

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Evaluación de tecnologías alternativas para la recuperación de nutrientes en efluentes de instalaciones porcinas comunitarias en la subcuenca del río Daule

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Santiago Martín Romo Herrera

Paul Arturo Tumbaco Muñiz

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

El presente proyecto lo dedico a mis padres quienes han sido pilares fundamentales para no decaer en el intento.

A mis sobrinos Liam y Kenneth, quienes con sus ocurrencias hacen de mí una mejor persona.

Y a mis perritos Aquiles y Lucas, quienes con su forma de ser y juegos han hecho que vea al mundo de otra forma.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento a Dios por darme las fuerzas cada día para poder culminar esta maravillosa carrera.

A mis padres por su gran apoyo incondicional y esfuerzo económico.

A mis hermanas Joselyn y Paola, por estar siempre conmigo.

A la Ing. Andrea Rosado, a los Biólogos John Ramos y Gabriela Sanguña, por prestarnos un espacio de su laboratorio, su paciencia, y prestos en ayudarnos para culminar nuestro proyecto.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Luis Domínguez e Ing. Christian Macías, cotutor y tutor de nuestra tesis, gracias por darnos la oportunidad y confianza para poder ser parte de este proyecto, y a su vez ser ese apoyo para no de caer en el intento.

A todos mis amigos, pero en especial a Cesar Santiago, Angélica Velasteguí y Belén Baque, gracias por el apoyo que me brindaron.

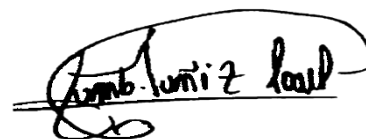
Y a cada persona que, sin ser parte del proyecto colaboraron con su ayuda para terminar este trabajo.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Santiago Martín Romo Herrera* y *Paul Arturo Tumbaco Muñiz* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Santiago Martín Romo
Herrera



Paul Arturo Tumbaco
Muñiz

EVALUADORES

Nadia Flores

PROFESOR DE LA MATERIA

Christian Macías

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

El río Daule es una de las principales fuentes de agua natural, de la cual se ve beneficiada la población que se asienta a su alrededor. La constante contaminación de este cuerpo de agua está causando un cambio considerable en su concentración de nutrientes, el cual, perjudica tanto a las comunidades que hacen uso de este suministro como a la vida acuática y silvestre que se desarrolla en su entorno. Uno de los contaminantes principales es el manejo y desecho erróneo de los efluentes porcinos de instalaciones porcinas ubicadas por la subcuenca del río. Una de las alternativas para el tratamiento de este tipo de residuos es el uso de la microalga *Arthrospira Platensis*. Por lo que, este trabajo evalúa la viabilidad de sostener un cultivo de la especie en una escala de laboratorio.

Se realizaron cuatro cultivos bajo condiciones de laboratorio partiendo de dos ejemplares diferentes de cepa madre. Se hizo uso del medio de Zarrouk para todos los cultivos. Además, se compararon dos métodos distintos de preparación del medio. Se determinó por análisis fotográfico junto al modelo RGB la variación de clorofila α en las muestras, lo cual indicó un desarrollo en todos los cultivos. Este, demostró el crecimiento logarítmico de la microalga *Espirulina*. Por lo que, se validó el mantener un cultivo de la especie *Arthrospira Platensis* a nivel de laboratorio con un método de preparación por stocks del medio de Zarrouk.

Palabras Clave: Modelo RGB, análisis fotográfico, *Arthrospira Platensis*, microalga, medio de Zarrouk.

ABSTRACT

*The Daule river is one of the main sources of natural water for the population that settles around it. The ongoing contamination of this body of water is causing a considerable change in its concentration of nutrients. Thus, harming both the communities that benefits from this supply, and the wildlife that develops in its environment. One of the reasons of contamination is the bad management and disposal of the effluent of pig farms that are in the river basins. An alternative treatment for this type of wastewater is the usage of the microalgae *Arthrospira Platensis*. Therefore, this work evaluates the viability of maintaining a culture of this specie of microalgae on a laboratory scale.*

*Four cultures were carried out under constant conditions, starting from two different mother strain specimens. Zarrouk's medium was used for all cultures. In addition, two different methods of preparation were compared. The variation of chlorophyll α in the sample cultures were determined by a photographic analysis together with a RGB model, which indicated a development in all crops. The logarithmic growth of the *Spirulina* microalgae was observed with this analysis. Therefore, validating the sustainability of the species *Arthrospira Platensis* at a laboratory scale, with a method of preparation by stocks of the Zarrouk's medium.*

Keywords: *RGB model, photographic analysis, microalgae, *Arthrospira Platensis*, Zarrouk's medium.*

ÍNDICE GENERAL

EVALUADORES	4
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	9
1. Introducción.....	9
1.1 Descripción del problema.....	9
1.2 Justificación del problema.....	9
1.3 Objetivos	10
1.3.1 Objetivo General.....	10
1.3.2 Objetivos Específicos	10
1.4 Marco teórico	10
1.4.1 Generalidades de las microalgas	10
1.4.2 <i>Arthrospira platensis</i> (Espirulina).....	11
1.4.2.1 Uso de <i>Arthrospira platensis</i> en tratamiento de aguas residuales.....	12
1.4.2.2 Uso de <i>Arthrospira platensis</i> en efluentes porcinos.....	13
1.4.2.3 <i>Arthrospira plantensis</i> suplemento alimenticio.....	14
1.4.3 Características del efluente de las instalaciones porcinas.....	15
1.4.4 Uso del modelo RBG en análisis de imagen digital como alternativa para cuantificación de clorofila	16
CAPÍTULO 2	17
2. Metodología.....	17

2.1	Métodos para el cultivo de microalgas Spirulina	17
2.1.1	Método 1.....	17
2.1.2	Método 2.....	21
2.2	Estudio del crecimiento de los cultivos.....	25
CAPÍTULO 3		28
3.	Resultados Y ANÁLISIS	28
CAPÍTULO 4		35
4.	Conclusiones Y Recomendaciones.....	35
	Conclusiones.....	35
	Recomendaciones	37
BIBLIOGRAFÍA		38
APÉNDICES		43

ABREVIATURAS

ESPOL Escuela Superior Politécnica del Litoral

RGB Rojo, Verde y Azul

ONG's Organización No Gubernamental

IPV Intensidad de Píxel Verde

IPVF Intensidad de Píxel Verde Final

SIMBOLOGÍA

mL	Mililitro
L	Litro
g	Gramo
pH	Potencial de Hidrógeno
P	Fósforo
HCl	Ácido Clorhídrico
CO ₂	Dióxido de Carbono
°C	Grados Celsius
%v/v	Porcentaje volumen-volumen
ud	Unidad
α	Alfa
MP	Megapíxel
%	Porcentaje
H	Horas
Máx.	Máximo
MPa	Mega Pascales
NaNO ₃	Nitrato de Sodio
K ₂ HPO ₄	Fosfato Hidrogeno Dipotásico
K ₂ SO ₄	Sulfato de Potasio
MgSO ₄	Sulfato de Magnesio
NaCl	Cloruro de Calcio
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Hierro (II) Heptahidratado
Na-EDTA	EDTA Sal Disódica
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
H ₃ BO ₃	Ácido Bórico
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de Manganeso (II) Monohidratado
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de Zinc Heptahidratado
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato de Sodio Dihidratado
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de Cobre (II) Pentahidratado

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Contenido de nutrientes del efluente del sistema de cultivo batch del S. Plantensis.....	14
Figura 1.2 S.Plantensis fuente de alimento porcino	15
Figura 2.1 Autoclave del medio.....	18
Figura 2.2 cultivo de Espirulina	20
Figura 2.3 Reactivos para el medio de Zarrouk	22
Figura 2.4 Soluciones stock (macronutrientes)	24
Figura 2.5 Soluciones stock (micronutrientes)	24
Figura 2.6 Registro fotográfico del cultivo de Espirulina de la muestra 4.....	26
Figura 2.7 Regiones de selección de píxeles para el estudio de intensidad de verdes	27
Figura 3.1 Medio de cultivo Zarrouk por el método 1	29
Figura 3.2 Medio de cultivo Zarrouk por el método 2	29
Figura 3.3 Ilustración gráfica del IPVF de cada muestra en comparativa	31
Figura 3.4 Muestras de cultivo 1 y 4 en el segundo día de crecimiento.....	33
Figura 3.5 Variación Porcentual de Intensidad de Píxeles Verdes.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Valor nutricional de la Espirulina	12
Tabla 2.1 Medio de Zarrouk para el método 1	19
Tabla 2.2 Soluciones para cultivo de Espirulina.....	21
Tabla 2.3 Macronutrientes y micronutrientes	23
Tabla 2.4 Medio de Zarrouk	25
Tabla 3.1 Resultados de la intensidad de píxel verde final para cada muestra.....	30
Tabla 3.2 Variación porcentual del IPVF por día.....	34
Tabla 3.3 Valores y cantidades de cada materia prima según el mercado	48
Tabla 3.4 Cantidades requeridas para la producción de 1 L de Espirulina	49
Tabla 3.5 Valor total de cada insumo para la producción de 1 L de Espirulina	50

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

Durante muchos años, el río Daule ha sido fuente importante en la labor de las granjas porcinas que se encuentran ubicadas en su orilla, debido a que ha servido como suministro para llevar a cabo los trabajos diarios. A su vez, es afectado por los desperdicios biológicos de los animales, que son desechados dentro del río sin tratamiento previo. Las instalaciones rurales carecen de un tratamiento adecuado para los efluentes generados, debido al alto costo de implementación y mantenimiento de un sistema convencional y el estar desvinculados de las consecuencias ambientales (Sandoval-Herazo et al., 2020). Estos efluentes contienen material orgánico y nutrientes, teniendo una alta concentración de nitratos (Panchana Erika, 2021). Por lo que, la calidad del agua en el río está siendo comprometida y su deterioro se ha registrado en diferentes estudios académicos (Tamayo Guadalupe, 2018). Algunos de los parámetros que indican este cambio de calidad son el oxígeno disuelto, nitratos, fosfatos, pH y turbidez (Quiroz et al., 2017). Lo cual, presenta un desbalance en la naturaleza y a su vez puede ocasionar enfermedades en los seres humanos y animales que se benefician del agua (Escobar Jairo, 2002). Con esto, se propone utilizar un sistema de tratamiento basado en crecimiento de microalgas, como una alternativa económica, para la recuperación de nutrientes de las aguas residuales porcinas. Se espera que la remoción de nutrientes del efluente mejore la calidad del agua residual minimizando el impacto ambiental generado actualmente por las descargas; sin dejar de lado el valor agregado que se le dará a la microalga, ya sea como alimento animal o como fertilizante para las cosechas (Molinuevo-Salces et al., 2019).

