gráfico de barras correspondiente a la diferencia de pesos entre los sustratos.

Tabla 11. Diferencia de pesos de disco y hélices

Sustrato	Peso (g) día 1	Peso (g) día 36	Microalgas adheridas (g)
Hélice 1 (vileda húmedas)	117.905	135.05	17.145
Hélice 2 (esponjas húmedas)	111.77	119.81	8.04
Disco 1	121.486	144.41	22.924
Disco 2	123.475	139.26	15.785

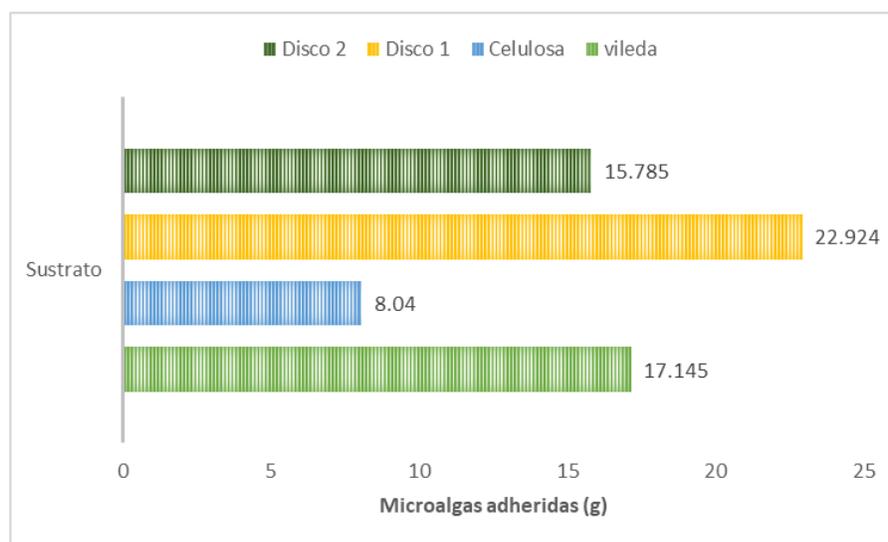


Figura 23. Microalgas adheridas a los sustratos

En base a la Tabla 12., los datos obtenidos reflejan que después de un total de 36 días en el reactor, el biofilm se adhirió con éxito, como podemos observar en la Figura 24., los discos presentaron una mayor adhesión de microalgas esto es concordante con el cálculo del área efectiva de contacto para adhesión de microalgas la cual es mayor que la obtenida para las hélices. Seguido por el crecimiento en el sustrato de nylon poliéster el cual tuvo una fijación de biofilm, de casi 16 g. Sin embargo, en el caso del sustrato de celulosa se observa que el crecimiento fue muy bajo esto se debe a que el material al estar en contacto por un período prolongado empieza a degradarse disminuyendo la cantidad de sustrato disponible, parámetro en el que el material PET y nylon poliéster presentan una ventaja, como se observa en la Figura 23.

Por lo cual, se determina el impacto que tiene las propiedades de la superficie del sustrato como su rugosidad y material [55].

