



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO  
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES**

**BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS RESIDUALES URBANAS PROVENIENTES DE LAS  
DESCARGAS HACIA EL RÍO YASNÁN-PULAMARÍN DEL CANTÓN CAYAMBE-  
ECUADOR MEDIANTE EL USO DE *CHLORELLA SP.***

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
Ingeniero/a en Biotecnología de los Recursos Naturales**

**AUTORES: STEPHANIE NICOLE REINOSO SALAS  
DARÍO SEBASTIAN REINOSO CARRILLO  
TUTOR: DANIEL ALBERTO FREIRE BALSECA**

**Quito-Ecuador**

**2022**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Stephanie Nicole Reinoso Salas con documento de identificación N° 1803797750 y Darío Sebastian Reinoso Carrillo con documento de identificación N° 2300195456; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 1 de septiembre del año 2022

Atentamente,



-----  
Stephanie Nicole Reinoso Salas

C.C: 1803797750



-----  
Darío Sebastian Reinoso Carrillo

C.C: 2300195456

## CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Nosotros, Stephanie Nicole Reinoso Salas con documento de identificación N° 1803797750 y Darío Sebastian Reinoso Carrillo con documento de identificación N° 2300195456, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Biorremediación de aguas residuales urbanas provenientes de las descargas hacia el río Yasnán-Pulamarín del cantón Cayambe-Ecuador mediante el uso de *Chlorella sp.*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 1 de septiembre del año 2022

Atentamente,

-----  
Stephanie Nicole Reinoso Salas

C.C: 1803797750

-----  
Darío Sebastian Reinoso Carrillo

C.C: 2300195456

## **CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, Daniel Alberto Freire Balseca con documento de identificación N° 1720534468, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: Biorremediación de aguas residuales urbanas provenientes de las descargas hacia el río Yasnán-Pulamarín del cantón Cayambe-Ecuador mediante el uso de *Chlorella sp.*, realizado por Stephanie Nicole Reinoso Salas con documento de identificación N° 1803797750 y por Darío Sebastian Reinoso Carrillo con documento de identificación N° 2300195456, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 1 de septiembre del año 2022

Atentamente,



Firmado electrónicamente por:  
**DANIEL ALBERTO  
FREIRE BALSECA**

-----  
Ing. Daniel Alberto Freire Balseca  
C.C:1720534468

## Dedicatoria

A mis padres: Margot y Nelson, que han sido uno de los pilares en mi excelente formación profesional y calidad humana.

A mi hermana: Doménica, que has sido el más grande tesoro e inspiración que me ha dado la vida.

A Cori, mi compañera de desvelos.

Y a todos los soñadores que luchan por un cambio desde sus pequeñas trincheras en el lugar del mundo en el que se encuentren, sepan que su esfuerzo no es en vano.

*Stephanie Nicole Reinoso Salas*

A mis padres: Darío y Rosi, que gracias a su apoyo, amor y esfuerzo he podido cumplir con un sueño más, gracias por inculcarme el ejemplo de esfuerzo y perseverancia.

A mis hermanos: Alan, Toño y José, que han sido mi inspiración en varios aspectos y una de las razones por la que no desfallecí.

A Thor, Nina y Max, quienes me acompañaron en los largos días de escritura.

A todos por quien luchan por crecer cada día, porque la verdadera mejora es cuando superas a tu yo de ayer.

*Darío Sebastian Reinoso Carrillo*

## **Agradecimiento**

A Dios, por permitirme llegar a este mundo en el momento preciso, con las personas ideales y en un entorno propicio para convertirme en la “mujer de ciencia, pero también de fe” que soy ahora.

A mi familia: Margot, Nelson, Dome y Cori; que, sin su apoyo, enseñanzas, expectativas y entrega mutua durante todos estos años, habría sido imposible desarrollarme como un ser humano de excelencia integral y que ha podido dar uno de los pasos más críticos en esta formación.

A la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito y Cayambe, por darme la oportunidad de demostrar las capacidades que yo misma desconocía que tenía, con retos cada vez mayores, siendo testigo de todos y cada uno de los triunfos y derrotas en el camino a este galardón académico. A todos y cada uno de los docentes y compañeros que influyeron de una u otra manera en el ser que soy actualmente.

Mi más sincera gratitud a la Ing. Mafer Guevara Granja, que, aunque nuestros caminos se tuvieron que separar, nos dejó bajo la tutela del mejor guía apasionado por las microalgas, el Ing. Daniel Freire, que con su paciencia y ayuda en los puntos clave, se pudo llevar a cabo esta investigación. A la EMAPAAC-EP por ayudarnos con la toma de muestra. Al Ing. Christian Larenas Uría, cuya instrucción en química analítica y su sincera preocupación salvó el rumbo del presente trabajo. A la Ing. Laura Huachi Espín, por ser una inspiración de crecimiento personal, así como intelectual y facilitarnos el desarrollo del presente proyecto en los Laboratorios de Ciencias de la Vida; que nos permitió conocer al sinónimo de todo lo que está bien en la UPS: la Ing. Joha Meneses, cuyo apoyo, guía y amistad fue vital para continuar a pesar de los altibajos que se presentaron en el camino. Y a la Ing. Rosita Espinosa por sus siempre bienvenidos consejos.

Agradezco de corazón a todos los que se me quedan en el tintero y, aunque, la extensión y las palabras no alcanzan para describir lo que siento, mi dicha actual es el resultado de la mejor coincidencia y decisión que simbolizas en mi vida: Darío Reinoso.

¡Muchas gracias por tanto!

*Stephanie Nicole Reinoso Salas*

A mi padre Darío quien gracias a su gran ejemplo de superación y esfuerzo me dio la fuerza y la oportunidad para continuar con esta fase de mi vida, a mi madre Rosi quien gracias a su apoyo y amor incondicional puse seguir firme y en mis tiempos de vacilación me apoyó, a mis hermanos que gracias a su presencia en mi vida me impulsan a querer ser mejor y para apoyarlos cuando me necesiten, a mi tía Goita que gracias a sus constantes bromas y ocurrencias me dieron la fortaleza para continuar con mi camino.

A la Universidad Politécnica Salesiana sede Quito y Cayambe por apoyarnos en el uso de equipo y compartir su conocimiento para que este trabajo fuera lo más sencillo posible. Al Ing. Daniel Freire quien nos guio a lo largo de todo el proceso de tesis y que sin su ayuda el presente trabajo no se hubiera concretado. A la Ing. Mafer Guevara por animarnos a elegir este tema y ser nuestra primera guía en el increíble tema que es la biorremediación, al Ing. Christian Larenas por auténtica preocupación y ayuda con respecto a la sección de química analítica y sus valiosos consejos para con la fase de análisis de contaminantes. A la Ing. Laura Huachi quien con su gran corazón y apoyo la tesis pudo seguir sin problemas, a la Ing. Joha Meneses quien no solo nos guio en el manejo de equipos y generalmente en los laboratorios, sino que se volvió una amiga.

Por último, agradezco a mi compañera de tesis Stephanie Reinoso quien no solo fue indispensable para el presente trabajo y sin su ayuda no existiría, sino a su tan importante presencia en mi vida ya que es y será mi más preciada persona, te amo inmensamente, gracias, por tanto.

*Darío Sebastian Reinoso Carrillo*

## Resumen

El presente trabajo evaluó la capacidad de biorremediación de *Chlorella sp.* en aguas residuales provenientes de Cayambe, mediante la inoculación de tres concentraciones: 0,001; 0,005 y 0,01 g/L en 2 L de muestras con tres repeticiones por tratamiento, además de un grupo control de biorreactores, a los que se suministró oxígeno y fotoperíodo constante durante 26 días. Se monitoreó diariamente la cinética de crecimiento con cámara de Neubauer de cada unidad experimental, por otra parte, se examinó semanalmente la conductividad y pH; así como la degradación de fosfatos, nitratos y amoníaco mediante espectrofotometría. Por último, se realizó un análisis inicial y final de DBO e indicadores microbiológicos. El ensayo determinó que la mejor concentración fue C3 con una remoción de 34,68; 84,58 y 95,81 % de nitratos, fosfatos y amoníaco respectivamente. La disminución de DBO fue de 87,8 %, mientras que la eliminación de bacterias alcanzó un promedio del 99 %. En cuanto al pH, los valores iniciales de 6,504 ascendieron a 9 en todos los tratamientos; mientras que la conductividad se mantuvo entre un rango de 284 y 285 mS/cm. En conclusión, la capacidad de remoción de contaminantes y patógenos de las aguas residuales está directamente relacionada con la concentración del inóculo de *Chlorella sp.*, siendo más que una alternativa, una necesidad para alcanzar los límites permisibles: 50 mg/L de DBO<sub>5</sub>, 10 mg/L de fosfatos, 10 mg/L de nitratos, 10mg/L de amoníaco y un rango de pH entre 5-9; acorde con la Legislación.

**Palabras clave:** microalgas; biotecnología; contaminación de aguas; ficorremediación.



## **Abstract**

This study evaluated the bioremediation capability of *Chlorella* sp. in wastewater from Cayambe, by inoculating three different concentrations: 0,001; 0,005, and 0,01 g/L in 2 L. Every treatment had three replications and a general control group. Bioreactors were supplied with oxygen and constant photoperiod for 26 days. All the treatments were monitored daily in a Neubauer chamber to follow the growth kinetics. pH was examined weekly, as well as the phosphates, nitrates, and ammonia degradation by spectrophotometry. Finally, BOD and microbiological indicators were analyzed at the beginning and the end of the experiment. The investigation determined that the best concentration was C3 with the removal of 34,68; 84,58 and 95,81 % of nitrates, phosphates, and ammonia respectively. The decrease in BOD was 87.8 %, while the removal of bacteria reached an average of 99 %. As for pH, the initial values of 6,504 ascended to 9 in all treatments, while conductivity remained between a range of 284 and 285 mS/cm. To conclude, the removal capacity of pollutants and pathogens from wastewater is directly related to the concentration of the *Chlorella* sp. inoculum, being more than an alternative, a necessity to reach the permissible limits: 50 mg/L of BOD5, 10 mg/L of phosphates, 10 mg/L of nitrates, 10mg/L of ammonia and a pH range between 5-9; under the Legislation.

**Key words:** microalgae, biotechnology; water pollution; phycoremediation.

## Índice

<b>1</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Marco teórico</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1</b>	<b>Distribución del agua en Ecuador</b> .....	<b>4</b>
2.1.1	Tipos de contaminación.....	4
2.1.2	Métodos para el tratamiento de aguas residuales .....	5
2.1.3	Situación de las aguas residuales en Cayambe .....	5
<b>2.2</b>	<b>Calidad del agua</b> .....	<b>6</b>
2.2.1	Parámetros.....	7
<b>2.3</b>	<b>Marco Legal</b> .....	<b>10</b>
<b>2.4</b>	<b>Generalidades de las microalgas</b> .....	<b>12</b>
2.4.1	Clasificación.....	13
2.4.2	Metabolismo.....	15
2.4.3	Aislamiento y Cultivo .....	18
2.4.4	Usos.....	20
<b>3</b>	<b> Materiales y métodos</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1</b>	<b> Etapa preliminar</b> .....	<b>25</b>
3.1.1	Escalado de cultivo de <i>Chlorella sp.</i> .....	25
3.1.2	Conteo manual de <i>Chlorella sp.</i> .....	26
3.1.3	Peso seco <i>Chlorella sp.</i> .....	26
3.1.4	Curva de calibración <i>Chlorella sp.</i> .....	27
3.1.5	Obtención de las concentraciones para los tratamientos .....	28
3.1.6	Curva de calibración contaminantes.....	28
3.1.7	Obtención de las muestras .....	32

3.2	Montaje del experimento.....	32
3.3	Factores de estudio.....	34
4	<b>Resultados y discusión</b> .....	<b>40</b>
4.1	Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> .....	40
4.2	Degradación de contaminantes.....	43
4.2.1	Amoníaco .....	44
4.2.2	Nitratos.....	45
4.2.3	Fosfatos .....	45
4.3	pH.....	47
4.4	Conductividad .....	49
4.5	Otros análisis .....	50
4.5.1	DBO <sub>5</sub> .....	50
4.5.2	Indicadores microbiológicos .....	51
5	<b>Conclusiones</b> .....	<b>54</b>
6	<b>Bibliografía</b> .....	<b>55</b>
7	<b>Anexos</b> .....	<b>83</b>

## Índice tablas

Tabla 1. Parámetros de la calidad de agua .....	7
Tabla 2. Estándares de agua potable y de riego .....	11
Tabla 3. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce .....	12
Tabla 4. Elaboración de concentraciones .....	26
Tabla 5. Curva de calibración de <i>Chlorella sp.</i> .....	27
Tabla 6. Patrones de fosfato .....	29
Tabla 7. Patrones de nitratos .....	30
Tabla 8. Patrones de amoníaco.....	31
Tabla 9. Disposición de las unidades experimentales .....	33
Tabla 10. Demanda biológica de oxígeno .....	35
Tabla 11. Elaboración de medios sólidos.....	37
Tabla 12. Diferencia estadística entre las diferentes concentraciones de <i>Chlorella sp.</i> .....	40
Tabla 13. Resultados estadísticos para amoníaco, nitratos, fosfatos, pH y conductividad. .....	43
Tabla 14. Resultado estadístico de crecimiento bacteriano.....	50

## Índice de figuras

Figura 1. Pirámide de Kelsen .....	10
Figura 2 Vista en microscopio de <i>Chlorella sp.</i> .....	14
Figura 3. Etapas de crecimiento en cultivo de microalgas .....	17
Figura 4. Potenciales usos de las microalgas en diferentes industrias .....	21
Figura 5. Distribución unidades experimentales .....	33
Figura 6. Dilución seriada .....	37
Figura 7. Etiquetado de cajas Petri en cámara de flujo laminar .....	38
Figura 8. <i>Scenedesmus</i> presente en la muestra de agua residual, vista en microscopio lente 40X.....	42

## Índice de ecuaciones

Ecuación 1. Fórmula para calcular el pH de una solución .....	8
Ecuación 2. Fórmula de densidad celular.....	27
Ecuación 3. Fórmula para cálculo de diluciones.....	28
Ecuación 4. Fórmula de DBO <sub>5</sub> .....	36

## Índice de gráficas

Gráfica 1. Curva de calibración <i>Chlorella sp.</i> .....	28
Gráfica 2. Curva de calibración para fosfatos .....	29
Gráfica 3. Curva de calibración para nitratos.....	30
Gráfica 4. Curva de calibración para amoníaco .....	31
Gráfica 5. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> .....	41
Gráfica 6. Amoníaco .....	45
Gráfica 7. Nitratos .....	45
Gráfica 8. Fosfatos .....	46
Gráfica 9. pH .....	48
Gráfica 10. Conductividad .....	49
Gráfica 14. Análisis de DBO <sub>5</sub> .....	50
Gráfica 11. Recuento de coliformes totales .....	51
Gráfica 12. Recuento de <i>E. coli</i> .....	52
Gráfica 13. Recuento de aerobios totales .....	53

## Índice de anexos

Anexo 1. Escalado de <i>Chlorella sp.</i> .....	83
Anexo 2. Patrones para curva de calibración de amoníaco .....	84
Anexo 3. Patrones para curva de calibración de fosfatos.....	85
Anexo 4. Patrones para curva de calibración de nitratos .....	86
Anexo 5. Toma de muestra .....	87
Anexo 6. Toma de muestra para análisis.....	88
Anexo 7. Centrifugado de muestra para análisis.....	89
Anexo 8. Dilución seriada para siembra de bacterias .....	90
Anexo 9. Siembra en Petrifilm para conteo bacteriano.....	91
Anexo 10. Preparación de la muestra para medir DBO <sub>5</sub> .....	92
Anexo 11. Análisis estadístico para la cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> .....	115
Anexo 12. Análisis estadístico para amoníaco.....	121
Anexo 13. Análisis estadístico para nitratos .....	126
Anexo 14. Análisis estadístico para fosfatos.....	132
Anexo 15. Análisis estadístico para pH .....	137
Anexo 16. Análisis estadístico para conductividad.....	143
Anexo 17. Análisis estadístico para bacterias .....	146



## 1 Introducción

La contaminación del agua es uno de los problemas ambientales de mayor preocupación mundial, puesto que es uno de los recursos naturales más vulnerables en este aspecto. Dentro de las fuentes de contaminación se tienen dos: fuente puntual o identificable (como escorrentías y lixiviados de vertederos) y fuente difusa o no identificable (como áreas de escorrentía urbana sin alcantarillado) (Singh & Gupta, 2017).

Con la urbanización e industrialización, la contaminación de las fuentes de agua dulce se ha visto incrementadas, donde, de acuerdo con Kılıç (2021) “se registra que entre el 75 y el 80 % de la contaminación del agua es causada por las aguas residuales domésticas”. Esto teniendo en cuenta que la mayoría de estas no reciben ningún tratamiento previo al vertido en ríos aledaños, lo que representa una amenaza de seguridad que atenta contra el 80 % de la población mundial (Owa, 2013).

En Ecuador, el abastecimiento de agua importa más en cantidad que en calidad y esto se ve reflejado en la limitada inversión económica destinada al sostenimiento de las fuentes primarias de este recurso natural, motivo por el cual la remediación de los cuerpos de agua contaminados ha sido mínima o inexistente (Terneus & Yanez, 2018). El problema de la escasez de agua en ciertas zonas del país incentiva, principalmente, a agricultores y ganaderos a recurrir a la reutilización de aguas residuales desechadas a los cuerpos acuíferos aledaños, lo que representa una amenaza tanto para la flora y fauna en contacto con estas, así como para la población en general (Motevalli et al., 2015).

La implementación de tratamientos de aguas residuales previo a su eliminación se origina de la necesidad de reducir o eliminar compuestos orgánicos complejos que dan lugar a gases malolientes, microorganismos patógenos y compuestos tóxicos que pueden afectar la existencia de los seres vivos a través del ciclo del agua. Además, se debe tener en cuenta que, si una gran cantidad de materia orgánica se vierte en un río o cuerpo de agua, consumirá el oxígeno disuelto para satisfacer la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y, por lo tanto, agotará el oxígeno disuelto causando la muerte de peces y demás organismos vivos. Así como la presencia de nutrientes indeseables que pueden estimular el crecimiento de algas causando eutrofización (Topare et al., 2011). Por esto es necesario tomar medidas urgentes para el cuidado de este recurso, puesto que es indispensable para la existencia y supervivencia de los seres vivos (Ramos, 2016).

El cantón Cayambe cuenta con un crecimiento en su población que da un total de 85,795 personas debido a la creciente actividad florícola en el sector (INEC, 2010), esto ha generado un aumento en el uso del alcantarillado público y la contaminación generada de los vertidos a los cauces naturales de ríos.

En el diagnóstico de aguas residuales de Cayambe, elaborado por Navarro & Costa (2003) se menciona que los vertidos hacia el río Yasnán- Pulamarín carecen de tratamiento previo suficiente para la contaminación difusa de estos, puesto que el alcantarillado sanitario solo se encuentra en la parte central de la zona urbana, mientras que el resto desemboca en acequias aledañas.

Actualmente, el saneamiento del cantón está a cargo de la Empresa Pública Municipal de Agua Potable, Alcantarillado y Aseo de Cayambe, donde se usan tanques Imhoff previo al vertido (EMAPAAC EP, 2021). En mayor detalle, este tratamiento primario consiste en un diseño de dos pisos en donde, como primer paso, se utiliza la fuerza de gravedad para separar sólidos de las aguas residuales (sedimentación primaria), para luego degradarlos mediante digestión anaerobia en una cámara localizada en la parte inferior de la estructura (digestión por lodos sedimentados) (Stauffer & Spuhler, 2014). Como en el caso de Cayambe, estos son utilizados por comunidades pequeñas de alrededor de 8000 personas o 1300 hogares, con flujos de aguas residuales que oscilan los 950 m<sup>3</sup>/día (Eawag, 2014).

Si bien, los tratamientos primarios de aguas residuales son útiles para reducir patógenos y algunos compuestos tóxicos, los efluentes obtenidos contienen subproductos de desinfección que ponen en riesgo la salud cuando se utilizan como suministro de agua potable (Krasner, 2009); por este motivo, agencias reguladoras y sociedades profesionales han sugerido el desarrollo de alternativas asequibles y sostenibles con base en nuevas tecnologías. Entre las alternativas con menos impacto ambiental para pequeñas comunidades, surgen los sistemas basados en algas (Garfi et al., 2017), debido a que poseen la capacidad de remover nitrógeno y fósforo (principales contaminantes en aguas negras) utilizándolos como nutrientes para su desarrollo (Romero et al., 2018), siendo *Chlorella* uno de los más grandes referentes en biorremediación.

Todo lo anterior mencionado converge a la siguiente pregunta: ¿De qué manera *Chlorella sp.* influye en el proceso de biorremediación de aguas residuales provenientes de las descargas hacia el río Yasnán-Pulamarín del cantón Cayambe-Ecuador? Interrogante que se pretende

responder mediante el objetivo de evaluar la capacidad de biorremediación de aguas residuales urbanas provenientes de las descargas hacia el río Yasnán-Pulamarín del cantón Cayambe-Ecuador mediante el uso de *Chlorella sp.* y sustentado en los siguientes objetivos específicos:

- Caracterizar los contaminantes como nitratos, fosfatos, amoníaco y DBO<sub>5</sub> presentes en muestras de aguas tomadas de las descargas en el sector las Violetas en Cayambe mediante análisis físicos y químicos.
- Monitorear la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* mediante conteo celular en los diferentes tratamientos.
- Identificar el mejor tratamiento de *Chlorella sp.* de acuerdo con el grado de remoción de contaminantes presentes en las muestras de aguas residuales a escala de laboratorio mediante fotobiorreactores.

## 2 Marco teórico

### 2.1 Distribución del agua en Ecuador

En Ecuador el ineficiente uso de los recursos hídricos, generan un desperdicio del 40 % por la alta demanda y carencia de cultura del agua por parte de los ecuatorianos. La cantidad anual promedio de agua disponible en el país es de 241,048.61 Hm<sup>3</sup> (Campos, 2016); en la región costa el consumo per cápita es de 282 L/hab.d (litros por habitante por día), mientras que en la sierra, es de 204 L/hab.d con un promedio de 237 L/hab.d. Comparando estas cifras con el consumo promedio en Sudamérica (169 l/hab./d), se cataloga al Ecuador como el país con mayor consumo per cápita del recurso hídrico (SENAGUA, 2016).

#### 2.1.1 Tipos de contaminación

Los cuerpos de agua reciben contaminación de diversas fuentes que varían tanto en volumen como en intensidad; existiendo una mezcla entre materiales inorgánicos y orgánicos naturales, así como compuestos hechos por el ser humano. Alrededor de  $\frac{3}{4}$  del carbono orgánico en las aguas residuales están presentes como carbohidratos, grasas, proteínas, aminoácidos y ácidos volátiles. Los constituyentes inorgánicos incluyen grandes concentraciones de sodio, calcio, potasio, magnesio, cloro, azufre, fosfato, bicarbonato, sales de amonio y metales pesados (Ni Aung & Myo Swe, 2019). Los cuerpos de agua reciben contaminación de diversas fuentes que varían tanto en volumen como en intensidad; existiendo una mezcla entre materiales inorgánicos y orgánicos naturales, así como compuestos hechos por el ser humano. Alrededor de  $\frac{3}{4}$  del carbono orgánico en las aguas residuales están presentes como carbohidratos, grasas, proteínas, aminoácidos y ácidos volátiles. Los constituyentes inorgánicos incluyen grandes concentraciones de sodio, calcio, potasio, magnesio, cloro, azufre, fosfato, bicarbonato, sales de amonio y metales pesados (Ni Aung & Myo Swe, 2019). Y las diferentes fuentes de contaminantes incluyen: descarga de aguas residuales sin tratar o tratadas de pueblos y aldeas; descarga de plantas manufactureras o industriales; escorrentía de tierras agrícolas; y lixiviados de sitios de disposición de residuos sólidos, estos sitios de contaminación tienen problemas por lo que se busca una solución (Hantke, 2012). El uso humano de los recursos hídricos es una de las causas directas de impacto en el ciclo del agua, en donde la apropiación de este equivale a la mitad de la descarga total global de los ríos (Abbott et al., 2019).

### **2.1.2 Métodos para el tratamiento de aguas residuales**

En Latinoamérica, el tratamiento de aguas residuales en zonas rurales se basa en tecnologías tradicionales como fosas sépticas, y en áreas urbanas, lodos activados con el objetivo de erradicar suspensiones sólidas y reducir la DBO (Proaño & Gualoto, 2018). En cualquiera de los dos casos, los sistemas resultan insuficientes en el cumplimiento de las normativas bajo las cuales fueron desarrollados, lo que implica una pérdida de la inversión pública y un fracaso en la eliminación de microcontaminantes y nutrientes inorgánicos.

Los tratamientos para aguas residuales urbanas operan en tres diferentes niveles. A nivel primario el objetivo es eliminar sedimentos y materiales similares que resultarían problemáticos en etapas posteriores; a nivel secundario, el enfoque está en degradar la materia orgánica presente (Rambabu et al., 2020), en donde el efluente resultante es rico en nitrógeno y fósforo, que a su vez son los principales causantes de la eutrofización; además de la existencia de metales pesados que incrementan la contaminación ambiental a largo plazo (Rathod, 2015). Finalmente, en un nivel terciario, los tratamientos empleados están enfocados en la reducción progresiva de nitratos, fosfatos y materia orgánica con el fin de liberar una descarga inocua a los cuerpos de agua (Brück et al., 2019). Las fases implementadas en la eliminación de contaminantes dependerán exclusivamente de la empresa gestora a cargo y el contexto tanto social como económico, además del grado del compromiso ambiental para con los recursos hídricos (Zinicovscaia & Cepoi, 2016).

### **2.1.3 Situación de las aguas residuales en Cayambe**

La Unidad de Planificación del Municipio de Cayambe ha declarado que los vertidos procedentes del alcantarillado público y pluvial desembocan de manera directa al cauce natural del río Yasnán, que se origina a la una altura de 3900 msnm, lo que provoca una contaminación difusa en el recurso destinado hacia la agricultura y pastos de consumo ganadero (Navarro & Costa, 2003). El Plan Maestro de Agua Potable y Saneamiento atribuye esto a los inconvenientes que el sistema de alcantarillado de Cayambe posee (Churuchumbi, 2020); entre los principales se encuentra la falta de mantenimiento y operación que las plantas de tratamiento reciben, puesto que los lodos acumulados no son procesados y el sistema de alcantarillado no está diseñado para aguas sanitarias y fluviales.

### ***2.1.3.1 Tratamiento primario***

Un tanque Imhoff es una estructura diseñada para proporcionar un tratamiento primario a las aguas residuales y consiste en un tanque de sedimentación con piso cónico de pendiente pronunciada, que descansa sobre un digester de lodos. Los sólidos suspendidos ingresan a la cámara de sedimentación y caen a través de una pequeña abertura hacia la cámara de almacenamiento y digestión de lodos. A su vez, esta eliminación de sólidos también reduce la demanda de oxígeno de las aguas residuales; una vez que los sólidos eliminados estabilizan anaeróbicamente gracias a reacciones químicas y microbiológicas hasta que la cámara se llene, entonces es posible vaciarla por gravedad mediante válvulas ubicadas en el fondo de los tanques (Mikelonis, 2010). El inconveniente de las tecnologías es que a menudo se presentan ineficiencias con fracciones de nitrógeno y fósforo totales presentes en el efluente tratado (Yamashita, 2014).

### ***2.1.3.2 Tratamiento secundario***

Los sistemas de remediación de aguas residuales con algas han evolucionado desde la década de 1950 y se continúan usando en la actualidad debido a la significativa reducción del costo del servicio público y la huella de carbono (Ansa et al., 2015), siendo, además más amigable con el ambiente frente a las plantas convencionales con lodos, que poseen un impacto de 2 a 5 veces mayor (Garfí et al., 2017). Entonces, la ficorremediación ofrece una alternativa prometedora en el tratamiento de aguas residuales debido a su alta tasa de crecimiento en este medio adverso, en donde puede asimilar nutrientes orgánicos e inorgánicos (Martínez et al., 2017) y, al mismo tiempo, generar biomasa de alto potencial (Mohsenpour & Gutiérrez, 2021) como coproducto que puede generar ingresos orientados hacia el aporte de la economía circular de los flujos de residuos (Catone, & Ulgiati, 2021).

## **2.2 Calidad del agua**

Está determinada por las cualidades fisicoquímicas y biológicas naturales o tras actividades antrópicas (Baeza, 2016), (Bhateria & Jain, 2016). De acuerdo con Hassan (2020), esta se clasifica en cuatro tipos:

- **Agua potable:** es segura para beber, posee sabor agradable y es comúnmente usada con fines domésticos.

- **Agua apetecible:** Es estéticamente agradable y presenta productos químicos que no significan una amenaza para la salud humana.
- **Agua contaminada:** Posee sustancias físicas, químicas, biológicas y/o radioactivas que imposibilitan su uso doméstico y no son seguras para beber.
- **Agua infectada:** Presenta organismos patógenos que imposibilitan su uso por representar un riesgo para la salud.

### 2.2.1 Parámetros

Están clasificados en físicos, químicos y biológicos, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 1.

Parámetros de la calidad de agua

Parámetros para medir la calidad de agua			
No.	Físicos	Químicos	Biológicos
1	Turbidez	pH	Bacterias
2	Temperatura	Acidez	Algas
3	Color	Alcalinidad	Virus
4	Sabor y olor	Cloro	Protozoarios
5	Sólidos	Cloro residual	
6	Conductividad eléctrica	Sulfatos	
7		Nitrógeno	
8		Dureza	
9		Oxígeno disuelto	
10		Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO)	
11		Demanda Química de Oxígeno (DQO)	
12		Sustancias inorgánicas tóxicas	
13		Sustancias orgánicas tóxicas	
14		Sustancias radioactivas	

Fuente: (Hassan, 2020)

Los más utilizados se describen a continuación:

### **2.2.1.1 Potencial de hidrógeno (pH)**

Se define como el logaritmo negativo de la concentración de hidronios (ecuación 1), siendo el resultado un número adimensional que muestra la acidez o basicidad de una solución o del agua (Campanella et al., 2016); si es ácida, presentará iones de hidrógeno ( $H^+$ ) extra, mientras que, si es básica, contendrá iones de hidroxilo extra ( $OH^-$ ) (Spellman, 2017).

Ecuación 1. Fórmula para calcular el pH de una solución

$$pH = -\log[H^+]$$

Fuente: (Helmenstine, 2021)

El pH tiene una escala que varía entre 0 y 14, donde 7 es el punto medio o neutro en donde se encuentra el agua pura a 25 °C. Valores inferiores a 7 muestran acidez, mientras que los superiores indican basicidad (Roberts et al., 2007). El agua potable destinada a usos domésticos y para salvaguardar a los organismos vivos, se encuentra en un intervalo entre 6,5 y 8,5 (World Health Organization, 2011).

### **2.2.1.2 Conductividad eléctrica**

Es uno de los parámetros por excelencia para determinar la viabilidad de agua de riego, ya que se puede medir la corriente eléctrica de iones conductores por la presencia de materia inorgánica como cloruros, carbonatos, sulfuros y sales disueltas (Genau & Selektiv, 2019), (el agua pura no es buena conductora eléctrica). Su unidad en el Sistema Internacional es el miliSiemens/m (mS/m) (Pacheco & Landa de Saá, 2016).

