



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO COMO ENRIQUECEDOR DE
MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *CYANOBACTERIAS***

Trabajo de Investigación (Graduación), Modalidad: Seminario de Graduación, presentado como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Autor

Monserath Elizabeth León Cahuasquí

Tutor

Ing. Gladys Navas Miño

Ambato – Ecuador

2013

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del trabajo de investigación sobre el tema: **“APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO COMO ENRIQUECEDOR DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *CYANOBACTERIAS*”**, de la estudiante Monserrath Elizabeth León Cahuasquí de la Carrera de Ingeniería Bioquímica contempla las orientaciones metodológicas de la Investigación Científica.

Que ha sido dirigida en todas sus partes, cumpliendo con las disposiciones por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

Por lo expuesto:

Autorizo su presentación ante los organismos competentes para la sustentación del mismo.

Ambato, Febrero del 2013

.....
Tutor: Ing. Gladys Navas Miño.

AUTORIA DE LA INVESTIGACION

La responsabilidad del contenido de este trabajo de investigación, corresponde exclusivamente a Monserrath Elizabeth León Cahuasquí y de la Ing. Gladys Navas, Tutor del Proyecto de Investigación “**APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO COMO ENRIQUECEDOR DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS**” y el patrimonio intelectual de la misma a la Universidad Técnica de Ambato.

.....

Monserrath León C.

Autor

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación, sobre el Tema de investigación: **“APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO COMO ENRIQUECEDOR DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *CIANOBACTERIAS*”**, de la estudiante: Monserrath León C.

Ambato, Enero 2013

Para constancia firman:

MIEMBRO TRIBUNAL

MIEMBRO TRIBUNAL

PRESIDENTE TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios, por las grandes bendiciones en mi vida.

A mi madre por su gran ejemplo de tenacidad, responsabilidad, por su lucha diaria, hoy sé que Dios puso un verdadero ángel en mi vida, gracias por todos tus cuidados y sabios consejos.

A mi padre por su gran amor y apoyo incondicional, por tu entera confianza en cada reto que se me ha presentado, y por hacerme saber que eres alguien con quien siempre puedo contar.

Gracias papá y mamá por su infinito amor, por sus bendiciones diarias, por velar siempre por mi bienestar y educación, y hacer de mí una persona de bien, les amo inmensamente.

A mis pequeños hermanos, por su angelical alegría y más puro amor, son el motor que mueve mi vida, gracias Josué y Milagros, les amo con todo mi corazón.

A mis abuelitos Normita y Pochito, mis ñaños, Miriam, Freddy, Juan, Ale y a mis pequeños primitos, gracias todo por su cariño, por ser una gran familia.

A Alejandro, mis infinitas gracias por ser mi mejor amigo, mi compañero en los buenos y malos momentos, por tu inmenso amor, has sido tú un pilar importante en mi vida para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica de Ambato en especial a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos por haberme acogido en sus aulas en estos años, prepararme en mi vida profesional y fomentar en mí los mejores valores.

A las Ingenieras Gladys Navas y Ana Alfaro por su asesoría, por su orientación y cariño en el proceso de la elaboración de este trabajo.

INDICE

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1	Tema de Investigación	1
1.2	Planteamiento del problema.....	1
1.2.1	Contextualización	2
1.2.1.1	Contexto Macro	2
1.2.1.2	Contexto Meso.....	3
1.2.1.3	Contexto Micro.....	4
1.2.2	Análisis Critico	7
1.2.3	Prognosis.....	7
1.2.4	Formulación del problema	8
1.2.5	Preguntas directrices	8
1.2.6	Delimitación.....	9
1.3	Justificación.....	9
1.4	Objetivos.....	11
1.4.1	Objetivo General.....	11
1.4.2	Objetivos Específicos	11

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1.	Antecedentes Investigativos	12
2.1.1.	LACTOSUERO	12
2.1.1.1.	Propiedades del lactosuero	13
2.1.1.2.	Impacto ambiental generado por el lactosuero	15
2.1.2.	CIANOBACTERIAS	16
2.1.2.1.	GENERALIDADES.....	16
2.1.2.2.	ANTECEDENTES	17
2.1.2.3.	CARACTERISTICAS	18
2.1.2.4.	CLASIFICACION.....	19
2.1.2.5.	FACTORES DE CRECIMIENTO	22
2.1.2.5.1.	Fotobiorreactores	23
2.1.2.5.2.	Nutrientes	23
2.1.2.5.3.	Medios de Cultivo	24
2.1.2.5.4.	Iluminación	25
2.1.2.5.5.	Dinámica de Fluido	28
2.1.2.5.6.	Temperatura.....	28
2.1.2.5.7.	Control de pH.....	28
2.1.2.5.8.	Importancia.....	29
2.2.	Fundamentación Filosófica.....	30
2.3.	Fundamentación Legal	30
2.4.	Categorías fundamentales.....	36