1.2 Justificación del problema

En muchos casos, el acceso al agua fresca en pequeñas comunidades es limitado, y esta a su vez es contaminada con desperdicios biológicos de la misma comunidad (Carreño et al., 2020), por lo que, el presente proyecto está enfocado en investigar y proponer una

alternativa al tratamiento de efluentes de una parte de las instalaciones porcinas rurales a lo largo de la cuenca del río Daule. Durante los últimos años, varias ONG's y Gobiernos seccionales (prefecturas y municipalidades) han promovido en sectores rurales la crianza de cerdos, como una estrategia de obtención de medios de vida a comunidades vulnerables asentadas en sus riveras, lo cual ha provocado un potencial impacto de contaminación en el río. Se pretende utilizar tecnologías de bajo costo, que permitan dar un correcto tratamiento a los efluentes que son desechados al río, mediante la recuperación de nutrientes. La tecnología por emplear es un sistema que se sustenta en el uso de microalgas que utilizan degradación biológica de materia orgánica, por lo cual su uso en el tratamiento de aguas tiene un gran potencial (Li et al., 2019). Las microalgas poseen la cualidad de consumir dióxido de carbono generando a su vez biomasa con un valor agregado (Pires et al., 2012) Además, estos microorganismos procesan fosfatos y nitratos, los cuales se encuentran en gran abundancia en aguas residuales de instalaciones (Campuzano & Zambrano, 2020).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar el crecimiento de la microalga *Espirulina* en condiciones controladas mediante la intensidad de clorofila, para la elaboración de un protocolo de cultivo que permita su implementación en instalaciones porcinas rurales.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Validar el uso del medio de Zarrouk en el cultivo de *espirulina*, para la producción de biomasa a mayor escala.
2. Evaluar el crecimiento de la microalga *Espirulina*, para la determinación de la variación de concentración en su esperanza de vida.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Generalidades de las microalgas

Se conoce como microalga a un microorganismo que realiza fotosíntesis en presencia de oxígeno, su estructura está conformada por clorofila y pigmentos fotosintéticos (Gómez Luna, 2007). Las microalgas se pueden clasificar en dos tipos de organismos debido a su

estructura celular, entre los cuales se encuentran a las cianobacterias como la *Arthrospira plantensis* cuya estructura es procariota, las restantes tienen una estructura eucariota (Abalde et al., 1995). La *Arthrospira plantensis* puede dar origen a células versátiles, dependiendo de sus condiciones de cultivo, dando así sustancias y nutrientes que son generados dentro de ellos, como lípidos, sales minerales, vitaminas, carotenoides, proteínas, carbohidratos, etc. Una característica importante que se encuentra en las microalgas es la capacidad que tienen para absorber CO₂ y nutrientes, tales como nitrógeno y fósforo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014), de manera que las microalgas son una alternativa tentativa en la purificación de aguas residuales. Y a su vez, se pueden reproducir en ambientes controlados generando biomasa, misma que se puede usar para diferentes aplicaciones como comida para peces, crustáceos, rotíferos y moluscos, o biofertilizantes (Molinuevo-Salces et al., 2019; Abalde et al., 1995).

1.4.2 *Arthrospira platensis* (Espirulina)

Arthrospira platensis es un tipo de alga microscópica de la familia cianobacteria de color azul verdoso que se encuentran en aguas cálidas (Masojídek & Torzillo, 2014). La Espirulina es rica en vitaminas y minerales; conteniendo hierro, calcio, fósforo, magnesio, vitamina A, vitamina E y vitamina B12, sin dejar de lado su alto contenido de proteínas (Tabla 1.1). Uno de los sistemas de cultivo de Espirulina más utilizados es el sistema por lotes, que permite el tratamiento biológico de aguas residuales, removiendo fósforo, nitrógeno, demanda química de oxígeno y ciertos metales pesados (Campuzano & Zambrano, 2020; Li et al., 2019).

Tabla 1.1*Valor nutricional de la Espirulina*

Contenido	Por 2g % Diario
Calorías	7 (30k)
Lípidos	0.1g
Colesterol	0mg
Carbohidratos	0.7g
Fibras	0.2g
Proteínas	1.1g
Vitamina A	28%
Vitamina C	0%
Calcio	2%
Hierro	21%
Vitamina E	2%
Tiamina	5%
Riboflavina	5%
Vitamina B12	200%
Magnesio	3%

Nota: Esta tabla muestra la composición nutricional de la Espirulina por cada 2g. Tomado de *Remoción de contaminante de un efluente de una empacadora utilizando una mezcla microalgas (Chlorella Spirulina) y microorganismo (Lodos Activados)* (p.19), por Campuzano & Zambrano, 2020, Universidad de Guayaquil.

1.4.2.1 Uso de *Arthrospira platensis* en tratamiento de aguas residuales

La producción de biomasa a partir de microalgas es una de las aplicaciones en tratamiento de aguas residuales dentro de diversas áreas dependiendo de las características del efluente. Existe interés en el uso de estos sistemas en efluentes con alta carga orgánica dado que, muchas especies de microalgas tienen un metabolismo quimioheterótrofo o mixotrófico (Wollmann et al., 2019). El efluente de instalaciones porcinas contiene un alto contenido de zinc y cobre, los cuales causan

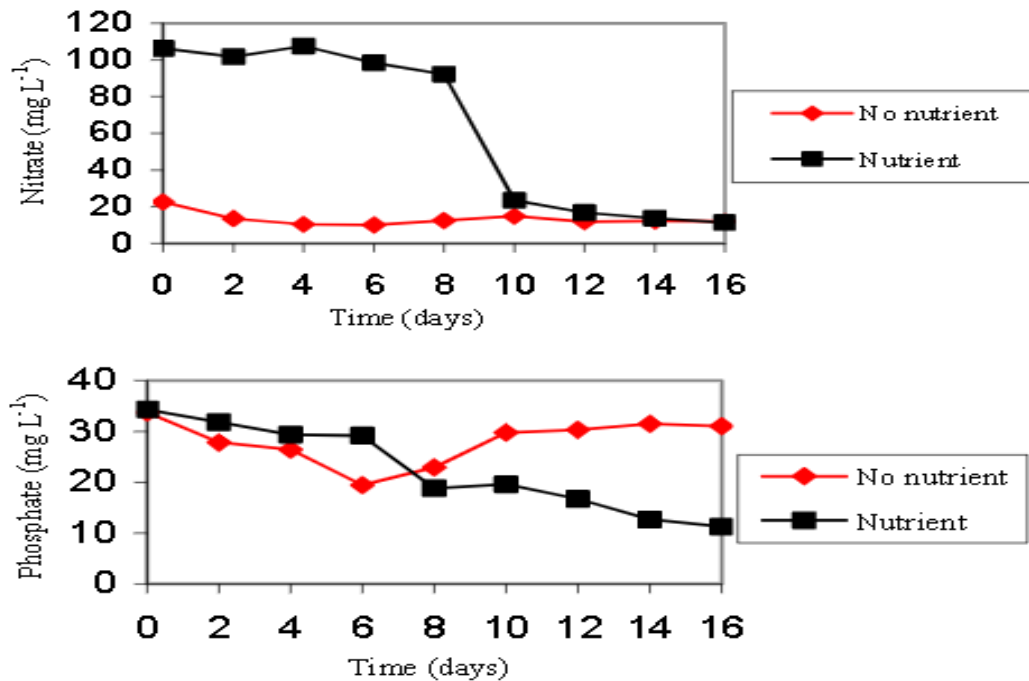
impactos ambientales (Cestonaro do Amaral et al., 2014). Por lo que recientemente, se han hecho estudios en el uso de la especie *Arthrospira platensis* en el tratamiento de aguas con un contenido de zinc (Zinicovscaia et al., 2018). Según Zinicovscaia (2018) se determinó un máximo de 83% de remoción de zinc en soluciones batch, lo cual indica una tecnología económica y viable en tratamientos de efluentes que contienen zinc. Adicionalmente, existen investigaciones en el uso de esta especie de microalga en efluentes porcinos, las cuales usan el agua residual porcina como medio de cultivo. Con esto, se logra disminuir la concentración de nutrientes, además, del uso de la biomasa como agregado en la alimentación de peces. (Mezzomo et al., 2010).

1.4.2.2 Uso de *Arthrospira platensis* en efluentes porcinos

Se ha experimentado con el uso de la especie *Arthrospira platensis* en el tratamiento de aguas residuales porcinas para la remoción de nitratos, fosfatos y amonios (Cheunbarn & Peerapornpaisal, 2015). Según Cheunbam y Peerapompaisal (2015) el cultivo de esta microalga puede sobrevivir a condiciones de instalaciones pequeñas con una carga de efluente bajo en comparación de industrias a mayor escala. Además, la biomasa tiene un valor agregado proteico que puede ser aprovechado por los cerdos como suplemento alimenticio a muy bajo costo. Los resultados de esta investigación muestran que las mejores condiciones para el crecimiento de la microalga son a una dilución al 10% del efluente con 20% del alga. Esto, va sujeto con el agregado de nutrientes a la solución del efluente para máximo crecimiento del alga, caso contrario, su esperanza de vida no supera los 6 días. La remoción de nutrientes de nitrógeno y fosfato fue de un 49% y 67% respectivamente.

Figura 1.1

Contenido de nutrientes del efluente del sistema de cultivo batch del *S. Plantensis*



Nota: El gráfico representa el comportamiento de la concentración de nitratos y fosfatos en el efluente sujeto al crecimiento de la microalga. Tomado de *Cultivation of Spirulina platensis using Anaerobically Swine Wastewater Treatment Effluent* (p.589), por Siraporn Cheunbarm, 2015, International Journal of Agriculture & Biology.

1.4.2.3 *Arthrospira plantensis* suplemento alimenticio

La dieta de los cerdos en la actualidad se basa en productos que contienen soja como el principal ingrediente proteico para su alimentación; al tener un alto costo de producción la soja se han buscado alternativas que logren generar una alimentación equilibrada en lechones y cerdos de engorde, una de estas alternativas proteica es el uso de harina de algas de *Arthrospira plantensis* lo cual a su vez genera carnes de gran calidad, alto valor nutricional y buen sabor, aportando la espirulina aproximadamente 68% de proteína, vitaminas y minerales, y fortaleciendo el sistema inmune de los cerdos (Neumann et al., 2018; Umaña, 2019; Martins et al., 2021).

Un estudio realizado en la Universidad de Goettingen (Alemania) permitió medir la calidad de la proteína en la dietas de lechones y cerdos de engordes, el mismo se basó en un estudio de balance de nitrógeno con una gran inclusión de harina de espirulina

parcialmente desgrasada con un grado graduado de suplementos de aminoácidos; el estudio se llevó a cabo en 16 lechones y 16 cerdos de engordes los cuales tenían un peso corporal entre 25 kg y 60 kg, dando como resultado una gran calidad de proteína (63.7 ± 3.4) en la suplementación de los animales (Neumann et al., 2018). Neumann (2018) recalca que “Los estudios de balance del nitrógeno enfatizan la calidad proteica superior de las dietas para cerdos con un alto nivel de inclusión de harina de espirulina cuando se asegura la suplementación adecuada de aminoácidos” (p. 11).