### **2.2.1.3 Demanda Bioquímica de Oxígeno**

La presencia de microorganismos en los cuerpos de agua permite la degradación de la materia orgánica y consumo de oxígeno disuelto, que, si no es reemplazado de forma continua, natural o artificialmente, pondrá en riesgo toda la vida alrededor (Lorenzo et al., 2018). Y es precisamente a esto a lo que se denomina: demanda bioquímica de oxígeno (DBO), presentando una relación proporcional: a mayor presencia de materia orgánica en el agua, mayor DBO usada



por microbios existirá; siendo este el caso de las aguas residuales fuertes, mientras que las débiles, presentarán una baja DBO. (Kiel et al., 2011).

Cabe mencionar que una descomposición completa de la materia orgánica ocurre usualmente en el día 20 en circunstancias normales, presentándose entonces la DBO final, que consiste en una cantidad de oxígeno utilizado en un volumen específico de agua para degradar todas las sustancias orgánicas (Lorenzo et al., 2018).

#### **2.2.1.4 Demanda Química de Oxígeno**

Este parámetro es el encargado de medir el número de compuestos orgánicos, tanto los biodegradables como los que no lo son, mediante oxidantes químicos fuertes tales como: dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y elevadas temperaturas (Hassan, 2020). En contraste con el análisis de DBO, que tradicionalmente requiere de mínimo 5 días, el de DQO posee un diseño en el que se obtiene resultados en horas (Hu & d Grasso, 2005).

#### **2.2.1.5 Nitratos, Fosfatos y Amoníaco**

La presencia de contaminantes en los cuerpos de agua, se atribuyen principalmente a actividades antrópicas, que han sido la principal causa de deterioro progresivo de este recurso natural (Díaz & Granada, 2018). Entre los compuestos prevalentes, destacan: nitratos, fosfatos y amoníaco, procedentes en mayor medida de fertilizantes y químicos de uso tanto agrícola como doméstico, siendo este el caso del nitrato de amonio ( $NH_4NO_3$ ) (Grizzetti et al., 2011), (Rao, 2014).

Los nitratos son el resultado de la descomposición de compuestos nitrogenados tales como úrea y proteínas, además de encontrarse naturalmente en algunos suelos (Keeton, 2011). Mientras que el fósforo interviene de manera indispensable en la formación y/o composición de biomoléculas como ADN, ARN y fosfolípidos; además de procesos como la fotosíntesis, transferencia de información, rutas metabólicas y generación/ almacenamiento de energía (Q. Wu et al., 2021)

#### **2.2.1.6 Indicadores biológicos**

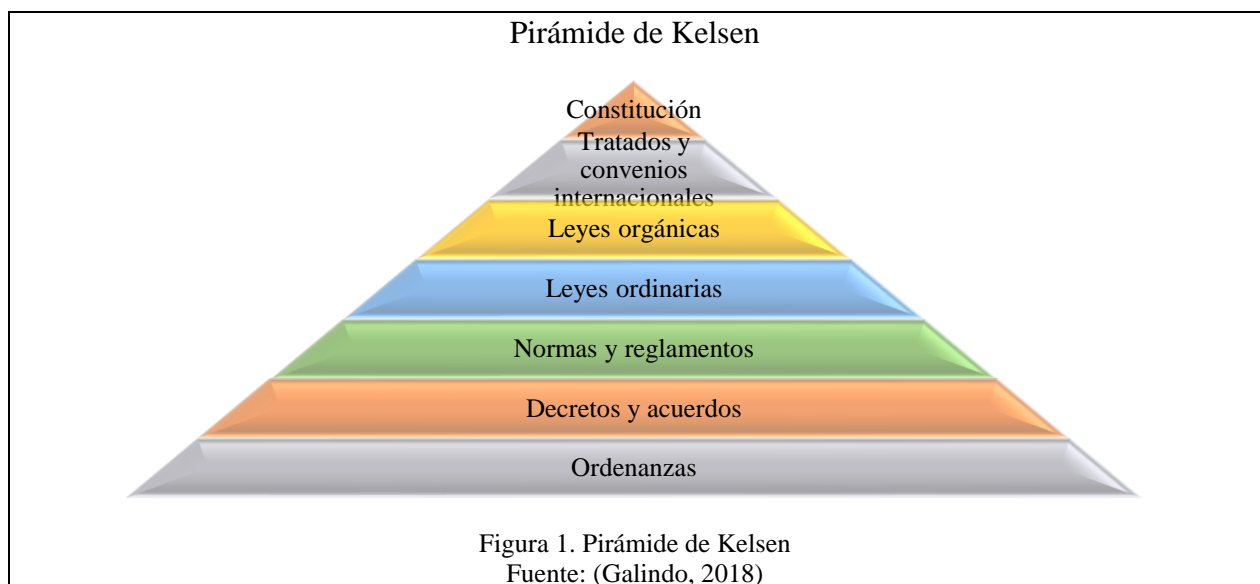
Se basa en la presencia o ausencia de organismos vivos y son de las herramientas más útiles para determinar la calidad del agua, puesto que en esta puede existir una gran diversidad, que

mientras más equilibrada esté, más saludable se considerará el sistema (Authman, 2015). Existen microorganismos con capacidad de desarrollarse en ambientes adversos, como contaminantes específicos, lo que los convierte en indicadores de estos (F. Ramírez et al., 2015). Así mismo, los presentes en el cuerpo humano, sobre todo los de la flora intestinal, aunque resultan en su mayoría inofensivos, también pueden poner en riesgo la vida de otros seres al contaminar las aguas con patógenos (Gorski et al., 2019). Un ejemplo de primera mano son los adenovirus provenientes de humanos, que se utilizan como indicadores de contaminación fecal debido a que son altamente resistentes a rayos UV y son detectables a lo largo del año, a diferencia de enterovirus y norovirus, que solamente se registran durante algunos períodos (Rames et al., 2016).

Por otro lado, las bacterias indicadoras fecales (BIF) son usadas para la detección de contaminación fecal en muestras de agua y consta de: coliformes totales, coliformes fecales, *E. coli* y *Streptococcus faecalis*. En 2018, varios brotes relacionados a agua contaminada se presentaron, incrementando la importancia de los análisis de calidad de agua mediante determinación de aerobios totales (Truitt et al., 2018); caracterizados por crecer entre 20 a 45 °C en presencia de oxígeno, donde un recuento elevado y por sobre los límites permitidos de acuerdo con la legislación de cada región, significa un peligro inminente para la vida humana y animal (Wen et al., 2020).

### 2.3 Marco Legal

A continuación, se presenta un resumen con la legislación respecto a aguas residuales en orden jerárquico de acuerdo con la Pirámide de Kelsen (figura 1)



En el Artículo 264 numeral 4 de la **Constitución del Ecuador** (2008, p. 86) establece que entre las responsabilidades de los gobiernos municipales se encuentra la depuración de aguas residuales. **La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO)** y la **Organización Mundial de la Salud (OMS)** han instituido estándares para la calidad de agua potable y de riego, siendo la primera organización la más estricta entre ambas (Abascal et al., 2022).  
Tabla 2.

Estándares de agua potable y de riego

Parámetro	OMS	FAO
Nitratos (mg/L)	50	22
Calcio (mg/L)	300	
Magnesio (mg/L)	300	
Sodio (mg/L)	200	69
Potasio (mg/L)	12	
Sulfatos (mg/L)	250	
Cloro (mg/L)	200	107
Bicarbonatos (mg/L)		91.5
Fluoruros (mg/L)	1.5	
Conductividad (uS/cm)	2500	
pH	6.5	
Sólidos totales disueltos (mg/L)	600	450

Fuentes: (Misstear et al., 2017; World Health Organization, 2011)

En la misma línea de lo ya planteado en la Constitución del Ecuador, el artículo 18, literal “1” de la **Ley Orgánica de Recursos Hídricos, Usos y Aprovechamiento del Agua**, menciona que entre las competencias y atribuciones de la Autoridad Única del Agua, se encuentra el establecimiento de mecanismos de control y complementariedad con los Gobiernos autónomos en miras de cubrir con servicios públicos entre los que se encuentra la depuración de aguas residuales (Asamblea Nacional del Ecuador, 2015, p. 4). Así como en la Sección IV SERVICIOS PÚBLICOS, Art. 38 en el que se prohíbe la autorización del uso o aprovechamiento de las aguas residuales cuando se incumpla la normativa vigente (Asamblea Nacional del Ecuador, 2015, p. 8).

En cuanto a la Sección II: OBJETIVOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN DEL AGUA, en el artículo 80 define a los vertidos como las descargas no

tratadas, en dominios hídricos públicos, haciendo hincapié en la prohibición de estos actos (Asamblea Nacional del Ecuador, 2015, p. 13).

Las tasas y otros cargos por vertidos serán fijadas por las diferentes municipalidades, así como la administración competente de estas, en miras de la protección ambiental; así lo indica el artículo 38 de la **Ley de Gestión Ambiental** (Congreso Nacional, 2004, p. 7).

La **Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua** (2011) en sus primeros capítulos pone en conocimiento del lector las definiciones clave referente a cuerpos de agua y contaminantes de estas, así como los diferentes criterios de calidad y límites permisibles. De estos, se destaca la siguiente tabla con una adaptación pertinente al caso:

Tabla 3.

Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Coliformes totales	NMP	NMP/100 ml	Remoción > al 99,9 %
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO <sub>5</sub>	mg/l	50,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/l	100,0
Fósforo Total	P	mg/l	10,0
Nitrógeno amoniacal	NH <sub>3</sub>	mg/l	10,0
Potencial de hidrógeno	pH		5-9
Nitratos	N	mg/l	10

Fuente: (TULMAS, 2011, pp. 45–47)

## 2.4 Generalidades de las microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares de alrededor de 8105 especies (Voznesenskiy et al., 2018), donde más del 50 % son marinas y alrededor del 40 % habitan en agua dulce (de Luca et al., 2019), aunque también existen en hábitats terrestres y subaéreas que incluyen el suelo y corteza (Metsoviti et al., 2019); con tamaños que van de pocos a cientos de micrómetros (Venkatesan et al., 2015). El 99 % de las especies aisladas pertenecen a *Chlorophyceae*, *Bacillariophyceae*, *Chrysohyceae*, *Euglenophyceae*, entre otros; y se presume que faltan muchas por añadir a las bases de datos (Ghosh et al., 2016).

La evolución de estos organismos les ha permitido adaptarse fácilmente a una gran variedad de entornos y gracias a esto, desarrollar una diversidad genética colosal (Hildebrand et al., 2013) que ha dado paso a la explotación de compuestos bioactivos tales como ácidos grasos, carotenoides, pectinas, aminoácidos semejantes a micosporinas, ficobilinas, entre otros (Leu & Boussiba, 2014). Aunque un limitado número de microalgas puede desarrollarse de forma heterótrofa y sin luz, semejante a las bacterias, la mayoría son fotosintéticas obligatoriamente (Su, 2021).

## **2.4.1 Clasificación**

De acuerdo con la abundancia en la naturaleza (Venkatesan et al., 2015), se destacan las siguientes clases:

### **2.4.1.1 Procariotas**

#### **2.4.1.1.1 Cyanophyceae**

Las cianobacterias son procariotas fotosintéticas que se encuentran en la mayoría, pero no en todos, los tipos de entornos iluminados; en términos de cantidad, también se encuentran entre los organismos más importantes de la Tierra (Whitton, 2012). La mayoría produce el pigmento ficobilina, ficocianina, que en concentraciones suficientemente altas deja las células de un color azulado y es responsable del nombre popular de algas verdeazuladas. En ocasiones también se forma un tinte rojo, la ficoeritrina. Sin embargo, existen algunos géneros, que, aunque no tienen un color característico, sí producen otros pigmentos accesorios peculiares (S. Zhang & Bryant, 2011).

Su importancia radica en su utilidad como alimento para consumo humano debido a que son una excelente fuente de proteínas y vitaminas, teniendo también compuestos bioactivos con actividad farmacológica (Uzair, 2012). Una representante por excelencia es la *Spirulina sp.*

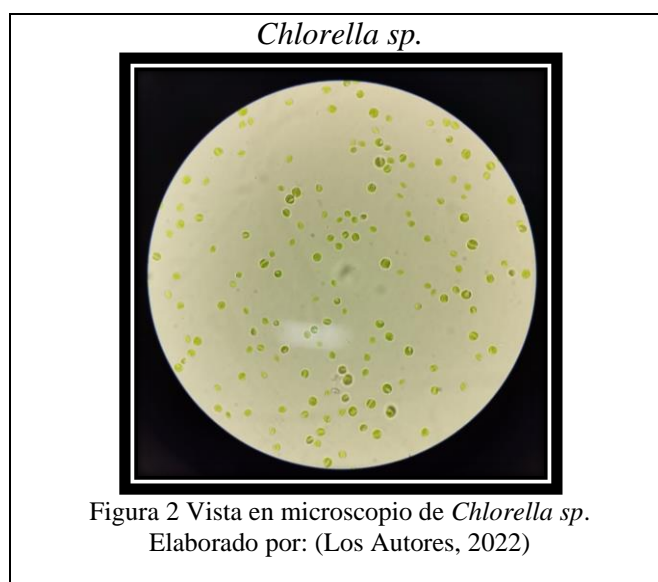
### **2.4.1.2 Eucariotas**

#### **2.4.1.2.1 Chlorophyceae**

Esta clase se caracteriza por su un color verdoso presente en suelos desérticos como por formar parte de comunidades microbióticas que incluyen cianobacterias y otros procariotas tales como líquenes y hongos liquenizados, así como eucariotas fotosintéticos tales como diatomeas, xantófitos y eustigmatofitos (Dorr, 2014). Su morfología es simple, en paquetes celulares o débiles filamentos, pero con diversos taxones que se define con cada muestreo genético y de taxones

(Fučíková et al., 2019). Dentro de esta clase se encuentran dos clados principales: SV (compuesto por *Sphaeropleales* y *Volvocales*) y OCC (compuesto por *Oedogoniales*, *Chaetophorales* y *Chaetopeltidales*) (Tippery et al., 2012). Un ejemplo sorprendente es *Haematococcus pluvialis* que se caracteriza por su capacidad de enquistarse y sobrevivir a condiciones extremas de radiación, concentración salina y temperatura, además de ser una fuente rica en astaxantina (Niizawa et al., 2021). Mientras que otro género destacable por su recurrente uso en estudios, incluyendo el presente, es *Chlorella*.

### **Características de *Chlorella sp.***



Las especies pertenecientes al género de *Chlorella* son morfológicamente similares, pero una manera de diferenciarlas es en su genética, su ciclo reproductivo es netamente asexual mediante autoesporas (El-Sheekh, 2020). Tiene un tamaño inferior a 2 mm de diámetro, de aspecto redondeado y con una invaginación que la caracteriza (Kelaiya & Chauhan, 2018). Uno de los factores más importantes para su crecimiento es la luz blanca debido a que son microalgas fototróficas (Delavari & Khoobkar, 2021).

El uso de *Chlorella sp.* ha sido muy amplia en los campos de producción de sustancias bioactivas como proteínas, pigmentos, sustancias farmacológicas y biocombustible gracias a su capacidad de conservación de radiación solar en forma de energía, crecimiento que roza características exponenciales y su alta acumulación de lípidos en su biomasa (Xu et al., 2021).

Además de ser rica en minerales y vitaminas, mejora el bienestar, la salud en general y por sus efectos anticancerígenos, mejora el desarrollo infantil y el sistema inmunológico (Park, 2019).

#### **2.4.1.2.2 Bacillariophyceae**

Llamadas también Diatomeas, constituyen un conjunto de algas unicelulares de alrededor de 20000 especies que ocupan la base de la cadena alimenticia en calidad de productores (fitoplancton) (Falasco et al., 2009). Su característica pared celular de dióxido de silicio hidratado o sílice opalino varía en formas que, se presume, se remontan al período Jurásico y, que, en la actualidad son utilizadas como indicadores de la calidad de agua en diferentes investigaciones sobre el cambio climático (Prasetiya et al., 2019).

#### **2.4.2 Metabolismo**

Para comprender el metabolismo de las microalgas, es primordial partir del proceso de la fotosíntesis, y con este, la absorción de Carbono, Nitrógeno y Fósforo. Existen dos fases que componen la fotosíntesis: en la primera se presentan las reacciones dependientes de luz, donde se transportan las diversas moléculas mediante almacenamiento lumínico; la segunda fase es independiente de luz y es en donde ocurre la asimilación del Carbono (Vuppaladiyam et al., 2018).

Las reacciones lumínicas se desarrollan en los cloroplastos, específicamente en las membranas tilacoides, donde se encuentran cinco complejos: antenas que captan luz, PS II, citocromo b6/f, PS I y ATP sintasa (Ranglová et al., 2019), en donde, en síntesis, los electrones se mueven en el agua hacia NADP<sup>+</sup> gracias a la energía lumínica absorbida por los pigmentos. Posteriormente, 4 H<sup>+</sup> resultan de la hidrólisis y su transporte hacia las membranas tilacoides generan ATP (Su, 2021). En otras palabras, el objetivo es generar energía potencial a partir de energía lumínica. Puesto que en la naturaleza las microalgas se exponen a períodos de luz y oscuridad, estas han desarrollado ciclos circadianos con el fin de equilibrar sus actividades fisiológicas y metabólicas, siendo la luz la señal promotora de este proceso (Niwa et al., 2013). La síntesis de ADN y ARN ocurren bajo estímulos lumínicos, mientras que, durante la noche, se produce la división celular (Winter, 2015).

Por el contrario, en un ambiente de laboratorio, donde las variables son controladas, se ha demostrado que la exposición a luz continua evita la pérdida de biomasa algal que varía entre 1 a 22 % en períodos de oscuridad mediante la respiración oscura en el ciclo luminoso (Edmundson & Huesemann, 2015).

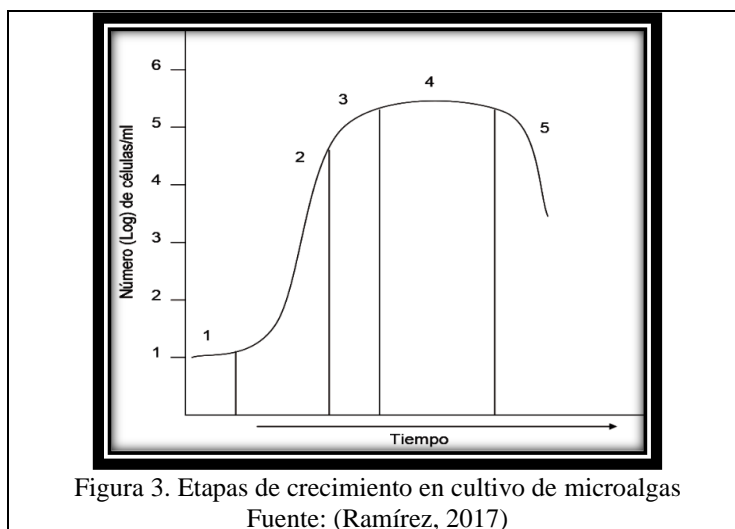
Debido a la vasta diversidad filogenética que presentan las microalgas, los metabolitos producidos por estas resultan igual de útiles y variados, por lo que los investigadores se han visto en la necesidad de desarrollar la denominada ingeniería metabólica, que consiste en la aplicación de herramientas de transformación genómica específicas para cada especie de interés (Gimpel et al., 2015). Un ejemplo de primera mano se encuentra en la producción de biocombustibles, en donde el enfoque de investigación es incrementar la liberación o producción de lípidos, hidrocarburos y/o alcoholes con el objetivo de lograr rendimientos más altos y competir económicamente con los combustibles fósiles (Varela et al., 2020).

Por otra parte, es menester tener presente la curva típica de crecimiento de microalgas, en donde se tiene las siguientes fases de acuerdo con Se-Kwon (2015):

- **Fase de inducción:** es un período de adaptación fisiológica por parte de las algas, en donde puede existir un retraso en el crecimiento celular debido al ambiente nuevo.
- **Fase exponencial:** en esta etapa existe un crecimiento en función a una ley de tasa exponencial de primer orden simple.
- **Fase de crecimiento decreciente:** en este punto, la tasa de división celular se reduce debido a algún factor limitante como pH, luz, nutrientes, etc.
- **Fase estacionaria:** aquí tanto la tasa de crecimiento como el factor limitante encuentran un equilibrio, presentando una densidad celular constante.
- **Fase de muerte:** en esta última etapa, las condiciones del cultivo desfavorecen el crecimiento sostenible y la densidad celular empieza a decrecer en gran medida.

Crecimiento en cultivo de microalgas
--------------------------------------





### 2.4.2.1 Requerimientos desarrollo

Al igual que muchas otras especies, las microalgas dependen de diversos factores fisicoquímicos para su crecimiento, entre estos destacan: la intensidad de luz, temperatura, salinidad, concentración de nutrientes y pH (Metsoviti et al., 2019).

La absorción de luz específica de cada especie, determinará el crecimiento de estas; siendo las células de área grande las de mayor absorción y, por ende, las que presenten mayor tasa fotosintética (Janssen, 2016). Baidya et al., (2021) investigó el efecto que tienen diferentes tipos de longitud de onda en el crecimiento y concentración de pigmentos de *Chlorella ellipsoidea*, en donde LED blancas (380-750 nm), verdes (510 nm), azules (475 nm); y rojas (650 nm) fueron puestas a prueba; obteniéndose un incremento de la producción de lípidos y proteínas, además de un tamaño y área superiores en el espectro de LED azul. Lo que sugiere que la mejor condición para la producción de biomasa se encuentra en una longitud de alrededor de 475 nm.

Otra variable de suma importancia en el crecimiento de las microalgas es la temperatura, en donde es imprescindible tener en cuenta que cada cepa posee un rango específico en el que alcanzará su máxima eficiencia fotosintética (Béchet et al., 2013), llegando a tolerar niveles entre los 15 y 40 °C, sin embargo, la mayoría presenta un mejor crecimiento alrededor de los 30 °C (Ranglová et al., 2019). Temperaturas por encima o por debajo de los requerimientos de la especie con la que se esté trabajando, provocarán la caída del crecimiento de estas debido al descenso de las actividades fotosintéticas (Benavides et al., 2017).

Por otra parte, la salinidad es también un requerimiento variable de acuerdo con la cepa de interés, misma que se ve modificada en su concentración por la evaporación, lluvias y precipitación. Existen tres formas en que las microalgas se ven afectadas por los cambios de concentración salina: estrés iónico, cambio en la proporción iónica por permeabilidad de membrana y estrés osmótico (Kumar, 2015). A pesar de lo anteriormente mencionado, cabe recalcar que existen especies con mecanismos adaptativos frente a los cambios de concentración salina y un ejemplo relevante es *Tetraselmis sp.* que posee una eficiente bomba de Na<sup>+</sup> que le permite cambiar rápida y gradualmente la salinidad en un rango de 5,5 a 12 % p/v, NaCl (Mata et al., 2010).

Para la producción de cualquier especie de microalga es importante que se cuente con una diversidad amplia de nutrientes tales como: vitaminas, urea, nitrógeno, hierro, selenio, níquel, cobalto, manganeso, nitrato, amonio y fósforo. Siendo estos últimos tres, imprescindibles (López et al., 2015). La mayoría depende del llamado “Mecanismo de Concentración del Carbono” (CCM), que sirve para concentrar el CO<sub>2</sub> mediante la ruta de fijación de este (J. Liu et al., 2017).

Se ha demostrado, además, que el pH es un factor químico clave en el desarrollo, puesto que determina la disponibilidad de las fuentes de carbono inorgánico, los nutrientes y afecta el proceso de fotosíntesis (Jin et al., 2016). Aunque el rango óptimo varía entre especies, se ha evidenciado que los medios de crecimiento inician a pH neutro cuando se inocula e incrementa con el paso del tiempo debido al consumo de carbono inorgánico, que empieza a transformarse en bicarbonato, reduciendo el CO<sub>2</sub> libre disponible (Hanson et al., 2014); en contraparte, un extremo básico dificulta la biodisponibilidad de dióxido de carbono e imposibilita el crecimiento de las microalgas (Qiu et al., 2017). En otra instancia, Rai et al., (2015) demostró que un pH de 6 resulta más beneficioso si se pretende obtener una acumulación de lípidos a gran escala, mientras que un pH de 8 es más rentable en demanda de CO<sub>2</sub> para el cultivo, pero presenta un menor porcentaje de proteínas.

Los parámetros anteriormente mencionados pueden ser regulados a escala de laboratorio con el objetivo de mejorar el rendimiento de la cepa de interés (Mathimani et al., 2018).

### **2.4.3 Aislamiento y Cultivo**

En la naturaleza, las microalgas suelen adaptarse a las condiciones en las que se encuentren y gracias a esta característica, los científicos han desarrollado diversas técnicas para la mejora de

la calidad de estas y sus productos (Liu et al., 2017). El aislamiento consiste en la búsqueda en fuentes acuáticas tales como: dulce, marina y salobre, pero existen casos en que también se pueden encontrar en lagos de aguas termales, drenaje ácido de minas y lagos de hielo. Se ha presentado, además, evidencia del crecimiento de algunas cepas de microalgas en tierra, campos de radiación ionizante y salmuera (Ma et al., 2010); (García et al., 2013); (Middleton et al., 2014).

La recolección de las muestras requiere equipos de protección tales como: guantes, anteojos y máscara; así como recipientes asépticos, medidor de pH y GPS para fijar los datos precisos y consistentes (Bosch & Bingham, 2019). La identificación de las diferentes cepas, tradicionalmente se realiza de forma morfológica mediante microscopía electrónica, aunque complementar esto con diluciones seriadas, subcultivos, placas y procedimientos antibacterianos y antifúngicos, son esenciales para eliminar microorganismos no deseados (Pringsheim, 2016).

Comúnmente el cultivo de microalgas se realiza en condiciones ambientales interiores o controladas y con presencia de luz natural directa o blanca externa (Devaraja et al., 2017), siendo las luces LED una fuente con longitud de onda específica adecuada para el cultivo masivo en interiores, debido a que puede convertir de manera eficiente energía eléctrica en lumínica (Pattanaik et al., 2018). La contraparte de este requerimiento radica en los elevados costos de la luz artificial para la producción de biomasa, siendo aproximadamente 0,12 \$ kWh<sup>-1</sup>/ 1 kg en peso seco; por lo que una alternativa viable, aunque menos controlada, es el uso de luz natural (Blanken et al., 2013).

El cultivo es costoso debido a su alta demanda de nutrientes (nitrógeno, fosfato, oligoelementos y fuentes de carbono), pero esto puede ser reducido usando aguas residuales municipales (Han et al., 2019). Precisamente una de las ventajas de la biomasa producida por algas versus las plantas se debe a que las algas ofrecen un rendimiento mayor en tierras no cultivables, así como en la recuperación de nutrientes en aguas residuales y un desarrollo mayor en cepas domesticadas (Benedetti, 2018). Además de que las microalgas pueden exceder de 10 a 50 veces la fotosíntesis en comparación de las plantas terrestres (Gao et al., 2018).

#### 2.4.3.1 *Cultivo abierto*

El cultivo en lagos y estanques ha sido utilizado desde 1950, convirtiéndose en un método tradicional, pero que ha presentado varios problemas como perturbación ambiental y contaminación (Venkatesan et al., 2015).

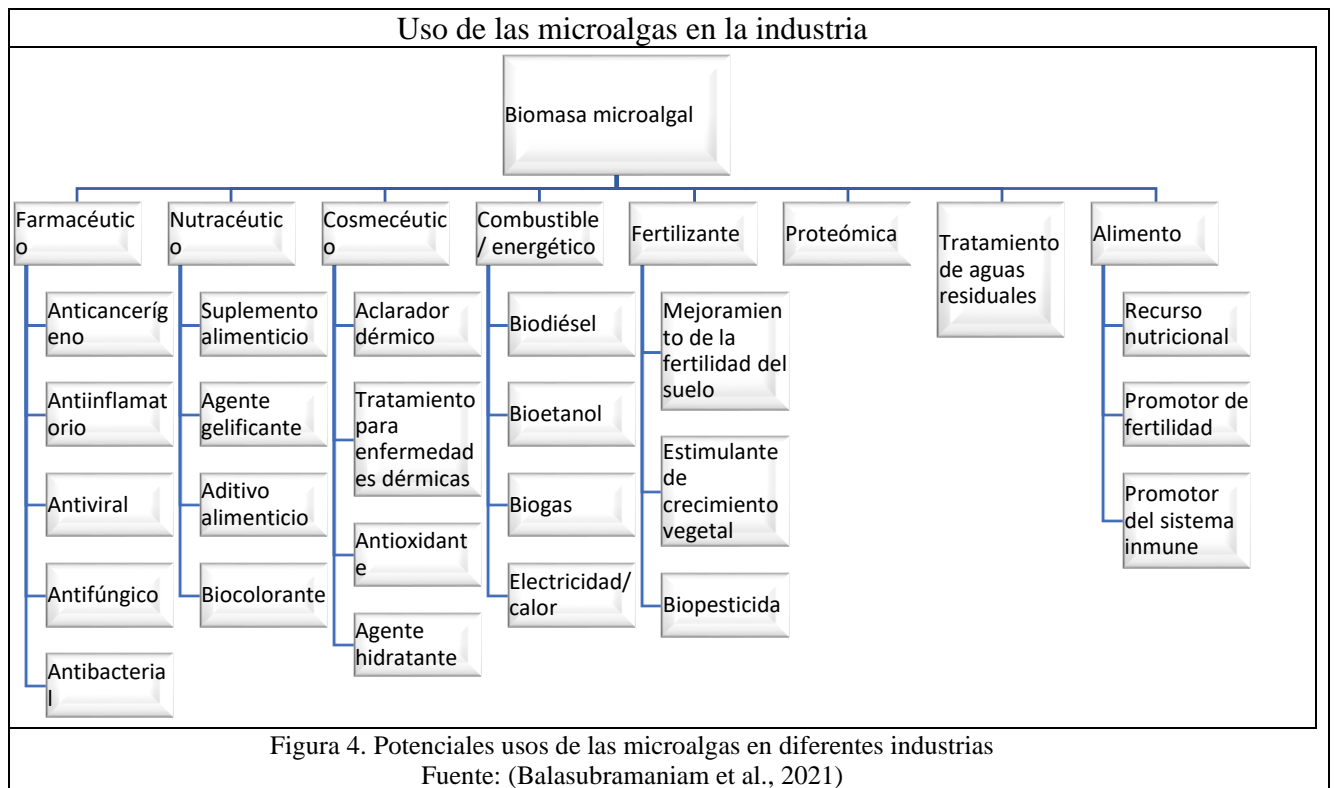
#### 2.4.3.2 *Cultivo en fotobiorreactores*

Caracterizado por presentar más ventajas que su predecesor, existiendo tres mecanismos diferentes para llevarlo a cabo (Vuppaladadiyam et al., 2018), (Ghosh et al., 2016):

- **Autotrófico:** donde la energía obtenida a partir de la luz solar ayuda a convertir materiales inorgánicos en orgánicos.
- **Heterotrófico:** utiliza fuentes de carbono de otros organismos, ya que es incapaz de sintetizar los propios compuestos orgánicos a partir de fuentes inorgánicas.
- **Mixotrófica:** incluye las dos formas anteriores, en donde asimila fuentes de carbono orgánico de otros organismos además de compuestos inorgánicos en presencia lumínica. Siendo este último el que mejores resultados en producción lipídica ha tenido.