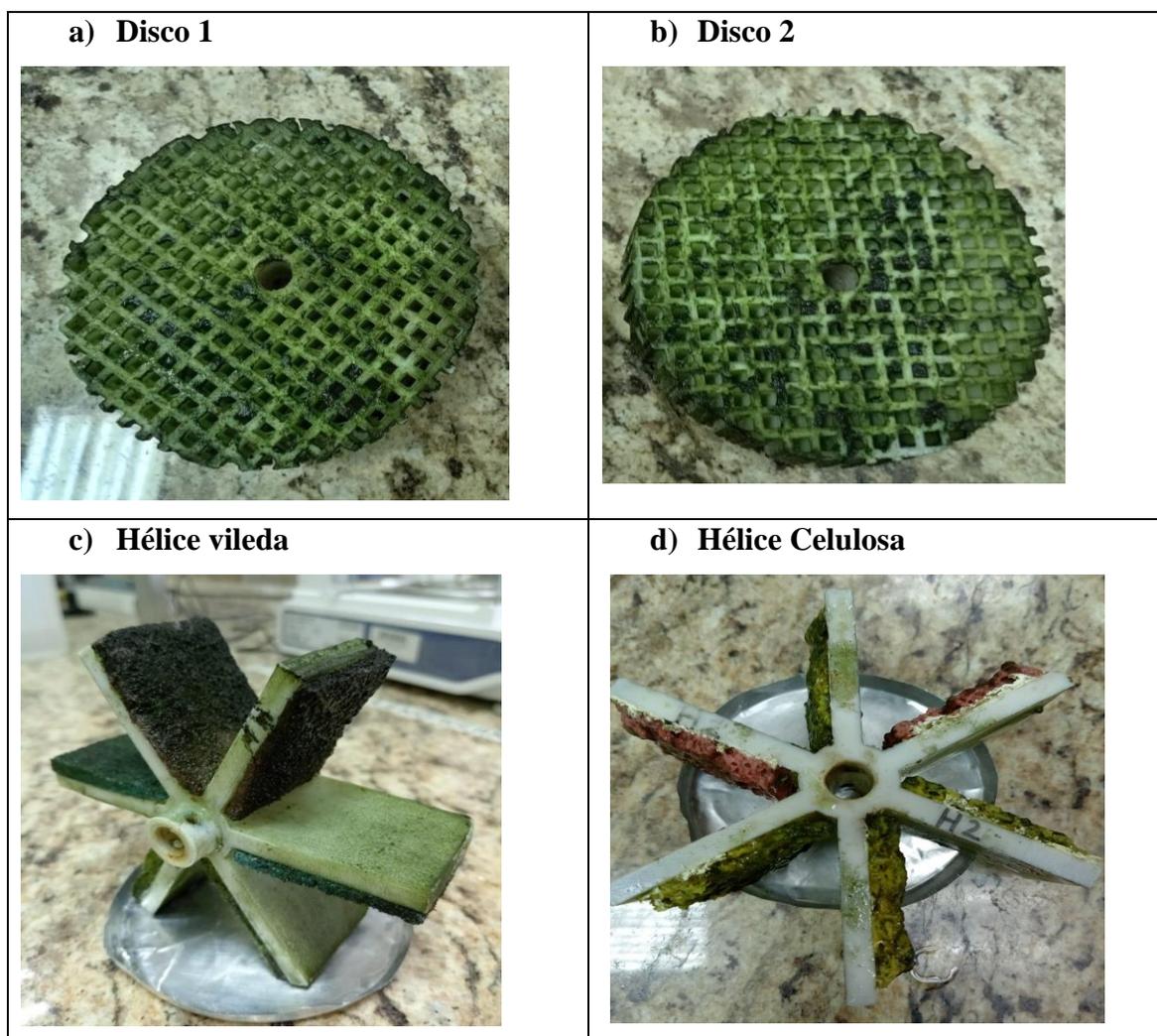


Figura 24. A) vista frontal disco 1, b) vista frontal disco 2, c) vista frontal hélice (vileda), d) vista frontal hélice (esponja)

4. CONCLUSIONES

Se trabajó en el diseño puesta en marcha el biorreactor para fijación de biofilm a escala laboratorio, demostrando qué sustrato es el más adecuado para la aplicación de este fotobiorreactor in situ, además de analizar el efecto de la cafeína en el crecimiento de las microalgas. Tras analizar los estudios relacionados con el río San Pedro, se logró recabar información relevante sobre el estado de la cuenca del río, estableciendo contaminantes convencionales y emergentes provenientes de las aguas sin tratamiento que se vierten en este río. Los estudios realizados en la zona del río San Pedro evidencian altas concentraciones de contaminantes presentes, debido al crecimiento poblacional alrededor de este río, se debe buscar tratamientos integrales para los efluentes del río para evitar que el efecto de la contaminación sea irreversible.