Figura 1.2

S. Plantensis fuente de alimento porcino



Nota: El gráfico muestra el uso de las microalgas como fuente de alimento animal de gran calidad. Tomado de *Es factible producir microalgas para alimento animal y a la vez ayudar al ambiente*, por Umaña, 2019, Tecnológico de Costa Rica (TEC).

1.4.3 Características del efluente de las instalaciones porcinas

El efluente de las instalaciones porcinas contiene una alta carga de nitrógenos, fósforos y de demanda biológica de oxígeno (Mezzomo et al., 2010). Las concentraciones de los componentes en estos efluentes pueden variar dependiendo de la carga alimenticia que se le proporciona al ganado porcino (Sarto et al., 2019). Según la caracterización realizada por Sarto (2019) se encontró en la composición de aguas residuales porcinas, además de nitrógenos y fósforos, potasio, zinc, calcio, magnesio, cobre, manganeso y hierro como micro y macronutrientes. Por lo que, el estudio en tecnologías para tratar estos efluentes se enfoca en la recuperación de estos nutrientes.

1.4.4 Uso del modelo RGB en análisis de imagen digital como alternativa para cuantificación de clorofila

Existen varios protocolos de seguimiento para cuantificar el crecimiento de biomasa o aumento de clorofila en cultivos de microalgas. No obstante, estos suelen ser muy intrusivos y requieren equipos con un alto costo económico (Gregor & Maršálek, 2004). Por lo que, se han desarrollado métodos no destructivos y de bajo costo que puedan cuantificar la clorofila. Uno de estos es por medio del análisis digital por medio de un modelo RGB. Consiste en ir determinando la intensidad de los píxeles verdes del cultivo a lo largo de su crecimiento por medio de software que ayuden a determinar los valores del modelo RGB (Wood, 2020). Basado en los resultados de Wood (2020), se determinó una fuerte relación lineal entre este método y los métodos convencionales (Gupta et al., 2013).

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

El uso de microalgas en tratamiento de aguas residuales porcinas es un tema que lleva un buen tiempo bajo investigación. Una de las alternativas que se tenía para el proyecto era el uso de la especie de microalga, Azolla. El razonamiento detrás de esto es que los cerdos prefieren el sabor de estas algas, además de ser resilientes ante ambientes hostiles. No obstante, se optó por la especie *Arthospira plantensis* debido a que, la literatura indica que puede crecer sin problemas en temperaturas de hasta 40°C, es decir presenta una resistencia térmica considerable, además la biomasa generada por esta especie contiene mayor porcentaje proteico en comparación a otras microalgas, lo cual, le otorga un valor agregado.

2.1 Métodos para el cultivo de microalgas Espirulina

Para el cultivo de Espirulina lo primero que se hizo fue esterilizar los materiales que se usaron. Se usó la autoclave a una temperatura de 121°C y una presión de 0.14 MPa durante un tiempo de 15 minutos. Después de este proceso, se transportaron los materiales a la cabina de flujo laminar hasta enfriarse a temperatura ambiente.

Se decidió realizar dos métodos distintos que involucran diferentes preparaciones del medio de cultivo. En el método 1 se optó por preparar de manera convencional el medio de Zarrouk, mientras que el método 2 se realizó por soluciones stock. Se evaluó el crecimiento del alga en ambos métodos, y se determinó en que medio la espirulina tiene mejor adaptabilidad, en base a su preparación.

2.1.1 Método 1

En el método 1 se procedió con la preparación del medio de Zarrouk de manera convencional, donde lo primero que se hizo fue pesar los macronutrientes necesarios tal y como se indica en la Tabla 2.1. Luego se procedió a agregar cada reactivo en orden como lo indica la Tabla 2.1 en un envase que contenía 1 litro de agua tipo 1, con agitación

constante para el correcto mezclado de los mismos. El medio fue llevado a la autoclave durante 15 minutos para su esterilización antes de empezar el cultivo, dejando enfriar el mismo hasta temperatura ambiente, obteniendo un pH de 9.2.

Figura 2.1

Autoclave del medio



Nota: El gráfico muestra el medio de Zarrouk en la autoclave.

Tabla 2.1*Medio de Zarrouk para el método 1*

Modificado	
Macronutrientes	Peso g/L a pH 9.0
NaHCO₃	16.8
K₂HPO₄	0.5
NaNO₃	2.5
K₂SO₄	1.0
NaCl	1.0
MgSO₄	0.2
CaCl₂	0.04
FeSO₄.7H₂O	0.018
Na-EDTA	0.08
H₃BO₃	2.860
MnSO₄.H₂O	1.54
ZnSO₄.7H₂O	0.222
Na₂MoO₄.2H₂O	0.0076
CuSO₄.5H₂O	0.079

Nota: Se presentan los nutrientes que permiten la preparación del medio para el cultivo de *Espirulina*. Tomado de *Evaluation of anticandidal activities of spirulina metabolite against candida albicans* (p. 1002), por Mishra & Prasad, 2015, International Journal Pharmaceutical Sciences and Research.

Se aumentó gradualmente el cultivo desde una solución de menor volumen hasta obtener un aumento en la concentración de biomasa. Una vez que se tuvo el medio, se comenzó con la preparación de la solución para el cultivo de *Espirulina*. Esta preparación se la llevó a cabo en una cabina de flujo laminar y para el primer cultivo se inició con 33 mL de solución tal como se indica en la Tabla 2.2 (30% v/v de cepa y 70% v/v del medio de Zarrouk) (Canal Rany co., 2016), para lo cual fue necesario el control regular de pH, el cual osciló entre 9.0 a 9.2. Luego se trasladó el cultivo a una incubadora fijando una temperatura de 25°C, implementando ciclos de iluminación 12:12 (12 horas de luz y 12

horas de oscuridad) con un flujo luminoso de 1200 lumen y con agitación manual con un periodo de 2 a 3 veces diarias. El crecimiento del cultivo fue monitoreado en periodos de 3 días y debido a que se tenía poco volumen de cultivo a los 9 días se siguió con un segundo cultivo a partir de la primera generación de microalgas.

Figura 2.2

Cultivo de Spirulina



Nota: El gráfico muestra el cultivo de Spirulina en la incubadora a 25°C.

Para escalar el cultivo (segundo cultivo), se tomaron las mismas consideraciones que en la primera generación. En el escalamiento del cultivo, se aumentó el volumen total de solución con algas manteniendo la proporción entre el medio de cultivo y microalgas (30 mL de algas de la primera generación y 70 mL del medio de cultivo) como se muestra en la Tabla 2.2, con el objetivo de obtener más microalga. El medio se lo agregó lentamente a la vez que se agitaba para alcanzar homogeneidad.

Tabla 2.2*Soluciones para cultivo de Esprulina*

Medio Zarrouk	Unidad	Cepa Microalgas	Unidad
3000	mL	50	mL
Primer Cultivo			
	Volumen de Zarrouk	Volumen Algas (cepa)	Total [mL]
1	23.1	9.9	33
2	23.1	9.9	33
3	23.1	9.9	33
Total [mL]	69.3	29.7	99
Segundo Cultivo			
	Volumen de Zarrouk	Volumen Algas	Total [mL]
1	70.00	30.00	100.00
2	70.00	30.00	100.00
3	70.00	30.00	100.00
Total [mL]	210.00	90.00	300.00

Nota: Se presenta las cantidades de medio y algas que se usaron para el cultivo de Esprulina.

2.1.2 Método 2

Se realizó un segundo método, en donde la diferencia se dio en la preparación del medio de Zarrouk para llevar a cabo el cultivo de Esprulina. Esto se realizó con el fin de disminuir la turbidez y mejorar la homogeneidad de los reactivos en la preparación del medio para el cultivo. La preparación del medio comenzó con la elaboración de soluciones stock de los macronutrientes y micronutrientes, esto, en base a otro estudio. Cada reactivo fue pesado en la balanza y disueltos con agua tipo 1 (Tabla 2.3) dentro de un envase plástico hasta un aforo de 250 mL cada uno.

Figura 2.3

Reactivos para el medio de Zarrouk



Nota: El gráfico muestra los reactivos que se pesaron en la balanza para preparar las soluciones stock.

Tabla 2.3*Macronutrientes y micronutrientes*

Mediciones		
Macronutrientes en 250 mL		
Reactivos	Peso teórico [g]	Peso experimental [g]
NaNO₃	12.5	12.4995
K₂HPO₄	1.25	1.251
K₂SO₄	5	5.0019
NaCl	5	4.9999
MgSO₄	1	1.0019
CaCl₂	1	1.0024
FeSO₄·7H₂O	0.25	0.25
Na-EDTA	2	2.0009
NaHCO₃	21	20.9995
Micronutrientes en 250 mL		
H₃BO₃	7.15	7.1515
MnSO₄·H₂O	7.7	7.7072
ZnSO₄·7H₂O	5.55	5.5505
Na₂MoO₄·2H₂O	0.4425	0.4428
CuSO₄·5H₂O	1.975	1.9758

Nota: Se presentan las cantidades necesarias de los macronutrientes y micronutrientes para la preparación de las soluciones stock que permitieron la preparación del medio Zarrouk.

Figura 2.4

Soluciones stock (macronutrientes)

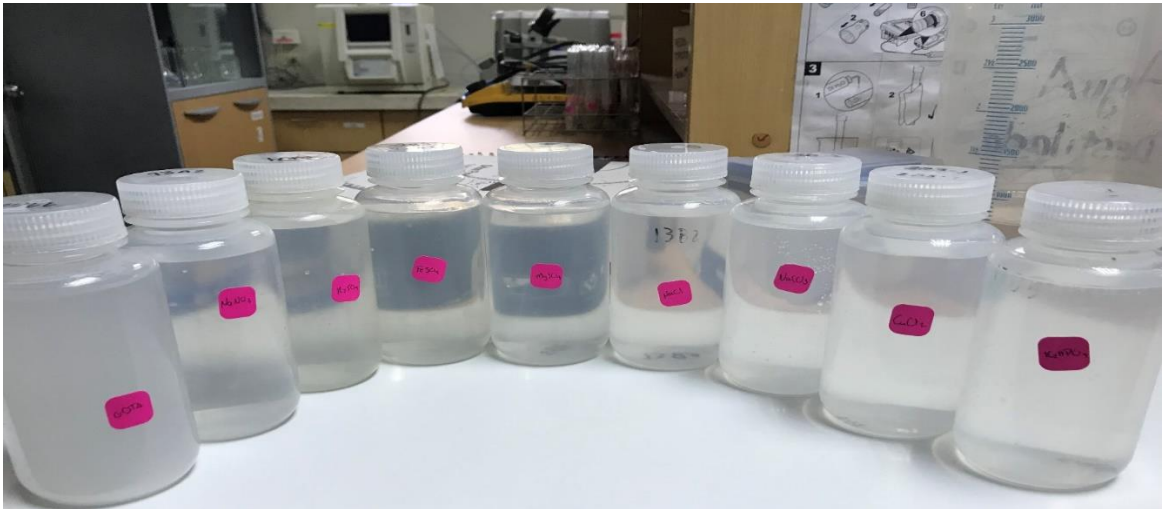


Figura 2.5

Soluciones stock (micronutrientes)



A continuación, se procedió con la preparación del medio de Zarrouk. Se agregó un volumen de cada solución stock en un envase de vidrio, tal y como se indica en la Tabla 2.4. Esta se aforo con agua de tipo 1 hasta un volumen de 1 L. Se midió el pH el cual fue de 9.4.