#### 2.4.4 Usos

La búsqueda exhaustiva de cepas de microalgas fotosintéticas con importancia comercial en las últimas décadas identificó tres géneros importantes: *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Nannochloropsis* (Yun et al., 2019). El potencial que poseen estos microorganismos en el área biotecnológica es inmenso ya que su producción, así como sus metabolitos, es muy alta (Roselet et al., 2019). La biomasa obtenida de procesos biotecnológicos posee un elevado potencial industrial (figura 4), ya que puede ser recuperada y convertida en varios productos de interés económico destinados tanto a la salud como la alimentación humana y animal, biocombustibles de alta productividad e indefenso para el medio ambiente, entre otros (Katiyar et al., 2017); (Molazadeh, 2019); (Jehlík et al., 2019).



Las microalgas tienen el potencial de satisfacer varias demandas globales, pero es necesaria una disminución de los costos de producción actuales para lograr llenar la brecha entre la productividad teórica e industrial (Benedetti, 2018). A pesar de todos los esfuerzos en investigación todavía no se ha logrado una viabilidad económica completamente estable para aplicaciones comerciales (Shaikh et al., 2021).

#### 2.4.4.1 Alimentos

El interés alimenticio de las microalgas radica en sus compuestos bioactivos, que participan directamente en la mejora de la calidad de nutrición en animales y humanos (Asadi et al., 2019), así como también tomando un papel prometedor en el crecimiento económico; un ejemplo de estos son las ficocianinas, que se encuentran en las algas verdiazules con alrededor de \$ 250 millones en el mercado global (Ashaolu et al., 2021). La implementación de estas en la dieta ha demostrado ser efectiva en el tratamiento complementario de trastornos metabólicos como Alzheimer, diabetes tipo 2 y obesidad; gracias a su alto contenido de carotenoides y polifenoles, encontrados en concreto en *P. purpureum* y *N. oculata* (Vieira, 2021).

En su composición, *Chlorella* posee una concentración de 60-75 % de proteínas, 10-20 % de grasas, minerales y vitaminas un 15 % y antioxidantes 1 % (Jehlík et al., 2019). Las especies destinadas como suplementos alimenticios son *Biddulphia sp.*, *Nitzschia sp.* y *Navicula uncerta*; en concreto para pacientes con diabetes, estudiados durante la pandemia de COVID-19 (Mohamed & Ainane, 2021). Por otra parte, y en este mismo contexto, se ha encontrado que las algas pardas *Phaeophyceae*, al ser ricas en fucooidanos, poseen propiedades inmunomoduladores, antiinflamatorias, antidiabéticas y anticancerígenas; que prometen grandes resultados para las personas con secuelas inflamatorias sistémicas (Asanka & Herath, 2021).

#### **2.4.4.2 Cosméticos**

El término “talasoterapia” nace de la implementación de elementos marinos en formulaciones cosméticas y cosmeceúticas que tienen la capacidad de alcanzar beneficios como mejorar la estructura, apariencia y morfología de la piel (Mourelle & Gómez, 2017). Esto debido a la capacidad de almacenamiento de compuestos químicos o también llamados sustancias bioactivas, entre los que destacan los antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, entre otros (Zamani, 2021); por lo que el medio marino y en este, las microalgas, poseen un elevado potencial para la industria cosmética (Kijjoa & Sawangwong, 2004).

Entre los ingredientes funcionales identificados a partir de algas marinas, los pigmentos naturales han recibido especial atención, mismos que se clasifican en clorofilas (azul violeta y rojo anaranjado), carotenoides y ficobiliproteínas (Pangestuti & Kim, 2011). En el caso de los carotenoides, se han reportado alrededor de 600 tipos en la naturaleza y muy pocos se aplican comercialmente debido a la falta de investigación (Stoyneva-Gärtner, 2020); aunque de aquellos más estudiados, se tiene la certeza de que su elevada capacidad antioxidante y de protección solar, previene la muerte celular de la piel (Kusmita et al., 2021).

#### **2.4.4.3 Agropecuaria**

Las microalgas son usadas en la acuicultura como fuente de alimento para camarones y pepinos de mar, además de la presencia de pigmentos en su composición como la cantaxantina, zeaxantina, astaxantina y clorofila por su acción antioxidante (Kandasamy & Shaleh, 2017). En particular, *Chlorella vulgaris* ha demostrado ser un excelente reemplazo de la harina de pescado que se utiliza comúnmente en la alimentación de camarones, esto debido a la presencia de ácidos

grasos poliinsaturados de cadena larga que incrementan de manera significativa la tasa de supervivencia de estos animales (Pakravan et al., 2018).

Por otro lado, la sustitución parcial de alimentos tradicionales para ganado lechero, como harina de colza y habas por *Spirulina platensis* ha demostrado una mejora en la producción de leche debido a su elevada composición nutricional de metionina (como alimento proteico) (Lamminen et al., 2019).

#### **2.4.4.4 Biocombustibles**

La materia prima para elaborar biocombustibles por excelencia son las microalgas debido a su alta tasa de crecimiento, elevado rendimiento energético (independientemente de las condiciones climáticas), bajo impacto ambiental y no necesita tierras de cultivo, por lo que no representan una competencia con la producción de alimentos como el maíz (Xue et al., 2016), (Ríos, 2015). La biomasa microalgal posee baja viscosidad, baja densidad y un alto valor calórico (Kumar et al., 2018), su composición en carbono es de 30 a 60 %, en lípidos es de 20 a 40 % para elaborar bioetanol y biodiesel respectivamente, y la cantidad de CO<sub>2</sub> que capta para generar 1 kg de biomasa es de 1,83 kg (Khan et al., 2018).

Estos lípidos poseen concentraciones elevadas de ácidos grasos monoinsaturados y saturados, además de que la cantidad de ácido linoleico están dentro de las normas de biodiesel americanas y europeas (Arguelles & Goss, 2021). La transesterificación, donde los triglicéridos son unidos por la acción del alcohol y presencia de catalizadores alcalinos o ácidos dan como resultado un éster metílico de ácidos grasos (Kim et al., 2019), originando un biocombustible viable para que la dependencia al combustible fósil se reduzca; tomando en cuenta que las microalgas usadas para su elaboración tienen una rápida reproducción, aprovechamiento de nutrientes presentes en las aguas residuales, capacidad de captar CO<sub>2</sub> (Amit & Chandra, 2017) y en comparación el biocombustible es biodegradable, no es tóxico para el ambiente, generan bajas emisiones de azufre y liberan oxígeno (10 a 45 %) (S. Gupta et al., 2019).

#### **2.4.4.5 Tratamiento de aguas residuales**

La elevada presencia de nitrógeno (N) y fósforo (P) en las aguas residuales urbanas es la principal causa de la eutrofización y posterior desequilibrio en los cuerpos de agua. La remoción

de estos contaminantes suele ser costosa y es entonces donde la fitorremediación se presenta como un método respetuoso con el ambiente y con capacidad de producir biomasa (Amenorfenyo et al., 2019); ya que, el uso de microalgas, al basarse en la naturaleza misma, no genera residuos de alto riesgo ambiental (Rasoul-Amini et al., 2014).

Su uso es secundario biológico en el tratamiento de aguas residuales y comenzó en la década de 1970 (Wu et al., 2021). Actualmente, suele estar acompañado de procedimientos físicos, químicos u otros biológicos. Cuando las microalgas realizan la fotosíntesis, el pH, la temperatura y el oxígeno disuelto aumentan dificultando la proliferación de microorganismos patógenos (Verma, 2020). Los nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^-$ ) son eliminados simultáneamente debido a dos procesos metabólicos: su asimilación para el crecimiento y el almacenaje del restante en la biomasa misma como polifosfatos (Bunce, 2018).

Además, las microalgas son un biosorbente prometedor debido a su alta absorción de contaminantes, bajo costo, alta disponibilidad y capacidad reproductiva (Sümeyye, 2021). Varios estudios demuestran que su uso es muy eficiente para la eliminación de metales y nutrientes en las aguas residuales para que los parámetros requeridos en normas internacionales se cumplan (Omari et al., 2018). Además, las microalgas son un biosorbente prometedor debido a su alta absorción de contaminantes, bajo costo, alta disponibilidad y capacidad reproductiva (Sümeyye, 2021). Varios estudios demuestran que su uso es muy eficiente para la eliminación de metales y nutrientes en las aguas residuales para que los parámetros requeridos en normas internacionales se cumplan (Omari et al., 2018). Además, Las macrófitas pueden ser reemplazadas por microalgas debido a que estas poseen numerosas ventajas que incluyen: una mínima formación de lodos, alta rentabilidad, la capacidad de captar gases de efecto invernadero, baja demanda energética y la generación de biomasa potencialmente útil (Ouaer et al., 2020). Además de que, si su aislamiento procede de aguas residuales industriales, implicaría una adaptación al medio y, por ende, mejores resultados de degradación de contaminantes (Rajivgandhi & Ramachandran, 2022).



### 3 Materiales y métodos

El presente trabajo de titulación plantea un tipo de investigación experimental de acuerdo con las características del ensayo desarrollado, debido a que el manejo y análisis de datos fueron obtenidos de forma empírica bajo variables controladas. El proceso constó de tres etapas bien diferenciadas: etapa preliminar, montaje del experimento y análisis de datos.

#### 3.1 Etapa preliminar

##### 3.1.1 Escalado de cultivo de *Chlorella sp.*

Mediante el uso de microscopio marca “Nikon” se identificó morfológicamente *Chlorella sp.* a partir de una cepa donada por la Universidad Politécnica Salesiana (UPS) Sede Quito, Campus El Girón. La siembra se realizó en el laboratorio de ciencias de la vida de la UPS localizado en la Av. Isabel la Católica Alfredo Mena UPS – Bloque B en las coordenadas 0°12'29.6"sur 78°29'17.0"oeste, la técnica usada fue de estriado en 10 cajas Petri con cultivo sólido de agar 15 g/L y enriquecido con Nitrofoska 5 mL/L; con el fin de determinar su viabilidad.

El cultivo se desarrolló a una temperatura promedio de 16° C, con lámparas de 2000 luxes y temporizador automático con fotoperíodo 12/12. Al cabo de 15 días se observó crecimiento; con lo cual se pudo verificar la morfología colonial mediante uso de microscopio marca “Nikon”, para posteriormente, inocular en cultivo líquido.

En un frasco graduado para laboratorio marca “Boeco Germany” se vertió 1 L de agua destilada con 5 mL de Nitrofoska, que fue esterilizado en un autoclave horizontal marca “Tuttnauer” a 121° C durante 45 minutos junto con 20 tubos de ensayo estándar, que posteriormente fueron almacenados.

A continuación, en una cabina de flujo laminar marca “Esco” se transfirió 10 mL del medio en cada uno de los 20 tubos previamente etiquetados, en los cuales se tomó una colonia de *Chlorella sp.* del cultivo sólido con un asa de siembra estéril y se inoculó en el medio líquido. Por cada caja Petri se inoculó dos tubos. Una vez finalizada la siembra, se selló cada tubo con su respectiva tapa y se reforzó con Parafilm. Las condiciones de crecimiento fueron con fotoperíodo 12/12, intensidad lumínica de 2000 luxes y temperatura promedio de 16° C.

Transcurridos 20 días, se esterilizó dos balones de fondo redondo de 500 mL marca “Glassco”, en los cuales se vertió 10 tubos del cultivo líquido por balón; mismos que reposaron en

una base de 5 cm de tubo PVC fijado con silicona, con un sistema de aireación provista por motores marca “JAD SC-7500”, tapones de algodón y gasa estéril.

### 3.1.2 Conteo manual de *Chlorella sp.*

Para identificar la densidad celular del cultivo líquido previamente preparado se usó el método de conteo manual en cámaras de Neubauer, donde se usó 4 diferentes concentraciones elaboradas en tubos de ensayo de 15 mL, de la siguiente manera:

Tabla 4.

Elaboración de concentraciones

<i>Concentración (%)</i>	<i>Muestra (mL)</i>	<i>Agua destilada (mL)</i>
100	10	0
80	8	2
60	6	4
20	2	8

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, en posición horizontal, de manera que cubrió toda la parte central (retículo superior e inferior). Mediante un gotero, se tomó una muestra de uno de los tubos y se expulsó suavemente el contenido en el borde del cubreobjetos hasta observar una distribución homogénea por capilaridad. El conteo se realizó en microscopio con lente objetivo de 40X, tomando en cuenta solo los cuadrantes esquineros de 1x1 mm. Y se realizó por duplicado, usando ambos retículos.

### 3.1.3 Peso seco *Chlorella sp.*

Por medio de un equipo de filtrado conformado por un matraz Kitasato, un compresor de aire, una manguera de caucho, una pinza metálica de sujeción, un cono de goma, un embudo graduado de vidrio, un filtro esmerilado Büchner y filtros de 5 µm; se separó todo el medio líquido del cultivo de *Chlorella sp.* de las diferentes concentraciones previamente preparadas para el conteo manual.

Como primer punto, se pesó cada uno de los filtros (conforme se fueron usando) con la ayuda de una pinza metálica estéril y una balanza analítica, se procedió a registrar los valores obtenidos y se colocó la membrana entre el filtro esmerilado y el embudo graduado, que fueron asegurados por la pinza de sujeción. Se vertió los 10 mL del tubo de ensayo en el embudo, se encendió el compresor de aire para que creará un vacío y así todo el líquido de la muestra llegara al matraz de Kitasato dejando las células de *Chlorella sp.* en el papel filtro, mismo que se secó en el medidor halógeno de humedad marca “Mettler Toledo” a una temperatura de 160 °C por 3 minutos para ser pesado nuevamente y por medio de una resta con el peso inicial del filtro se obtuvo el peso seco de cada una de las muestras, siguiendo este mismo proceso.

### 3.1.4 Curva de calibración *Chlorella sp.*

Con los datos obtenidos en el punto anterior, se pudo calcular la densidad celular de cada concentración mediante la fórmula:

Ecuación 2. Fórmula de densidad celular

$$DC = N * 10^4 * (F. d)$$

Donde:

DC: densidad celular (x10<sup>4</sup> cél/mL)

N: promedio de células presentes en 1 mm<sup>2</sup> (0.1 µL)

10<sup>4</sup>: factor de conversión de 0.1 µL

F.d.: factor de dilución = (vol. i.+vol. f/ vol. i)

Fuente: (Vega, 2007)

Con la información obtenida, se realizó una curva de relación de cél/mL vs. Peso seco de *Chlorella sp.*, como se observa a continuación:

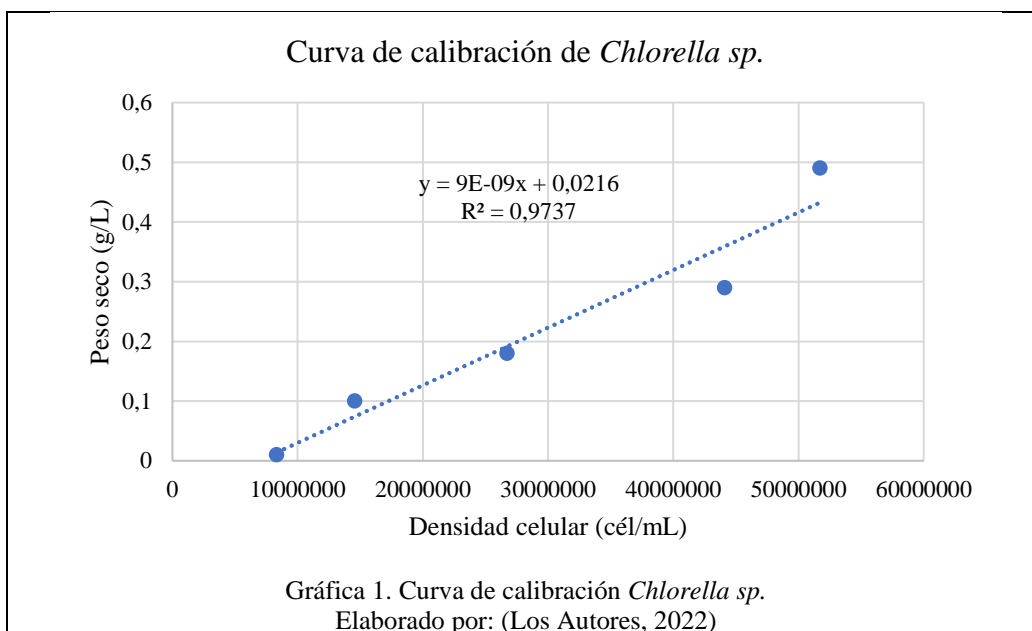
Tabla 5.

Curva de calibración de *Chlorella sp.*

<i>Inóculo</i>	<i>Concentración (%)</i>	<i>CN (cél/mL)</i>	<i>PS (g/L)</i>
	100	51701250	0,49

D1	80	44072500	0,29
D2	60	26713500	0,18
D3	40	14546250	0,1
D4	20	8315000	0,01

Elaborado por: (Los Autores, 2022)



### 3.1.5 Obtención de las concentraciones para los tratamientos

Con el objetivo de identificar posibles variaciones en la concentración del cultivo líquido, se realizó un segundo conteo previo al día de inoculación. Mediante la ecuación de regresión lineal (gráfico 1) se calculó la concentración celular (g/L) actualizada y, a partir de esta, se obtuvo tres diferentes medidas (0,001; 0,005 y 0,01 g/L) para inocular los tratamientos usando la siguiente fórmula:

Ecuación 3. Fórmula para cálculo de diluciones

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Fuente: (Mónica Salas, 2015)

### 3.1.6 Curva de calibración contaminantes

- Fosfatos:

Se realizó la solución madre con una concentración de 100 ppm usando fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en una cantidad de 0,014316 gramos diluidos en 100 mL de agua

destilada. Partiendo de los cálculos mediante la fórmula para las diluciones (ecuación 3) se elaboraron los siguientes patrones para realizar la curva de calibración:

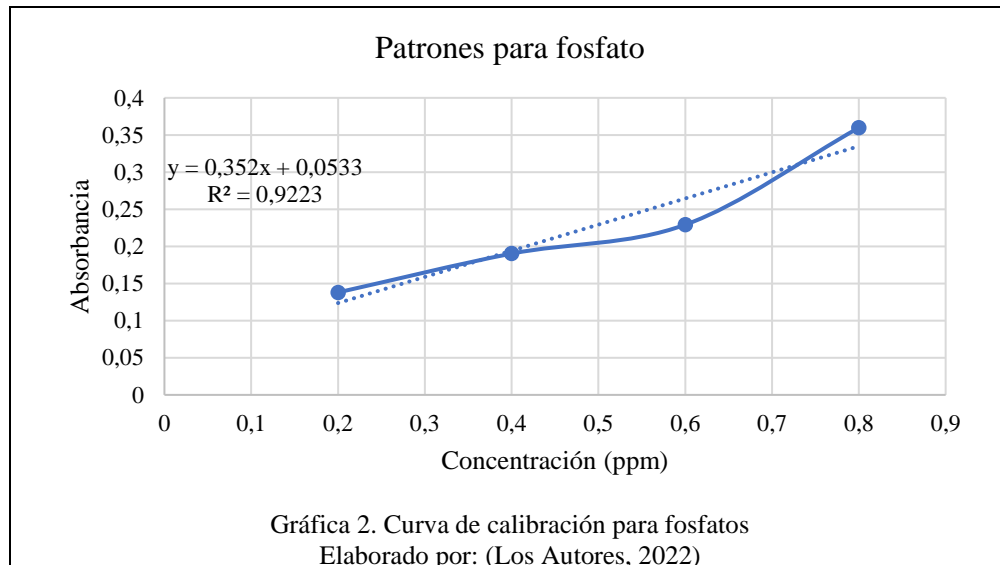
Tabla 6.

Patrones de fosfato

ppm	mL de solución		mL de agua destilada
	madre	μL	
5	0,5	500	9,5
10	1	1000	9
15	1,5	1500	8,5
20	2	2000	8

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Los patrones fueron tinturados de acuerdo con el método colorimétrico (Aparicio, 2017), fue usado el kit comercial para fosfatos PO<sub>4</sub> marca “Sera”, para ser analizado cuantitativamente en un espectrofotómetro UV-visible marca “JASCO V-730” y fueron leídas a una longitud de onda de 400 nm en celdas plásticas.



- Nitratos:

Se partió de una solución madre de 100 ppm marca “Hach” para la elaboración de los patrones que fueron usados para la curva de calibración. Los cálculos usados para los patrones fueron obtenidos mediante la fórmula de diluciones (ecuación 3) fueron:

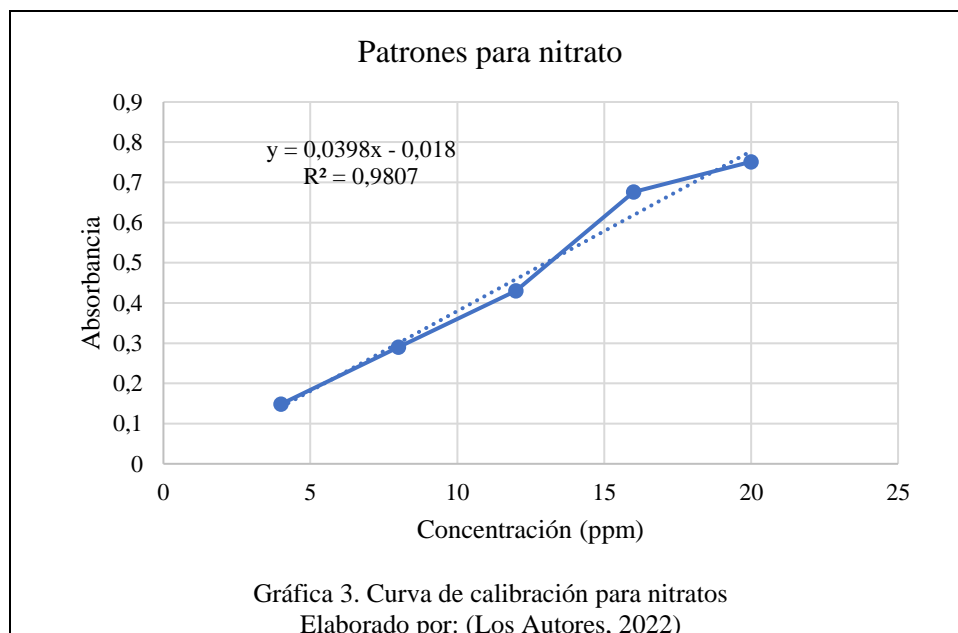
Tabla 7.

Patrones de nitratos

ppm	mL de solución madre	μL	mL de agua destilada
4	0,4	400	9,6
8	0,8	800	9,2
12	1,2	1200	8,8
16	1,6	1600	8,4
20	2	2000	8

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Se usó el método colorimétrico para tinturar los patrones, se usó el kit comercial para nitratos NO<sub>3</sub> marca “Sera” y para su lectura se usó el espectrofotómetro UV-visible marca “JASCO V-730”, la cual fue ajustada a una longitud de onda de 440 nm.



- Amoniaco:

La solución madre con la que se partió para la elaboración de los patrones fue de 1 ppm marca “Hach” y los cálculos realizados para obtener los datos de los patrones fueron obtenidos por medio de la fórmula de diluciones (ecuación 3), y fueron los siguientes:

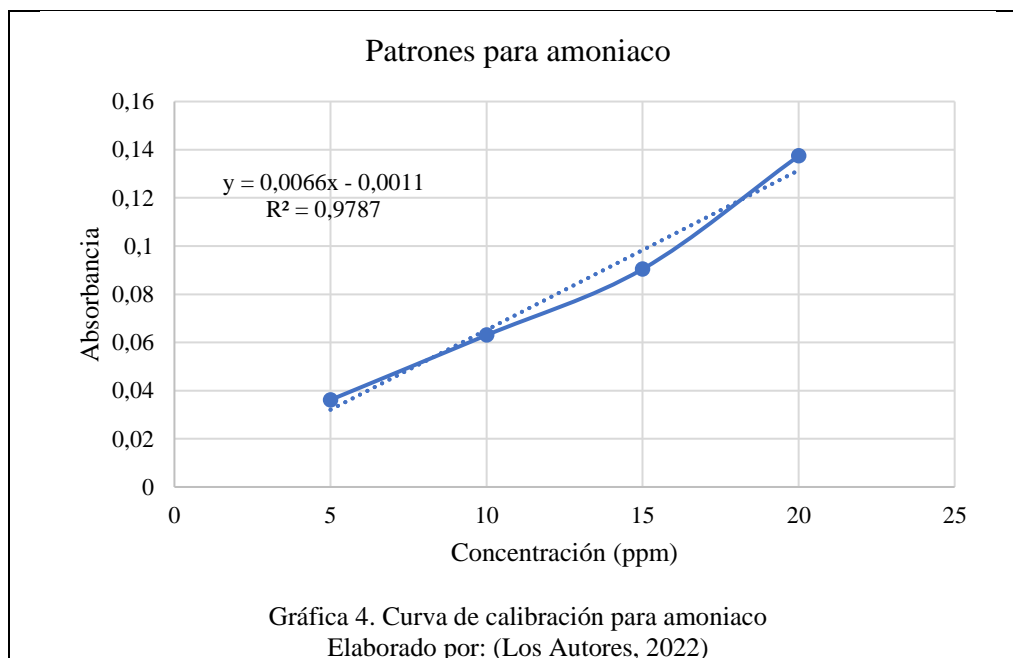
Tabla 8.

Patrones de amoníaco

ppm	mL de solución madre	μL	mL de agua destilada
0,2	2	2000	8
0,4	4	4000	6
0,6	6	6000	4
0,8	8	8000	2

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Los patrones fueron teñidos con reactivo de Nessler marca “Hach”, se agregó 0,4 mL a cada uno, ya que se usó el método colorimétrico y la lectura se realizó en el espectrofotómetro UV-visible a una longitud de onda de 425 nm en celdas de plástico.



### **3.1.7 Obtención de las muestras**

El muestreo se realizó en el catón de Cayambe, provincia de Pichincha Ecuador, en el sector “las Violetas”, coordenadas 0°02'29.2''N y 78°09'28.8''O, El punto de colección fue a las 10:16 A.M. en el cuerpo de agua al que llegan directamente los vertidos. Se utilizó un barril plástico HDPE blanco con tapa rosca de capacidad de 40 litros. El recipiente fue sumergido y enjuagado con las aguas servidas para posteriormente llenarlo a ras y asegurarlo con *film* plástico para evitar derrames, además de cerrarlo fuertemente su propia tapa.

La cadena de custodia empezó tras la toma de muestra a las 10:30 A.M. y el primer medio de transporte fue una camioneta doble cabina con destino al terminal terrestre de Cayambe-Ecuador, en donde se transportó la muestra hacia Quito; específicamente, a la entrada de Carapungo por medio del transporte interparroquial “Flor del valle”. Al llegar al destino se tomó un bus tipo “Guadalajara” hasta la 12 de octubre y Gral. Ignacio de Veintimilla, donde se transportó la muestra en un coche hasta los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana.

## **3.2 Montaje del experimento**

Se inició con la esterilización de 12 botellas de boca ancha con una capacidad de 4 L y su respectiva tapa de aluminio, 8 metros de manguera para acuario y 12 varillas de vidrio de 10 cm, se usó un autoclave horizontal marca “Tuttnauer” y el proceso de esterilizado se realizó a 121 °C por 45 minutos.

Las tapas de cada botella fueron perforadas en el centro de esta usando un destornillador estrella haciendo una abertura de 1 cm x 1 cm, cada botella fue llenada con 2 litros de agua residual sin dilución ni esterilización y posteriormente marcado el nivel hasta donde llegó con un marcador negro permanente. Las botellas fueron colocadas en una repisa de acero cromado, la cual tenía acoplado en su parte posterior lámparas de luz blanca con una potencia de 2000 lux y estas estaban conectados a un temporizador para que las unidades experimentales tengan un periodo de luz de 12/12.

Se usaron 4 motores marca “JAD SC-7500” con una producción de oxígeno de 3x2 L/min donde cada uno alimentaba 3 unidades experimentales, los cuales lo hacían por medio de mangueras que en su extremo se colocó una varilla de vidrio formando una línea de oxígeno. Las



unidades experimentales fueron distribuidas como se observa en la tabla 9 y se inocularon con 0,001, 0,005 y 0,01 g/L de *Chlorella sp.* que representan las concentraciones 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 9.

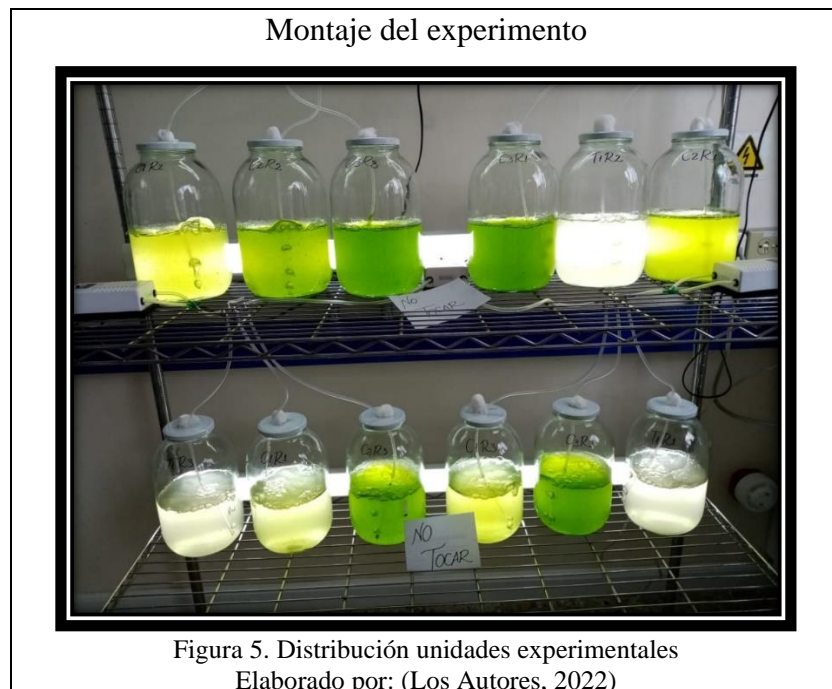
Disposición de las unidades experimentales

C1, R2	C2, R2	C3, R3	C3, R1	T, R2	C2, R1
T, R3	C1, R1	C2, R3	C1, R3	C3, R2	T, R1

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Nota: C1 es concentración 1, C2 es concentración 2, C3 es concentración 3, T es testigo, R1 es repetición 1, R2 es repetición 2 y R3 es repetición 3.

Cada unidad experimental fue cerrada con su respectiva tapa y por la abertura de esta se introdujo la línea de oxígeno hasta el fondo de la botella; dicha abertura fue sellada con un tampón de algodón envuelto en gasa estéril para asegurar la línea de oxígeno y evitar la evaporación de la muestra, como se observa en la figura 5.



### **3.3 Factores de estudio**

Los parámetros analizados fueron: cinética de crecimiento, reducción de contaminantes (DBO<sub>5</sub>, N, P, NH<sub>3</sub>) e indicadores microbiológicos de la calidad de agua (Aerobios totales y Coliformes fecales).

#### **pH**

En un tubo de ensayo se colocaron 5 mL de la muestra a analizar donde se introdujo el electrodo hasta que quedó completamente sumergido para que la lectura fuera posible. Se usó un potenciómetro marca “Mettler Toledo”. Mismo que fue desinfectado y secado antes de medir cada una de las muestras.

#### **Conductividad**

Se usó un potenciómetro marca “Mettler Toledo” con una adaptación capaz de medir microvoltios (mV), se usaron 5 mL de muestra en un tubo de ensayo para que el electrodo quedara completamente sumergido y pudiera realizar la lectura. De igual manera que el punto anterior, el electrodo fue desinfectado y secado adecuadamente antes de medir cada una de las muestras.