2.5.	Hipótesis	37
2.5.1.	Hipótesis Nula H_0	37
2.5.2.	Hipotesis Alternativa H_1	37
2.6.	Señalamiento de Variables.....	37
2.6.1.	Variable Independiente.....	37
2.6.2.	Variable Dependiente:	37

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1.	Enfoque.....	38
3.2.	Modalidad Básica de Investigación	38
3.3.	Nivel o tipo de Investigación.....	38
3.4.	Población y Muestra	39
3.4.1.	Población	39
3.4.2.	Muestra	39
3.5.	Operacionalización de Variables	40
3.6.	Recolección de Información	40
3.7.	Plan de procesamiento.....	46
3.8.	Análisis de la información	48

CAPITULO IV

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1.	DATOS DE CRECIMIENTO DE CHLORELLA EN UFC.....	49
4.2.	ANALISIS ESTADISTICO.....	49
4.3.	CURVAS DE CRECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS	50
4.4.	VERIFICACION DE LA HIPOTESIS	51

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1.	CONCLUSIONES.....	52
5.2.	RECOMENDACIONES	53

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1.	DATOS INFORMATIVOS	54
6.2.	ANTECEDENTES	55
6.3.	JUSTIFICACION	57
6.4.	OBJETIVOS	58
6.4.1.	Objetivo General.....	58
6.4.2.	Objetivos Específicos	58
6.5.	ANALISIS DE FACTIBILIDAD.....	58
6.6.	FUNDAMENTACION.....	59
6.7.	METODOLOGIA.....	59
6.8.	Modelo Operativo (Plan de acción).....	62
6.9.	ADMINISTRACION.....	63

MATERIALES DE REFERENCIA

Bibliografía	65
ANEXOS.....	73

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones de los sistemas de alcantarillado de la provincia de Tungurahua en el año 1999.....	6
Tabla 2: Composición de Lactosuero dulce y ácido.....	13
Tabla 3: Composición de aminoácidos, expresados en 100 g. de proteína de los sueros lácteos.	14
Tabla 4: Clasificación morfológica de las cianobacterias.....	20
Tabla 4: Operacionalización de variables.....	40
Tabla 5: Medio BG11, ATCC Médium 616 para el crecimiento de cianobacterias..	42
Tabla 6: Mezcla elementos traza.....	42
Tabla 7: Características del motor utilizado para la aireación.....	44
Tabla 8: Características del motor utilizado para la aireación.¡Error! Marcador no definido.	
Tabla 9: Tratamientos en estudio.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 10: Costos de Investigación.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 11: Modelo operativo de la propuesta.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 12: Administración de la propuesta.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 13: Previsión de la Evaluación.....	¡Error! Marcador no definido.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Producción de leche total nacional en la Región Sierra	4
Figura 2: Producción por tamaño UPA en el cantón Ambato	5
Figura 3: Arbol de problema: Desconocimiento del lactouero como enriquecedor de medios de cultivo	7
Figura 4: Proceso de fotosíntesis en algas, fase luminosa y fase oscura.....	26
Figura 5: Trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad.....	27
Figura 6: Efecto de energía luminosa (E) en la tasa fotosintética (F) y en la eficiencia fotosintética (F/E).....	27
Figura 7: Equipo de reacción armado – Biorreactor para el crecimiento de <i>Chlorella</i>	43
Figura 8: Shiglor de cocina doméstica	¡Error! Marcador no definido.
Figura 9: Cruces para pecera	¡Error! Marcador no definido.
Figura 10: Observación microscópica de la muestra de agua – inóculo.....	¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Las Cianobacterias proveen de múltiples beneficios, en la producción de alimentos, sustancias químicas de alto valor comercial, tratamiento de aguas residuales, mejoramiento de suelos y uso potencial como fertilizantes. Por lo anterior, es necesaria la búsqueda de alternativas que reduzcan costos en la producción de estos microorganismos.