Tabla 2.4*Medio de Zarrouk*

Macronutrientes y micronutrientes en 1 L de agua tipo 1	
Reactivos	Volumen [mL]
NaNO ₃	50
K ₂ HPO ₄	100
K ₂ SO ₄	50
NaCl	50
MgSO ₄ .H ₂ O	50
CaCl ₂	10
FeSO ₄ .7H ₂ O	10
Na-EDTA	10
NaHCO ₃	200
Sol. micronutrientes	1

Nota: Se presentan las cantidades necesarias de los micronutrientes y macronutrientes de cada solución stock para la preparación de 1 L del medio Zarrouk.

De igual manera que el método 1, se optó por comenzar con un volumen pequeño para su consecuente escala y aumento de concentración de biomasa. Las condiciones de control se mantuvieron constantes. Los cultivos se construyeron con 25mL de cepa madre y 75mL de medio de Zarrouk (100 mL de cultivo). Se realizaron un total de 4 cultivos provenientes de la misma cepa madre. El crecimiento del cultivo fue monitoreado diariamente para darle agitación manual unas 2 a 3 veces en periodos de 2 horas, además de registrar el aumento en la concentración de biomasa mediante el uso de fotografía.

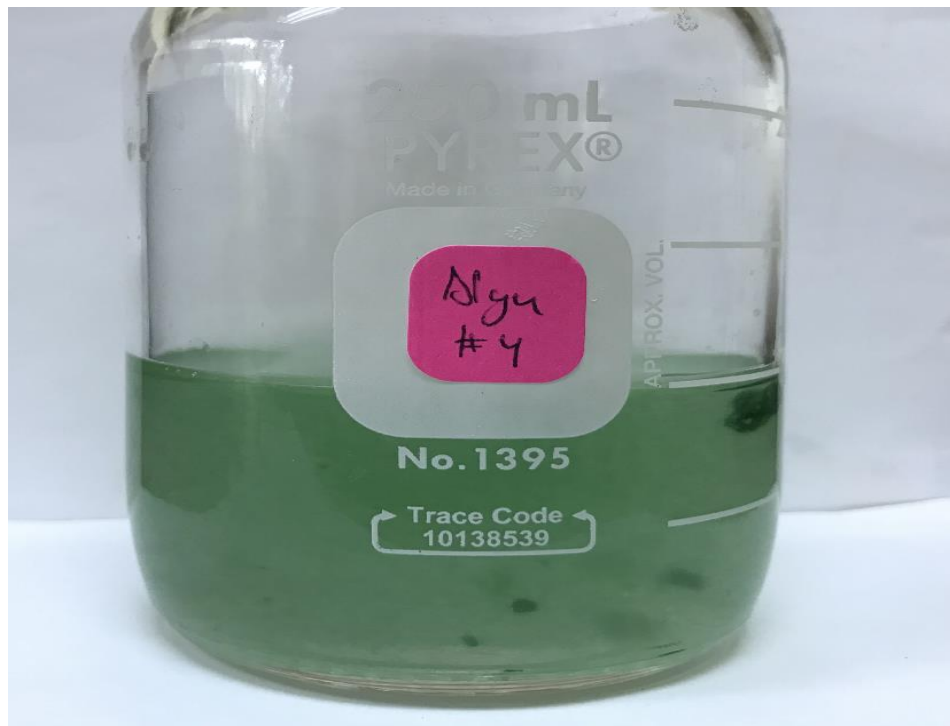
2.2 Estudio del crecimiento de los cultivos

Acogiendo el método 2, se determinó el crecimiento del cultivo durante su primera semana de adaptación al medio de crecimiento. Para esto, se tomó en consideración el estudio de Nicola Wood (2020) en un análisis fotográfico para la cuantificación de clorofila α (Wood et al, 2020). Se tomaron diariamente 3 fotos, usando un smartphone (iPhone 7, Apple Inc.)

con cámara digital (12MP), de cada muestra de cultivo de manera consecutiva bajo las mismas condiciones, luego de que estos hayan sido agitados por al menos un minuto. Para el medio de Zarrouk solamente se realizó un ensayo de esta práctica. Este registro se realizó considerando la hora del día para acercarse lo más posible a 24 horas desde el último registro.

Figura 2.6

*Registro fotográfico del cultivo de *Espirulina* de la muestra 4*

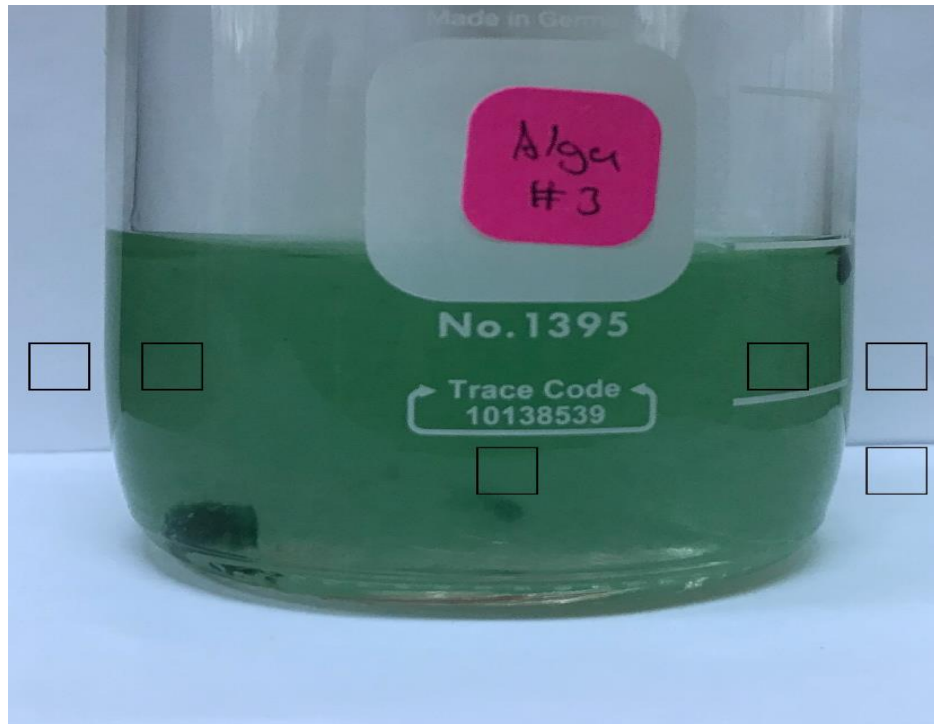


Nota: Se presenta el cultivo de la muestra 4 al tercer día de crecimiento en fondo y base blanco.

Se hizo uso del programa de gráficos vectoriales (Adobe Illustrator 2020) para determinar la intensidad de pixeles verdes de cada fotograma de las muestras. Los valores de rojo, verde y azul se obtuvieron al hacer uso del modelo RGB y la herramienta de selector de color del software. Se tomaron valores de tres regiones en el cultivo y el fondo blanco como se observa en la Figura 2.7 (procurando tomar muestras de posibles sombras). Se realizó el mismo estudio para el medio Zarrouk.

Figura 2.7

Regiones de selección de píxeles para el estudio de intensidad de verdes



Nota: Regiones de selección de valores del cultivo de la muestra 3 al tercer día de crecimiento.

En base al estudio realizado por Wood, se determinó la intensidad del píxel verde mediante la Ecuación (1).

$$\text{Intensidad del Píxel Verde (IPV)} = \frac{G}{R + G + B} \quad (1)$$

Donde los valores R, G y B son los valores de rojo, verde y azul, respectivamente. Se calculó la intensidad para cada fotograma en las regiones indicadas, promediando el IPV del cultivo, del fondo y del medio Zarrouk. Se obtuvo la intensidad del píxel verde final restando los valores promediados de IPV del medio Zarrouk y el fondo blanco como indica la Ecuación (2), de cada muestra respectivamente.

$$\begin{aligned} \text{Intensidad del Píxel Verde Final (IPVF)} \\ = \text{Promedio}(IPV_{\text{cultivo}}) - \text{Promedio}(IPV_{\text{fondo}}) \\ - \text{Promedio}(IPV_{\text{medio}}) \end{aligned} \quad (2)$$

CAPÍTULO 3

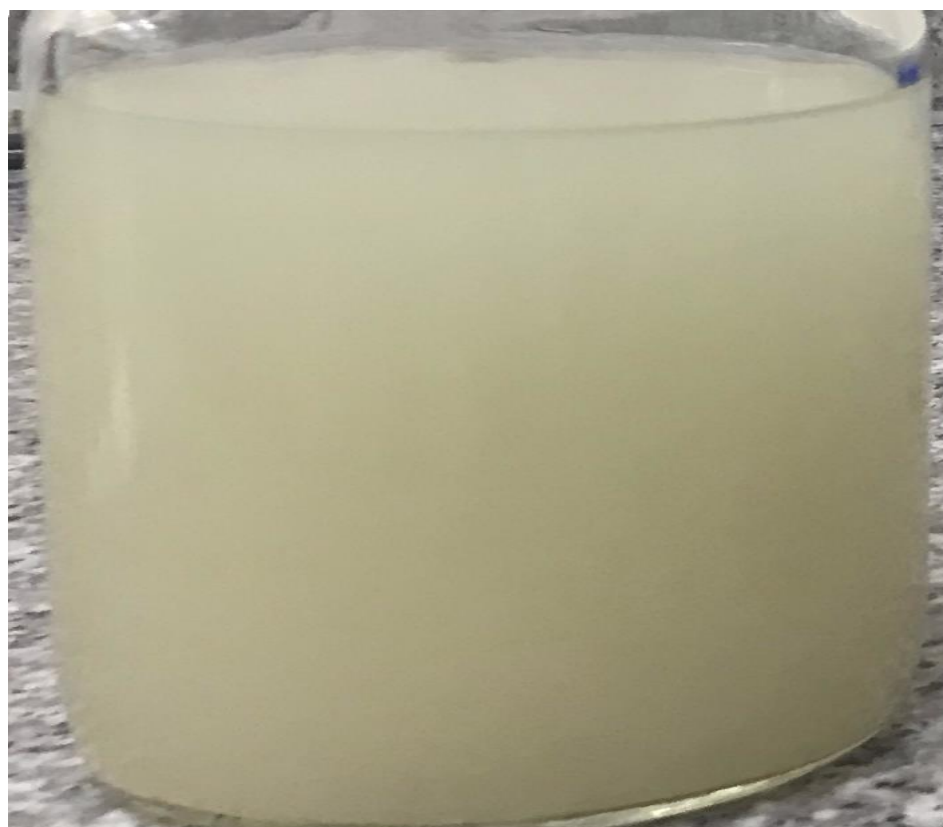
3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Comparativa entre preparaciones del medio Zarrouk

Los ensayos del método 1 resultaron en muy baja adaptabilidad de parte de las algas al método de preparación del medio de cultivo Zarrouk. Las concentraciones de los micronutrientes en el medio eran muy altas, por lo que hacía que la solución tenga alta turbiedad y tome un color amarillento como se observa en la Figura 3.1. Esto difería a lo que se conoce en la teoría (medio transparente).