#### **Nitratos**

Se tomó 10 mL de muestra que fueron tinturados con el kit de detección de contaminantes de acuario marca “SERA” para NO<sub>3</sub>. Durante el primer análisis, la muestra se tiñó de amarillo intenso lo que imposibilitó la lectura con el método de espectrofotometría debido a la alta concentración del contaminante en cuestión, por lo que fue diluida a una proporción de 3:10. El análisis se realizó por triplicado, llenando 3 celdas de plástico destinadas a ser leídas en un espectrofotómetro UV-visible marca “JASCO V-730”. La lectura se realizó a una longitud de onda de 440 nm y los datos obtenidos fueron en unidades de absorbancia.

#### **Fosfatos**

Se usó el kit marca “Sera” para PO<sub>4</sub> en 10 mL de muestra; para el primer análisis se tinturó de un intenso azul y se diluyó en una proporción de 2:10 para que la lectura fuera posible. El análisis se realizó por triplicado usando celdas de plástico en un espectrofotómetro UV-visible

marca “JASCO V-730” a una longitud de onda de 400 nm, la concentración del contaminante se obtuvo en unidades de absorbancia.

### **Amoníaco**

Se tomaron 10 mL de muestra para ser tinturada con el reactivo de Nessler marca “Hach”, en donde el primer análisis se tiñó de un amarillo fuerte y la muestra fue diluida en una relación de 0,5:10. La lectura se realizó por triplicado en celdas de plástico y leídas en un espectrofotómetro UV-visible marca “JASCO V-730” a una longitud de onda de 425 nm, dando como dato la concentración del contaminante en unidades de absorbancia.

### **Análisis semanal**

Usando una pipeta de vidrio de 10 mL por cada tratamiento, se tomó un total de 30 mL de cada unidad experimental semanalmente para el análisis de amoníaco, nitratos y fosfatos. El contenido se depositó en tubos Falcon de 50 mL y las muestras fueron centrifugadas en una centrífuga marca “Hermle” a una velocidad de 3000 rpm por 1 minuto para sedimentar las microalgas y evitar que interfirieran en la cuantificación de los contaminantes. Posteriormente se extrajo 10 mL de sobrenadante de cada tubo Falcon para cada uno de los tres análisis.

### **DBO<sub>5</sub>**

El método usado fue el manométrico, que consiste en medir el cambio de presión de la muestra en un frasco de vidrio ámbar a una temperatura de 20 °C con agitación constante por 5 días; fue usado el sistema de medición de DBO y refrigeradora marca “Velp” para el análisis. Fueron vertidos 164 mL de muestra en los frascos ámbar de acuerdo con la tabla 10 y usando la ecuación 4 se obtuvo los valores de mgO<sub>2</sub>/L de las muestras. Este análisis se realizó al comienzo y al final de la fase experimental.

Tabla 10.

Demanda biológica de oxígeno

<b>Volumen de muestra (mL)</b>	<b>Factor</b>	<b>Rango estimado (mgO<sub>2</sub>/L)</b>
22,7	100	0-4000

43,5	50	0-2000
97	20	0-800
164	10	0-400
250	5	0-200

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

#### Ecuación 4. Fórmula de DBO<sub>5</sub>

$$DBO_5 \left( \frac{mgO_2}{L} \right) = Valor * Factor$$

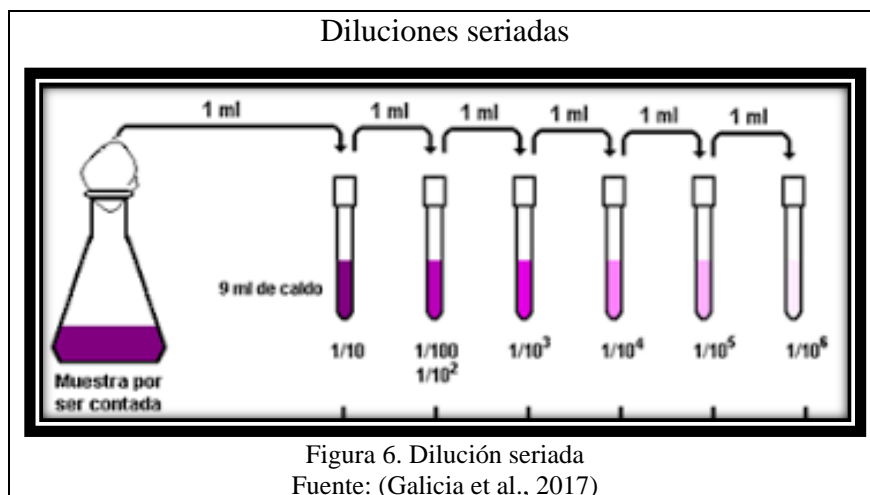
Fuente: (Nadal et al., 2017)

### Conteo microbiológico

El conteo se realizó al inicio y al final de la fase experimental y las bacterias analizadas fueron coliformes totales, *E. coli* y aerobios totales. El primer conteo se realizó en placas Petrifilm marca “Millipore” especializadas para conteo rápido de coliformes totales y aerobios totales, para el segundo y último análisis se usó medio de cultivo sólido en placas Petri.

- **Primer conteo**

Para realizar el agua de dilución se pesó 0,6 gramos de agua peptona bufferada marca “Merck”, que fueron diluidos en 30 mL de agua destilada. Se colocó 9 mL en 3 tubos de ensayo para que luego fueran esterilizados en un autoclave horizontal marca “Tuttnauer” a 121 °C por 45 minutos. Ya que se realizó una dilución seriada hasta alcanzar una concentración de 10<sup>-3</sup> (figura 6) se colocó 1 mL de muestra en un tubo de ensayo con agua peptona aforando a 10 mL su contenido, de este mismo se tomó 1 mL de inóculo del anterior tubo de ensayo para ser inoculado en el siguiente y de la misma manera con el último tubo de ensayo.



Se inoculó 1 mL de la concentración  $10^{-3}$  usando una micropipeta marca “Thermo” en cada uno de los Petrifilm, generando 6 siembras en total: 3 para coliformes totales y 3 para aerobios totales. Posteriormente fueron almacenados en una cámara de incubación marca “Memmert” a 35 °C; las placas especializadas en coliformes totales fueron retiradas a las 24 horas y las especializadas en aerobios totales a las 48 horas. Las colonias de coliformes fecales tomaron una coloración azul verdoso, mientras que las de *E. coli*, una coloración roja violácea. Las colonias de aerobios totales tomaron una coloración naranja y el conteo se realizó en un contador de colonias marca “Boheco”.

- **Segundo conteo**

Para la elaboración del agar fueron empleados dos medios marca “Merck” especializados para el crecimiento de aerobios totales y coliformes totales respectivamente. En la tabla 11 se observa en detalle:

Tabla 11.

Elaboración de medios sólidos

Medio	Cantidad (gramos)	Agua destilada (mL)
Aerobios totales	11,2	500
Coliformes totales	12,5	500

Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Los medios fueron esterilizados en frascos de vidrio con tapa, marca “Boheco” junto con 48 cajas Petri de vidrio en un autoclave horizontal marca “Tuttner” a 121 °C por 45 minutos. El

dispensado de los medios en cada caja Petri se realizó en una cámara de flujo laminar marca “ESCO” con la presencia de 3 mecheros de alcohol. Posteriormente se sembró una muestra de cada tratamiento por duplicado, dando un total de 12 cajas Petri por análisis. El método de siembra utilizado fue por estriado, usando un asa metálica. Al finalizar, las cajas Petri fueron selladas con parafilm y etiquetadas respectivamente como se muestra en la figura 7 para ser almacenadas en una incubadora marca “Mettmert” a 35 °C durante 48 horas.



El conteo se realizó en un contador de colinas marca “Boheco” y el resultado fue promediado considerando las repeticiones de cada tratamiento para el registro de los datos.

### **Unidad experimental**

La unidad experimental consistió en un recipiente de 4 litros con tapa de aluminio con un agujero de 1x1 cm en el centro por el que pasa una línea de oxígeno conformada por una varilla de vidrio y una manguera de caucho conectada a un motor de pecera y asegurado por un tapón de algodón y gasa estéril en la abertura de la tapa.

Se implementaron 12 unidades experimentales, 3 por cada tratamiento y 3 destinadas al grupo control o testigo. El primer tratamiento fue inoculado con 0,001 g/L, el segundo con 0,005 g/L, el tercero con 0,01 g/L y el testigo no fue inoculado con ninguna cepa.

### **Análisis estadístico**

Para el registro periódico de los datos obtenidos durante el ensayo se utilizó un diario de campo y el software Excel. Mientras que el análisis estadístico se realizó mediante el uso del software “Minitab” versión 19. Se usó el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor debido a la cantidad de datos generados y por tener una sola variable independiente (concentración del analito); y la prueba LSD Fisher por su cualidad de agrupar en parejas todos los datos para compararlos entre sí.

### **Variables y métodos de evaluación**

Las variables medidas fueron químicas: pH, nitratos, amonio, fosfatos y DBO<sub>5</sub>; físicas: conductividad y biológicas: cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* y recuento microbiológico (*E. coli*, aerobios totales y coliformes totales) en cada unidad experimental.

En síntesis:

- La medición de pH y conductividad fue mediante un potenciómetro.
- Nitratos, amoníaco y fosfatos fueron medidos usando por medio de un espectrofotómetro UV-visible.
- DBO<sub>5</sub> fue medido usando el método manométrico mediante un equipo para estos fines (medidor de DBO).
- La cinética de crecimiento se midió usando conteo manual.
- El conteo bacteriano se realizó mediante placas Petrifilm y medio de cultivo sólido.

### **Manejo del ensayo experimental**

Las unidades experimentales tuvieron un fotoperiodo de 12/12 por un lapso de 4 semanas (tiempo que duró la fase experimental) con aireación constante. Se realizó un control de la cinética de crecimiento diariamente por medio de conteo manual, los análisis de contaminantes se realizaron una vez por semana usando el método espectrofotométrico con excepción del DBO<sub>5</sub> que se realizó al inicio y al final de la fase experimental.

## 4 Resultados y discusión

### 4.1 Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*

Los datos de cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* registrados en el software Excel permitieron elaborar una curva de crecimiento en donde se observa el incremento o decremento del número de células de cada tratamiento a lo largo del tiempo, como se muestra a continuación:

Tabla 12.

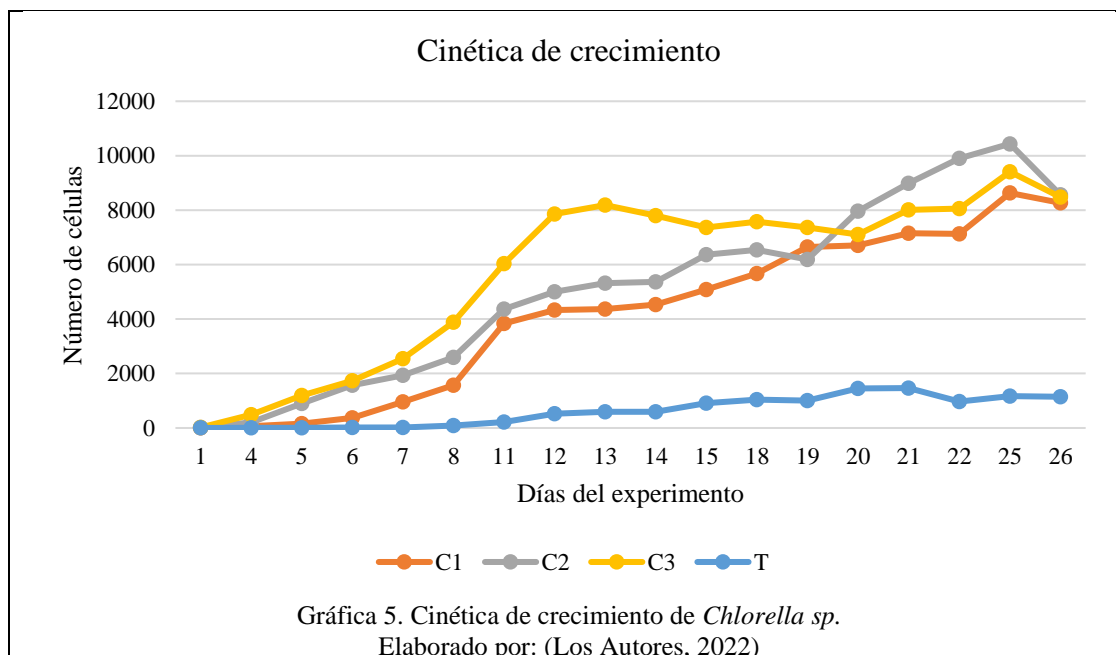
Diferencia estadística entre las diferentes concentraciones de *Chlorella sp.*

<i>Día</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>Testigo</i>
<i>1</i>	5,21±0,32 c	14,83±1,28 b	20,71±3,74 a	1,67±1,16 c
<i>4</i>	71,59±31,9 c	204,38±88,2 b	489,3±61,7 a	5,25±5,85 c
<i>5</i>	155,6±80,4 c	900±184 b	1190,4±60,9 a	9,32±9,35 c
<i>6</i>	375,9±21,4 b	1572,9±161,6 a	1740,7±133,5 a	16,61±13,7 c
<i>7</i>	954,8±58,3 c	1937,3±89,9 b	2550,3±167,5 a	24,1±19,2 d
<i>8</i>	1575,63±30,9 c	2593,67±303 b	3890,67±325 a	84,79±59,8 d
<i>11</i>	3837,46±634 c	4365,16±1642 b	6035,96±56,8 a	219,17±94,7 d
<i>12</i>	4331±545 b	5004,3±152,8 b	7863±1613 a	526±581 c
<i>13</i>	4368±417 b	5325,1±109,6 b	8186±2070 a	589±333 c
<i>14</i>	4528±474 b	5371±1734 b	7798±921 a	589±240 c
<i>15</i>	5081±1003 b	6365±1116 ab	7365,8±153,8 a	908±319 c
<i>18</i>	5677±307 b	6542±401 b	7575±773 a	1041±272 c
<i>19</i>	6653,33±311 b	6188,33±129,5 c	7370±225 a	1003,33±162,6 d
<i>20</i>	6709,2±152,3 a	7965±2322 a	7107±485 a	1448±328 b
<i>21</i>	7157±488 b	8983±730 a	8010±966 ab	1467±306 c
<i>22</i>	7133±1531 b	9898±274 a	8060±1304 ab	967±515 c
<i>25</i>	8630±1493 a	10437±955 a	9410±1511 a	1165±202 b
<i>26</i>	8270±1197 a	8567,5±2167 a	8478,33±1333 a	1150±109 b

Elaborado por: (Los Autores, 2022).

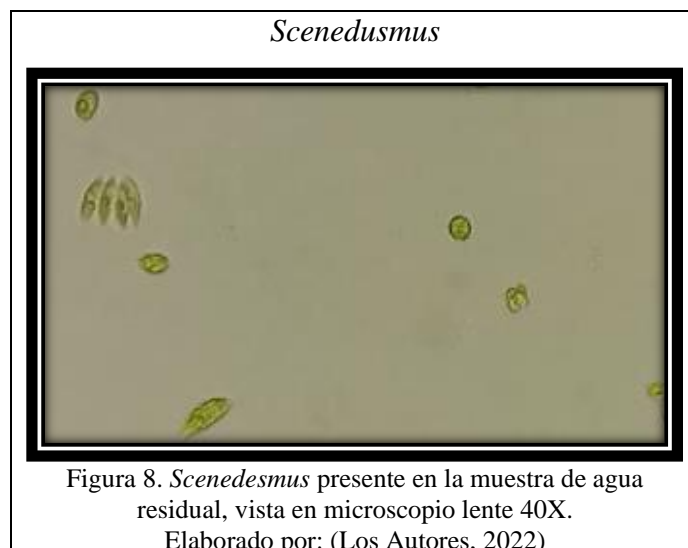
Nota: Los valores que comparten letra son estadísticamente iguales con un nivel de significancia de 0,05.





Cada curva del ensayo atravesó las 5 fases esperadas a lo largo del experimento, a excepción del testigo, puesto que una vez finalizado este, se mantuvo en etapa estacional. El tratamiento que mejores resultados presentó en cuanto a crecimiento fue el tercero (C3) debido a que el inóculo inicial fue el más concentrado (0,01 g/L) en contraste con C2 (0,005 g/L) y C1 (0,001 g/L); obteniéndose resultados semejantes a los de Saad (2016) quien inoculó 4 concentraciones diferentes de *Chlorella*: 20, 40, 60 y 80 g/L en 0,5 L; siendo la última la que tuvo una diferencia significativa constante durante todo el experimento.

Durante la etapa de adaptación hasta el día 4, C3 mantuvo una diferencia estadística para con el resto de los tratamientos, en donde C2 y los controles fueron significativamente iguales. Mientras que la fase exponencial en el día 8 fue la que más diferencia presentó entre los tratamientos, siendo todos estadísticamente diferentes; aquí se registró el crecimiento de microalgas propias de las aguas residuales de las unidades experimentales de control, donde se identificó morfológicamente a *Scenedesmus*, siendo una de las cepas más abundantes en este tipo de cuerpos de agua; esto está respaldado por lo mencionado por Morales et al. (2004), quienes aislaron *Scenedesmus* y *Chlorella* de una represa y laguna, respectivamente, para analizar su capacidad de remoción de contaminantes para aguas residuales con características similares a las de su origen.



Como se ha evidenciado, las microalgas pueden desarrollarse en ambientes adversos siempre y cuando tengan los requerimientos básicos a su alcance, por lo que, al manipular los ciclos lumínicos y el suministro de luz en los controles del experimento, posibilitó el crecimiento de microalgas propias del medio y la posterior remoción de contaminantes de acuerdo con las capacidades de estas. Este comportamiento es atribuible a lo planteado en la técnica de bioestimulación, que consiste en la modificación del entorno para estimular la degradación de contaminantes mediante microorganismos autóctonos (Kouzuma & Watanabe, 2019).

El registro durante el día 11, aún en la fase exponencial, indica una semejanza estadística entre C1 y C2; mientras que para el día 11 ya se consideró el ingreso a fase estacionaria, teniendo un comportamiento estadístico igual al anterior. El contraste significativo ocurrió en el día 19, donde la etapa de crecimiento decreciente fue más evidente puesto que ningún tratamiento tuvo una agrupación cercana, así como un descenso de la división celular por la reducción de nutrientes en el medio. Este comportamiento es semejante a lo que reportaron Yatirajula et al. (2019) donde la cinética de crecimiento de *Chlorella vulgaris* alcanzó un crecimiento exponencial hasta el día 8 con una duplicación celular diaria y desde el noveno día inició la fase estacionaria hasta el día 16, que mostró una producción de polisacárido y muerte celular igual; para, posteriormente entrar en fase de muerte. Esto de acuerdo con la curva típica esperada en un período de alrededor de 15 días debido al volumen, inóculo y demás factores entre los que destacan los nutrientes, considerados como la principal limitante de crecimiento en estos experimentos.

Por un lado, en el presente ensayo el volumen fue de 2000 mL con concentraciones de entre 0,001 y 0,01 g/L; mientras que Yatirajula et al. (2019) utilizaron 1 g/L en volúmenes de 20, 50, 150, 500 y 2000 mL. Es por esto por lo que un inóculo reducido en un mayor volumen permitió la extensión del experimento hasta los 26 días y no hasta los 15 como varios autores reportan (Eze et al., 2018; Lee et al., 2015), además de un porcentaje de crecimiento mucho más elevado; tal es el caso de Tafur & Estrada (2015) reportaron que el inóculo inicial para su experimento fue de  $1 \times 10^6$  cél/mL y al cabo de 20 días la concentración se elevó a  $8,9 \times 10^6$  cél/mL, generando un crecimiento del 890 %; mientras que, en el presente ensayo, el inóculo inicial de mayor concentración fue para C3 (2017 cél/mL) y al cabo de 20 días su concentración se elevó a 796533 cél/mL, que corresponde a un crecimiento del 39490,98 %.

Por último, fue en la fase de muerte, en el día 26, donde las concentraciones manipuladas fueron estadísticamente iguales al llegar a un mismo punto de caída, mientras que el testigo fue el único significativamente diferente, ya que se hallaba todavía en fase estacional. En un experimento realizado por Silva et al. (2022) se utilizó un volumen inicial de 1,5 L e inóculo de 0,3 L y fue posible mantener el cultivo durante 26 días gracias a adiciones diarias de 50 mL de medio o agua destilada, es decir, manejando un diseño de flujo continuo, contrario al sistema Batch que se utilizó en el ensayo actual.

## 4.2 Degradación de contaminantes

Los valores obtenidos de la degradación de contaminantes fueron registrados en tablas elaboradas en el software Excel para ser graficados posteriormente con los siguientes resultados:

Tabla 13.

Resultados estadísticos para amoníaco, nitratos, fosfatos, pH y conductividad.

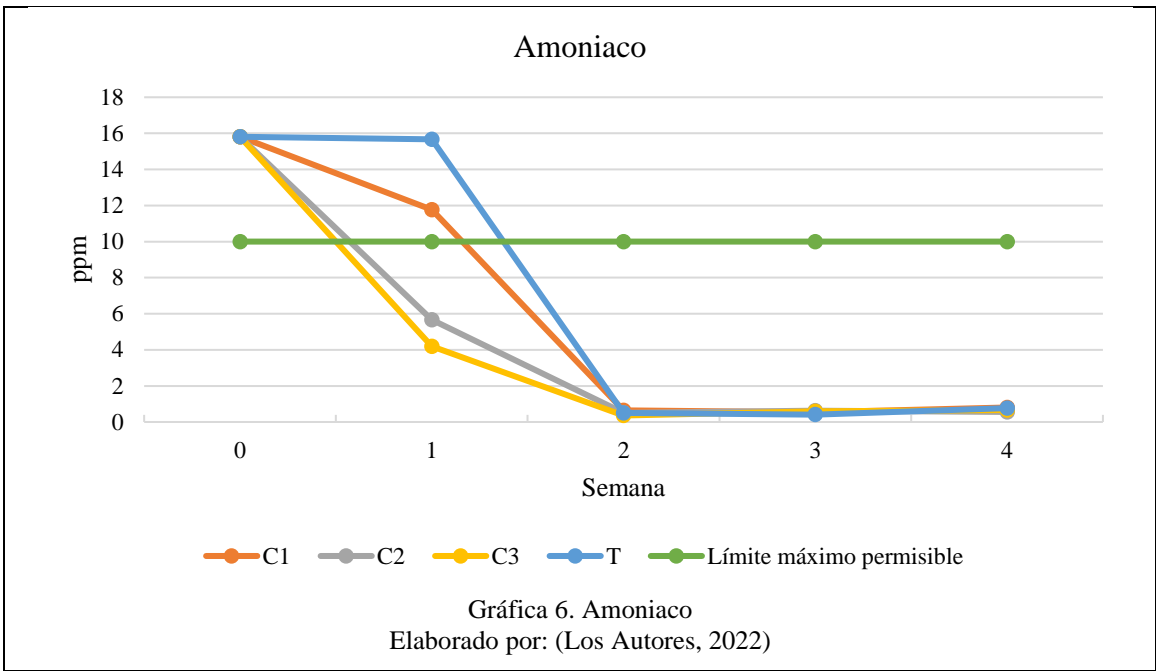
	<i>Tratamiento</i>	<i>Amoniaco</i> (mg/L)	<i>Nitrato</i> (mg/L)	<i>Fosfato</i> (mg/L)	<i>pH</i>	<i>Conductividad</i>
<i>Semana</i>	<b>C1</b>	11,76±4,53 a	45,47±1,27 a	48,36±2,54 b	9,09±0,04 ab	284,5±0,0 a
	<b>C2</b>	5,67±2,65 b	38,37±2,71 b	44,19±4,11 bc	9,19±0,15 a	284,47±0,06 a

	<b>C3</b>	4,19±0,9 b	34,29±3,36 b	38,76±5,47 c	9,38±0,26 a	284,43±0,06 a
	<b>T</b>	15,7±1,51 a	47,91±2,47 a	60,51±4,2 a	8,62±0,46 b	284,43±0,06 a
<i>Semana 2</i>	<b>C1</b>	0,65±0,65 a	38,3±2,85 a	28,26±0,93 a	8,27±0,01 b	285,13±0,06 a
	<b>C2</b>	0,51±0,14 ab	43,12±2,8 a	31,89±2,66 a	8,21±0,17 b	285,17±0,06 a
	<b>C3</b>	0,36±0,02 b	41,33±11,29 a	23,46±3,21 a	8,37±0,04 b	285,2±0,0 a
	<b>T</b>	0,5±0,14 ab	41,72±5,78 a	28,52±8,77 a	8,98±0,25 a	284,97±0,15 b
<i>Semana 3</i>	<b>C1</b>	0,54±0,09 ab	44,57±1,96 a	36,76±15,26 a	8,66±0,13 a	285,13±0,06 a
	<b>C2</b>	0,63±0,12 a	45,62±2,18 a	28,6±18,2 a	8,58±0,09 a	285,2±0,10 a
	<b>C3</b>	0,6±0,03 a	47,14±1,96 a	25,37±5,83 a	8,69±0,23 a	285,17±0,06 a
	<b>T</b>	0,41±0,11 b	46,81±3,52 a	18,5±2,75 a	8,91±0,27 a	285,27±0,15 a
<i>Semana 4</i>	<b>C1</b>	0,8±0,4 a	40,87±2,78 a	14,7±1,99 a	9,03±0,14 a	285,17±0,06 a
	<b>C2</b>	0,55±0,06 a	36,1±3,48 a	13,84±0,88 a	9,04±0,03 a	285,2±0,10 a
	<b>C3</b>	0,66±0,16 a	36,35±1,47 a	13,99±0,23 a	9,08±0,04 a	285,17±0,06 a
	<b>T</b>	0,77±0,55 a	37,19±9,73 a	13,69±1,14 a	9,17±0,06 a	285,17±0,32 a

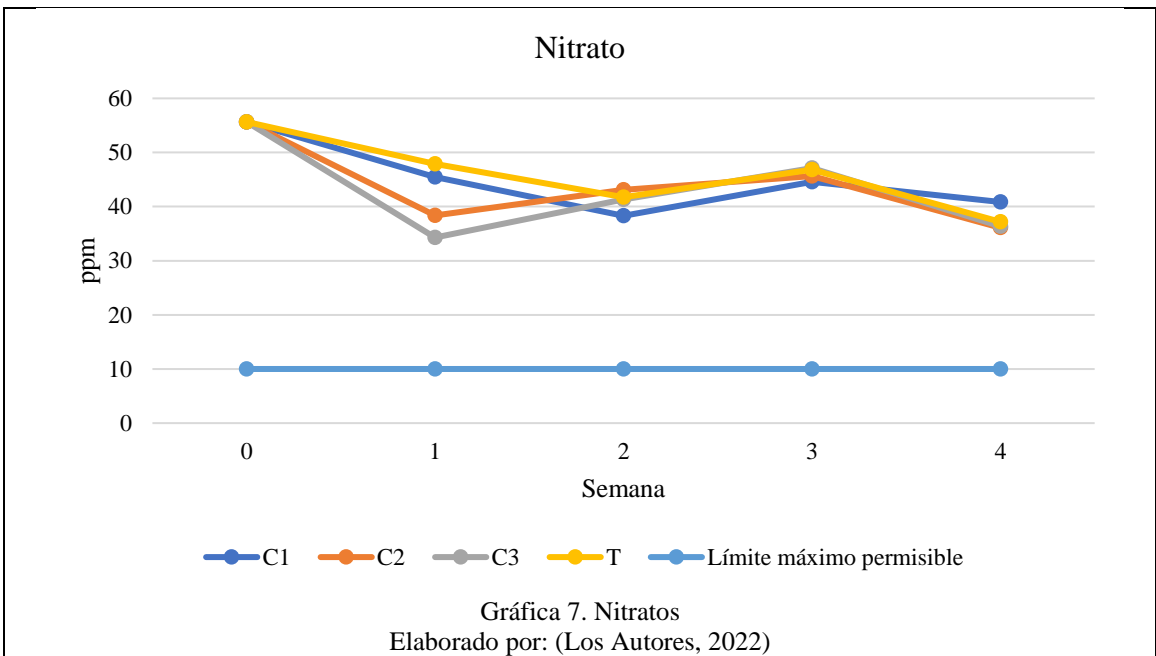
Elaborado por: (Los Autores, 2022)

Nota: Los valores que comparten letra son estadísticamente iguales con un nivel de significancia de 0,05.

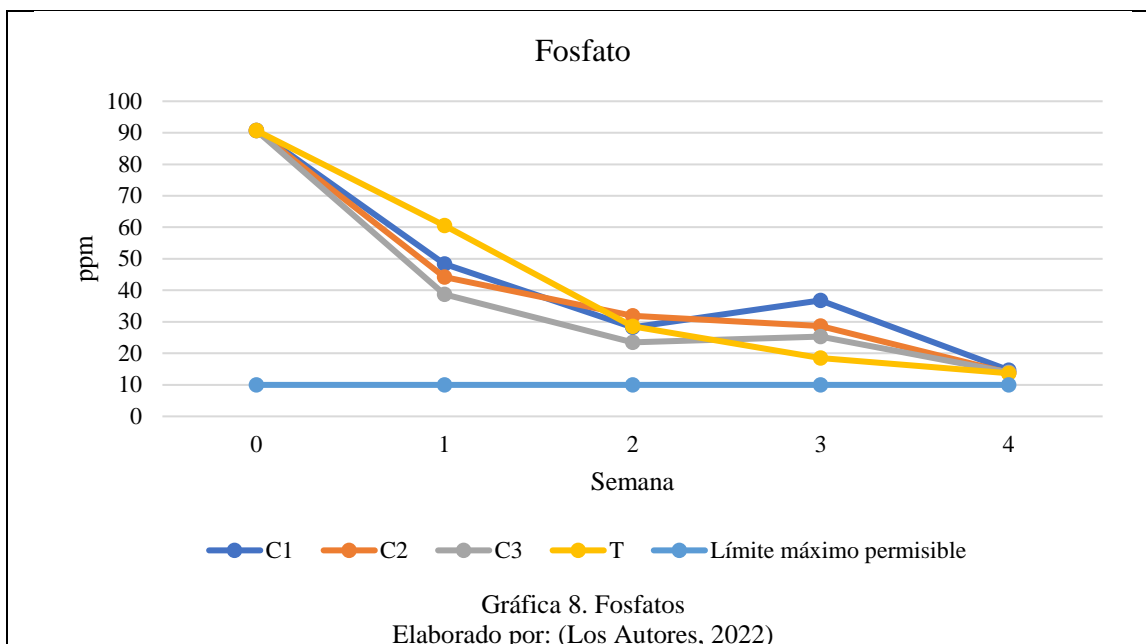
#### 4.2.1 Amoniaco



#### 4.2.2 Nitratos



#### 4.2.3 Fosfatos



La reducción de contaminantes mediante microalgas se relaciona directamente con la proporción de N:P, siendo lo recomendable una de 6:3 aún en aguas residuales (E. Ramos et al., 2014) debido a los requerimientos nutricionales de estas. Olguín, (2012) reportó una degradación total de nitrógeno de entre 61 a 79 %, mientras que el fósforo osciló entre 62 y 93 %. En el presente experimento, los resultados mostraron una degradación del 51,4 % de fosfatos en la primera semana, mientras que en nitratos fue de 29,3 % en el mismo período; lo que indica un consumo superior de fósforo frente al nitrógeno; en donde el análisis de varianza arrojó una diferencia significativa para los tratamientos 2 (C2) y 3 (C3), siendo los que más destacaron. Vacca et al. (2017) reportó que el porcentaje de remoción de contaminantes es directamente proporcional a la concentración de *Chlorella*, siendo esta la razón principal por la que el tercer tratamiento (C3) del presente experimento obtuvo la mayor proporción de degradación.