Por otro lado, el lactosuero es un residuo líquido que es vertido a efluentes de agua causando un alto índice de contaminación.

En el presente estudio se evaluó el efecto del lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo para el crecimiento de cianobacterias cultivado en un sistema de producción continuo en fotobiorreactores de columna burbujeada. Los tratamientos resultaron de la variación del porcentaje de nutrientes y de lactosuero que fueron de 0, 25, 50, 75 y 100%; se realizaron por triplicado con un volumen de 250 ml, un fotoperiodo de 24 h luz y una temperatura entre 23 y 24 °C.

El seguimiento de los cultivos se realizó cada 48 h, a través de mediciones de pH, temperatura y UFC. Las condiciones permitieron que el género *Chlorella* predominara totalmente sobre otros.

Las Cianobacterias crecieron favorablemente con el tratamiento en combinación del 25% de nutrientes propios del medio de cultivo específico para *Chlorella* y el 100% de lactosuero

El presente estudio permitió conocer los beneficios de producción de *Chlorella* utilizando el lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo y las proporciones adecuadas para conseguir un óptimo crecimiento.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 Tema de Investigación

APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO COMO ENRIQUECEDOR DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE *CIANOBACTERIAS*

1.2 Planteamiento del problema

Los RILES (Residuos Industriales Líquidos) han aumentado debido a las múltiples industrias lácteas que existen en la región, como producto de la elaboración de quesos se genera gran cantidad de lactosuero diariamente, el cual, es un grave contaminante líquido, que al ser arrojado al medio ambiente sin ser previamente tratado, por la gran cantidad de materia orgánica que contiene, promoverá el desarrollo de microorganismos patógenos en el agua, afectando la salud animal y humana.

Es necesaria la implementación de nuevas alternativas que contribuyan a la utilización del lactosuero con el fin de evitar que múltiples plantas industriales viertan estos residuos líquidos a ríos, arroyos o quebradas, lo cual promoverá a la contaminación de suelos y agua del sector.

Con la finalidad de que este desecho no se convierta en un factor más que incremente el impacto ambiental y la generación de enfermedades, se busca aprovechar las propiedades de éste como enriquecedor de proteínas para medios de cultivo de microorganismos importantes a nivel industrial como las *Cianobacterias*.

1.2.1 Contextualización

1.2.1.1 Contexto Macro

Desde la década de los años 60, con el aumento de la industrialización y del crecimiento demográfico, la polución de aguas y aire se ha visto seriamente atacado. Desde entonces se ha empezado a contemplar nuestro entorno, como algo muy delicado que hay que preservar, pues de no ser así se podrían producir alteraciones irreversibles (Ronda, 2000)

La producción mundial anual estimada de suero lácteo es de aproximadamente 145 millones de toneladas, de las cuales 6 millones son de lactosa (Carrillo, 2006).

En la mayor parte de los países considerados desarrollados se aplican tratamientos a las aguas residuales en un porcentaje elevado, la Unión Europea en 1991 creó un plan para el tratamiento de aguas residuales teniendo como resultado que el 60% de la población estuviera conectado a algún sistema de depuración; para el año 2005 esta cifra pasó a ser del 92%.

Desafortunadamente en los demás países, que constituyen más del 80% el agua no recibe tratamiento, por tanto existe gran cantidad de agua contaminada que se vierte a lagos o lagunas y zonas costeras sin previo tratamiento. (Valencia, 2010)

Según Almécija (2007) la distribución de la producción de lactosuero en el mundo en el año 2005 fue: Europa 53%, América del Norte y central 28%, Asia 6%, África 5%, Oceanía 4%, América del Sur 4%, anualmente estos porcentajes representan 110-115 millones de toneladas métricas de lactosuero que son producidas a nivel mundial a través de la elaboración de queso (Briczinskiy Roberts, 2002), se considera que el 45% se desechan en ríos, lagos y otros centros de aguas residuales, o en el suelo, lo que representa una pérdida significativa de nutrientes ocasionando serios problemas de contaminación (Londoño, 2006).

Sin embargo, y a pesar de la falta crónica de proteínas en gran parte del mundo, una proporción muy considerable de la producción total de lactosuero se vierte como residuo y otro por ciento se utiliza en la alimentación de animales.

En España, la producción de quesos según estimaciones de la Unión Europea fue de 287.000 toneladas; por lo tanto, la cantidad producida de suero lácteo pudo ser aproximadamente de 2.870 millones de litros.