Figura 3.1

Medio de cultivo Zarrouk por el método 1



Nota: El medio de Zarrouk, luego de ser esterilizado, por el método 1 presenta partículas suspendidas por las concentraciones elevadas de los micronutrientes. A diferencia del método 1, el método 2 (por soluciones stock) presentó una mejor homogeneidad como se puede observar en la Figura 3.2. Se cambió las concentraciones

de los micronutrientes y se agitó por mayor tiempo el medio mientras se iban añadiendo las soluciones stocks. En contraste con el método 1, se pudo obtener datos cualitativos viables, para un análisis fotográfico, por el medio de preparación del método 2.

Figura 3.2

Medio de cultivo Zarrouk por el método 2



Nota: El medio de Zarrouk, luego de ser esterilizado, presenta menos partículas suspendidas y baja turbiedad.

3.2 Análisis fotográfico para la determinación de variación de clorofila α

Para estimar el aumento de clorofila α en las muestras del método 2, se calculó la intensidad de píxel verde final (IPVF) para cada una de estas durante la primera semana de crecimiento, como se puede observar en la Tabla 3.1. Los resultados mostraron un crecimiento en clorofila α en cada una de las muestras en comparación con el valor inicial del primer día. Esto indicó que la microalga se llegó a adaptar al medio de Zarrouk. No obstante, se observó que no todas las muestras siguen un patrón de crecimiento similar.

Tabla 3.1

Resultados de la intensidad de píxel verde final para cada muestra

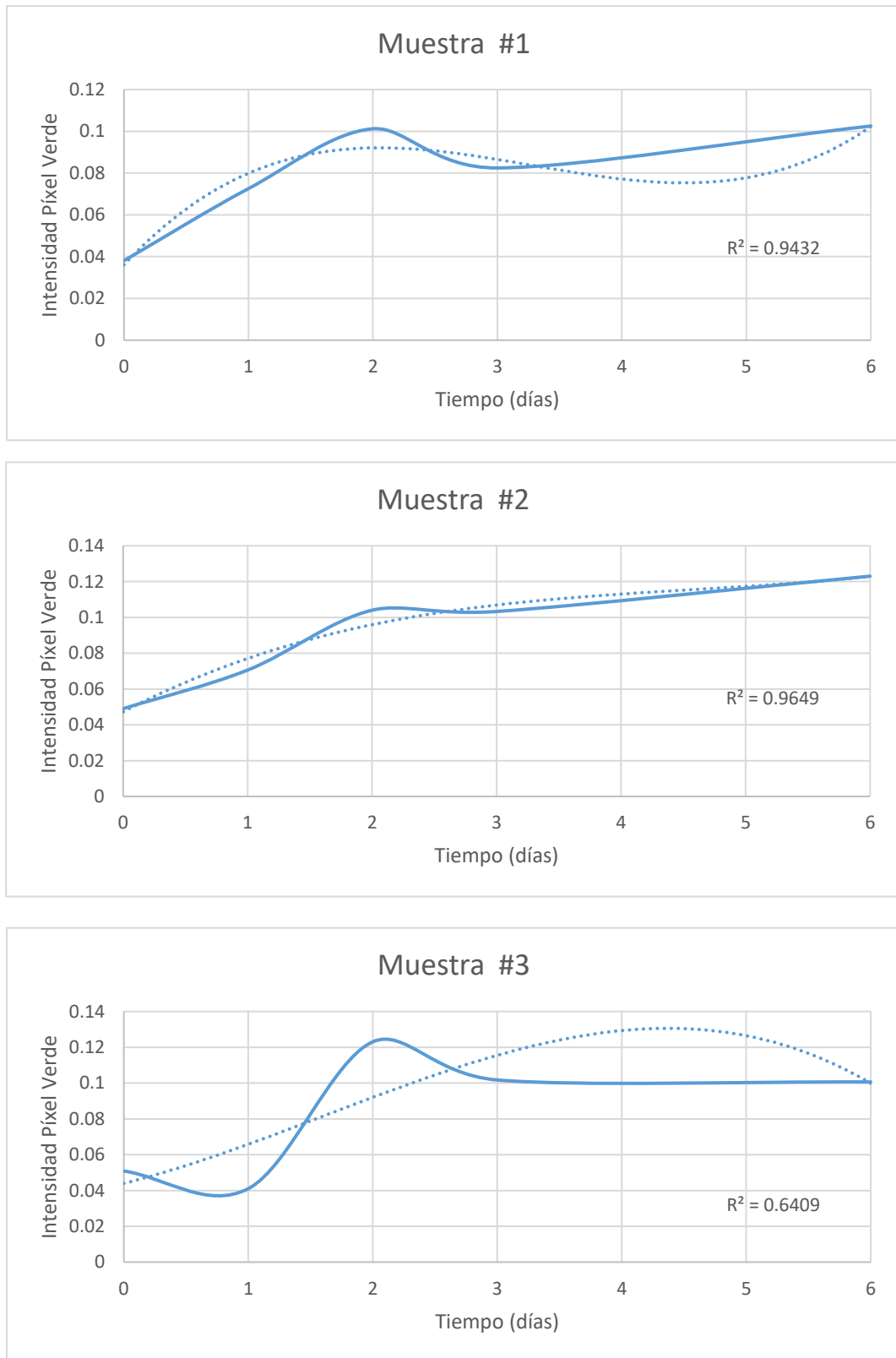
Día	Muestra #1	Muestra #2	Muestra #3	Muestra #4
	IPVF	IPVF	IPVF	IPVF
1	0.038	0.049	0.051	0.078
2	0.073	0.071	0.041	0.061
3	0.101	0.104	0.123	0.088
4	0.082	0.103	0.102	0.098

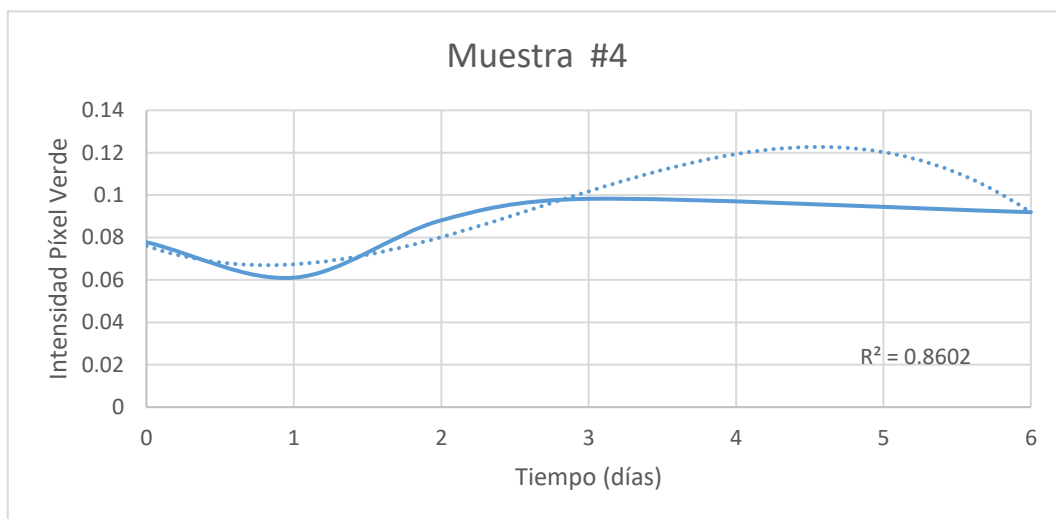
Nota: Para cada muestra se consideró un ciclo de crecimiento de una semana antes de renovar el medio de cultivo.

Se compararon los resultados de cada una de las muestras, estos se observan en la Figura 3.3. Se encontró que durante el tercer día existe un pico en la intensidad de verde en todas las muestras exceptuando la muestra 4. Además, la muestra 3 tuvo el mayor valor IPVF durante este pico. Sin embargo, todas las muestras exceptuando la 4, mostraron un declive en la intensidad de verde durante el último día de estudio. Esto indica que el crecimiento logarítmico de la especie está llegando a un cierre.

Figura 3.3

Ilustración gráfica del IPVF de cada muestra en comparativa





Nota: Se muestran los cuatro cultivos realizados, visualizándose sus tendencias de crecimiento de intensidad del píxel verde.

Se visualizó que la muestra 1 y la muestra 2 presentan una tendencia de crecimiento similar, mientras que la muestra 3 y muestra 4 tienen un declive al segundo día. Esto es, por el origen de las cepas madres en las muestras. Para las dos primeras muestras se utilizó el mismo ejemplar de cepa madre, por otro lado, para las muestras restantes, se usó otro ejemplar, debido a que las cepas fueron enviadas por una institución externa, y estas vieron en dos contenedores distintos. Además, se encontró, luego de 24 horas de haber sido cultivadas las muestras, flóculos como se observa en la Figura 3.4. Estos, llegaron a concentrar la coloración de las soluciones en un solo punto, por lo que causó una disminución en los valores de pigmentos verdes en las muestras 3 y 4 (cuales presentaron mayor índice de floculación).

Figura 3.4

Muestras de cultivo 1 y 4 en el segundo día de crecimiento



Nota: Comparación de coloración visual entre la muestra 1 y la muestra 4. Se presenta flóculos en ambos cultivos, sin embargo, la muestra 4 pierde mayor parte de su coloración.

Añadiendo a la floculación, se observó precipitación de sales en todas las muestras. Tanto las sales como los flóculos se llegaron a disipar mediante la agitación manual constante. No obstante, el proceso de agitación se lo llevó a cabo con extremos cuidados, debido a la sensibilidad de las microalgas a fuerzas externas. Por ende, no se llegó a homogenizar por completo todas las muestras, pero se logró, progresivamente, ir disminuyendo la cantidad de flóculos en los cultivos.

3.3 Comparativa porcentual del crecimiento

Determinando el cambio porcentual de valores de intensidad de píxel verde durante la primera semana de crecimiento se obtienen los datos de la Tabla 3.2. Con esto, se puede apreciar con claridad el comportamiento de cada muestra, sus ascensos y declives de biomasa saludable. Se observa que la muestra 1 y 2 tienen una variación relativamente similar (véase la Figura 3.5), lo cual se corrobora al observar el crecimiento con respecto al primer y último día del ciclo, este siendo de 169.36% y 150.92% respectivamente. Por

otro lado, las muestras restantes muestran menor adaptabilidad en el medio, debido a la cantidad de declives. Lo cual se refleja en su crecimiento con respecto al día cero del cultivo, para la muestra 3 se obtiene un 97.83% y para la muestra 4 un 18.17%.