Por otra parte, este comportamiento, contrario a lo esperado teóricamente, está respaldado por García & Arbib (2015), donde mencionan que la tasa máxima específica de degradación de fósforo es generalmente superior a la del nitrógeno y esta se relaciona, a su vez, con la biomasa producida siempre y cuando el fósforo no sea una limitante.

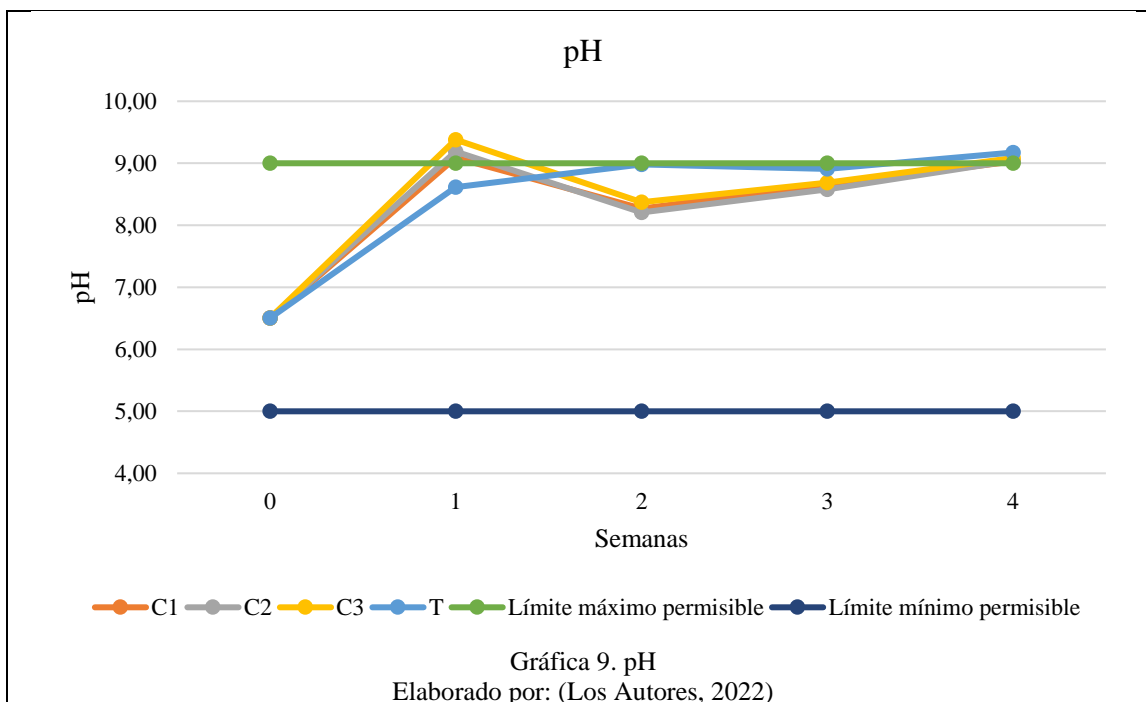
Durante la segunda semana, la remoción de nitratos llegó a 26,5 %, considerando como punto de partida 55,65 ppm; lo que se asemeja al ensayo realizado por Medrano et al. (2021), en donde se usó *Chlorella sp.* para verificar la reducción del mismo contaminante en aguas

provenientes de camal, obteniéndose una disminución de 90,2 % a partir de 60,2 ppm, en el mismo lapso.

La tasa de remoción de amoníaco fue superior a la de los ya mencionados nutrientes, debido a la rápida asimilación que poseen las microalgas para con este compuesto (N. Liu et al., 2015). Tal es el caso presentado por Ramos & Pizarro (2018), que reportaron una remoción del 21,48 % en el lapso de 2 días. Si bien, en el presente ensayo se obtuvo una degradación del 73,5 %, siendo los tratamientos 2 (C2) y 3 (C3) estadísticamente iguales y superiores al resto, al haber transcurrido la primera semana. Para el análisis final, a los 26 días, se registró un promedio de 96,2 % entre todos los tratamientos, que se asemeja a los resultados presentados por Chacón et al. (2004), donde mencionan que, al cabo de 27 días de experimentación el porcentaje de amoníaco degradado fue del 100 %, atribuyéndose al tiempo que las aguas residuales estuvieron siendo tratadas con *Chlorella*; en donde a mayor exposición, mayor degradación existió.

Es importante mencionar que la biorremediación de amoníaco pudo alcanzar los límites permisibles de la legislación debido al mecanismo propio de asimilación de *Chlorella* (N. Liu et al., 2015). Mientras que, en el caso de nitratos y fosfatos, no alcanzó dichos parámetros debido a que el agua recolectada fue directamente tomada de la zona de descarga sin tratamiento previo, es por esto por lo que Waktole et al. (2019) obtuvieron una remoción de casi el 50 % de fosfatos y 75 % de nitratos, contando con aguas tratadas con métodos fisicoquímicos tradicionales, mientras que Delgadillo et al. (Delgadillo et al., 2016) registró una remoción entre 72 y 83 % para nitrógeno y 100 % para fósforo en un tratamiento completo, es decir, incluyendo un tratamiento terciario.

### **4.3 pH**



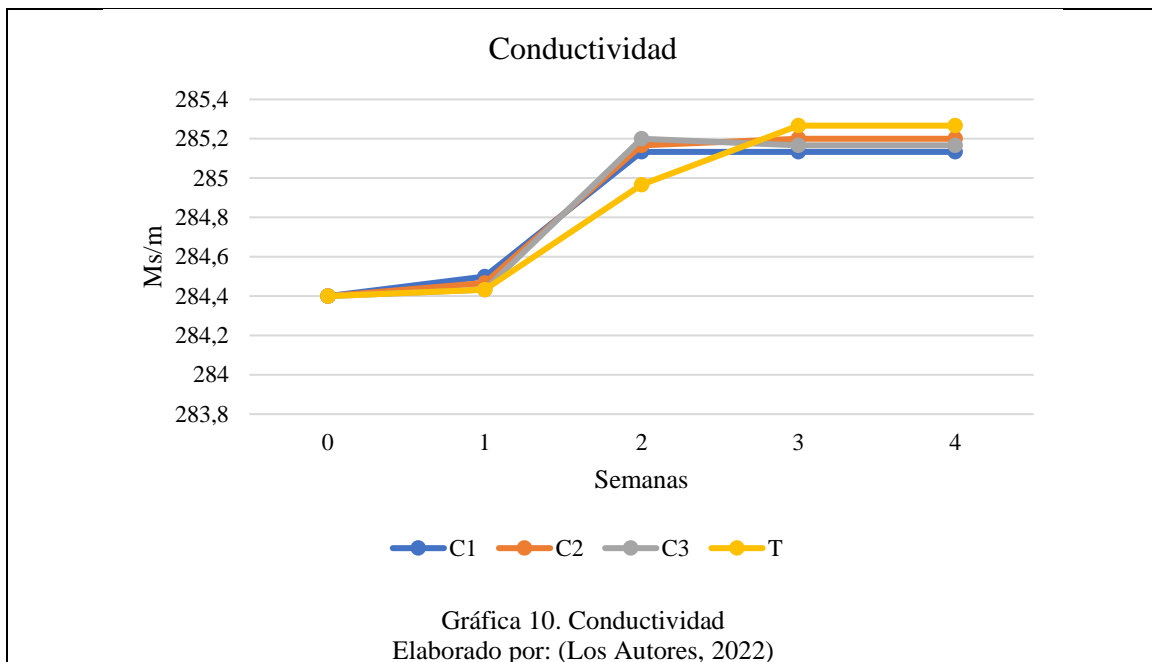
El análisis de pH previo a la inoculación partió de un valor ligeramente ácido: 6,504; en donde fue ascendiendo durante el transcurso del ensayo. Durante la primera semana se reportó tres agrupaciones: C1 (9,089) y el grupo control (8,615) fueron estadísticamente iguales, del mismo modo que C3 (9,381) y C2 (9,189); por otro lado, C2 (9,189) y C1 (9,089) también compartieron similitud. Una cualidad destacable de este reporte es el incremento en el valor de pH de todos los tratamientos, comportamiento que se asemeja al documentado por Zhang et al. (2014), en donde el cultivo de microalgas de su experimento partió de 5,0 y al cabo de 8 días incrementó en alcalinidad hasta alcanzar valores de 8 a 11; esto atribuyendo a la absorción de CO<sub>2</sub> y liberación de algas durante la fase estacionaria.

En cuanto a la segunda semana, existió una diferencia significativa en el tratamiento de control presentándose un pH de 8,981; mientras que las concentraciones manipuladas fueron estadísticamente iguales con pH de 8,267; 8,208 y 8,3713 para C1, C2 y C3 respectivamente. En lo que concierne a la tercera semana, los valores fueron muy semejantes y sin diferencia significativa, con un ligero incremento, siendo este: C1 (8,660), C2 (8,577), C3 (8,687) y T (8,910). La fluctuación en este par de semanas puede atribuirse a la composición iónica del medio de crecimiento y, sobre todo a otras actividades microbianas que influyen en la fuente de suministro de CO<sub>2</sub> (Melo et al., 2022).



Finalmente, en la última medición para la cuarta semana, la diferencia significativa fue inexistente, pero con incremento en la alcalinidad de los tratamientos, de la siguiente manera: C1 (9,030), C2 (9,043), C3 (9,083) y T (9,173). Esto se atribuye directamente a la excreción de sustancias por parte de las microalgas, alcanzando niveles entre 9 y 11, aun habiéndose ajustado el pH a 7 previo al ensayo, como ocurrió en el caso de Otondo et al. (2018).

#### 4.4 Conductividad



Respecto a la conductividad registrada al principio del experimento fue de 284 mS/cm, sin existir diferencia significativa a lo largo del ensayo, obteniéndose un promedio de 284,5; 285,18, 285,17 y 285,2 mS/cm para la primera, segunda, tercera y cuarta semana respectivamente. Resultados semejantes se muestran en un estudio presentado por Higgins et al. (2018) en donde se realizó varios tratamientos biológicos, pero ninguno pudo eliminar iones del medio acuático debido a que no es una cualidad de las microalgas, es por esto por lo que la conductividad eléctrica elevada es un comportamiento esperado en estos tratamientos.

## 4.5 Otros análisis

Los parámetros que fueron analizados al inicio y al final de la fase experimental fueron los microbiológicos, DBO<sub>5</sub> y densidad poblacional bacteriana, tal como se presenta en los siguientes resultados:

Tabla 14.

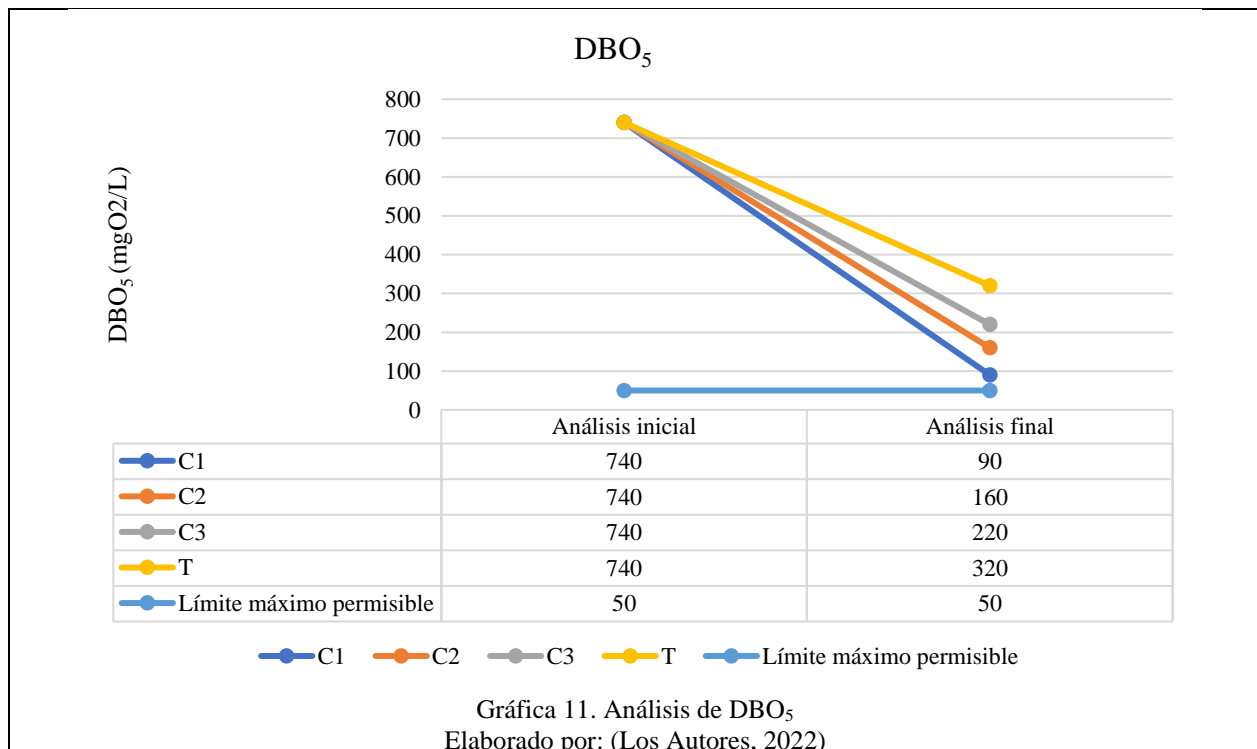
Resultado estadístico de crecimiento bacteriano.

Parámetro	Medición	C1	C2	C3	T
<b>Coliformes totales</b>	Iniciales	1040000±0 a	1040000±0 a	1040000±0 a	1040000±0 a
	Finales	2333±4041 a	2333±577 a	3000±1000 a	5667±8963 a
<b>E. coli</b>	Iniciales	33333,33±0 a	33333,33±0 a	33333,33±0 a	33333,33±0 a
	Finales	0	0	0	0
<b>Aerobios totales</b>	Iniciales	7883333,33±0 a	7883333,33±0 a	7883333,33±0 a	7883333,33±0 a
	Finales	2335±2515 a	1333±577 a	2667±1528 a	3000±2646 a

Elaborado por: (Los Autores, 2022).

Nota: Los valores que comparten letra son estadísticamente iguales con un nivel de significancia de 0,05.

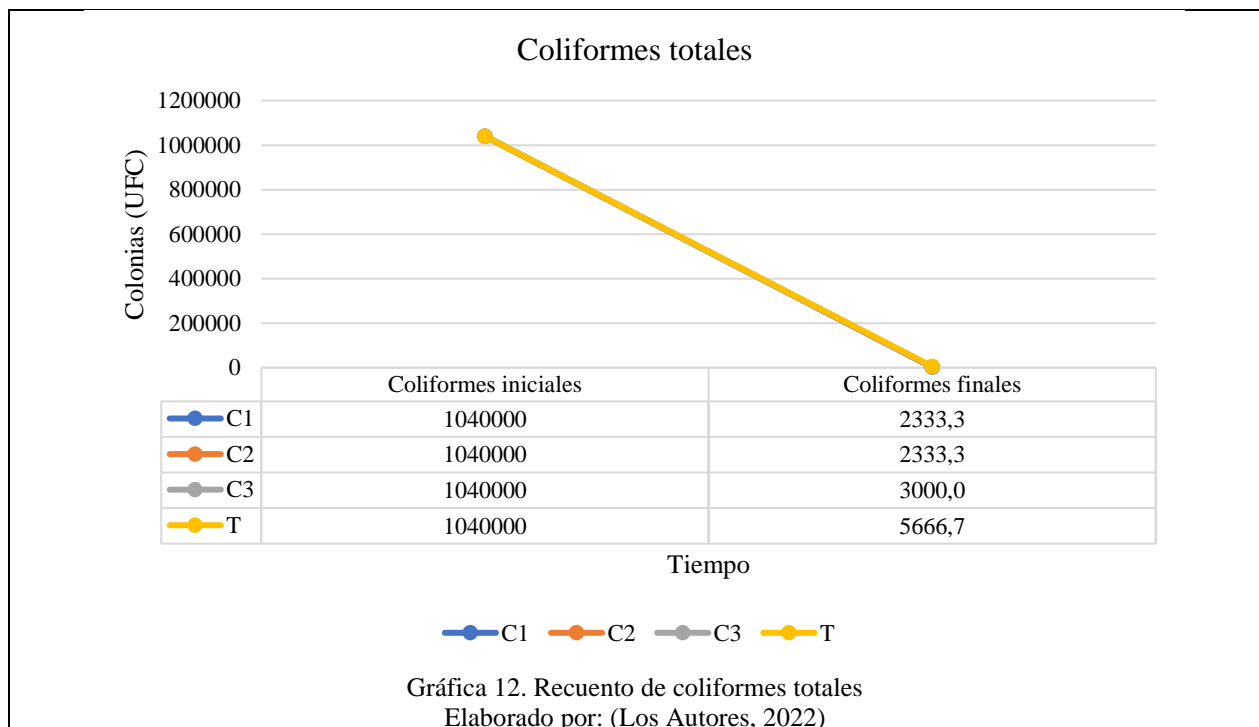
### 4.5.1 DBO<sub>5</sub>



El porcentaje de reducción de la DBO<sub>5</sub> tras cuatro semanas de tratamiento fue de 87,8 %, siendo un valor semejante al que obtuvo Cho (2016) en 8 días, esto debido a la concentración y el volumen utilizado en su experimento, donde el que inóculo inicial fue de 6 g/ 500 mL. Por otra parte, Oralte & Valencia (2016) registraron una reducción de 30,92 % en la mitad de tiempo del presente ensayo, con condiciones semejantes a excepción del inóculo, que fue de 0,6 g/L. Lo que demuestra una reducción superior a mayor inóculo inicial y/o a mayor tiempo del experimento.

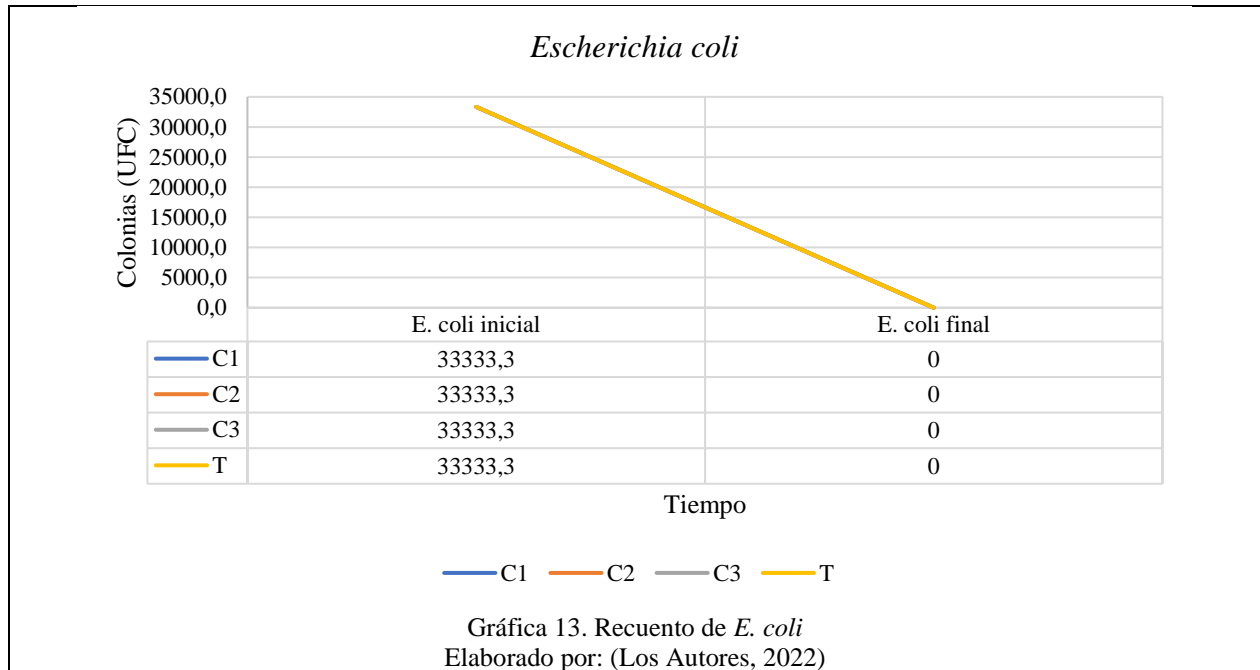
## 4.5.2 Indicadores microbiológicos

### 4.5.2.1 Coliformes totales



El análisis estadístico de coliformes no mostró una diferencia significativa para ninguno de los tratamientos y alcanzó un porcentaje de remoción de bacterias del 99,71; 99,78; 99,78 % para C1, C2 y C3 respectivamente, y del 99,46 % en el caso del grupo control. Resultados similares a los de Gupta et al. (2016) en donde se utilizó una cepa de *Chlorella* y *Scenedesmus* para el tratamiento de aguas residuales, obteniendo una eliminación del 99,93 % para coliformes totales y del 100 % para fecales.

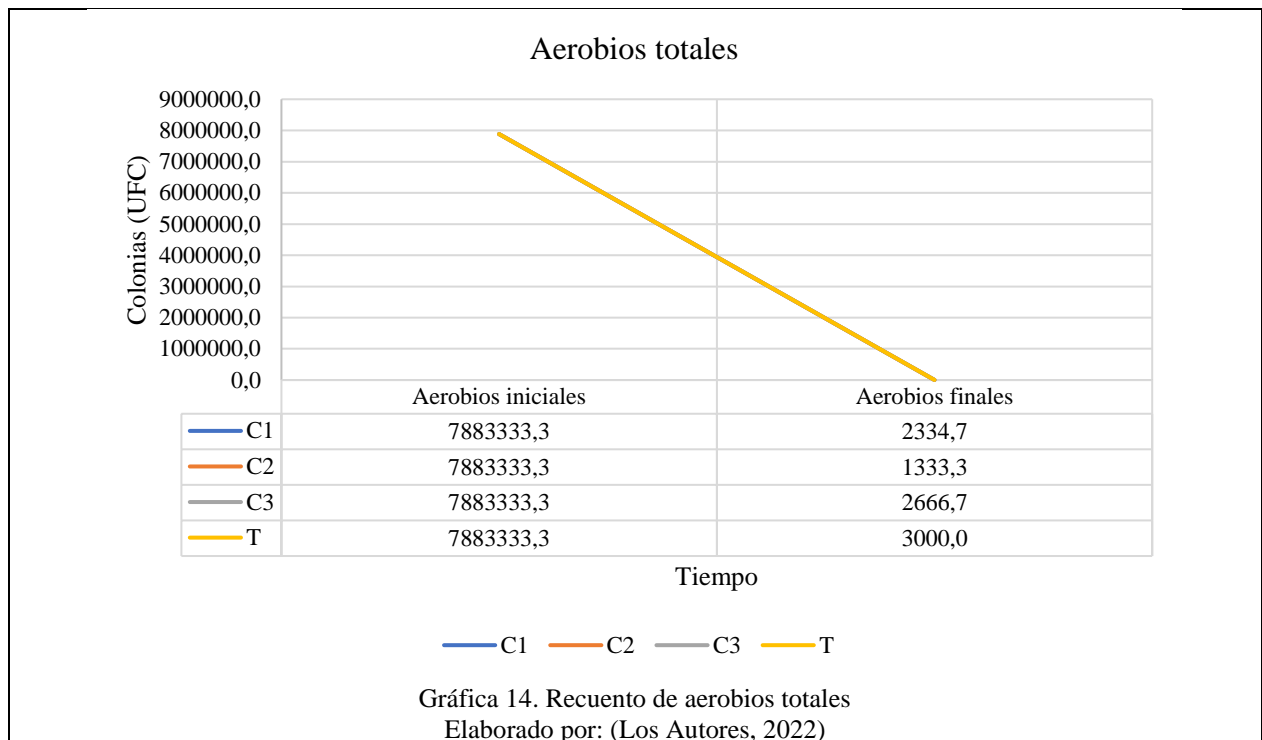
#### 4.5.2.2 *E. coli*



En el experimento de crecimiento/ ausencia de 188 cepas *Escherichia coli* en función del pH, Haberbeck et al. (2015) destacan la importancia de la acidez en un rango de 3,5 y 4,5 para el desarrollo óptimo de esta bacteria; siendo el crecimiento inversamente proporcional al pH del medio, es decir que, a menor pH, mayor crecimiento.

Por otra parte, Matula et al. (2021) plantean que el incremento celular de *Chlorella* en un medio de aguas residuales sin control de pH, permite la liberación de iones de hidróxido a través de la membrana celular a raíz de la fijación de productos de carbono inorgánico, lo que provoca el aumento de pH, comportamiento que se observó en el presente ensayo y motivo por el cual resulta un ambiente hostil para *E. coli* y otras bacterias. Es por esto por lo que el descenso en el crecimiento de esta bacteria fue del 100 % al igual que lo reportado por Hernández (2014).

#### 4.5.2.3 *Aerobios totales*



Se reportó un descenso del 99,70; 99,83; 99,66 y 99,61 % para C1, C2, C3 y Testigo respectivamente, sin existir diferencia estadística significativa entre estos. Este resultado se respalda con el estudio realizado por Darvishmotevalli (2019), donde muestra la eficacia en la reducción de contaminantes y parámetros microbianos tras combinar un tratamiento primario en tanques Imhoff con uno secundario de humedales artificiales, obteniéndose resultados de eliminación hasta 99,999 % para aerobios y coliformes totales, fecales, parásitos de nemátodos intestinales y quistes de protozoos. Lo que respalda el beneficio de usar varios tratamientos de aguas residuales en conjunto para optimizar los resultados.

## 5 Conclusiones

Se concluye que la implementación de *Chlorella sp.* en el tratamiento de aguas residuales urbanas provenientes del punto de vertido logró reducir las concentraciones de contaminantes presentes en las muestras, pero el  $\text{NH}_4$  fue el único que alcanzó los límites máximos permisibles exigidos por la Legislación Ambiental Ecuatoriana. Por otra parte, C3 fue el mejor tratamiento para la remoción de  $\text{NO}_3$ ,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{NH}_4$  y  $\text{DBO}_5$  debido a que la velocidad de biorremediación fue superior a los demás tratamientos en relación directa a su concentración de inóculo.

El conteo celular permitió identificar las 5 fases características de una curva típica de crecimiento de microalgas para *Chlorella sp.*, aunque también se evidenció el desarrollo de microalgas propias del medio (*Scenedesmus*) en el grupo control, debido a las variables reguladas de luz y oxígeno, así como la presencia de nutrientes de las muestras de agua. Entonces, el metabolismo de las microalgas incrementó el pH del medio lo que dio a lugar a la disminución significativa de la población bacteriana.

## 6 Bibliografía

- Abascal, E., Gómez-Coma, L., Ortiz, I., & Ortiz, A. (2022). Global diagnosis of nitrate pollution in groundwater and review of removal technologies. *Science of the Total Environment*, 810. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.152233>
- Abbott, B. W., Bishop, K., Zarnetske, J. P., Minaudo, C., Chapin, F. S., Krause, S., Hannah, D. M., Conner, L., Ellison, D., Godsey, S. E., Plont, S., Marçais, J., Kolbe, T., Huebner, A., Frei, R. J., Hampton, T., Gu, S., Buhman, M., Sara Sayedi, S., ... Pinay, G. (2019). Human domination of the global water cycle absent from depictions and perceptions. *Nature Geoscience*, 12(7), 533–540. <https://doi.org/10.1038/s41561-019-0374-y>
- Amenorfenyo, D. K., Huang, X., Zhang, Y., Zeng, Q., Zhang, N., Ren, J., & Huang, Q. (2019). Microalgae brewery wastewater treatment: Potentials, benefits and the challenges. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(11). <https://doi.org/10.3390/ijerph16111910>
- Amit, & Chandra. (2017). Phycoremediation potential of marine microalga *Tetraselmis indica* on secondary treated domestic sewage for nutrient removal and biodiesel production. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(26), 20868–20875. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9734-6>
- Ansa, E. D. O., Awuah, E., Andoh, A., Banu, R., Dorgbetor, W. H. K., Lubberding, H. J., & Gijzen, H. J. (2015). A Review of the Mechanisms of Faecal Coliform Removal from Algal and Duckweed Waste Stabilization Pond Systems. *American Journal of Environmental Sciences*, 11(1), 28–34. <https://doi.org/10.3844/AJESSP.2015.28.34>
- Aparicio, E. G. (2017). *Técnicas colorimétricas Colorimetric techniques “La colorimetría es la ciencia que estudia la medida de los colores.”*

- Arguelles, E. D., & Martinez-Goss, M. R. (2021). Lipid accumulation and profiling in microalgae *Chlorolobion* sp. (BIOTECH 4031) and *Chlorella* sp. (BIOTECH 4026) during nitrogen starvation for biodiesel production. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02126-z>
- Asadi, P., Rad, H. A., & Qaderi, F. (2019). Comparison of *Chlorella vulgaris* and *Chlorella sorokiniana* pa.91 in post treatment of dairy wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(28), 29473–29489. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06051-8>
- Asamblea Nacional del Ecuador. (2015). *Ley orgánica de Aprovechamiento del Agua*. 1–23.
- Asanka, S., & Herath, K. (2021). *Anti-inflammatory mechanisms of fucoidans to treat inflammatory diseases: A review / Signed in. Review*. <https://bibliotecas.upse.edu.ec:2226/record/display.uri?eid=2-s2.0-85120562333&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=algae&nlo=&nlr=&nls=&sid=1c6614e7514d84d34f7982651d532913&sot=b&sdt=sisr&sl=20&s=TITLE-ABS-KEY%28algae%29&ref=%28skin%29&relpos=107&citeCnt=0&searchTerm=>
- Ashaolu, T. J., Samborska, K., Lee, C. C., Tomas, M., Capanoglu, E., Tarhan, Ö., Taze, B., & Jafari, S. M. (2021). Phycocyanin, a super functional ingredient from algae; properties, purification characterization, and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2320–2331. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.11.064>
- Authman, M. M. (2015). Use of Fish as Bio-indicator of the Effects of Heavy Metals Pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 06(04). <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>



- Baeza, E. (2016). Calidad del Agua Final. *Bcn*, 56, 11.  
[https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/23747/2/Calidad del Agua Final.pdf](https://obtienearchivo.bcn.cl/obtienearchivo?id=repositorio/10221/23747/2/Calidad%20del%20Agua%20Final.pdf)
- Baidya, A., Akter, T., Islam, M. R., Shah, A. K. M. A., Hossain, M. A., Salam, M. A., & Paul, S. I. (2021). Effect of different wavelengths of LED light on the growth, chlorophyll,  $\beta$ -carotene content and proximate composition of *Chlorella ellipsoidea*. *Heliyon*, 7(12), e08525.  
<https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2021.E08525>
- Balasubramaniam, V., Devi-Nair Gunasegavan, R., Mustar, S., Chelyn Lee, J., Fairulnizal Mohd Noh, M., Díaz-Marrero, A. R., & Javier Fernández Castro, J. (2021). *molecules Isolation of Industrial Important Bioactive Compounds from Microalgae*.  
<https://doi.org/10.3390/molecules26040943>
- Béchet, Q., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1648–1663.  
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Benavides, A. M., Ranglová, K., Malapascua, J. R., Masojídek, J., & Torzillo, G. (2017). Diurnal changes of photosynthesis and growth of *Arthrospira platensis* cultured in a thin-layer cascade and an open pond. *Algal Research*, 28(October), 48–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.10.007>
- Benedetti, M. (2018). Biomass from microalgae: The potential of domestication towards sustainable biofactories. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–19.  
<https://doi.org/10.1186/s12934-018-1019-3>

- Bhateria, R., & Jain, D. (2016). Water quality assessment of lake water: a review. *Cross Mark*.  
<https://doi.org/10.1007/s40899-015-0014-7>
- Blanken, W., Cuaresma, M., Wijffels, R. H., & Janssen, M. (2013). Cultivation of microalgae on artificial light comes at a cost. *Algal Research*, 2(4), 333–340.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.09.004>
- Bosch, N. S., & Bingham, S. A. (2019). Blue-green algae (*cyanobacteria*) patterns and prediction in 12 lakes in Kosciusko County, Indiana. *Proceedings of the Indiana Academy of Science*, 128(1), 1–12.
- Brück, T. B., Balasubramaniam, A., Brück, W. M., Ahmadzadeh, H., Molazadeh, M., Pourianfar, H. R., Lyon, S., & Rampelotto, P. H. (2019). The Use of Microalgae for Coupling Wastewater Treatment With CO<sub>2</sub> Biofixation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology / Www.Frontiersin.Org*, 1, 42. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00042>
- Bunce, J. T. (2018). A review of phosphorus removal technologies and their applicability to small-scale domestic wastewater treatment systems. In *Frontiers in Environmental Science* (Vol. 6, Issue FEB). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2018.00008>
- Campanella, B., Onor, M., D'Ulivo, A., Gianecchini, R., D'Orazio, M., Petrini, R., & Bramanti, E. (2016). Human exposure to thallium through tap water: A study from Valdicastello Carducci and Pietrasanta (northern Tuscany, Italy). *Science of the Total Environment*, 548–549, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.010>
- Campos, A. (2016). Distribución per cápita del agua en el Ecuador. *Revista de Ciencias Naturales y Ambientales*, 10(1), 29–36.