Para el cultivo de microalgas, se utilizó un consorcio de algas *Chlorella sp.* del oriente ecuatoriano en ensayos con y sin cafeína, utilizando el método de conteo de la cámara de Neubauer durante 15 días. Los ensayos con cafeína presentaron menor densidad celular en los primeros días, sin embargo, en los días posteriores, se evidenció un ligero aumento en el número de microalgas de los ensayos con cafeína, comparado con los ensayos control. Se concluye que no se evidencia efectos adversos en el crecimiento de las microalgas, añadiendo 35 mg/L de cafeína.

Por otro lado, se desarrolló un modelo estadístico obtenido por espectrofotometría creando una curva de calibración entre la densidad celular y la absorbancia, de tal manera que se evite el conteo celular manual; dicho modelo estadístico fue validado con los valores de conteo manual, por lo que se concluye que se puede utilizar el método de espectrofotometría para calcular la densidad celular de microalgas con la ecuación. En el

resultado del cálculo de áreas superficiales disponibles para la adhesión de biofilm, se obtiene que el disco de PET brinda mayor área superficial disponible y ocupando menos espacio en comparación a las hélices. Además, la Tabla 12., de la sección 3.1. de Resultados, permite observar el porcentaje de incremento de peso húmedo de biofilm en cada sustrato: esponja, vileda o discos PET. Los valores permiten concluir que el disco PET presenta mayor adhesión de biofilm con un valor de 22.924 g de biofilm adherido después de 36 días.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] R. K. Oruganti, K. Katam, P. L. Show, V. Gadhamshetty, V. K. K. Upadhyayula, y D. Bhattacharyya, “A comprehensive review on the use of algal-bacterial systems for wastewater treatment with emphasis on nutrient and micropollutant removal”, *Bioengineered*, vol. 13, núm. 4, pp. 10412–10453, 2022, doi: 10.1080/21655979.2022.2056823.
- [2] E. Recurso Desaprovechado, *AGUAS RESIDUALES*. 2017. [En línea]. Disponible en: www.unesco.org/open-access/terms-use-ccbysa-en
- [3] D. Vinueza *et al.*, “Determining the microbial and chemical contamination in Ecuador’s main rivers”, *Sci Rep*, vol. 11, núm. 1, pp. 1–14, 2021, doi: 10.1038/s41598-021-96926-z.
- [4] S. Li, J. Wen, B. He, J. Wang, X. Hu, y J. Liu, “Occurrence of caffeine in the freshwater environment: Implications for ecopharmacovigilance”, *Environmental Pollution*, vol. 263. Elsevier Ltd, el 1 de agosto de 2020. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114371.
- [5] A. Al-Omari, I. Farhan, T. Kandakji, y F. Jibril, “Zarqa River pollution: impact on its quality”, *Environ Monit Assess*, vol. 191, núm. 3, pp. 1–21, mar. 2019, doi: 10.1007/S10661-019-7283-9/TABLES/8.
- [6] P. Borja-Serrano *et al.*, “Determination of the microbial and chemical loads in rivers from the Quito capital province of Ecuador (Pichincha)—A preliminary analysis of microbial and chemical quality of the main rivers”, *Int J Environ Res Public Health*, vol. 17, núm. 14, pp. 1–26, 2020, doi: 10.3390/ijerph17145048.
- [7] I. P. Vizcaíno, E. V. Carrera, S. Muñoz-Romero, L. H. Cumbal, y J. L. Rojo-álvarez, “Spatio-temporal river contamination measurements with electrochemical probes and mobile sensor networks”, *Sustainability (Switzerland)*, vol. 10, núm. 5, pp. 1–27, 2018, doi: 10.3390/su10051449.
- [8] A. Saravanan *et al.*, “Effective water/wastewater treatment methodologies for toxic pollutants removal: Processes and applications towards sustainable development”, *Chemosphere*, vol. 280, p. 130595, oct. 2021, doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.130595.
- [9] P. U. Iyare, S. K. Ouki, y T. Bond, “Environmental Science Water Research & Technology CRITICAL REVIEW Microplastics removal in wastewater treatment plants: a critical review †”, *Cite this: Environ. Sci.: Water Res. Technol*, vol. 6, p. 2664, 2020, doi: 10.1039/d0ew00397b.
- [10] K. Li *et al.*, “Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review”, *Bioresource Technology*, vol. 291. Elsevier Ltd, el 1 de noviembre de 2019. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121934.
- [11] A. Agüera, P. Plaza-Bolaños, y F. G. A. Fernández, “Removal of contaminants of emerging concern by microalgae-based wastewater treatments and related analytical