Tabla 3.2

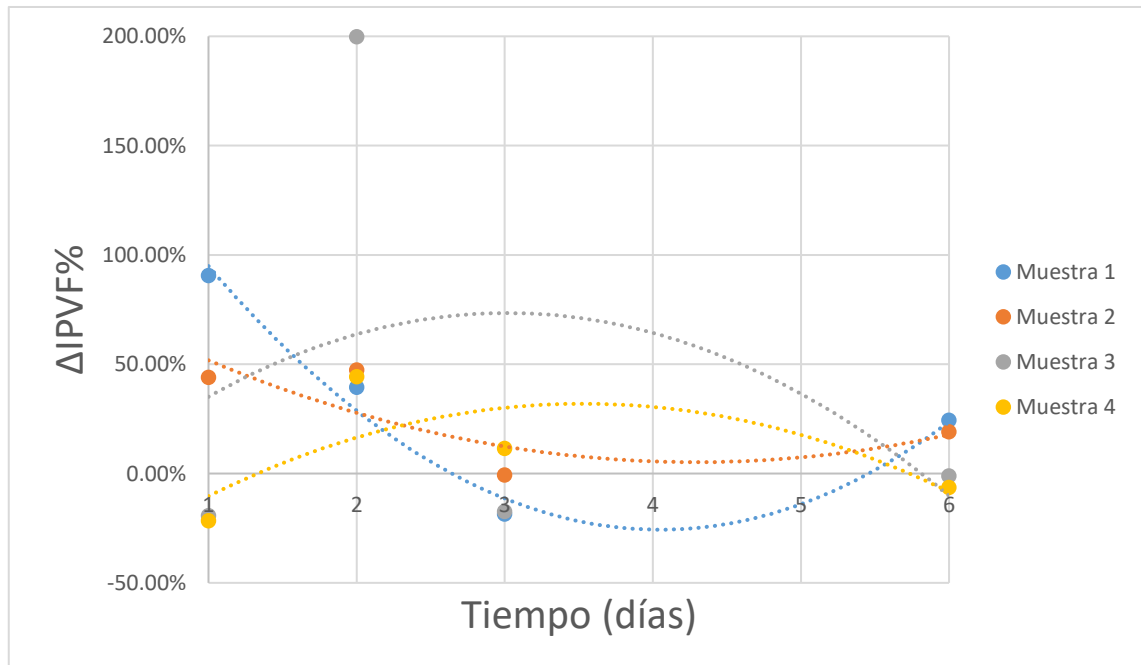
Variación porcentual del IPVF por día

Día	Muestra #1 Δ IPVF%	Muestra #2 Δ IPVF%	Muestra #3 Δ IPVF%	Muestra #4 Δ IPVF%
1	90.62%	43.95%	-19.29%	-21.51%
2	39.49%	47.38%	199.76%	44.31%
3	-18.53%	-0.69%	-17.33%	11.49%
4	24.34%	19.10%	-1.09%	-6.42%

Nota: Celdas verdes representan un crecimiento en los cultivos de microalga, mientras que las celdas rojas indican un declive en pigmentos verde de clorofila α .

Figura 3.5

Variación Porcentual de Intensidad de Píxeles Verdes



Nota: La muestra 1 y 2 muestran una campana cóncava hacia arriba mientras las muestras 3 y 4 una cóncava hacia abajo. Mostrando la naturaleza de variación de la intensidad de píxeles verdes.

CAPÍTULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El tratamiento de los efluentes es de suma importancia para el correcto desecho de los mismos. Por lo que, varios estudios se enfocan en encontrar alternativas para el tratamiento de los mismos, con nuevas alternativas a los métodos convencionales utilizados en las industrias. Donde algunas de las problemáticas principales en el desarrollo de nuevos protocolos son el componente económico y la dificultad de implementación.

En este estudio, se exploró una de las alternativas para el tratamiento de efluentes porcinos, el cual consiste en el uso de la microalga *Arthrospira Plantensis* (Espirulina). En donde, la primera fase para lograr implementar esta alternativa en las instalaciones porcinas fue evaluar el crecimiento de la Espirulina en condiciones controladas de laboratorio a través del uso de dos métodos distintos. Con el primer método no se obtuvieron buenos resultados debido a que unas de las principales debilidades para su cultivo fue la sensibilidad innata que tiene la especie en concentraciones bajas, ya que cuando se escaló de un volumen de cultivo de 33 mL a 100 mL se observó como este microorganismo fue muriendo con el pasar del tiempo, sin lograr adaptarse. Con el segundo método se obtuvieron mejores resultados ya que se logró escalar el cultivo y evaluar el crecimiento de la microalga a través de la intensidad de clorofila. Logrando así, la elaboración de un protocolo (el cual se encuentra en el apéndice c) que permita replicar el cultivo de espirulina para que futuras investigaciones la puedan implementar y usar en investigaciones de tratamiento de aguas residuales de instalaciones porcinas rurales.

Debido a que no se tenía mucha muestra de cultivo y con ayuda del método 2 se procedió con el estudio del crecimiento de los cultivos. Se determinó el IPVF de la especie *Arthrospira Plantensis* estimando el aumento de clorofila α de cada muestra durante la primera semana, ya que este proceso permite no destruir la microalga. Logrando así

observar el aumento del IPVF tal como se muestra en la Tabla 3.1, y con ayuda de la Figura 3.3 se constató que, durante el tercer día a excepción de la muestra 4 todo el resto tuvieron un pico de la intensidad de verde, permitiendo así llegar al último día de estudio en donde el crecimiento logarítmico de la especie tuvo un declive, lo cual nos indica que está llegando a su pico de crecimiento. Esto permitió evaluar el crecimiento de la microalga y su adaptabilidad al medio, logrando obtener el cambio porcentual para cada muestra, donde para la muestra 1 y 2 se obtuvo 169.36% y 150.92%, mientras que la muestra 3 y 4 se obtuvo un cambio de 97.83% y 18.17% respectivamente, lo cual se observó que las dos primeras muestras tuvieron mejor adaptabilidad al medio de cultivo y las condiciones de laboratorio previamente nombradas en la metodología.

En referencia a lo mencionado, para llegar a escalar correctamente el cultivo de *Espirulina*, se validaron dos tipos de modificaciones de este medio de cultivo. Los cultivos se reprodujeron dos veces con cada método, variando la cantidad de micronutrientes usadas en la preparación de los medios Zarrouk como se mencionan en el método 1 y método 2. Para la producción de biomasa de esta microalga se obtuvieron mejores resultados con el segundo método que es detallado en el capítulo 2. Esto se dio ya que la *Espirulina* tuvo una mejor adaptabilidad a este medio que en el medio del método 1. Con el método 2 se logró observar el incremento de la biomasa a medida que pasaban los días, siguiendo un análisis fotográfico que permitió cuantificar la clorofila α con la intensidad de píxel verde final, logrando de esta manera escalar el cultivo para obtener una mayor cantidad de microalga. Con lo cual se constató que, el uso de este medio permite escalar el cultivo de la *espirulina* con resultados satisfactorios.

Este hallazgo, implica que se puede iniciar un cultivo de *Espirulina* a mayor escala, el cual, se implementaría en el tratamiento de aguas residuales porcinas de instalaciones ubicadas en la subcuenca del Río Daule. Este trabajo es una parte de un proyecto más amplio con implicaciones en encontrar una alternativa económica y de fácil implementación a una problemática con ámbito ambiental y social.

Recomendaciones

Es aconsejable que se tomen las medidas necesarias de higienes y desinfección del lugar de trabajo, materiales y de la persona que está realizando el cultivo, ya que la microalga es muy delicada a nivel de inocuidad y si no se tienen las medidas necesarias puede contaminarse y por defecto moriría.

Se recomienda tener mucho cuidado al preparar el medio Zarrouk, ya que este debe tener un color medio blanquecino o pálido traslucido; para esto es bueno agitar los reactivos mientras se prepara las soluciones y autoclavar el medio, lo cual a su vez permite la eliminación de contaminantes. Si no se logra este color y se llega a tener un medio turbio, se puede decir que el medio está mal preparado.

Al comenzar con un volumen pequeño de cultivo (menor a 600 mL), lo aconsejable es agitar de manera manual y no mecánicamente, debido que esto destruiría las células de la microalga. La agitación se debe realizar lentamente de 2 a 3 veces por día para que se homogenice el cultivo.

Se debe observar el cultivo periódicamente, con el fin de ver las algas muertas (esta es de color azul, amarilla, café o marrón) y sacarlas con mucho cuidado del frasco, lo cual permitirá que no se contamine el resto del cultivo y por ende muera la microalga.

Se recomienda utilizar luz blanca, ya que favorece el crecimiento de la microalga, y no otro tipo de luz porque se produciría fotoinhibición, lo cual reduce la tasa fotosintética para el crecimiento del cultivo hasta el punto de matarlas.

Es necesario controlar el pH del cultivo todos los días o cada 2 días, ya que este debe ser básico, pero tampoco tan alto debido a que puede ser tóxico para el alga. El pH puede estar entre 9.0 a 11.5. Si se desea bajar el pH, se lo puede realizar con una solución de HCl 6 molar, el cual se agrega poco a poco en la solución del cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

Abalde, Julio., Cid, Ángeles., Fidalgo, Pablo., Torres, Enrique., & Herrero, Concepción.

(1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*.

Aguilar Moreno, J. (2020). *Tratamiento de aguas residuales con el uso de microalgas*

[Tesis de grado]. Universidad Científica del Sur.

Barbosa Costales, A. S. (2020). *Investigación sistemática literaria del tratamiento biológico*

de aguas residuales usando bacterias y microalgas [Tesis de grado]. Universidad San Francisco de Quito.

Campuzano Jerson, Zambrano Dayana. (2020). *Remoción de contaminante de un*

efluente de una empacadora utilizando una mezcla microalgas (Chlorella Spirulina) y microorganismo (Lodos Activados). Universidad de Guayaquil.

Carreño Ricarte, Montenegro Karina, Mosquera José. (2020). *Guía de agua segura*.

Ministerio de Salud Pública.

Cestonaro do Amaral, A., Kunz, A., Radis Steinmetz, R. L., & Justi, K. C. (2014). *Zinc and*

copper distribution in swine wastewater treated by anaerobic digestion. *Journal of Environmental Management*, 141, 132–137.

<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.03.021>

Cheunbarn, S., & Peerapornpisal, Y. (2015). *Cultivation of Spirulina platensis using*

Anaerobically Swine Wastewater Treatment Effluent. *International journal of agriculture & biology Cultivation of Spirulina platensis using Anaerobically Swine Wastewater Treatment Effluent*. *Int. J. Agric. Biol*, 12, 586–590.

<http://www.fspublishers.org>

Escobar Jairo. (2002). *La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y*

el mar. CEPAL, División de Recursos Naturales e Infraestructura.

Gómez Luna, L. M. (2007). *Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos*: Vol. XIX.

Universidad de Oriente Santiago de Cuba.