- Catone, C. M., Ripa, M., Geremia, E., & Ulgiati, S. (2021). Bio-products from algae-based biorefinery on wastewater: A review. *Journal of Environmental Management*, 293(May), 112792. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112792>
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., & Morales, E. (2004). *Uso de Chlorella sp. y Scenedesmus sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y dco de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela.*
- Cho, H. J. (2016). Dairy wastewater treatment using microalgae for potential biodiesel application. *Environmental Engineering Research*, 21(4), 393–400. <https://doi.org/10.4491/eer.2015.151>
- Churuchumbi, G. (2020). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial.* 204.
- Congreso Nacional. (2004). Ley de Gestión Ambiental, Codificación. *Bulgarian Medicine.*
- Darvishmotevalli, M., Moradnia, M., Asgari, A., Noorisepehr, M., & Mohammadi, H. (2019). Reduction of pathogenic microorganisms in an imhoff tank-constructed wetland system. *Desalination and Water Treatment*, 154(January), 283–288. <https://doi.org/10.5004/dwt.2019.24044>
- de Luca, D., Kooistra, W. H. C. F., Sarno, D., Gaonkar, C. C., & Piredda, R. (2019). Global distribution and diversity of Chaetoceros (Bacillariophyta, Mediophyceae): Integration of classical and novel strategies. *PeerJ*, 2019(8), e7410. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.7410/SUPP-11>
- Delavari, H., & Khoobkar, Z. (2021). Using Phycocyanin as Spectral Converter on the Growth Parameters and Lipid Content of the Green Microalga Chlorella sp. in a Double Layer Flat Panel Photobioreactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(4), 940–951. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03479-4>

- Delgadillo, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, *11*, 18–26. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2016.04.003>
- Devaraja, S., Bharath, M., Deepak, K., Suganya, B., Bs, V., Swaminathan, D., Meyyappan, & N. (2017). *Adv Biotech & Micro Studies on the Effect of Red, Blue and White LED Lights on the Productivity of Chlorella Vulgaris to Treat Dye Industry Effluent*. <https://doi.org/10.19080/AIBM.2017.06.555682>
- Díaz, J., & Granada, A. (2018). Efecto de las actividades antrópicas sobre las características fisicoquímicas y microbiológicas del río Bogotá a lo largo del municipio de Villapinzón, Colombia Effect of anthropic activities on the physicochemical and microbiological characteristics of t. *Rev. Fac. Med*, *66*(1), 45–52. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v66n1.59728>
- Dorr, L. J. (2014). *Two Important Floras Treating Malagasy Trees and Beans The Leguminosae of Madagascar by David J . Du Puy ; Jean-Noël Labat ; Raymond Rabevohitra ; Jean-François Villiers ; Jean Bosser ; Justin Moat ; Generic Tree Flora of Madagascar by George E . Schatz ; 18–20.*
- Eawag, D. (2014). *Imhoff Tank | SSWM - Find tools for sustainable sanitation and water management!* <https://sswm.info/es/factsheet/imhoff-tank>
- Ecuador, C. de la R. del. (2008). *CONSTITUCION DE LA REPUBLICA DEL ECUADOR 2008*. [www.lexis.com.ec](http://www.lexis.com.ec)
- Edmundson, S. J., & Huesemann, M. H. (2015). The dark side of algae cultivation: Characterizing night biomass loss in three photosynthetic algae, *Chlorella sorokiniana*, *Nannochloropsis*

- salina* and *Picochlorum* sp. *Algal Research*, 12, 470–476.  
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2015.10.012>
- El-Sheekh, M. (2020). Molecular identification, biomass, and biochemical composition of the marine chlorophyte *Chlorella* sp. MF1 isolated from Suez Bay. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00044-8>
- EMAPAAC EP. (2021, December). *EMAPAAC EP | Agua Potable y Saneamiento*.  
<https://emapaac.gob.ec/emapaac-aguapotable-saneamiento.php>
- Eze, V. C., Velasquez-Orta, S. B., Hernández-García, A., Monje-Ramírez, I., & Orta-Ledesma, M. T. (2018). Kinetic modelling of microalgae cultivation for wastewater treatment and carbon dioxide sequestration. *Algal Research*, 32, 131–141.  
<https://doi.org/10.1016/J.ALGAL.2018.03.015>
- Falasco, E., Blanco Lanza, S., Bona, F., Gomá Martínez, J., Hlubikova, D., Novais, M. H., Hoffmann, L., & Ector, L. (2009). *Taxonomy, morphology and distribution of the Sellaphora stroemii complex (Bacillariophyceae)*. <http://hdl.handle.net/10612/7111>
- Nadal, A., Fortunato, P., Aguirre, S., Zamar, J., & Larrosa, N. (2017). *Modelación de oxígeno disuelto y DBO5 con tasas cinéticas determinadas experimentalmente: Un aporte para la gestión del arroyo Chicamtoltina*. 23–30.
- Fučíková, K., Lewis, P. O., Neupane, S., Karol, K. G., & Lewis, L. A. (2019). Order, please! Uncertainty in the ordinal-level classification of Chlorophyceae. *PeerJ*, 2019(5), e6899.  
<https://doi.org/10.7717/PEERJ.6899/SUPP-8>
- Galicia, A., Díaz, L., Arrieta, J., & Habana Lorena, L. (2017). *Desplazamiento de la práctica de diluciones entre la comunidad de ingenieros bioquímicos y la escuela Core*.

- Galindo, M. (2018). La pirámide de Kelsen o jerarquía normativa en la nueva CPE y el nuevo derecho autonómico. *Revista Jurídica Derecho*, 7(9), 126–148. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2413-28102018000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2413-28102018000200008&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Gao, F., Peng, Y. Y., Li, C., Yang, G. J., Deng, Y. B., Xue, B., & Guo, Y. M. (2018). Simultaneous nutrient removal and biomass/lipid production by *Chlorella sp.* in seafood processing wastewater. *Science of the Total Environment*, 640–641, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.380>
- García, C., & Arbib, Z. (2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Redalyc*, 1. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=353539900003>
- García, C., Baselga, B., García, A., Igual, J. M., Lopez, V., & Costas, E. (2013). Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology*, 144–145, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.003>
- Garfí, M., Flores, L., & Ferrer, I. (2017). Life Cycle Assessment of wastewater treatment systems for small communities: Activated sludge, constructed wetlands and high rate algal ponds. *Journal of Cleaner Production*, 161, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.05.116>
- Genau, M., & Selektiv. (2019). *Conductivity Handbook MEASUREMENT TECHNIQUE THEORY AND TIPS FOR PRACTICAL APPLICATION*. [www.XylemAnalytics.com](http://www.XylemAnalytics.com)
- Ghosh, A., Khanra, S., Mondal, M., Halder, G., Tiwari, O. N., Saini, S., Bhowmick, T. K., & Gayen, K. (2016). Progress toward isolation of strains and genetically engineered strains of microalgae for production of biofuel and other value added chemicals: A review. *Energy*

- Conversion and Management*, 113, 104–118.  
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.01.050>
- Gimpel, J. A., Henríquez, V., & Mayfield, S. P. (2015). In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: Potential and challenges come with great diversity. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01376>
- Gorski, L., Rivadeneira, P., & Cooley, M. B. (2019). *Minireview New strategies for the enumeration of enteric pathogens in water*. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12786>
- Grizzetti, B., Bouraoui, F., Billen, G., van Grinsven, H., Cardoso, A. C., Thieu, V., Garnier, J., Curtis, C., Howarth, R., & Johnes, P. (2011). Nitrogen as a threat to European water quality. *The European Nitrogen Assessment*, 379–404.  
<https://doi.org/10.1017/cbo9780511976988.020>
- Gupta, S. K., Ansari, F. A., Shriwastav, A., Sahoo, N. K., Rawat, I., & Bux, F. (2016). Dual role of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus obliquus* for comprehensive wastewater treatment and biomass production for bio-fuels. *Journal of Cleaner Production*, 115, 255–264.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.12.040>
- Gupta, S., Pawar, S. B., & Pandey, R. A. (2019). Current practices and challenges in using microalgae for treatment of nutrient rich wastewater from agro-based industries. In *Science of the Total Environment* (Vol. 687, pp. 1107–1126). Elsevier B.V.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.115>
- Gurbuz, F., Uzunmehmetoğlu, O. Y., Diler, Ö., Metcalf, J. S., & Codd, G. A. (2016). Occurrence of microcystins in water, bloom, sediment and fish from a public water supply. *Science of the Total Environment*, 562, 860–868. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.027>

- Haberbeck, L. U., Oliveira, R. C., Vivijs, B., Wenseleers, T., Aertsen, A., Michiels, C., & Geeraerd, A. H. (2015). Variability in growth/no growth boundaries of 188 different *Escherichia coli* strains reveals that approximately 75 % have a higher growth probability under low pH conditions than *E. coli* O157:H7 strain ATCC 43888. *Food Microbiology*, *45*(PB), 222–230. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2014.06.024>
- Han, S. F., Jin, W., Abomohra, A. E. F., Tu, R., Zhou, X., He, Z., Chen, C., & Xie, G. jun. (2019). Municipal Wastewater Enriched with Trace Metals for Enhanced Lipid Production of the Biodiesel-Promising Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioenergy Research*, *12*(4), 1127–1133. <https://doi.org/10.1007/s12155-019-10042-5>
- Hanson, D. T., Collins, A. M., Jones, H. D. T., Roesgen, J., Lopez-Nieves, S., & Timlin, J. A. (2014). On-line stable isotope gas exchange reveals an inducible but leaky carbon concentrating mechanism in *Nannochloropsis salina*. *Photosynthesis Research*, *121*(2–3), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s11120-014-0001-0>
- Hantke-domas, M., & Jouravlev, A. (2012). Network for Cooperation in Integrated Water Resource Management for Sustainable Development in Latin America and the Caribbean. *United Nations Economic Commission for Latin America and the Caribbean (ECLAC)*, No. 36, 1–8.
- Hassan, N. (2020). Water Quality Parameters. *Water Quality - Science, Assessments and Policy*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.89657>
- Helmenstine, A. (2021, August 5). *How to Calculate pH - Formula and Examples*. <https://sciencenotes.org/how-to-calculate-ph-formula-and-examples/>
- Hernández, 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>



- Higgins, B. T., Gennity, I., Fitzgerald, P. S., Ceballos, S. J., Fiehn, O., & VanderGheynst, J. S. (2018). Algal–bacterial synergy in treatment of winery wastewater. *Npj Clean Water*, *1*(1). <https://doi.org/10.1038/S41545-018-0005-Y>
- Hildebrand, M., Abbriano, R. M., Polle, J. E. W., Traller, J. C., Trentacoste, E. M., Smith, S. R., & Davis, A. K. (2013). Metabolic and cellular organization in evolutionarily diverse microalgae as related to biofuels production. *Current Opinion in Chemical Biology*, *17*(3), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.02.027>
- Hu, Z., & d Grasso, S. (2005). Chemical Oxygen Demand. *Elsevier*.
- INEC. (2010). Resultados del Censo 2010 de población y vivienda en el Ecuador. *Fascículo Provincial Pichincha*, 0–7.
- Janssen, M. (2016). Microalgal Photosynthesis and Growth in Mass Culture. In *Advances in Chemical Engineering* (1st ed., Vol. 48). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ache.2015.11.001>
- Jehlík, T., Kodrík, D., Křišťůfek, V., Koubová, J., Sábová, M., Danihlík, J., Tomčala, A., & Čapková Frydrychová, R. (2019). Effects of *Chlorella sp.* on biological characteristics of the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, *50*(4), 564–577. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00670-3>
- Jin, J., Dupré, C., Legrand, J., & Grizeau, D. (2016). Extracellular hydrocarbon and intracellular lipid accumulation are related to nutrient-sufficient conditions in pH-controlled chemostat cultures of the microalga *Botryococcus braunii* SAG 30.81. *Algal Research*, *17*, 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.007>

- Kandasamy, G., & Shaleh, S. R. M. (2017). Harvesting of the Microalga *Nannochloropsis sp.* by Bioflocculation with Mung Bean Protein Extract. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(2), 586–597. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2346-7>
- Katiyar, R., Gurjar, B. R., Biswas, S., Pruthi, V., Kumar, N., & Kumar, P. (2017). Microalgae: An emerging source of energy based bio-products and a solution for environmental issues. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 72, pp. 1083–1093). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.10.028>
- Keeton, J. T. (2011). Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease. *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-616-0>
- Kelaiya, S. V., & Chauhan, P. M. (2018). *Studies on Properties of Biodiesel Prepared from Microalgae (Chlorella sp.)* (pp. 53–66). [https://doi.org/10.1007/978-981-10-6107-3\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-10-6107-3_4)
- Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. D. (2018). The promising future of microalgae: Current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. In *Microbial Cell Factories* (Vol. 17, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Kiel, B., David, R., Heath, W. F., & Morse, M. Z. J. W. (2011). *Examination and Refinement of the Determination of Aqueous Hydrogen Sulfide by the Methylene Blue Method*. 567–582. <https://doi.org/10.1007/s10498-011-9128-1>
- Kijjoa, A., & Sawangwong, P. (2004). Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs*, 2(2), 73–82. <https://doi.org/10.3390/MD202073>
- Kim, E. J., Jung, W., Lim, S., Kim, S., Choi, H. G., & Han, S. J. (2019). Lipid Production by Arctic Microalga *Chlamydomonas sp.* KNF0008 at Low Temperatures. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 188(2), 326–337. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2921-1>

- Kiran Kumar, P., Vijaya Krishna, S., Verma, K., Pooja, K., Bhagawan, D., Srilatha, K., & Himabindu, V. (2018). Bio oil production from microalgae via hydrothermal liquefaction technology under subcritical water conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 153, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.014>
- Kılıç, Z. (2021). *Water Pollution: Causes, Negative Effects and Prevention Methods*. 3(1), 129–132. <https://doi.org/10.47769/izufbed.862679>
- Kouzuma, A., & Watanabe, K. (2019). Molecular approaches for the analysis of natural attenuation and bioremediation. In *Comprehensive Biotechnology* (Third Edit, Vol. 6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64046-8.00337-2>
- Krasner, S. (2009). Occurrence of disinfection byproducts in United States wastewater treatment plant effluents. *Environmental Science and Technology*, 43(21), 8320–8325. <https://doi.org/10.1021/es901611m>
- Kumar, K. (2015). Recent trends in the mass cultivation of algae in raceway ponds. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 51, 875–885. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.06.033>
- Kumar, S. (2015). A Dual Role of Marine Microalga *Chlorella* sp. (PSDK01) in Aquaculture Effluent with Emphasis on Initial Population Density. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 40(1), 29–35. <https://doi.org/10.1007/s13369-014-1498-4>
- Kusmita, L., Mutmainah, N. F. N., Sabdono, A., Trianto, A., Radjasa, O. K., & Pangestuti, R. (2021). Characteristic evaluation of various formulations of anti-aging cream from carotenoid extract of bacterial symbiont *Virgibacillus salarius* strain 19.PP.Sc1.6. *Cosmetics*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/cosmetics8040120>
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Vanhatalo, A., & Jaakkola, S. (2019). The effect of partial substitution of rapeseed meal and faba beans by *Spirulina*

- platensis microalgae on milk production, nitrogen utilization, and amino acid metabolism of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 7102–7117. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16213>
- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. *Algal Research*, 12, 497–512. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.10.004>
- Leu, S., & Boussiba, S. (2014). Advances in the Production of High-Value Products by Microalgae. *Industrial Biotechnology*, 10(3), 169–183. <https://doi.org/10.1089/ind.2013.0039>
- Liu, J., Song, Y., & Qiu, W. (2017). Oleaginous microalgae *Nannochloropsis* as a new model for biofuel production: Review & analysis. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 72(May 2016), 154–162. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.12.120>
- Liu, N., Li, F., Ge, F., Tao, N., Zhou, Q., & Wong, M. (2015). Mechanisms of ammonium assimilation by *Chlorella vulgaris* F1068: Isotope fractionation and proteomic approaches. *Bioresource Technology*, 190, 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.024>
- López, D., Bauer, M., Hornung, U., Posten, C., Kruse, A., & Prins, W. (2015). Cultivation of microalgae with recovered nutrients after hydrothermal liquefaction. *Algal Research*, 9, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.007>
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E., Dominguez, R., Pateiro, M., Saraiva, J. A., & Franco, D. (2018). Main groups of microorganisms of relevance for food safety and stability: General aspects and overall description. In *Innovative technologies for food preservation: Inactivation of spoilage and pathogenic microorganisms*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811031-7.00003-0>

- Ma, Y., Galinski, E. A., Grant, W. D., Oren, A., & Ventosa, A. (2010). Halophiles 2010: Life in saline environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(21), 6971–6981. <https://doi.org/10.1128/AEM.01868-10>
- Martínez, H. L. R., Manjarrez, M. P., Reyes, A. V. G., Trevizo, C. L. G., Fonseca, S. L. M., & Avalos, G. G. L. (2017). Arsenic bioremediation mediated by genetically modified microorganisms | Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados. *Terra Latinoamericana*, 35(4), 353–361.
- Mata, T. M., Martins, A. A., & Caetano, N. S. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(1), 217–232. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Mathimani, T., Uma, L., & Prabakaran, D. (2018). Formulation of low-cost seawater medium for high cell density and high lipid content of *Chlorella vulgaris* BDUG 91771 using central composite design in biodiesel perspective. *Journal of Cleaner Production*, 198, 575–586. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.06.303>
- Matula, E. E., & Nabity, J. A. (2021). Metabolic response of *Chlorella vulgaris* to a transient thermal environment for supporting simultaneous air revitalization and thermal control in a crewed habitat. *Acta Astronautica*, 187, 406–415. <https://doi.org/10.1016/j.actaastro.2021.07.003>
- Medrano, J., Aguirre, A. A., Encalada, P., Yerovi, R., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2021). Slaughtering and piggery wastewater for cultivation and biomass generation of *Chlorella vulgaris*. *Bionatura*, 6(2), 1824–1831. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.02.24>
- Melo, J. M., Telles, T. S., Ribeiro, M. R., de Carvalho Junior, O., & Andrade, D. S. (2022). *Chlorella sorokiniana* as bioremediator of wastewater: Nutrient removal, biomass production,

- and potential profit. *Bioresource Technology Reports*, 17, 100933.  
<https://doi.org/10.1016/J.BITEB.2021.100933>
- Metsoviti, M. N., Papapolymerou, G., Karapanagiotidis, I. T., & Katsoulas, N. (2019). Effect of Light Intensity and Quality on Growth Rate and Composition of *Chlorella vulgaris*. *Plants* 2020, Vol. 9, Page 31, 9(1), 31. <https://doi.org/10.3390/PLANTS9010031>
- Middleton, A. J., Vanderbeld, B., Bredow, M., Tomalty, H., Davies, P. L., & Walker, V. K. (2014). *Plant Cold Acclimation*. 1166, 255–277. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0844-8>
- Mikelonis, A. (2010). Honduran Imhoff Tanks: Potentials and Pitfalls. *Journal of Water Management Modeling*, January. <https://doi.org/10.14796/jwmm.r236-22>
- Misstear, B., Banks, D., & Clark, L. (2017). *Appendix 5 FAO Irrigation Water Quality Guidelines*.
- Mohamed, A.-L. F., & Ainane, A. (2021). *Dietary supplements based on microalgae for diabetics with covid-19: challenges and future perspectives*.  
<https://bibliotecas.ups.edu.ec:2226/record/display.uri?eid=2-s2.0-85122808319&origin=resultslist&sort=plf-f&src=s&st1=microalgae&nlo=&nlr=&nls=&sid=6b315caa86fe7bc8ff45bb0e6bfddc27&sot=b&sdt=sisr&sl=25&s=TITLE-ABS-KEY%28microalgae%29&ref=%28cosmetic%29&re>
- Mohsenpour, S. F., Hennige, S., Willoughby, N., Adeloye, A., & Gutierrez, T. (2021). Integrating micro-algae into wastewater treatment: A review. *Science of The Total Environment*, 752, 142168. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.142168>
- Molazadeh, M. (2019). The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO<sub>2</sub> biofixation. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Issue MAR). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00042>

- Morales, E., Chacón, Andrade, Araujo, & Cárdenas. (2004). Uso de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín de Investigaciones Biológicas de La Universidad Del Zulia.*, Vol. 38, 94 – 108.
- Motevalli, M. D., Sharafi, H. G., & Sharafi, K. (2015). Available Online through ( conventional activated sludge ) effluent of tomato paste factory for agricultural irrigation - a case study. January 2020.
- Mourelle, M., & Gómez, C. (2017). cosmetics The Potential Use of Marine Microalgae and Cyanobacteria in Cosmetics and Thalassotherapy. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4040046>
- Navarro, L., & Costa, P. (2003). Situación de las aguas residuales en la localidad de Cayambe. 135–145.
- Ni Aung, Z., & Myo Swe, Z. (2019). Observational Study of Wastewater Treatment by the Use of Microalgae. *International Journal of Science and Engineering Applications*, 8(7), 186–191. <https://doi.org/10.7753/ijsea0807.1004>
- Nicholls, K. H., & Wujek, D. E. (2015). *Chrysophyceae and Phaeothamniophyceae*. In *Freshwater Algae of North America: Ecology and Classification*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385876-4.00012-8>
- Niizawa, I., Espinaco, B. Y., Zorrilla, S. E., & Sihufe, G. A. (2021). Astaxanthin production by autotrophic cultivation of *Haematococcus pluvialis*: A success story. *Global Perspectives on Astaxanthin*, 71–89. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823304-7.00005-2>
- Niwa, Y., Matsuo, T., Onai, K., Kato, D., Tachikawa, M., & Ishiura, M. (2013). Phase-resetting mechanism of the circadian clock in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*, 110(33), 13666–13671.

<https://doi.org/10.1073/PNAS.1220004110>

Olguín, E. J. (2012). Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>

Omari, Z., Zerrouki, D., & Djaafri, M. (2018). Open pond culture of green algae *Chlorella sp.* Using municipal wastewater as medium in an arid desert. In *Advances in Science, Technology and Innovation* (pp. 1545–1547). Springer Nature. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-70548-4\\_449](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70548-4_449)

Oralte, E., & Valencia, M. (2016). *Evaluación del uso de la microalga Chlorella vulgaris en el tratamiento de aguas residuales industriales (Vinazas)*.

Otondo, A., Kokabian, B., Stuart-Dahl, S., & Gude, V. G. (2018). Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3213–3222. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.064>

Ouaer, M., Turki, N., Kallel, A., Halaoui, M., Trabelsi, I., & Hassen, A. (2020). Recovery of landfill leachate as culture medium for two microalgae: *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* *Environment, Development and Sustainability*, 22(3), 2651–2671. <https://doi.org/10.1007/s10668-019-00314-7>

Owa, F. D. (2013). Water pollution: Sources, effects, control and management. *Mediterranean Journal of Social Sciences*, 4(8), 65–68. <https://doi.org/10.5901/mjss.2013.v4n8p65>

Pacheco, M., & Landa de Saá, Y. (2016). Cadena de valor apícola en Cuba: propuestas para estrategia de valorización de las exportaciones. *ECA Sinergia*, 7(2), 124. [https://doi.org/10.33936/ECA\\_SINERGIA.V7I2.395](https://doi.org/10.33936/ECA_SINERGIA.V7I2.395)



- Pakravan, S., Akbarzadeh, A., Sajjadi, M. M., Hajimoradloo, A., & Noori, F. (2018). *Chlorella vulgaris* meal improved growth performance, digestive enzyme activities, fatty acid composition and tolerance of hypoxia and ammonia stress in juvenile Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 24(1), 594–604. <https://doi.org/10.1111/anu.12594>
- Pangestuti, R., & Kim, S. K. (2011). Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, 3(4), 255–266. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2011.07.001>
- Park. (2019). Protective effects of *Hizikia fusiforme* and *Chlorella sp.* extracts against lead acetate-induced hepatotoxicity in rats. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1). <https://doi.org/10.1186/s41240-019-0119-2>
- Pattanaik, A., Sukla, L., & Pradhan, D. (2018). Effect of LED Lights on the Growth of Microalgae. *Inglomayor*, 17–24. <https://www.researchgate.net/publication/324797584>
- Piątek, J., Lenarczyk, J., Piątek, M., & Hilliard, D. (2020). Assessing morphological congruence in Dinobryon species and their stomatocysts, including a newly established Dinobryon pediforme-stomatocyst connection. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65997-9>
- Prasetya, F. S., Gastineau, R., Poulin, M., Lemieux, C., Turmel, M., Syakti, A. D., Hardivillier, Y., Widowati, I., Risjani, Y., Iskandar, I., Subroto, T., Falaise, C., Arsad, S., Safitri, I., Mouget, J. L., & Leignel, V. (2019). *Haslea nusantara* (bacillariophyceae), a new blue diatom from the Java Sea, Indonesia: Morphology, biometry and molecular characterization. *Plant Ecology and Evolution*, 152(2), 188–202. <https://doi.org/10.5091/PLECEVO.2019.1623>
- Pringsheim, E. (2016). *Pure Cultures of Algae*. <https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=HFqJDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA57&>

dq=pure+culture+algae+scholarly+articles&ots=9-ZvnSziKF&sig=DLHg-

1cm9wGwkFDiIFm\_iVkS53k#v=onepage&q&f=false

- Proaño, R. G. S., & Gualoto, K. J. G. (2018). Wastewater treatment of industrial loads with advanced oxidation in conventional systems. *Granja*, 27(1), 103–111. <https://doi.org/10.17163/lgr.n27.2018.08>
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28(May), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Rai, M. P., Gautam, T., & Sharma, N. (2015). Effect of salinity, pH, light intensity on growth and lipid production of microalgae for bioenergy application. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 15(4), 260–267. <https://doi.org/10.3844/ojbsci.2015.260.267>
- Rajivgandhi, G., & Ramachandran, G. (2022). Environmental Technology & Innovation Green microalgal strain *Chlorella vulgaris* isolated from industrial wastewater with remediation capacity. *Environmental Technology & Innovation*, 28, 102597. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2022.102597>
- Rambabu, K., Banat, F., Pham, Q. M., Ho, S. H., Ren, N. Q., & Show, P. L. (2020). Biological remediation of acid mine drainage: Review of past trends and current outlook. *Environmental Science and Ecotechnology*, 2, 100024. <https://doi.org/10.1016/j.es.2020.100024>
- Rames, E., Roiko, A., Stratton, H., & Macdonald, J. (2016). Technical aspects of using human adenovirus as a viral water quality indicator. *Water Research*, 96, 308–326. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.03.042>

- Ramírez, F., Loera, A., Jacques, M., Garneau, P., Avelar-González, F. J., Harel, J., & Lilián Guerrero-Barrera, A. (2015). *Waterborne Pathogens: Detection Methods and Challenges*. 4, 307–334. <https://doi.org/10.3390/pathogens4020307>
- Ramírez, J. (2017). Viabilidad en la producción de biomasa microalgal a partir de fotobioreactores solares en el Valle del Cauca, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 127–140.
- Ramos, E., Sforza, E., Morandini, M., & Bertucco, A. (2014). Cultivation of *Chlorella protothecoides* with urban wastewater in continuous photobioreactor: Biomass productivity and nutrient removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1470–1485. <https://doi.org/10.1007/S12010-013-0629-9/FIGURES/10>
- Ramos, R. (2016). ECORFAN ® Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2(5), 1–10.
- Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Growth and bioremediation capacity of *chlorella vulgaris* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola Lalandi* (Perciformes: *Carangidae*). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), 75–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572018000100075>
- Ranglová, K., Lakatos, G. E., Manoel, J. A. C., Grivalský, T., & Masojídek, J. (2019). Rapid screening test to estimate temperature optima for microalgae growth using photosynthesis activity measurements. *Folia Microbiologica*, 64(5), 615–625. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00738-8>
- Rao, P. S. (2014). Ammonium Nitrate. In *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition* (Third Edit, Vol. 1, Issue 3). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00235-9>

- Rasoul-Amini, S., Montazeri-Najafabady, N., Shaker, S., Safari, A., Kazemi, A., Mousavi, P., Mobasher, M. A., & Ghasemi, Y. (2014). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae free cells in bath culture system. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(2), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2013.09.003>
- Rathod, H. (2015). *Algae based waste water treatment*. January, 16. <https://doi.org/10.13140/2.1.1241.8885>
- Ren, Y., & Sun, H. (2021). *Carotenoid production from microalgae: Biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies*. Scopus. <https://doi.org/10.3390/md19120713>
- Rios, L. F. (2015). Nitrogen Starvation for Lipid Accumulation in the Microalga Species *Desmodesmus* sp. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1), 469–476. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1283-6>
- Roberts, E., York, N., San, C., Lisbon, F., Madrid, L., City, M., New, M., San, D., & Seoul, J. (2007). Water Quality Control Handbook, Second Edition. In *Chemistry 2002: International conference on water chemistry in nuclear reactors systems - operation optimisation and new developments*. McGraw-Hill Education. <https://doi.org/10.1036/0071467602>
- Romero, M. A., Ortiz, M. T., & Meza, L. D. (2018). La biorremediación con microalgas (*Spirulina máxima*, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Revista De Investigación, Desarrollo E Innovación*, 9(1), 163–176. <https://doi.org/10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153>
- Roselet, M., Roselet, F., & Abreu, P. C. (2019). Foam fractionator as a tool to remove dissolved organic matter and improve the flocculation of the marine microalga *Nannochloropsis oceanica*. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 2911–2919. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01801-0>