El Instituto Tecnológico Agroalimentario (AINIA) ha estimado que la relación de litros de agua residual por litro de leche procesada es de 1 a 4. Los vertidos procedentes de restos de leche, lactosuero (contiene el 50% de nutrientes del producto inicial) y salmueras aumentan considerablemente la carga contaminante del vertido final (Valencia, 2010).

1.2.1.2 Contexto Meso

En el Ecuador existen aproximadamente 30 empresas lácteas industrializadas, se conoce que ALPINA es una de las empresas que ha implementado un sistema de tratamiento de aguas desde el año 2005, por tanto de las 250 empresas artesanales se desconoce que empleen algún tratamiento de los residuos lácteos. En estas industrias se produce 444.195 ton/año de lactosuero que es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación alterando sus propiedades fisicoquímicas.

En el país son seis empresas las productoras más grandes de lácteos, destacándose a nivel regional por su producción diaria de leche en la Sierra aproximadamente se utilizan 2.4 millones de litros al año para producción quesera de los cuales 1.7 millones son de suero láctico (Barba et al., 2010).

La elaboración de productos lácteos es una de las más dinámicas dentro de la industria manufacturera. En el período del 2000-2004 tuvo un promedio anual de crecimiento del 6,3%.

Desde el 2006, la industria nacional de lácteos captó el 31% de la producción nacional (4,08 millones de litros diarios) y cada día capta más para utilizarlos en la diversificación de los productos, demostrando que nuestra industria láctea está en constante crecimiento.

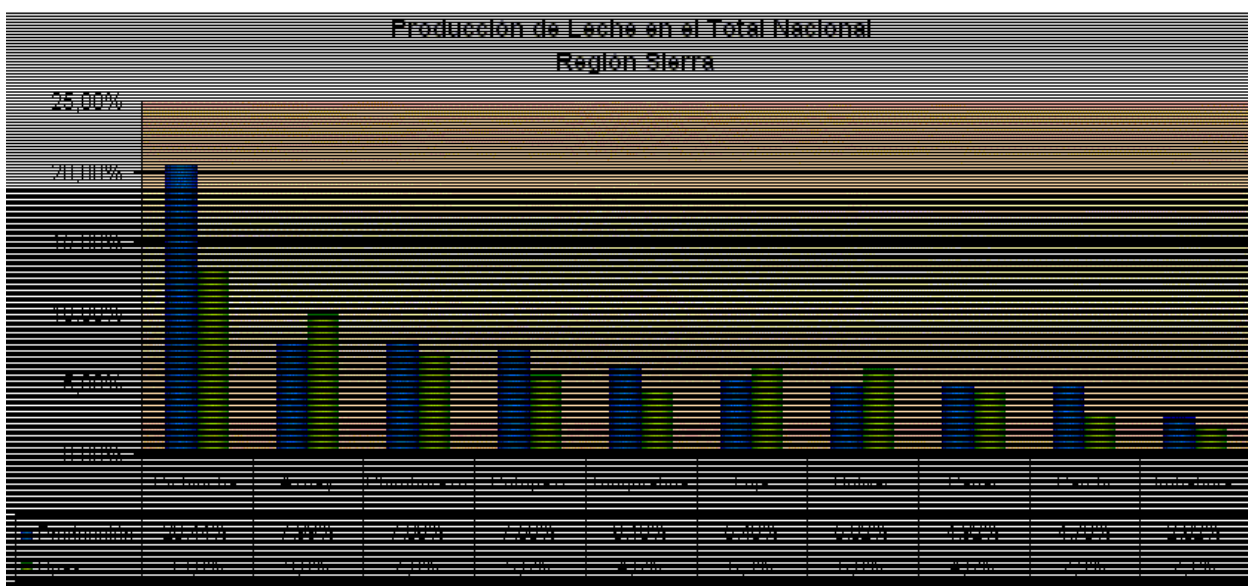


Figura 1: Producción de leche total nacional en la Región Sierra

Fuente: Proyecto SICA. Cámara de la Agricultura de la primera zona

1.2.1.3 Contexto Micro

La provincia de Tungurahua tiene un 6.18% de la producción lechera en cuanto a las demás provincias de la Región Sierra, datos estadísticos del Sistema de Información Agropecuaria (Siagro) se establece que en Tungurahua se producen 265 mil litros de leche diarios.