Gregor J., & Maršálek B. (2004). Freshwater phytoplankton quantification by chlorophyll a: a comparative study of in vitro, in vivo and in situ methods. The Academy of Sciences of the Czech Republic.
http://ecotox.ibot.cas.cz/en/publications/2004_gregor%2Bmarsalek_waterres_38_517.pdf

Gupta S. D., Ibaraki Y., Pattanayak A. K. (2013). Development of a digital image analysis methods for real-time estimation of chlorophyll content in micropropagated potato plants. *Plant Biotechnol. Rep.* 7, 91–97. 10.1007/s11816-012-0240-5

Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *In Revista de Biología Marina y Oceanografía* (Vol. 49, Issue 2, pp. 157–173). Universidad de Valparaíso. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Lafarga, T., & Sánchez Zurano, A. (25 de febrero de 2021). ¿Qué beneficios tiene la espirulina, el “alimento de los astronautas”? *The conversation*.
<https://theconversation.com/que-beneficios-tiene-la-espirulina-el-alimento-de-losastronautas-155097>

Li, K., Liu, Q., Fang, F., Luo, R., Lu, Q., Zhou, W., Huo, S., Cheng, P., Liu, J., Addy, M., Chen, P., Chen, D., & Ruan, R. (2019). Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*, 291, 121934.
<https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2019.121934>

Luis Santiago Quiroz Fernández, Elena Izquierdo Kulich, & Carlos Menéndez Gutiérrez.

(2017). *Aplicación del índice de calidad de agua en el río Portoviejo, Ecuador*. Scielo.

Martins, C. F., Pestana Assunção, J., Ribeiro Santos, D. M., Madeira, M. S. M. dos S., Alfaia,

- C. M. R. P. M., Lopes, P. A. A. B., Coelho, D. F. M., Cardoso Lemos, J. P., de Almeida, A. M., Mestre Prates, J. A., & Freire, J. P. B. (2021). *Effect of dietary inclusion of Spirulina on production performance, nutrient digestibility and meat quality traits in post-weaning piglets*. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105(2), 247–259. <https://doi.org/10.1111/jpn.13470>
- Masojídek, J., & Torzillo, G. (2014). Mass Cultivation of Freshwater Microalgae. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.09373-8>
- Mezzomo, N., Galon Saggiorato, A., Siebert, R., Oliveira Tatsch, P., Cristina Lago, M., Hemkemeier, M., Alberto Vieira Costa, J., Elita Bertolin, T., & Maria Colla, L. (2010). *Cultivation of microalgae Spirulina platensis (Arthrospira platensis) from biological treatment of swine wastewater*. Federal University Foundation of Rio Grande.
- Mishra Pragya, Prasad Sheo (2015). *Evaluation of anticandidal activities of spirulina metabolite against candida albicans*. In article *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*. [https://doi: 10.13040/ijpsr.0975-8232.6\(3\).1000-07](https://doi:10.13040/ijpsr.0975-8232.6(3).1000-07)
- Molinuevo-Salces, B., Riaño, B., Hernández, D., & García-González, M. C. (2019). Microalgae and wastewater treatment: Advantages and disadvantages. In *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment* (pp. 505–533). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_20
- Neumann, C., Velten, S., & Liebert, F. (2018). *N balance studies emphasize the superior protein quality of pig diets at high inclusion level of algae meal (Spirulina platensis) or insect meal (hermetia illucens) when adequate amino acid supplementation is ensured*. *Animals*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/ani8100172>
- Panchana Erika. (2021). *Proyección de un sistema de tratamiento biológico de efluentes*

derivados de una granja porcina como una alternativa viable para el mejoramiento del purín con fines agronómicos en la comuna zapotal provincia de Santa Elena. [Tesis de grado]. Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Pires, J. C. M., Alvim-Ferraz, M. C. M., Martins, F. G., & Simões, M. (2012). Carbon dioxide capture from flue gases using microalgae: Engineering aspects and biorefinery concept. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(5), 3043–3053. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2012.02.055>

Rodríguez, Q., Vega, A., Tavizón, F. E., Félix, V., Domínguez, B., Verduzco, C., Maldonado Macías A A, M. G., Juárez, C., & México, C. (2016). *Selección de un medio de cultivo a nivel laboratorio para el cultivo de la cianobacteria espirulina (Arthrospira maxima) Y cuantificación de los nutraceuticos* (Vol. 1, Issue 1).

Rojas, E., Ávila, M., & Parada, G. (2012). Environment and Resources of the South Pacific. *In Latin American Journal of Aquatic Research* 763 Lat. Am. J. Aquat. Res (Vol. 40, Issue 3).

Sandoval Simbaña, Diana Carolina (2017). *Evaluación del crecimiento de espirulina (Arthrospira Platensis) mediante alternativas de fertilización orgánica e inorgánica y su masificación en condiciones de campo en la HDA. El Prado.* [Tesis de grado]. Universidad de las Fuerzas Armadas.

Sandoval-Herazo, M., Nani, G., Sandoval, L., Rivera, S., Fernández-Lambert, G., & Alvarado-Lassman, A. (2020). Evaluación del desempeño de humedales construidos verticales parcialmente saturados para el tratamiento de aguas residuales porcinas. *In Tropical and Subtropical Agroecosystems* (Vol. 23).

Sarto, J. R. W., Neres, M. A., Sunahara, S. M. M., Nath, C. D., & Sarto, M. V. M. (2019). Chemical composition of swine wastewater, soil, and tifton 85 after 8 years of application. *Revista Caatinga*, 32(1), 259–269. <https://doi.org/10.1590/1983-21252019v32n126rc>

Tamayo Guadalupe. (2018). *Relación entre la calidad del agua del río Daule y la población de macroinvertebrados en los órdenes ephemeroptera, plecóptera y trichoptera, como bioindicadores* [Tesis de grado]. Universidad técnica estatal de Quevedo.

Umaña, J. (2019 del 11 de septiembre). Es factible producir microalgas para alimento animal y a la vez ayudar al ambiente. Hoy en el TEC.
<https://www.tec.ac.cr/hoyeneltec/2019/09/11/factible-producir-microalgas-alimento-animal-vez-ayudar-ambiente>

Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J. U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *In Engineering in Life Sciences* (Vol. 19, Issue 12, pp. 860–871). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>

Wood, N. J., Baker, A., Quinnell, R. J., & Camargo-Valero, M. A. (2020). A Simple and Non-destructive Method for Chlorophyll Quantification of Chlamydomonas Cultures Using Digital Image Analysis. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00746>

Zinicovscaia, I., Yushin, N., Shvetsova, M., & Frontasyeva, M. (2018). Zinc removal from model solution and wastewater by *Arthrospira* (Spirulina) Platensis biomass. *International Journal of Phytoremediation*, 20(9), 901–908. <https://doi.org/10.1080/15226514.2018.1448358>

Día 2									
Muestra #1	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	84.00	85.00	79.00	23.00	83.00	82.00	14.00	89.00	78.00
G	122.00	123.00	115.00	60.00	121.00	118.00	54.00	127.00	111.00
B	115.00	116.00	107.00	48.00	114.00	112.00	41.00	120.00	105.00
IPV	0.38	0.38	0.38	0.46	0.38	0.38	0.50	0.38	0.38
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	181.00	171.00	188.00	181.00	170.00	186.00	184.00	170.00	187.00
G	196.00	191.00	210.00	196.00	191.00	209.00	196.00	192.00	209.00
B	223.00	224.00	244.00	223.00	224.00	243.00	234.00	224.00	243.00
IPV_FONDO	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.32	0.33	0.33
Muestra #2	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	28.00	98.00	78.00	35.00	101.00	88.00	55.00	104.00	83.00
G	78.00	129.00	111.00	83.00	135.00	121.00	105.00	137.00	119.00
B	57.00	125.00	103.00	67.00	133.00	114.00	86.00	134.00	110.00
IPV	0.48	0.37	0.38	0.45	0.37	0.37	0.43	0.37	0.38
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	189.00	177.00	192.00	190.00	178.00	192.00	191.00	178.00	193.00
G	205.00	192.00	214.00	205.00	196.00	214.00	203.00	194.00	215.00
B	239.00	223.00	246.00	240.00	225.00	247.00	239.00	222.00	245.00
IPV_FONDO	0.32	0.32	0.33	0.32	0.33	0.33	0.32	0.33	0.33
Muestra #3	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	39.00	140.00	125.00	58.00	147.00	103.00	47.00	143.00	129.00
G	85.00	158.00	145.00	101.00	156.00	122.00	87.00	162.00	148.00
B	68.00	167.00	150.00	86.00	178.00	131.00	77.00	173.00	156.00
IPV	0.44	0.34	0.35	0.41	0.32	0.34	0.41	0.34	0.34
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	187.00	177.00	189.00	189.00	182.00	188.00	190.00	181.00	194.00
G	199.00	191.00	205.00	200.00	193.00	204.00	200.00	196.00	206.00
B	229.00	223.00	237.00	232.00	223.00	237.00	231.00	227.00	241.00
IPV_FONDO	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
Muestra #4	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	78.00	108.00	104.00	27.00	114.00	100.00	78.00	104.00	42.00
G	119.00	145.00	138.00	73.00	151.00	134.00	119.00	143.00	80.00
B	106.00	142.00	136.00	57.00	147.00	130.00	109.00	140.00	77.00
IPV	0.39	0.37	0.37	0.46	0.37	0.37	0.39	0.37	0.40
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	182.00	185.00	201.00	186.00	189.00	198.00	184.00	183.00	198.00
G	198.00	200.00	218.00	200.00	201.00	215.00	198.00	200.00	215.00
B	229.00	237.00	252.00	229.00	237.00	247.00	231.00	238.00	248.00
IPV_FONDO	0.33	0.32	0.32	0.33	0.32	0.33	0.32	0.32	0.33

Día 3									
Muestra #1	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	47.00	66.00	56.00	49.00	66.00	55.00	32.00	63.00	55.00
G	92.00	107.00	98.00	99.00	107.00	98.00	80.00	107.00	97.00
B	67.00	84.00	75.00	72.00	84.00	74.00	57.00	83.00	77.00
IPV	0.45	0.42	0.43	0.45	0.42	0.43	0.47	0.42	0.42
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	173.00	177.00	194.00	170.00	176.00	196.00	173.00	175.00	194.00
G	188.00	191.00	215.00	190.00	190.00	212.00	190.00	192.00	215.00
B	210.00	209.00	240.00	210.00	208.00	239.00	213.00	211.00	242.00
IPV_FONDO	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Muestra #2	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	34.00	51.00	51.00	49.00	50.00	53.00	44.00	46.00	58.00
G	82.00	95.00	93.00	97.00	95.00	94.00	94.00	95.00	103.00
B	61.00	71.00	72.00	77.00	73.00	78.00	67.00	70.00	83.00
IPV	0.46	0.44	0.43	0.43	0.44	0.42	0.46	0.45	0.42
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	172.00	167.00	184.00	171.00	162.00	180.00	176.00	168.00	188.00
G	193.00	188.00	210.00	193.00	183.00	207.00	197.00	190.00	214.00
B	220.00	203.00	236.00	226.00	205.00	238.00	222.00	207.00	238.00
IPV_FONDO	0.33	0.34	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.34	0.33
Muestra #3	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	36.00	41.00	36.00	44.00	41.00	39.00	21.00	38.00	37.00
G	96.00	91.00	84.00	95.00	91.00	83.00	87.00	93.00	89.00
B	73.00	68.00	65.00	74.00	68.00	66.00	61.00	69.00	68.00
IPV	0.47	0.46	0.45	0.45	0.46	0.44	0.51	0.47	0.46
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	152.00	142.00	169.00	158.00	145.00	164.00	152.00	139.00	165.00
G	186.00	173.00	204.00	183.00	171.00	196.00	188.00	175.00	206.00
B	213.00	196.00	235.00	215.00	199.00	227.00	214.00	197.00	234.00
IPV_FONDO	0.34	0.34	0.34	0.33	0.33	0.33	0.34	0.34	0.34
Muestra #4	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	66.00	71.00	64.00	50.00	82.00	77.00	55.00	69.00	69.00
G	113.00	115.00	104.00	102.00	126.00	121.00	105.00	112.00	108.00
B	81.00	85.00	77.00	74.00	105.00	104.00	74.00	81.00	83.00
IPV	0.43	0.42	0.42	0.45	0.40	0.40	0.45	0.43	0.42
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	199.00	201.00	211.00	210.00	216.00	201.00	200.00	201.00	212.00
G	214.00	218.00	229.00	235.00	238.00	226.00	214.00	216.00	230.00
B	230.00	229.00	240.00	254.00	255.00	244.00	232.00	232.00	243.00
IPV_FONDO	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.33	0.33	0.34