- techniques”, *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, pp. 503–525, 2020, doi: 10.1016/b978-0-12-819594-9.00020-6.
- [12] S. S. Rosli *et al.*, “Insight review of attached microalgae growth focusing on support material packed in photobioreactor for sustainable biodiesel production and wastewater bioremediation”, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 134, p. 110306, dic. 2020, doi: 10.1016/J.RSER.2020.110306.
- [13] EPMAPS, “Resumen Ejecutivo Proyecto Vindobona”, 2020.
- [14] R. Snyder y D. Wyant, “State of Michigan Department of Environmental Quality ACTIVATED SLUDGE PROCESS CONTROL TRAINING MANUAL FOR WASTEWATER TREATMENT PLANT OPERATORS Water Resources Division”. [En línea]. Disponible en: www.michigan.gov/deq800-662-9278EnvironmentalAssistanceCenter4/17
- [15] E. Freytez, A. Márquez, M. C. Pire, E. Guevara, y S. Pérez, “Design, construction and evaluation of the performance of a load reactor sequential for treatment of residual waters of teneries”.
- [16] S. Madan, R. Madan, y A. Hussain, “Advancement in biological wastewater treatment using hybrid moving bed biofilm reactor (MBBR): a review”, *Applied Water Science*, vol. 12, núm. 6. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, el 1 de junio de 2022. doi: 10.1007/s13201-022-01662-y.
- [17] A. Mantzorou y F. Ververidis, “Microalgal biofilms: A further step over current microalgal cultivation techniques”, *Science of The Total Environment*, vol. 651, pp. 3187–3201, feb. 2019, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2018.09.355.
- [18] M. B. Benítez, P. Champagne, A. Ramos, A. F. Torres, y V. Ochoa-Herrera, “Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae”, *Environmental Technology (United Kingdom)*, vol. 40, núm. 22, pp. 2977–2985, 2019, doi: 10.1080/09593330.2018.1459874.
- [19] D. Sharma, L. Misba, y A. U. Khan, “Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities”, *Antimicrobial Resistance & Infection Control 2019 8:1*, vol. 8, núm. 1, pp. 1–10, may 2019, doi: 10.1186/S13756-019-0533-3.
- [20] G. Zhao *et al.*, “Attached cultivation of microalgae on rational carriers for swine wastewater treatment and biomass harvesting”, *Bioresour Technol*, vol. 351, p. 127014, may 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2022.127014.
- [21] P. K. Akao *et al.*, “Coupled microalgal–bacterial biofilm for enhanced wastewater treatment without energy investment”, *Journal of Water Process Engineering*, vol. 41, núm. March, p. 102029, 2021, doi: 10.1016/j.jwpe.2021.102029.
- [22] D. M. Rivadeneira moya, “Evaluacion de la remocion de nitritos y nitratos”, *Tesis*, pp. 1–100, 2015, doi: 10.20868/UPM.thesis.39079.