- Saad, A. (2016). Cultivation of Microalgae *Chlorella vulgaris* in airlift photobioreactor for Biomass Production using commercial NPK nutrients. *Al-Khwarizmi Engineering Journal*, 12(1), 90–99.
- Se-Kwon, K. (2015). *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances - Google Libros*. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0-PIBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=1WUaLy8AvQ&sig=eliQwYn3dzsyLG4SxEhIdOk-kA8&redir\\_esc=y#v=onepage&q=death phase&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=0-PIBAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=1WUaLy8AvQ&sig=eliQwYn3dzsyLG4SxEhIdOk-kA8&redir_esc=y#v=onepage&q=death phase&f=false)
- SENAGUA. (2016). Estrategia Nacional de Calidad del Agua. *Ministerio de Ambiente, Ecuador*, 97.
- Shaikh, S. M. R., Hassan, M. K., Nasser, M. S., Sayadi, S., Ayesh, A. I., & Vasagar, V. (2021). A comprehensive review on harvesting of microalgae using Polyacrylamide-Based Flocculants: Potentials and challenges. *Separation and Purification Technology*, 277(May), 119508. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2021.119508>
- Silva, D., Cardoso, L., de Jesus Silva, J., de Souza, C., Lemos, P. V. F., de Almeida, P. F., Ferreira, E. de S., Lombardi, A. T., & Druzian, J. I. (2022). Strategy for the cultivation of *Chlorella vulgaris* with high biomass production and biofuel potential in wastewater from the oil industry. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102204. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2021.102204>
- Singh, R. M., & Gupta, a. (2017). Water Pollution-Sources , Effects and Control Water Pollution-Sources , Effects and Control. *Research Gate*, 5(3), 1–17.
- Spellman, F. R. (2017). The drinking water handbook, third edition. *The Drinking Water Handbook, Third Edition*, 1–356. <https://doi.org/10.1201/9781315159126/DRINKING-WATER-HANDBOOK-FRANK-SPELLMAN>

- Stauffer, B., & Spuhler, D. (2014). *Imhoff Tank Factsheet*.
- Stoyneva-Gärtner, M. (2020). *cosmetics Enigmatic Microalgae from Aeroterrestrial and Extreme Habitats in Cosmetics: The Potential of the Untapped Natural Sources*. <https://doi.org/10.3390/cosmetics7020027>
- Su, Y. (2021). Revisiting carbon, nitrogen, and phosphorus metabolisms in microalgae for wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 762, 144590. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144590>
- Sümeyye, H. (2021). Investigation of the Characteristics and Growth of *Chlorella variabilis* via Biosorption of a Steel Industry Wastewater. *Journal of Water Chemistry and Technology*, 43(5), 423–431. <https://doi.org/10.3103/s1063455x21050064>
- Tafur, J. E., & Estrada, L. (2015). Tratamiento de aguas residuales in vitro por medio de la microalga *Chlorella sp* en el municipio de Barrancabermeja, Colombia. *CITECSA*, 6, 5–19. [www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/index](http://www.unipaz.edu.co/ojs/index.php/revcitecsa/index)
- Terneus, E., & Yanez, P. (2018). Principios fundamentales en torno a la calidad del agua, el uso de bioindicadores acuáticos y la restauración ecológica fluvial en Ecuador. *La Granja*, 27(1), 36–50.
- Tippery, N. P., Fučíková, K., Lewis, P. O., & Lewis, L. A. (2012). Probing the Monophyly of the Sphaeropleales (Chlorophyceae) Using Data From Five Genes. *Journal of Phycology*, 48(6), 1482–1493. <https://doi.org/10.1111/jpy.12003>
- Topare, N. S., Attar, S. J., & Manfe, M. M. (2011). Sewage / Wastewater Treatment Technologies : a Review. *Sci . Revs . Chem . Commun*, 1(1), 18–24.
- Truitt, L. N., Vazquez, K. M., Pfunter, R. C., Rideout, S. L., Havelaar, A. H., & Strawn, L. K. (2018). Microbial quality of agricultural water used in produce preharvest production on the

- eastern shore of Virginia. *Journal of Food Protection*, 81(10), 1661–1672.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-185>
- TULMAS. (2011). Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua. *TULMAS Texto Unificado de Legislación Secundaria Del Ministerio Del Ambiente*.
- Uzair, B. (2012). Exploring marine cyanobacteria for lead compounds of pharmaceutical importance. *The Scientific World Journal*, 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/179782>
- Vacca, V. A., Angulo, E. R., Puentes, D. M., Torres, J. G., & Plaza, M. E. (2017). Uso de la microalga *Chlorella sp.* viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil/Using the microalgae *Chlorella sp.* live suspended in decoloration wastewater from a textile factory. *Prospectiva*, 15(1), 93–99. <https://doi.org/10.15665/rp.v15i1.829>
- Varela, J., Burgués, C., & Rösch, C. (2020). Acceptability of genetically engineered algae biofuels in Europe: Opinions of experts and stakeholders. *Biotechnology for Biofuels*, 13(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01730-y>
- Venkatesan, J., Manivasagan, P., & Kim, S. K. (2015). Marine Microalgae Biotechnology: Present Trends and Future Advances. *Handbook of Marine Microalgae: Biotechnology Advances*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00001-7>
- Verma, K. (2020). Phycoremediation of Sewage-Contaminated Lake Water Using Microalgae–Bacteria Co-Culture. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(6). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04652-5>
- Vieira, M. (2021, December). *Microalgae as a potential functional ingredient: Evaluation of the phytochemical profile, antioxidant activity and in-vitro enzymatic inhibitory effect of different species*. <https://bibliotecas.ups.edu.ec:2226/record/display.uri?eid=2-s2.0-85121508200&origin=resultslist&sort=plf->

- f&src=s&st1=microalgae&nlo=&nlr=&nls=&sid=6b315caa86fe7bc8ff45bb0e6bfddc27&sot  
=b&sdt=sisr&sl=25&s=TITLE-ABS-  
KEY%28microalgae%29&ref=%28cosmetic%29&relpos=28&citeCnt=0&searchTerm=  
Voznesenskiy, S. S., Popik, A. Y., Gamayunov, E. L., Orlova, T. Y., Markina, Z. v., Postnova, I.  
v., & Shchipunov, Y. A. (2018). One-stage immobilization of the microalga *Porphyridium  
purpureum* using a biocompatible silica precursor and study of the fluorescence of its  
pigments. *European Biophysics Journal*, 47(1), 75–85. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1213-y>
- Vuppaladadiyam, A. K., Yao, J. G., Florin, N., George, A., Wang, X., Labeeuw, L., Jiang, Y.,  
Davis, R. W., Abbas, A., Ralph, P., Fennell, P. S., & Zhao, M. (2018). Impact of Flue Gas  
Compounds on Microalgae and Mechanisms for Carbon Assimilation and Utilization.  
*ChemSusChem*, 11(2), 334–355. <https://doi.org/10.1002/cssc.201701611>
- Waktole, Y., Seid, M., Mereta, T., Fekadu, F., & Feyisa, F. (2019). Simultaneous removal of nitrate  
and phosphate from wastewater using solid waste from factory. *Applied Water Science* 2019  
9:2, 9(2), 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13201-019-0906-Z>
- Wen, X., Chen, F., Lin, Y., Zhu, H., Yuan, F., Kuang, D., Jia, Z., & Yuan, Z. (2020). *sustainability  
Microbial Indicators and Their Use for Monitoring Drinking Water Quality-A Review*.  
<https://doi.org/10.3390/su12062249>
- Whitton, B. A. (2012). Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time. *Ecology of  
Cyanobacteria II: Their Diversity in Space and Time*, 9789400738, 1–760.  
<https://doi.org/10.1007/978-94-007-3855-3>
- Winter, L. (2015). Circadian rhythms in microalgae. *International Review of Cytology*, 206, 213–  
247. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(01\)06023-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(01)06023-5)



- World Health Organization. (2011). *Guías para la calidad del agua de consumo humano*.  
<http://apps.who.int/>
- Wu, J. Y., Lay, C. H., Chen, C. C., Wu, S. Y., Zhou, D., & Mohamed Abdula, P. (2021). Textile wastewater bioremediation using immobilized *Chlorella* sp. Wu-G23 with continuous culture. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23(1), 153–161.  
<https://doi.org/10.1007/s10098-020-01847-6>
- Wu, Q., Guo, L., Li, X., & Wang, Y. (2021). Effect of phosphorus concentration and light/dark condition on phosphorus uptake and distribution with microalgae. *Bioresource Technology*, 340(July), 125745. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125745>
- Xu, R., Zhang, L., & Liu, J. (2021). Rotifers release a lipid-soluble agent that inhibits photosynthetic electron transport in *Chlorella* sp. *Journal of Applied Phycology*, 33(1), 57–65. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02065-9>
- Xue, J., Wang, L., Zhang, L., Balamurugan, S., Li, D. W., Zeng, H., Yang, W. D., Liu, J. S., & Li, H. Y. (2016). The pivotal role of malic enzyme in enhancing oil accumulation in green microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Microbial Cell Factories*, 15(1).  
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0519-2>
- Yamashita, T., & Yamamoto-Ikemoto, R. (2014). Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater Treatment Plant Effluent via Bacterial Sulfate Reduction in an Anoxic Bioreactor Packed with Wood and Iron. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(9), 9835. <https://doi.org/10.3390/IJERPH110909835>
- Yatirajula, K., Shrivastava, A., Saxena, V., & Kodavaty, J. (2019). Flow behavior analysis of *Chlorella Vulgaris* microalgal biomass. *Heliyon*, 5(6), e01845.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01845>

- Yun, Cho, Heo, Lee, Lee, Chang, & Kim. (2019). Evaluation of the potential of *Chlorella sp.* HS2, an algal isolate from a tidal rock pool, as an industrial algal crop under a wide range of abiotic conditions. *Journal of Applied Phycology*, *31*(4), 2245–2258. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-1751-z>
- Zamani, N. P. (2021). Overview of bioactivity studies on marine natural products. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *944*(1), 012029. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/944/1/012029>
- Zhang, Q., Wang, T., & Hong, Y. (2014). Investigation of initial pH effects on growth of an oleaginous microalgae *Chlorella sp.* HQ for lipid production and nutrient uptake. *Water Science and Technology*, *70*(4), 712–719. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.285>
- Zhang, S., & Bryant, D. A. (2011). The tricarboxylic acid cycle in cyanobacteria. *Science*, *334*(6062), 1551–1553. <https://doi.org/10.1126/science.1210858>
- Zinicovscaia, I., & Cepoi, L. (2016). *Cyanobacteria* for bioremediation of wastewaters. *Cyanobacteria for Bioremediation of Wastewaters*, 1–124. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-26751-7>

## 7 Anexos

### Escalado



Anexo 1. Escalado de *Chlorella sp.*  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Patrones para amoniaco



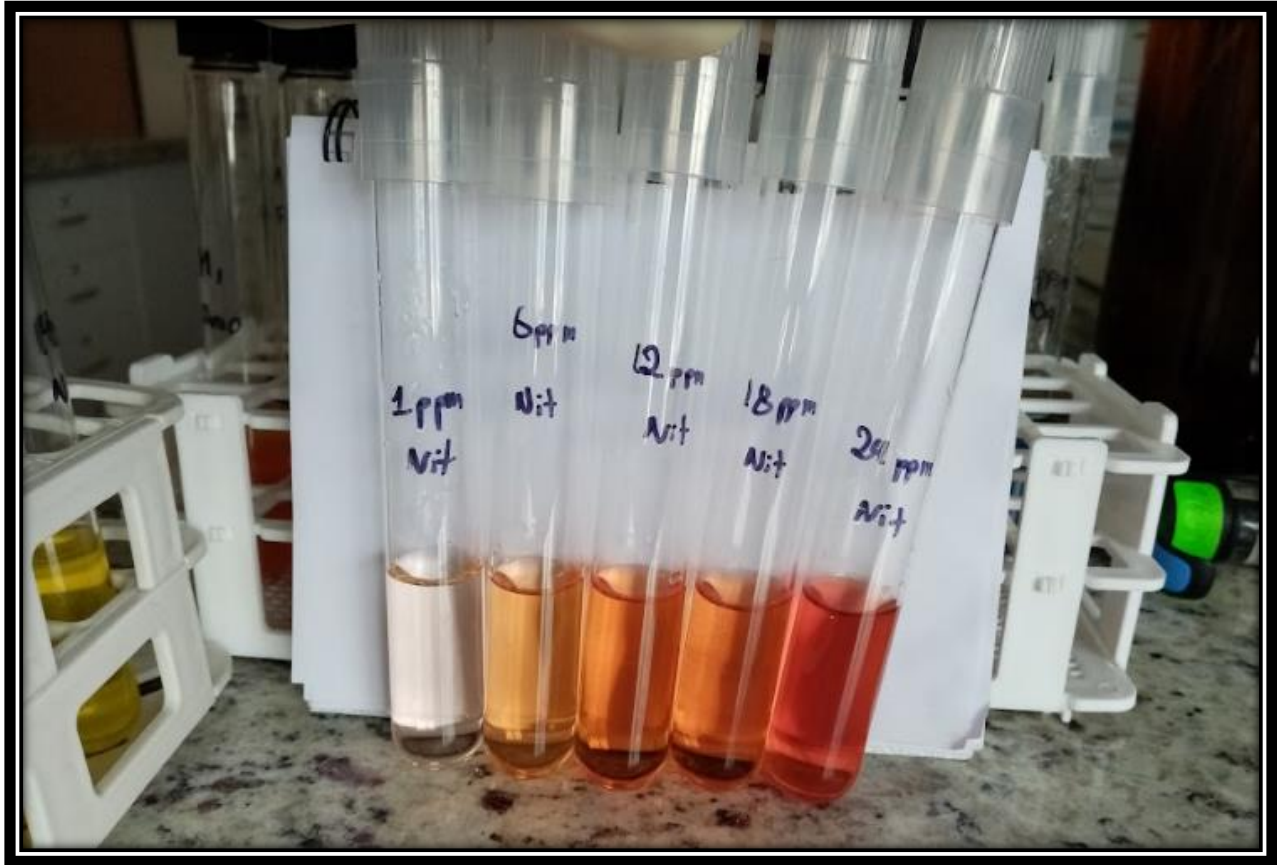
Anexo 2. Patrones para curva de calibración de amoniaco  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Patrones para fosfatos



Anexo 3. Patrones para curva de calibración de fosfatos  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Patrones para nitratos



Anexo 4. Patrones para curva de calibración de nitratos  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Muestreo



Anexo 5. Toma de muestra  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Muestreo para análisis



Anexo 6. Toma de muestra para análisis  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).



## Centrifugado



Anexo 7. Centrifugado de muestra para análisis  
Elaborado por: (Los Autores, 2022)

## Dilución bacteriana



Anexo 8. Dilución seriada para simbra de bacterias  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Petrifilm



Anexo 9. Siembra en Petrifilm para conteo bacteriano  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Equipo para DBO<sub>5</sub>



Anexo 10. Preparación de la muestra para medir DBO<sub>5</sub>  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Análisis estadístico de la cinética de crecimiento

### Día 1

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$
Filas no utilizadas	4

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	654,74	218,248	51,10	0,000
Error	8	34,17	4,271		
Total	11	688,91			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2,06660	95,04 %	93,18 %	88,84 %

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	5,208	0,315	(2,457; 7,960)
Con 2	3	14,833	1,283	(12,082; 17,585)
Con 3	3	20,17	3,74	(17,42; 22,92)
Testigo	3	1,667	1,155	(-1,085; 4,418)

Desv.Est. agrupada = 2,06660

#### Comparaciones en parejas de Fisher

#### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	20,17	A
Con 2	3	14,833	B
Con 1	3	5,208	C
Testigo	3	1,667	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	9,63	1,69	(5,73; 13,52)	5,70	0,000
Con 3 - Con 1	14,96	1,69	(11,07; 18,85)	8,86	0,000
Testigo - Con 1	-3,54	1,69	(-7,43; 0,35)	-2,10	0,069
Con 3 - Con 2	5,33	1,69	(1,44; 9,22)	3,16	0,013
Testigo - Con 2	-13,17	1,69	(-17,06; -9,28)	-7,80	0,000
Testigo - Con 3	-18,50	1,69	(-22,39; -14,61)	-10,96	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 4

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	413730	137910	43,62	0,000
Error	8	25291	3161		
Total	11	439021			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
56,2265	94,24 %	92,08 %	87,04 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	71,6	31,9	(-3,3; 146,4)
Con 2	3	204,4	88,2	(129,5; 279,2)
Con 3	3	489,3	61,7	(414,4; 564,2)
Testigo	3	5,25	5,85	(-69,61; 80,11)

Desv.Est. agrupada = 56,2265

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	489,3	A
Con 2	3	204,4	B
Con 1	3	71,6	C
Testigo	3	5,25	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	132,8	45,9	(26,9; 238,7)	2,89	0,020
Con 3 - Con 1	417,7	45,9	(311,8; 523,6)	9,10	0,000
Testigo - Con 1	-66,3	45,9	(-172,2; 39,5)	-1,44	0,186
Con 3 - Con 2	284,9	45,9	(179,1; 390,8)	6,21	0,000
Testigo - Con 2	-199,1	45,9	(-305,0; -93,3)	-4,34	0,002
Testigo - Con 3	-484,0	45,9	(-589,9; -378,2)	-10,54	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 5

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	2939358	979786	89,01	0,000
Error	8	88065	11008		
Total	11	3027423			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
104,920	97,09 %	96,00 %	93,45 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	155,6	80,4	(15,9; 295,3)
Con 2	3	900	184	(760; 1040)
Con 3	3	1190,4	60,9	(1050,7; 1330,1)
Testigo	3	9,32	9,35	(-130,36; 149,01)

Desv.Est. agrupada = 104,920

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	1190,4	A
Con 2	3	900	B
Con 1	3	155,6	C
Testigo	3	9,32	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	744,5	85,7	(547,0; 942,1)	8,69	0,000
Con 3 - Con 1	1034,8	85,7	(837,2; 1232,3)	12,08	0,000
Testigo - Con 1	-146,3	85,7	(-343,8; 51,3)	-1,71	0,126
Con 3 - Con 2	290,3	85,7	(92,7; 487,8)	3,39	0,010
Testigo - Con 2	-890,8	85,7	(-1088,3; -693,2)	-10,40	0,000
Testigo - Con 3	-1181,1	85,7	(-1378,6; -983,5)	-13,79	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 6

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$



Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	6640909	2213636	198,57	0,000
Error	8	89183	11148		
Total	11	6730092			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
105,583	98,67 %	98,18 %	97,02 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	375,9	21,4	(235,3; 516,4)
Con 2	3	1572,9	161,6	(1432,3; 1713,5)
Con 3	3	1740,7	133,5	(1600,1; 1881,2)
Testigo	3	15,61	13,70	(-124,96; 156,18)

Desv.Est. agrupada = 105,583

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	1740,7	A
Con 2	3	1572,9	A
Con 1	3	375,9	B
Testigo	3	15,61	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	1197,0	86,2	(998,2; 1395,8)	13,89	0,000
Con 3 - Con 1	1364,8	86,2	(1166,0; 1563,6)	15,83	0,000
Testigo - Con 1	-360,3	86,2	(-559,1; -161,5)	-4,18	0,003
Con 3 - Con 2	167,8	86,2	(-31,0; 366,5)	1,95	0,088
Testigo - Con 2	-1557,3	86,2	(-1756,1; -1358,5)	-18,06	0,000

Testigo - Con 3	-1725,1	86,2 (-1923,9; -1526,3)	-20,01	0,000
-----------------	---------	-------------------------	--------	-------

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 7

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	11096000	3698667	370,69	0,000
Error	8	79823	9978		
Total	11	11175823			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
99,8892	99,29 %	99,02 %	98,39 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	954,8	58,3	(821,8; 1087,8)
Con 2	3	1937,3	89,9	(1804,3; 2070,3)
Con 3	3	2550,3	167,5	(2417,3; 2683,2)
Testigo	3	24,1	19,2	(-108,9; 157,1)

Desv.Est. agrupada = 99,8892

### Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	2550,3	A
Con 2	3	1937,3	B
Con 1	3	954,8	C
Testigo	3	24,1	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	982,5	81,6	(794,4; 1170,6)	12,05	0,000
Con 3 - Con 1	1595,4	81,6	(1407,3; 1783,5)	19,56	0,000
Testigo - Con 1	-930,8	81,6	(-1118,8; -742,7)	-11,41	0,000
Con 3 - Con 2	612,9	81,6	(424,8; 801,0)	7,51	0,000
Testigo - Con 2	-1913,3	81,6	(-2101,3; -1725,2)	-23,46	0,000
Testigo - Con 3	-2526,2	81,6	(-2714,2; -2338,1)	-30,97	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 8

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	23309794	7769931	153,54	0,000
Error	8	404835	50604		
Total	11	23714629			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
224,954	98,29 %	97,65 %	96,16 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	1575,6	30,9	(1276,1; 1875,1)
Con 2	3	2594	303	(2294; 2893)
Con 3	3	3891	325	(3591; 4190)
Testigo	3	84,8	59,8	(-214,7; 384,3)

Desv.Est. agrupada = 224,954

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	3891	A
Con 2	3	2594	B
Con 1	3	1575,6	C
Testigo	3	84,8	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	1018	184	(594; 1442)	5,54	0,001
Con 3 - Con 1	2315	184	(1891; 2739)	12,60	0,000
Testigo - Con 1	-1491	184	(-1914; -1067)	-8,12	0,000
Con 3 - Con 2	1297	184	(873; 1721)	7,06	0,000
Testigo - Con 2	-2509	184	(-2932; -2085)	-13,66	0,000
Testigo - Con 3	-3806	184	(-4229; -3382)	-20,72	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 11

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
Nivel de significancia     $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	54014823	18004941	23,16	0,000
Error	8	6218684	777335		

Total 11 60233507

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
881,666	89,68 %	85,80 %	76,77 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	3837	634	(2664; 5011)
Con 2	3	4365	1642	(3191; 5539)
Con 3	3	6036,0	56,8	(4862,1; 7209,8)
Testigo	3	219,2	94,7	(-954,7; 1393,0)

Desv.Est. agrupada = 881,666

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	6036,0	A
Con 2	3	4365	B
Con 1	3	3837	B
Testigo	3	219,2	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	528	720	(-1132; 2188)	0,73	0,484
Con 3 - Con 1	2198	720	(538; 3859)	3,05	0,016
Testigo - Con 1	-3618	720	(-5278; -1958)	-5,03	0,001
Con 3 - Con 2	1671	720	(11; 3331)	2,32	0,049
Testigo - Con 2	-4146	720	(-5806; -2486)	-5,76	0,000
Testigo - Con 3	-5817	720	(-7477; -4157)	-8,08	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 12

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales

Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	82111633	27370544	33,59	0,000
Error	8	6519313	814914		
Total	11	88630947			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
902,726	92,64 %	89,89 %	83,45 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	4331	545	(3129; 5532)
Con 2	3	5004,3	152,8	(3802,5; 6206,2)
Con 3	3	7863	1613	(6661; 9065)
Testigo	3	526	581	(-676; 1727)

Desv.Est. agrupada = 902,726

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	7863	A
Con 2	3	5004,3	B
Con 1	3	4331	B
Testigo	3	526	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	674	737	(-1026; 2373)	0,91	0,387
Con 3 - Con 1	3533	737	(1833; 5232)	4,79	0,001
Testigo - Con 1	-3805	737	(-5505; -2105)	-5,16	0,001
Con 3 - Con 2	2859	737	(1159; 4558)	3,88	0,005

Testigo - Con 2	-4479	737 (-6178; -2779)	-6,08	0,000
Testigo - Con 3	-7338	737 (-9037; -5638)	-9,95	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 13

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	88573677	29524559	25,79	0,000
Error	8	9158675	1144834		
Total	11	97732352			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1069,97	90,63 %	87,11 %	78,91 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	4368	417	(2944; 5793)
Con 2	3	5325,1	109,6	(3900,5; 6749,6)
Con 3	3	8186	2070	(6762; 9611)
Testigo	3	589	333	(-835; 2014)

Desv.Est. agrupada = 1069,97

### Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	8186	A
Con 2	3	5325,1	B
Con 1	3	4368	B

Testigo 3 589 C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	957	874	(-1058; 2971)	1,10	0,305
Con 3 - Con 1	3818	874	(1803; 5833)	4,37	0,002
Testigo - Con 1	-3779	874	(-5794; -1764)	-4,33	0,003
Con 3 - Con 2	2861	874	(847; 4876)	3,28	0,011
Testigo - Con 2	-4736	874	(-6750; -2721)	-5,42	0,001
Testigo - Con 3	-7597	874	(-9611; -5582)	-8,70	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 14

### Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	80736906	26912302	26,01	0,000
Error	8	8276037	1034505		
Total	11	89012943			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1017,11	90,70 %	87,22 %	79,08 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	4528	474	(3173; 5882)
Con 2	3	5371	1734	(4017; 6725)
Con 3	3	7798	921	(6444; 9152)



Testigo 3 589 240 (-765; 1943)

Desv.Est. agrupada = 1017,11

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	7798	A
Con 2	3	5371	B
Con 1	3	4528	B
Testigo	3	589	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	843	830	(-1072; 2758)	1,02	0,340
Con 3 - Con 1	3271	830	(1356; 5186)	3,94	0,004
Testigo - Con 1	-3938	830	(-5853; -2023)	-4,74	0,001
Con 3 - Con 2	2428	830	(512; 4343)	2,92	0,019
Testigo - Con 2	-4782	830	(-6697; -2867)	-5,76	0,000
Testigo - Con 3	-7209	830	(-9124; -5294)	-8,68	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 15

### Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	72570775	24190258	40,71	0,000

Error	8	4753414	594177
Total	11	77324189	

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
770,829	93,85 %	91,55 %	86,17 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	5081	1003	(4055; 6107)
Con 2	3	6365	1116	(5339; 7392)
Con 3	3	7365,8	153,8	(6339,6; 8392,1)
Testigo	3	908	319	(-118; 1935)

Desv.Est. agrupada = 770,829

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	7365,8	A
Con 2	3	6365	A B
Con 1	3	5081	B
Testigo	3	908	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	1285	629	(-167; 2736)	2,04	0,076
Con 3 - Con 1	2285	629	(834; 3736)	3,63	0,007
Testigo - Con 1	-4173	629	(-5624; -2721)	-6,63	0,000
Con 3 - Con 2	1000	629	(-451; 2452)	1,59	0,151
Testigo - Con 2	-5457	629	(-6908; -4006)	-8,67	0,000
Testigo - Con 3	-6458	629	(-7909; -5006)	-10,26	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 18

### Método

Hipótesis nula      Todas las medias son iguales

Hipótesis alterna No todas las medias son iguales

Nivel de significancia  $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	74898843	24966281	107,84	0,000
Error	8	1852013	231502		
Total	11	76750856			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
481,146	97,59 %	96,68 %	94,57 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	5677	307	(5036; 6317)
Con 2	3	6542	401	(5901; 7182)
Con 3	3	7575	773	(6934; 8216)
Testigo	3	1041	272	(400; 1681)

Desv.Est. agrupada = 481,146

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	7575	A
Con 2	3	6542	B
Con 1	3	5677	B
Testigo	3	1041	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	865	393	(-41; 1771)	2,20	0,059
Con 3 - Con 1	1898	393	(992; 2804)	4,83	0,001
Testigo - Con 1	-4636	393	(-5542; -3730)	-11,80	0,000

Con 3 - Con 2	1033	393 (127; 1939)	2,63	0,030
Testigo - Con 2	-5501	393 (-6407; -4595)	-14,00	0,000
Testigo - Con 3	-6534	393 (-7440; -5628)	-16,63	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 19

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	76100506	25366835	531,23	0,000
Error	8	382013	47752		
Total	11	76482519			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
218,521	99,50 %	99,31 %	98,88 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	6653	311	(6362; 6944)
Con 2	3	6188,3	129,5	(5897,4; 6479,3)
Con 3	3	7370	225	(7079; 7661)
Testigo	3	1003,3	162,6	(712,4; 1294,3)

Desv.Est. agrupada = 218,521

### Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	7370	A
Con 1	3	6653	B

Con 2	3	6188,3	C
Testigo	3	1003,3	D

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-465	178	(-876; -54)	-2,61	0,031
Con 3 - Con 1	717	178	(305; 1128)	4,02	0,004
Testigo - Con 1	-5650	178	(-6061; -5239)	-31,67	0,000
Con 3 - Con 2	1182	178	(770; 1593)	6,62	0,000
Testigo - Con 2	-5185	178	(-5596; -4774)	-29,06	0,000
Testigo - Con 3	-6367	178	(-6778; -5955)	-35,68	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 20

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	78500043	26166681	18,18	0,001
Error	8	11513029	1439129		
Total	11	90013072			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1199,64	87,21 %	82,41 %	71,22 %

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	6709,2	152,3	(5112,0; 8306,3)
Con 2	3	7965	2322	(6368; 9562)

Con 3	3	7107	485	(5510; 8704)
Testigo	3	1448	328	(-150; 3045)

Desv.Est. agrupada = 1199,64

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 2	3	7965	A
Con 3	3	7107	A
Con 1	3	6709,2	A
Testigo	3	1448	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	1256	979	(-1003; 3515)	1,28	0,236
Con 3 - Con 1	398	979	(-1861; 2656)	0,41	0,696
Testigo - Con 1	-5262	979	(-7520; -3003)	-5,37	0,001
Con 3 - Con 2	-859	979	(-3117; 1400)	-0,88	0,406
Testigo - Con 2	-6518	979	(-8777; -4259)	-6,65	0,000
Testigo - Con 3	-5659	979	(-7918; -3400)	-5,78	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 21

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
--------	----	-----------	-----------	---------	---------

Factor	3	102527892	34175964	76,09	0,000
Error	8	3593300	449162		
Total	11	106121192			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
670,196	96,61 %	95,34 %	92,38 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	7157	488	(6264; 8049)
Con 2	3	8983	730	(8091; 9876)
Con 3	3	8010	966	(7118; 8902)
Testigo	3	1467	306	(574; 2359)

*Desv.Est. agrupada = 670,196*

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 2	3	8983	A
Con 3	3	8010	A B
Con 1	3	7157	B
Testigo	3	1467	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	1827	547	(565; 3089)	3,34	0,010
Con 3 - Con 1	853	547	(-409; 2115)	1,56	0,158
Testigo - Con 1	-5690	547	(-6952; -4428)	-10,40	0,000
Con 3 - Con 2	-973	547	(-2235; 289)	-1,78	0,113
Testigo - Con 2	-7517	547	(-8779; -6255)	-13,74	0,000
Testigo - Con 3	-6543	547	(-7805; -5281)	-11,96	0,000

*Nivel de confianza simultánea = 82,43 %*

## Día 22

## Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	135000923	45000308	41,07	0,000
Error	8	8764550	1095569		
Total	11	143765473			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1046,69	93,90 %	91,62 %	86,28 %

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95 %
Con 1	3	7133	1531	(5740; 8527)
Con 2	3	9898	274	(8505; 11292)
Con 3	3	8060	1304	(6666; 9454)
Testigo	3	967	515	(-427; 2360)

*Desv.Est. agrupada = 1046,69*

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95 %

Factor	N	Media	Agrupación
Con 2	3	9898	A
Con 3	3	8060	A B
Con 1	3	7133	B
Testigo	3	967	C

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95 %	Valor T	Valor p ajustado
-----------------------	--------------------------	------------------	------------	---------	------------------



Con 2 - Con 1	2765	855	(794; 4736)	3,24	0,012
Con 3 - Con 1	927	855	(-1044; 2897)	1,08	0,310
Testigo - Con 1	-6167	855	(-8137; -4196)	-7,22	0,000
Con 3 - Con 2	-1838	855	(-3809; 132)	-2,15	0,064
Testigo - Con 2	-8932	855	(-10902; -6961)	-10,45	0,000
Testigo - Con 3	-7093	855	(-9064; -5123)	-8,30	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43 %