Día 4									
Muestra #1	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	75.00	77.00	72.00	83.00	78.00	74.00	45.00	78.00	70.00
G	119.00	116.00	112.00	125.00	118.00	114.00	93.00	115.00	107.00
B	86.00	90.00	86.00	97.00	91.00	87.00	62.00	88.00	83.00
IPV	0.43	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41	0.47	0.41	0.41
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	183.00	190.00	221.00	182.00	195.00	213.00	182.00	193.00	215.00
G	198.00	205.00	236.00	197.00	207.00	230.00	197.00	205.00	233.00
B	211.00	218.00	252.00	210.00	221.00	245.00	210.00	216.00	246.00
IPV_FONDO	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.34
Muestra #2	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	75.00	69.00	72.00	23.00	72.00	73.00	11.00	70.00	72.00
G	125.00	110.00	112.00	72.00	126.00	120.00	46.00	116.00	117.00
B	92.00	87.00	92.00	45.00	89.00	93.00	32.00	89.00	93.00
IPV	0.43	0.41	0.41	0.51	0.44	0.42	0.52	0.42	0.41
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	181.00	189.00	199.00	183.00	186.00	199.00	183.00	183.00	198.00
G	201.00	206.00	217.00	209.00	213.00	225.00	205.00	203.00	221.00
B	223.00	223.00	239.00	222.00	224.00	240.00	224.00	221.00	241.00
IPV_FONDO	0.33	0.33	0.33	0.34	0.34	0.34	0.33	0.33	0.33
Muestra #3	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	51.00	61.00	83.00	87.00	48.00	82.00	50.00	96.00	80.00
G	96.00	93.00	121.00	133.00	86.00	124.00	98.00	134.00	118.00
B	58.00	60.00	86.00	88.00	48.00	88.00	63.00	96.00	82.00
IPV	0.47	0.43	0.42	0.43	0.47	0.42	0.46	0.41	0.42
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	204.00	211.00	221.00	205.00	205.00	221.00	205.00	209.00	221.00
G	210.00	215.00	228.00	214.00	210.00	230.00	212.00	213.00	228.00
B	216.00	218.00	235.00	217.00	213.00	237.00	216.00	219.00	236.00
IPV_FONDO	0.33	0.33	0.33	0.34	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33
Muestra #4	Foto 1			Foto 2			Foto 3		
	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3	Spot 1	Spot 2	Spot 3
R	67.00	68.00	62.00	79.00	64.00	38.00	75.00	70.00	67.00
G	114.00	105.00	101.00	126.00	104.00	79.00	122.00	107.00	106.00
B	77.00	79.00	75.00	88.00	72.00	48.00	86.00	79.00	77.00
IPV	0.44	0.42	0.42	0.43	0.43	0.48	0.43	0.42	0.42
	Fondo			Fondo			Fondo		
R	196.00	188.00	212.00	200.00	196.00	214.00	199.00	195.00	213.00
G	207.00	198.00	222.00	212.00	206.00	228.00	209.00	202.00	225.00
B	224.00	210.00	239.00	222.00	217.00	237.00	221.00	213.00	237.00
IPV_FONDO	0.33	0.33	0.33	0.33	0.33	0.34	0.33	0.33	0.33

APÉNDICE B

Costos

Se realizó un análisis de costos considerando las cantidades que se usaron y el precio de los reactivos e insumos, para la producción de 1 litro de espirulina partiendo de una cepa madre (*Arthrospira Platensis*) traída del exterior. Los costos son considerando el método 2, debido a que dio resultados satisfactorios.

Tabla 3.3

Valores y cantidades de cada materia prima según el mercado

Materiales, reactivos e insumos	Valor [\$]	Cantidad
Temporizador mecánico enchufable de 24 horas	\$ 23.00	1 ud
Frascos de 250 mL pyrex	\$ 81.45	12 uds
Lampara led con 1200 lúmenes	\$ 7.00	1 ud
Cepa de espirulina	\$ 125.00	250 mL
Agua destilada	\$ 1.10	1 L
Ácido Clorhídrico al 37%	\$ 45.64	2500 mL
Nitrato de sodio	\$ 39.87	500 g
Fosfato hidrogeno dipotásico	\$ 128.80	250 g
Sulfato de potasio	\$ 24.16	500 g
Cloruro de sodio	\$ 11.17	500 g
Sulfato de magnesio	\$ 27.57	500 g
Cloruro de calcio	\$ 31.67	250 g
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	\$ 35.84	500 g
EDTA sal disódica	\$ 38.08	500 g
Bicarbonato de sodio	\$ 47.04	500 g
Ácido bórico	\$ 75.04	1000 g
Sulfato de manganeso (II) monohidratado	\$ 28.00	500 g
Sulfato de zinc heptahidratado	\$ 24.95	500 g
Molibdato de sodio dihidratado	\$ 51.52	100 g
Sulfato de cobre (II) heptahidratado	\$ 62.94	500 g

Tabla 3.4*Cantidades requeridas para la producción de 1 L de espirulina*

Materiales, reactivos e insumos	Cantidad
Temporizador mecánico enchufable de 24 horas	1 ud
Frascos de 250 mL pyrex	5 uds
Lampara led con 1200 lúmenes	1 ud
Cepa de espirulina	100 mL
Agua destilada	4 L
Ácido Clorhídrico al 37%	50 mL
Nitrato de sodio	12.5 g
Fosfato hidrogeno dipotásico	1.25 g
Sulfato de potasio	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Sulfato de magnesio	1 g
Cloruro de calcio	1 g
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	0.25 g
EDTA sal disódica	2 g
Bicarbonato de sodio	21 g
Ácido bórico	7.15 g
Sulfato de manganeso (II) monohidratado	7.7 g
Sulfato de zinc heptahidratado	5.55 g
Molibdato de sodio dihidratado	0.4425 g
Sulfato de cobre (II) heptahidratado	1.975 g

Tabla 3.5*Valor total de cada insumo para la producción de 1 L de espirulina*

Materiales, reactivos e insumos	Valor total [\\$]
Temporizador mecánico enchufable de 24 horas	\$ 23.00
Frascos de 250 mL pyrex	\$ 33.94
Lampara led con 1200 lúmenes	\$ 7.00
Cepa de espirulina	\$ 50.00
Agua destilada	\$ 4.40
Ácido Clorhídrico al 37%	\$ 0.91
Nitrato de sodio	\$ 1.00
Fosfato hidrogeno dipotásico	\$ 0.64
Sulfato de potasio	\$ 0.24
Cloruro de sodio	\$ 0.11
Sulfato de magnesio	\$ 0.06
Cloruro de calcio	\$ 0.13
Sulfato de hierro (II) heptahidratado	\$ 0.02
EDTA sal disódica	\$ 0.15
Bicarbonato de sodio	\$ 1.98
Ácido bórico	\$ 0.54
Sulfato de manganeso (II) monohidratado	\$ 0.43
Sulfato de zinc heptahidratado	\$ 0.28
Molibdato de sodio dihidratado	\$ 0.23
Sulfato de cobre (II) heptahidratado	\$ 0.25
Total	\$ 125.29

Debido a que en nuestro país aún no existe una matriz que puedan producir espirulina el precio por la producción de 1 L de alga resultaría rentable (\$125.29), ya que según precios internacionales la venta de esta microalga oscila entre los \$125 a \$500 por 250 mL, esto se da debido que la espirulina no es nativa de nuestro país y se debe exportarla.

APÉNDICE C

Protocolo para el cultivo de *Espirulina (Arthrospira Platensis)*

Preparación del medio Zarrouk por soluciones stocks

1. Pesar los reactivos enlistados en la Tabla 2.3
2. Realizar soluciones para cada reactivo en función de la Tabla 2.3, y aforar hasta 250 mL con agua destilada (soluciones stocks).
3. Agitar rigurosamente cada solución stock.
4. En un envase de vidrio mezclar las soluciones stocks del paso anterior siguiendo el volumen que se indica en la Tabla 2.4, aforando hasta 1 L con agua destilada.
5. Agitar rigurosamente la mezcla hasta obtener homogeneidad.
6. Autoclavar el medio Zarrouk antes de ser usado.

Procedimiento de cultivo

1. Añadir 25 mL de cepa madre, en 75 mL de medio Zarrouk (mantener la relación 1:3) en un frasco de 250 mL. Esto se lo realiza en una cabina de flujo laminar.
2. Agitar levemente el cultivo hasta homogenizar la solución.
3. Llevar el cultivo a una incubadora con una temperatura de 25°C.
4. Mantener la solución del cultivo expuesta a luz blanca por periodos de 12 H (3200 lúmenes máx.).

Recomendaciones generales

- Esterilizar toda instrumentación de laboratorio que se use directamente con el cultivo para evitar contaminación.
- Mantener una agitación manual diaria de 2 a 3 veces, por al menos 1 minuto por sesión.
- Para aumentar el volumen del cultivo se debe duplicar el volumen con que se inicio el cultivo o cultivo antes del escalamiento con medio Zarrouk (esperar al menos 1 semana antes de duplicar el cultivo).

- Al llegar a un cultivo de al menos 600 mL la agitación debe ser constante (agitación mecánica o aireación) para mantener al margen la generación de flóculos.
- Observar el cultivo periódicamente y si se ven algas de color azul, amarilla, café o marrón sacarlas del envase con ayuda de una pipeta, teniendo en cuidado debido.
- Controlar el pH del cultivo periódicamente, el cual debe estar entre 9.0 a 11.5. Si el pH está muy elevado, bajarlo con una solución de HCl 6 molar, el cual se agrega poco a poco en la solución del cultivo.