- [23] S. A. Mousavi y F. Khodadoost, “Effects of detergents on natural ecosystems and wastewater treatment processes: a review”, *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 26, núm. 26, pp. 26439–26448, sep. 2019, doi: 10.1007/S11356-019-05802-X/TABLES/3.
- [24] K. Rolle Longley, W. Huang, C. Clark, y E. Johnson, “Effects of nutrient load from St. Jones River on water quality and eutrophication in Lake George, Florida”, *Limnologica*, vol. 77, p. 125687, jul. 2019, doi: 10.1016/J.LIMNO.2019.125687.
- [25] ECOPETROL, “Agua Y Sedimento”, 2022.
- [26] NICOLÁS ALEJANDRO GRIJALVA BORJA, “EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN QUÍMICO-BIOLÓGICA DE UNA SOLUCIÓN MODELO DE CAFEÍNA”, 2020.
- [27] S. F. Ahmed *et al.*, “Recent developments in physical, biological, chemical, and hybrid treatment techniques for removing emerging contaminants from wastewater”, *J Hazard Mater*, vol. 416, p. 125912, ago. 2021, doi: 10.1016/J.JHAZMAT.2021.125912.
- [28] S. Velusamy, A. Roy, S. Sundaram, y T. Kumar Mallick, “A Review on Heavy Metal Ions and Containing Dyes Removal Through Graphene Oxide-Based Adsorption Strategies for Textile Wastewater Treatment”, *Chemical Record*, vol. 21, núm. 7, pp. 1570–1610, jul. 2021, doi: 10.1002/TCR.202000153.
- [29] Q. Farmacéutico Bachiller, Q. Crispin, R. Asesor, Q. M. Paredes, y J. Paul, “FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA”, 2015.
- [30] N. A. Rosmahadi *et al.*, “Assuaging Microalgal Harvesting Woes via Attached Growth: A Critical Review to Produce Sustainable Microalgal Feedstock”, *Sustainability 2021, Vol. 13, Page 11159*, vol. 13, núm. 20, p. 11159, oct. 2021, doi: 10.3390/SU132011159.
- [31] P. K. Akao *et al.*, “Coupled microalgal–bacterial biofilm for enhanced wastewater treatment without energy investment”, *Journal of Water Process Engineering*, vol. 41, p. 102029, jun. 2021, doi: 10.1016/J.JWPE.2021.102029.
- [32] M. J. Page *et al.*, “The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews”, *The BMJ*, vol. 372. BMJ Publishing Group, el 29 de marzo de 2021. doi: 10.1136/bmj.n71.
- [33] Y. Tong Cheah y D. Juinn Chieh Chan, “Physiology of microalgal biofilm: a review on prediction of adhesion on substrates Physiology of microalgal biofilm: a review on prediction of adhesion on substrates, Physiology of microalgal biofilm: a review on prediction of adhesion on substrates”, 2021, doi: 10.1080/21655979.2021.1980671.