## Día 25

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	160947406	53649135	39,23	0,000
Error	8	10941567	1367696		
Total	11	171888973			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1169,49	93,63%	91,25%	85,68%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	8630	1493	(7073; 10187)
Con 2	3	10437	955	(8880; 11994)
Con 3	3	9410	1511	(7853; 10967)
Testigo	3	1165	220	(-392; 2722)

Desv.Est. agrupada = 1169,49

### Comparaciones en parejas de Fisher

**Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%**

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
---------------	----------	--------------	-------------------

Con 2	3	10437	A
Con 3	3	9410	A
Con 1	3	8630	A
Testigo	3	1165	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

<b>Diferencia de niveles</b>	<b>Diferencia de las medias</b>	<b>EE de diferencia</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Con 2 - Con 1	1807	955	(-395; 4009)	1,89	0,095
Con 3 - Con 1	780	955	(-1422; 2982)	0,82	0,438
Testigo - Con 1	-7465	955	(-9667; -5263)	-7,82	0,000
Con 3 - Con 2	-1027	955	(-3229; 1175)	-1,08	0,314
Testigo - Con 2	-9272	955	(-11474; -7070)	-9,71	0,000
Testigo - Con 3	-8245	955	(-10447; -6043)	-8,63	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Día 26

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>	<b>Valores</b>
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

<b>Fuente</b>	<b>GL</b>	<b>SC Ajust.</b>	<b>MC Ajust.</b>	<b>Valor F</b>	<b>Valor p</b>
Factor	3	119668527	39889509	20,15	0,000
Error	8	15834554	1979319		
Total	11	135503081			

### Resumen del modelo

<b>S</b>	<b>R-cuad.</b>	<b>R-cuad. (ajustado)</b>	<b>R-cuad. (pred)</b>
1406,88	88,31%	83,93%	73,71%

### Medias

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
Con 1	3	8270	1197	(6397; 10143)
Con 2	3	8568	2167	(6694; 10441)
Con 3	3	8478	1333	(6605; 10351)
Testigo	3	1150,0	109,0	(-723,1; 3023,1)

*Desv.Est. agrupada = 1406,88*

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Con 2	3	8568	A
Con 3	3	8478	A
Con 1	3	8270	A
Testigo	3	1150,0	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

<b>Diferencia de niveles</b>	<b>Diferencia de las medias</b>	<b>EE de diferencia</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Con 2 - Con 1	298	1149	(-2351; 2946)	0,26	0,802
Con 3 - Con 1	208	1149	(-2441; 2857)	0,18	0,861
Testigo - Con 1	-7120	1149	(-9769; -4471)	-6,20	0,000
Con 3 - Con 2	-89	1149	(-2738; 2560)	-0,08	0,940
Testigo - Con 2	-7418	1149	(-10066; -4769)	-6,46	0,000
Testigo - Con 3	-7328	1149	(-9977; -4679)	-6,38	0,000

*Nivel de confianza simultánea = 82,43%*

Anexo 11 Análisis estadístico para la cinética de crecimiento de *Chlorella sp.*  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Amoniaco semana 1

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	257,34	85,779	11,21	0,003
Error	8	61,23	7,653		
Total	11	318,56			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2,76645	80,78%	73,57%	56,76%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	11,76	4,53	(8,08; 15,44)
Con 2	3	5,67	2,65	(1,98; 9,35)
Con 3	3	4,193	0,896	(0,510; 7,877)
Testigo	3	15,660	1,512	(11,977; 19,343)

*Desv.Est. agrupada = 2,76645*

### Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	15,660	A
Con 1	3	11,76	A
Con 2	3	5,67	B
Con 3	3	4,193	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias		EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-6,09	2,26		(-11,30; -0,88)	-2,70	0,027
Con 3 - Con 1	-7,57	2,26		(-12,78; -2,36)	-3,35	0,010
Testigo - Con 1	3,90	2,26		(-1,31; 9,11)	1,73	0,123
Con 3 - Con 2	-1,47	2,26		(-6,68; 3,74)	-0,65	0,533
Testigo - Con 2	9,99	2,26		(4,78; 15,20)	4,42	0,002
Testigo - Con 3	11,47	2,26		(6,26; 16,68)	5,08	0,001

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Amoniaco semana 2

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,12623	0,04208	4,04	0,051
Error	8	0,08331	0,01041		
Total	11	0,20954			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,102047	60,24%	45,33%	10,55%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	0,6491	0,0544	(0,5132; 0,7849)
Con 2	3	0,5095	0,1351	(0,3737; 0,6454)
Con 3	3	0,3591	0,0232	(0,2232; 0,4949)
Testigo	3	0,5034	0,1411	(0,3675; 0,6393)

Desv.Est. agrupada = 0,102047

### Comparaciones en parejas de Fisher

## Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 1	3	0,6491	A
Con 2	3	0,5095	A B
Testigo	3	0,5034	A B
Con 3	3	0,3591	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-0,1395	0,0833	(-0,3317; 0,0526)	-1,67	0,133
Con 3 - Con 1	-0,2900	0,0833	(-0,4821; -0,0979)	-3,48	0,008
Testigo - Con 1	-0,1457	0,0833	(-0,3378; 0,0465)	-1,75	0,119
Con 3 - Con 2	-0,1505	0,0833	(-0,3426; 0,0416)	-1,81	0,109
Testigo - Con 2	-0,0061	0,0833	(-0,1983; 0,1860)	-0,07	0,943
Testigo - Con 3	0,1443	0,0833	(-0,0478; 0,3365)	1,73	0,121

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Amoniaco semana 3

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,08839	0,029465	3,34	0,076
Error	8	0,07049	0,008811		
Total	11	0,15888			

### Resumen del modelo

	R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad. (ajustado)	(pred)

0,0938657 55,64% 39,00% 0,18%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	0,5399	0,0880	(0,4149; 0,6649)
Con 2	3	0,6303	0,1232	(0,5054; 0,7553)
Con 3	3	0,5991	0,0295	(0,4741; 0,7240)
Testigo	3	0,4063	0,1070	(0,2813; 0,5313)

Desv.Est. agrupada = 0,0938657

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 2	3	0,6303	A
Con 3	3	0,5991	A
Con 1	3	0,5399	A B
Testigo	3	0,4063	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	0,0904	0,0766	(-0,0863; 0,2672)	1,18	0,272
Con 3 - Con 1	0,0592	0,0766	(-0,1176; 0,2359)	0,77	0,462
Testigo - Con 1	-0,1336	0,0766	(-0,3103; 0,0431)	-1,74	0,119
Con 3 - Con 2	-0,0313	0,0766	(-0,2080; 0,1455)	-0,41	0,694
Testigo - Con 2	-0,2240	0,0766	(-0,4008; -0,0473)	-2,92	0,019
Testigo - Con 3	-0,1928	0,0766	(-0,3695; -0,0160)	-2,52	0,036

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Amoniaco semana 4

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,1137	0,03788	0,30	0,822
Error	8	0,9987	0,12484		
Total	11	1,1124			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,353326	10,22%	0,00%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	0,796	0,402	(0,326; 1,267)
Con 2	3	0,5493	0,0644	(0,0789; 1,0197)
Con 3	3	0,6630	0,1628	(0,1926; 1,1334)
Testigo	3	0,768	0,554	(0,298; 1,238)

Desv.Est. agrupada = 0,353326

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 1	3	0,796	A
Testigo	3	0,768	A
Con 3	3	0,6630	A
Con 2	3	0,5493	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-0,247	0,288	(-0,912; 0,418)	-0,86	0,417
Con 3 - Con 1	-0,134	0,288	(-0,799; 0,532)	-0,46	0,656
Testigo - Con 1	-0,028	0,288	(-0,694; 0,637)	-0,10	0,924
Con 3 - Con 2	0,114	0,288	(-0,552; 0,779)	0,39	0,704
Testigo - Con 2	0,219	0,288	(-0,447; 0,884)	0,76	0,470
Testigo - Con 3	0,105	0,288	(-0,560; 0,770)	0,36	0,725

Nivel de confianza simultánea = 82,43%



Anexo 12. Análisis estadístico para amoniaco  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

**Nitratos semana 1****Método**

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

**Información del factor**

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

**Análisis de Varianza**

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	355,68	118,561	18,01	0,001
Error	8	52,65	6,582		
Total	11	408,33			

**Resumen del modelo**

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2,56546	87,11%	82,27%	70,99%

**Medias**

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	45,467	1,274	(42,051; 48,882)
Con 2	3	38,37	2,71	(34,95; 41,79)
Con 3	3	34,29	3,36	(30,87; 37,71)
Testigo	3	47,91	2,47	(44,49; 51,32)

*Desv.Est. agrupada = 2,56546*

**Comparaciones en parejas de Fisher****Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%**

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	47,91	A
Con 1	3	45,467	A
Con 2	3	38,37	B
Con 3	3	34,29	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

**Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias**

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias		EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-7,10	2,09	(-11,93; -2,27)	-3,39	0,010	
Con 3 - Con 1	-11,18	2,09	(-16,01; -6,35)	-5,34	0,001	
Testigo - Con 1	2,44	2,09	(-2,39; 7,27)	1,16	0,278	
Con 3 - Con 2	-4,08	2,09	(-8,91; 0,75)	-1,95	0,087	
Testigo - Con 2	9,54	2,09	(4,71; 14,37)	4,55	0,002	
Testigo - Con 3	13,62	2,09	(8,79; 18,45)	6,50	0,000	

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Nitratos semana 2

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	37,02	12,34	0,28	0,839
Error	8	353,68	44,21		
Total	11	390,69			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6,64903	9,47%	0,00%	0,00%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	38,30	2,85	(29,45; 47,16)
Con 2	3	43,12	2,80	(34,27; 51,97)
Con 3	3	41,33	11,29	(32,48; 50,18)
Testigo	3	41,72	5,78	(32,87; 50,58)

Desv.Est. agrupada = 6,64903

### Comparaciones en parejas de Fisher

## Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 2	3	43,12	A
Testigo	3	41,72	A
Con 3	3	41,33	A
Con 1	3	38,30	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	4,82	5,43	(-7,70; 17,34)	0,89	0,401
Con 3 - Con 1	3,03	5,43	(-9,49; 15,54)	0,56	0,593
Testigo - Con 1	3,42	5,43	(-9,10; 15,94)	0,63	0,546
Con 3 - Con 2	-1,79	5,43	(-14,31; 10,73)	-0,33	0,750
Testigo - Con 2	-1,40	5,43	(-13,91; 11,12)	-0,26	0,804
Testigo - Con 3	0,40	5,43	(-12,12; 12,91)	0,07	0,944

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Nitratos semana 3

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	12,35	4,116	0,66	0,598
Error	8	49,66	6,208		
Total	11	62,01			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2,49150	19,91%	0,00%	0,00%

## Medias

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Desv.Est.</b>	<b>IC de 95%</b>
Con 1	3	44,57	1,96	(41,26; 47,89)
Con 2	3	45,62	2,18	(42,31; 48,94)
Con 3	3	47,14	1,96	(43,82; 50,45)
Testigo	3	46,81	3,52	(43,49; 50,12)

*Desv.Est. agrupada = 2,49150*

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

<b>Factor</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Agrupación</b>
Con 3	3	47,14	A
Testigo	3	46,81	A
Con 2	3	45,62	A
Con 1	3	44,57	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

<b>Diferencia de niveles</b>	<b>Diferencia de las medias</b>	<b>EE de diferencia</b>	<b>IC de 95%</b>	<b>Valor T</b>	<b>Valor p ajustado</b>
Con 2 - Con 1	1,05	2,03	(-3,64; 5,74)	0,52	0,619
Con 3 - Con 1	2,56	2,03	(-2,13; 7,25)	1,26	0,243
Testigo - Con 1	2,23	2,03	(-2,46; 6,93)	1,10	0,304
Con 3 - Con 2	1,51	2,03	(-3,18; 6,20)	0,74	0,479
Testigo - Con 2	1,18	2,03	(-3,51; 5,87)	0,58	0,577
Testigo - Con 3	-0,33	2,03	(-5,02; 4,36)	-0,16	0,875

*Nivel de confianza simultánea = 82,43%*

## Nitratos semana 4

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

### Información del factor

<b>Factor</b>	<b>Niveles</b>	<b>Valores</b>
---------------	----------------	----------------

Factor 4 Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	44,08	14,69	0,50	0,691
Error	8	233,58	29,20		
Total	11	277,66			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5,40347	15,88%	0,00%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	40,87	2,78	(33,68; 48,07)
Con 2	3	36,10	3,48	(28,90; 43,29)
Con 3	3	36,348	1,472	(29,154; 43,542)
Testigo	3	37,19	9,73	(29,99; 44,38)

Desv.Est. agrupada = 5,40347

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media Agrupación
Con 1	3	40,87 A
Testigo	3	37,19 A
Con 3	3	36,348 A
Con 2	3	36,10 A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-4,77	4,41	(-14,95; 5,40)	-1,08	0,311
Con 3 - Con 1	-4,52	4,41	(-14,70; 5,65)	-1,03	0,335
Testigo - Con 1	-3,69	4,41	(-13,86; 6,49)	-0,84	0,428
Con 3 - Con 2	0,25	4,41	(-9,92; 10,43)	0,06	0,956
Testigo - Con 2	1,09	4,41	(-9,09; 11,26)	0,25	0,811
Testigo - Con 3	0,84	4,41	(-9,34; 11,01)	0,19	0,854

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

Anexo 13. Análisis estadístico para nitratos  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Análisis estadístico de fosfatos

### Fosfatos semana 1

#### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	769,5	256,52	14,49	0,001
Error	8	141,7	17,71		
Total	11	911,2			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,20799	84,45%	78,62%	65,02%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	48,36	2,54	(42,75; 53,96)
Con 2	3	44,19	4,11	(38,58; 49,79)
Con 3	3	38,76	5,47	(33,15; 44,36)
Testigo	3	60,51	4,20	(54,90; 66,11)

Desv.Est. agrupada = 4,20799

#### Comparaciones en parejas de Fisher

#### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	60,51	A
Con 1	3	48,36	B
Con 2	3	44,19	B C
Con 3	3	38,76	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-4,17	3,44	(-12,09; 3,75)	-1,21	0,259
Con 3 - Con 1	-9,60	3,44	(-17,52; -1,68)	-2,79	0,023
Testigo - Con 1	12,15	3,44	(4,23; 20,07)	3,54	0,008
Con 3 - Con 2	-5,43	3,44	(-13,35; 2,49)	-1,58	0,153
Testigo - Con 2	16,32	3,44	(8,40; 24,24)	4,75	0,001
Testigo - Con 3	21,75	3,44	(13,83; 29,67)	6,33	0,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Fosfatos semana 2

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	108,4	36,12	1,52	0,283
Error	8	190,4	23,80		
Total	11	298,7			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4,87815	36,27%	12,37%	0,00%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	28,259	0,930	(21,764; 34,753)
Con 2	3	31,89	2,66	(25,40; 38,38)
Con 3	3	23,46	3,21	(16,96; 29,95)
Testigo	3	28,52	8,77	(22,03; 35,02)

Desv.Est. agrupada = 4,87815



## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

<u>Factor</u>	<u>N</u>	<u>Media</u>	<u>Agrupación</u>
Con 2	3	31,89	A
Testigo	3	28,52	A
Con 1	3	28,259	A
Con 3	3	23,46	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

<u>Diferencia de niveles</u>	<u>Diferencia de las medias</u>	<u>EE de diferencia</u>	<u>IC de 95%</u>	<u>Valor T</u>	<u>Valor p ajustado</u>
Con 2 - Con 1	3,63	3,98	(-5,55; 12,82)	0,91	0,389
Con 3 - Con 1	-4,80	3,98	(-13,99; 4,38)	-1,21	0,262
Testigo - Con 1	0,27	3,98	(-8,92; 9,45)	0,07	0,948
Con 3 - Con 2	-8,43	3,98	(-17,62; 0,75)	-2,12	0,067
Testigo - Con 2	-3,36	3,98	(-12,55; 5,82)	-0,84	0,423
Testigo - Con 3	5,07	3,98	(-4,12; 14,25)	1,27	0,239

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Fosfatos semana 3

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

<u>Factor</u>	<u>Niveles</u>	<u>Valores</u>
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

<u>Fuente</u>	<u>GL</u>	<u>SC Ajust.</u>	<u>MC Ajust.</u>	<u>Valor F</u>	<u>Valor p</u>
Factor	3	517,7	172,6	1,14	0,391
Error	8	1213,1	151,6		
Total	11	1730,8			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
12,3140	29,91%	3,63%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	36,76	15,26	(20,37; 53,15)
Con 2	3	28,6	18,2	(12,3; 45,0)
Con 3	3	25,37	5,83	(8,97; 41,76)
Testigo	3	18,50	2,75	(2,10; 34,89)

Desv.Est. agrupada = 12,3140

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 1	3	36,76	A
Con 2	3	28,6	A
Con 3	3	25,37	A
Testigo	3	18,50	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-8,1	10,1	(-31,3; 15,1)	-0,81	0,443
Con 3 - Con 1	-11,4	10,1	(-34,6; 11,8)	-1,13	0,290
Testigo - Con 1	-18,3	10,1	(-41,4; 4,9)	-1,82	0,107
Con 3 - Con 2	-3,3	10,1	(-26,5; 19,9)	-0,33	0,753
Testigo - Con 2	-10,2	10,1	(-33,3; 13,0)	-1,01	0,342
Testigo - Con 3	-6,9	10,1	(-30,1; 16,3)	-0,68	0,514

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Fosfatos semana 4

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1,796	0,5988	0,40	0,760
Error	8	12,121	1,5152		
Total	11	13,918			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,23091	12,91%	0,00%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	14,70	1,99	(13,06; 16,34)
Con 2	3	13,838	0,875	(12,200; 15,477)
Con 3	3	13,990	0,231	(12,351; 15,629)
Testigo	3	13,687	1,137	(12,048; 15,326)

Desv.Est. agrupada = 1,23091

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 1	3	14,70	A
Con 3	3	13,990	A
Con 2	3	13,838	A
Testigo	3	13,687	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-0,86	1,01	(-3,18; 1,46)	-0,85	0,418
Con 3 - Con 1	-0,71	1,01	(-3,02; 1,61)	-0,70	0,502
Testigo - Con 1	-1,01	1,01	(-3,33; 1,31)	-1,01	0,344
Con 3 - Con 2	0,15	1,01	(-2,17; 2,47)	0,15	0,884
Testigo - Con 2	-0,15	1,01	(-2,47; 2,17)	-0,15	0,884

Testigo - Con 3	-0,30	1,01 (-2,62; 2,01)	-0,30	0,771
<i>Nivel de confianza simultánea = 82,43%</i>				

Anexo 14. Análisis estadístico para fosfatos  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Análisis estadístico de pH

### pH semana 1

#### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,9556	0,31855	4,16	0,047
Error	8	0,6119	0,07648		
Total	11	1,5675			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,276557	60,97%	46,33%	12,17%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	9,0887	0,0425	(8,7205; 9,4569)
Con 2	3	9,1890	0,1506	(8,8208; 9,5572)
Con 3	3	9,381	0,257	(9,013; 9,749)
Testigo	3	8,615	0,464	(8,246; 8,983)

*Desv.Est. agrupada = 0,276557*

#### Comparaciones en parejas de Fisher

#### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	9,381	A
Con 2	3	9,1890	A
Con 1	3	9,0887	A
Testigo	3	8,615	B

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias		IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
	de las medias	EE de diferencia			
Con 2 - Con 1	0,100	0,226	(-0,420; 0,621)	0,44	0,669
Con 3 - Con 1	0,292	0,226	(-0,228; 0,813)	1,29	0,232
Testigo - Con 1	-0,474	0,226	(-0,995; 0,047)	-2,10	0,069
Con 3 - Con 2	0,192	0,226	(-0,329; 0,713)	0,85	0,420
Testigo - Con 2	-0,574	0,226	(-1,095; -0,054)	-2,54	0,035
Testigo - Con 3	-0,766	0,226	(-1,287; -0,246)	-3,39	0,009

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## pH semana 2

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	1,1392	0,37972	16,38	0,001
Error	8	0,1854	0,02318		
Total	11	1,3246			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,152251	86,00%	80,75%	68,50%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	8,26733	0,00503	(8,06463; 8,47004)
Con 2	3	8,2083	0,1655	(8,0056; 8,4110)
Con 3	3	8,3713	0,0376	(8,1686; 8,5740)
Testigo	3	8,981	0,253	(8,778; 9,184)

Desv.Est. agrupada = 0,152251

### Comparaciones en parejas de Fisher

## Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	8,981	A
Con 3	3	8,3713	B
Con 1	3	8,26733	B
Con 2	3	8,2083	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias		EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-0,059	0,124	(-0,346; 0,228)	-0,47	0,648	
Con 3 - Con 1	0,104	0,124	(-0,183; 0,391)	0,84	0,427	
Testigo - Con 1	0,714	0,124	(0,427; 1,000)	5,74	0,000	
Con 3 - Con 2	0,163	0,124	(-0,124; 0,450)	1,31	0,226	
Testigo - Con 2	0,773	0,124	(0,486; 1,059)	6,22	0,000	
Testigo - Con 3	0,610	0,124	(0,323; 0,896)	4,90	0,001	

Nivel de confianza simultánea = 82,43

## pH semana 3

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,1824	0,06081	1,62	0,260
Error	8	0,3007	0,03759		
Total	11	0,4832			

### Resumen del modelo

		R-cuad.	R-cuad.
S	R-cuad.	(ajustado)	(pred)

0,193886 37,76% 14,42% 0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	8,6600	0,1345	(8,4019; 8,9181)
Con 2	3	8,5767	0,0902	(8,3185; 8,8348)
Con 3	3	8,687	0,228	(8,429; 8,945)
Testigo	3	8,910	0,269	(8,652; 9,168)

Desv.Est. agrupada = 0,193886

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	8,910	A
Con 3	3	8,687	A
Con 1	3	8,6600	A
Con 2	3	8,5767	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-0,083	0,158	(-0,448; 0,282)	-0,53	0,613
Con 3 - Con 1	0,027	0,158	(-0,338; 0,392)	0,17	0,870
Testigo - Con 1	0,250	0,158	(-0,115; 0,615)	1,58	0,153
Con 3 - Con 2	0,110	0,158	(-0,255; 0,475)	0,69	0,507
Testigo - Con 2	0,333	0,158	(-0,032; 0,698)	2,11	0,068
Testigo - Con 3	0,223	0,158	(-0,142; 0,588)	1,41	0,196

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## pH semana 4

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor



Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,03762	0,012542	1,84	0,217
Error	8	0,05440	0,006800		
Total	11	0,09203			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0824621	40,89%	18,72%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	9,0300	0,1442	(8,9202; 9,1398)
Con 2	3	9,0433	0,0306	(8,9335; 9,1531)
Con 3	3	9,0833	0,0416	(8,9735; 9,1931)
Testigo	3	9,1733	0,0611	(9,0635; 9,2831)

Desv.Est. agrupada = 0,0824621

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	9,1733	A
Con 3	3	9,0833	A
Con 2	3	9,0433	A
Con 1	3	9,0300	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	0,0133	0,0673	(-0,1419; 0,1686)	0,20	0,848
Con 3 - Con 1	0,0533	0,0673	(-0,1019; 0,2086)	0,79	0,451
Testigo - Con 1	0,1433	0,0673	(-0,0119; 0,2986)	2,13	0,066
Con 3 - Con 2	0,0400	0,0673	(-0,1153; 0,1953)	0,59	0,569
Testigo - Con 2	0,1300	0,0673	(-0,0253; 0,2853)	1,93	0,090
Testigo - Con 3	0,0900	0,0673	(-0,0653; 0,2453)	1,34	0,218

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

Anexo 15. Análisis estadístico para pH  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Conductividad semana 1

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,009167	0,003056	1,22	0,363
Error	8	0,020000	0,002500		
Total	11	0,029167			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,05	31,43%	5,71%	0,00%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	284,5	0,0	(284,4; 284,6)
Con 2	3	284,467	0,058	(284,400; 284,533)
Con 3	3	284,433	0,058	(284,367; 284,500)
Testigo	3	284,433	0,058	(284,367; 284,500)

Desv.Est. agrupada = 0,05

### Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 1	3	284,5	A
Con 2	3	284,467	A
Testigo	3	284,433	A
Con 3	3	284,433	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-0,0333	0,0408	(-0,1275; 0,0608)	-0,82	0,438
Con 3 - Con 1	-0,0667	0,0408	(-0,1608; 0,0275)	-1,63	0,141
Testigo - Con 1	-0,0667	0,0408	(-0,1608; 0,0275)	-1,63	0,141
Con 3 - Con 2	-0,0333	0,0408	(-0,1275; 0,0608)	-0,82	0,438
Testigo - Con 2	-0,0333	0,0408	(-0,1275; 0,0608)	-0,82	0,438
Testigo - Con 3	0,0000	0,0408	(-0,0941; 0,0941)	0,00	1,000

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Conductividad semana 2

### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,09667	0,032222	4,30	0,044
Error	8	0,06000	0,007500		
Total	11	0,15667			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0866025	61,70%	47,34%	13,83%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	285,133	0,058	(285,018; 285,249)
Con 2	3	285,167	0,058	(285,051; 285,282)
Con 3	3	285,2	0,0	(285,1; 285,3)
Testigo	3	284,967	0,153	(284,851; 285,082)

Desv.Est. agrupada = 0,0866025

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 3	3	285,2	A
Con 2	3	285,167	A
Con 1	3	285,133	A
Testigo	3	284,967	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	0,0333	0,0707	(-0,1297; 0,1964)	0,47	0,650
Con 3 - Con 1	0,0667	0,0707	(-0,0964; 0,2297)	0,94	0,373
Testigo - Con 1	-0,1667	0,0707	(-0,3297; -0,0036)	-2,36	0,046
Con 3 - Con 2	0,0333	0,0707	(-0,1297; 0,1964)	0,47	0,650
Testigo - Con 2	-0,2000	0,0707	(-0,3631; -0,0369)	-2,83	0,022
Testigo - Con 3	-0,2333	0,0707	(-0,3964; -0,0703)	-3,30	0,011

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Conductividad semana 3

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,02917	0,009722	0,97	0,452
Error	8	0,08000	0,010000		
Total	11	0,10917			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,1	26,72%	0,00%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	285,133	0,058	(285,000; 285,266)
Con 2	3	285,200	0,100	(285,067; 285,333)
Con 3	3	285,167	0,058	(285,034; 285,300)
Testigo	3	285,267	0,153	(285,134; 285,400)

Desv.Est. agrupada = 0,1

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	285,267	A
Con 2	3	285,200	A
Con 3	3	285,167	A
Con 1	3	285,133	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	0,0667	0,0816	(-0,1216; 0,2550)	0,82	0,438
Con 3 - Con 1	0,0333	0,0816	(-0,1550; 0,2216)	0,41	0,694
Testigo - Con 1	0,1333	0,0816	(-0,0550; 0,3216)	1,63	0,141
Con 3 - Con 2	-0,0333	0,0816	(-0,2216; 0,1550)	-0,41	0,694
Testigo - Con 2	0,0667	0,0816	(-0,1216; 0,2550)	0,82	0,438
Testigo - Con 3	0,1000	0,0816	(-0,0883; 0,2883)	1,22	0,256

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Conductividad semana 4

### Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

## Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

## Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	0,002500	0,000833	0,03	0,993
Error	8	0,240000	0,030000		
Total	11	0,242500			

## Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,173205	1,03%	0,00%	0,00%

## Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	285,167	0,058	(284,936; 285,397)
Con 2	3	285,200	0,100	(284,969; 285,431)
Con 3	3	285,167	0,058	(284,936; 285,397)
Testigo	3	285,167	0,321	(284,936; 285,397)

Desv.Est. agrupada = 0,173205

## Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Con 2	3	285,200	A
Testigo	3	285,167	A
Con 3	3	285,167	A
Con 1	3	285,167	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

## Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	0,033	0,141	(-0,293; 0,359)	0,24	0,820
Con 3 - Con 1	0,000	0,141	(-0,326; 0,326)	0,00	1,000
Testigo - Con 1	0,000	0,141	(-0,326; 0,326)	0,00	1,000
Con 3 - Con 2	-0,033	0,141	(-0,359; 0,293)	-0,24	0,820
Testigo - Con 2	-0,033	0,141	(-0,359; 0,293)	-0,24	0,820

Testigo - Con 3	0,000	0,141 (-0,326; 0,326)	0,00	1,000
<i>Nivel de confianza simultánea = 82,43%</i>				

Anexo 16. Análisis estadístico para conductividad  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).

## Análisis estadístico de coliformes fecales

### Coliformes totales

#### Método

Hipótesis nula            Todas las medias son iguales  
Hipótesis alterna        No todas las medias son iguales  
Nivel de significancia    $\alpha = 0,05$

*Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.*

#### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

#### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	22666667	7555556	0,31	0,819
Error	8	196000000	24500000		
Total	11	218666667			

#### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4949,75	10,37%	0,00%	0,00%

#### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	2333	4041	(-4257; 8923)
Con 2	3	2333	577	(-4257; 8923)
Con 3	3	3000	1000	(-3590; 9590)
Testigo	3	5667	8963	(-923; 12257)

*Desv.Est. agrupada = 4949,75*

#### Comparaciones en parejas de Fisher

#### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	5667	A
Con 3	3	3000	A
Con 2	3	2333	A
Con 1	3	2333	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

#### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias



Diferencia de niveles	Diferencia de las medias		EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	0	4041		(-9320; 9320)	0,00	1,000
Con 3 - Con 1	667	4041		(-8653; 9986)	0,16	0,873
Testigo - Con 1	3333	4041		(-5986; 12653)	0,82	0,433
Con 3 - Con 2	667	4041		(-8653; 9986)	0,16	0,873
Testigo - Con 2	3333	4041		(-5986; 12653)	0,82	0,433
Testigo - Con 3	2667	4041		(-6653; 11986)	0,66	0,528

Nivel de confianza simultánea = 82,43%

## Aerobios totales

### Método

Hipótesis nula      Todas las medias son iguales  
 Hipótesis alterna      No todas las medias son iguales  
 Nivel de significancia       $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

### Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Factor	4	Con 1; Con 2; Con 3; Testigo

### Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Factor	3	4666671	1555557	0,39	0,764
Error	8	31981344	3997668		
Total	11	36648015			

### Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1999,42	12,73%	0,00%	0,00%

### Medias

Factor	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
Con 1	3	2335	2515	(-327; 4997)
Con 2	3	1333	577	(-1329; 3995)
Con 3	3	2667	1528	(5; 5329)
Testigo	3	3000	2646	(338; 5662)

Desv.Est. agrupada = 1999,42

### Comparaciones en parejas de Fisher

### Agrupar información utilizando el método LSD de Fisher y una confianza de 95%

Factor	N	Media	Agrupación
Testigo	3	3000	A
Con 3	3	2667	A
Con 1	3	2335	A
Con 2	3	1333	A

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.*

### Pruebas individuales de Fisher para diferencias de las medias

Diferencia de niveles	Diferencia de las medias	EE de diferencia	IC de 95%	Valor T	Valor p ajustado
Con 2 - Con 1	-1001	1633	(-4766; 2763)	-0,61	0,557
Con 3 - Con 1	332	1633	(-3433; 4097)	0,20	0,844
Testigo - Con 1	665	1633	(-3099; 4430)	0,41	0,694
Con 3 - Con 2	1333	1633	(-2431; 5098)	0,82	0,438
Testigo - Con 2	1667	1633	(-2098; 5431)	1,02	0,337
Testigo - Con 3	333	1633	(-3431; 4098)	0,20	0,843

*Nivel de confianza simultánea = 82,43%*

Anexo 17. Análisis estadístico para bacterias  
Elaborado por: (Los Autores, 2022).