- [34] Endong Zhang, “Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment”, *Afr J Biotechnol*, vol. 11, núm. 24, mar. 2012, doi: 10.5897/AJB11.4281.
- [35] A. Salomé y R. Espinosa, “Desarrollo de un tratamiento de aguas residuales con microalgas para la recuperación de nutrientes en Ecuador”.
- [36] G. Zhao *et al.*, “Attached cultivation of microalgae on rational carriers for swine wastewater treatment and biomass harvesting”, *Bioresour Technol*, vol. 351, p. 127014, may 2022, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2022.127014.
- [37] C. Ramírez-López, I. Chairez, y L. Fernández-Linares, “A novel culture medium designed for the simultaneous enhancement of biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris* UTEX 26”, *Bioresour Technol*, vol. 212, pp. 207–216, jul. 2016, doi: 10.1016/J.BIORTECH.2016.04.051.
- [38] University of Texas, “Bold Basal Medium | UTEX Culture Collection of Algae”, 2019. <https://utex.org/products/bold-basal-medium?variant=30991127609434> (consultado el 1 de abril de 2023).
- [39] A. Mojiri *et al.*, “Contaminant Removal from Wastewater by Microalgal Photobioreactors and Modeling by Artificial Neural Network”, *Water (Switzerland)*, vol. 14, núm. 24, 2022, doi: 10.3390/w14244046.
- [40] A. S. Bertan y M. A. Cremasco, “Determination of concentration of the pseudomycelles from fermentation broth via spectroscopy and Neubauer chamber”, ago. 2020, doi: 10.5281/ZENODO.3987017.
- [41] A. C. S. Gomes, L. T. De La Cruz, Y. Garcia, R. B. Bastos, y R. M. Lopes, “Frame Rhythm: A new cost-effective approach for semi-automatic microalgal imaging and enumeration”, *Algal Res*, vol. 64, p. 102659, may 2022, doi: 10.1016/J.ALGAL.2022.102659.
- [42] N. Abril Díaz *et al.*, “8. Espectrofometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas”.
- [43] P. K. Akao *et al.*, “Coupled microalgal–bacterial biofilm for enhanced wastewater treatment without energy investment”, *Journal of Water Process Engineering*, vol. 41, núm. March, p. 102029, 2021, doi: 10.1016/j.jwpe.2021.102029.
- [44] Xometry, “Polyethylene terephthalate data”, 2021.
- [45] RESSOL cleaning equipment, “Informe Técnico Estropajo fibra verde”, 2019.
- [46] D. Acebo-González y A. T. Hernández-García, “Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida”, *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 44, abr. 2013.
- [47] PRODIFA, “Información del producto Esponja Celulosa D1010”.

- [48] A. Ruiz-Martinez, “Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.”.
- [49] A. Shitu, S. Zhu, W. Qi, M. A. Tadda, D. Liu, y Z. Ye, “Performance of novel sponge biocarrier in MBBR treating recirculating aquaculture systems wastewater: Microbial community and kinetic study”, *J Environ Manage*, vol. 275, p. 111264, dic. 2020, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2020.111264.
- [50] “ATLAS CLIMÁTICO DE PICHINCHA”.
- [51] N. Hinojosa, “EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL AGUA DEL RÍO SAN PEDRO, SECTOR VALLE DE LOS CHILLOS, MEDIANTE EL ÍNDICE DE CALIDAD DE AGUA (ICA-NSF)”, 2018.
- [52] C. A. Quilumbaqui C, “UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO”.
- [53] M. Pazmiño, “UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍAS”.
- [54] P. Rescate Del Rio San Pedro, “INFORME TÉCNICO DE MONITOREO AMBIENTAL DE AGUA Y SEDIMENTO ANALÍTICA AVANZADA-ASESORÍA Y LABORATORIOS CIA LTDA”.
- [55] L. Machineni, “Review on biological wastewater treatment and resources recovery: attached and suspended growth systems”, *Water Science and Technology*, vol. 80, núm. 11, pp. 2013–2026, dic. 2019, doi: 10.2166/WST.2020.034.

ANEXO A



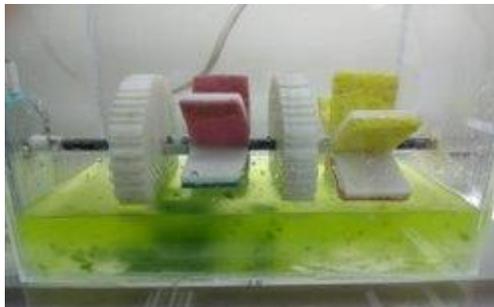
Día 1 Reactor sin inóculo



Día 20 Reactor Fijación biofilm, vista frontal



Día 36 Reactor fijación biofilm



Día 1 Reactor con inóculo



Día 20 Reactor Fijación biofilm, vista lateral