Esta provincia dispone de tres centros de acopio: en la parroquia Santa Rita de Píllaro, reúne 2 000 litros diarios de leche; Hualcanga, Quero, que recibe el mismo número, y en Sucre, Patate, se almacena 1 300 litros diarios de leche.

Esta leche después es comercializada por la Asociación de Ganaderos de la Sierra y el Oriente.

Producción de leche en el Cantón Ambato

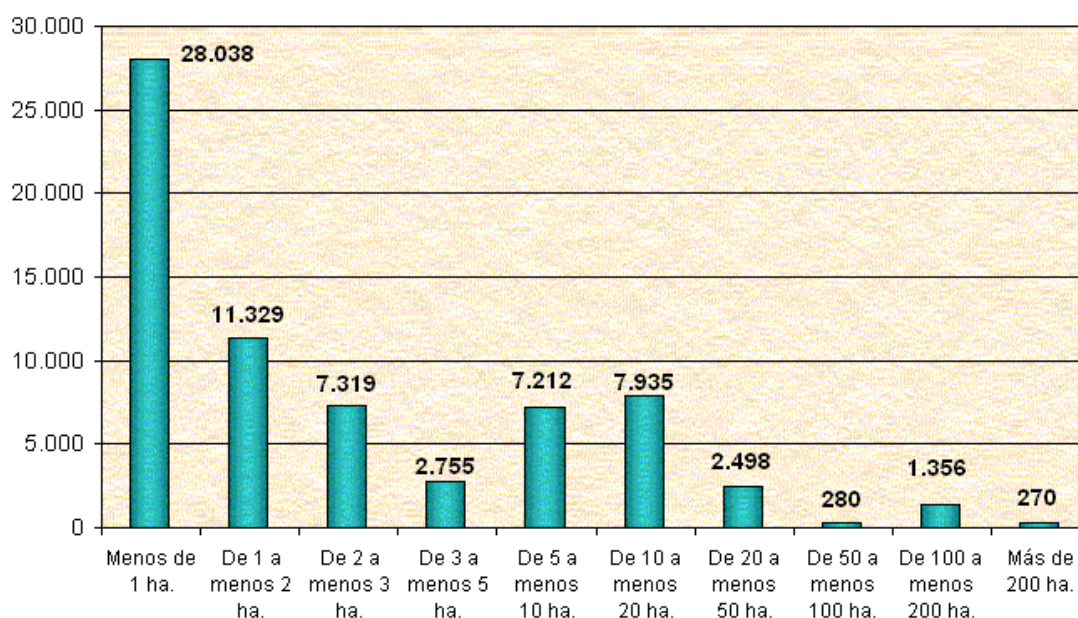


Figura 2: **Producción por tamaño UPA en el cantón Ambato**

Fuente: Proyecto SICA. Cámara de la Agricultura de la primera zona

Desde 1983 se realizaron estudios y se construyeron receptores en las márgenes de ríos y quebradas, que llevan las aguas residuales a la planta de tratamiento, que funciona desde 1999 y que tiene una proyección de diez años más.

Además, se implementaron planes de reciclaje de basura de líquidos industriales para que estos no fueran botados en las alcantarillas. (Diario Hoy, 2010)

Tabla 1: Condiciones de los sistemas de alcantarillado de la provincia de Tungurahua en el año 1999.

PROVINCIA	CANTON	POBLACION URBANA	COBERTURA DE AGUAS RESIDUALES(%)	TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES	
				SI	NO
TUNGURAHUA	Ambato	196,612.00			X
	Baños	11,776.00			X
	Cevallos	2,864.00	50		X
	Mocha	1,225.00	90	X	
	Patate	2,397.00	75		X
	Quero	3,688.00	95		X
	Pelileo	3,688.00	90		X
	Pillaro	6,556.00	70		X
	Tisaleo	1,865.00	80	X	

Fuente: Castro, 2001

La mayor parte de los cantones a nivel de la provincia de Tungurahua no disponen de un sistema de tratamiento de aguas residuales a pesar la gran contaminación de residuos que se genera por considerarse una de las provincias de mayor producción industrial en el Ecuador.

En los últimos años se están implementando nuevos sistemas de alcantarillado los cuales ya constan de entrada a la planta, by pass, un repartidor, tanque séptico, unidades de filtro biológico, canal desarenador, lecho de secado de lodo, cerramiento y la colocación de redes de alcantarillado (diario La Hora, 01 Nov 2012).

1.2.2 Análisis Crítico

Figura 3: Arbol de problema: Desconocimiento del lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo

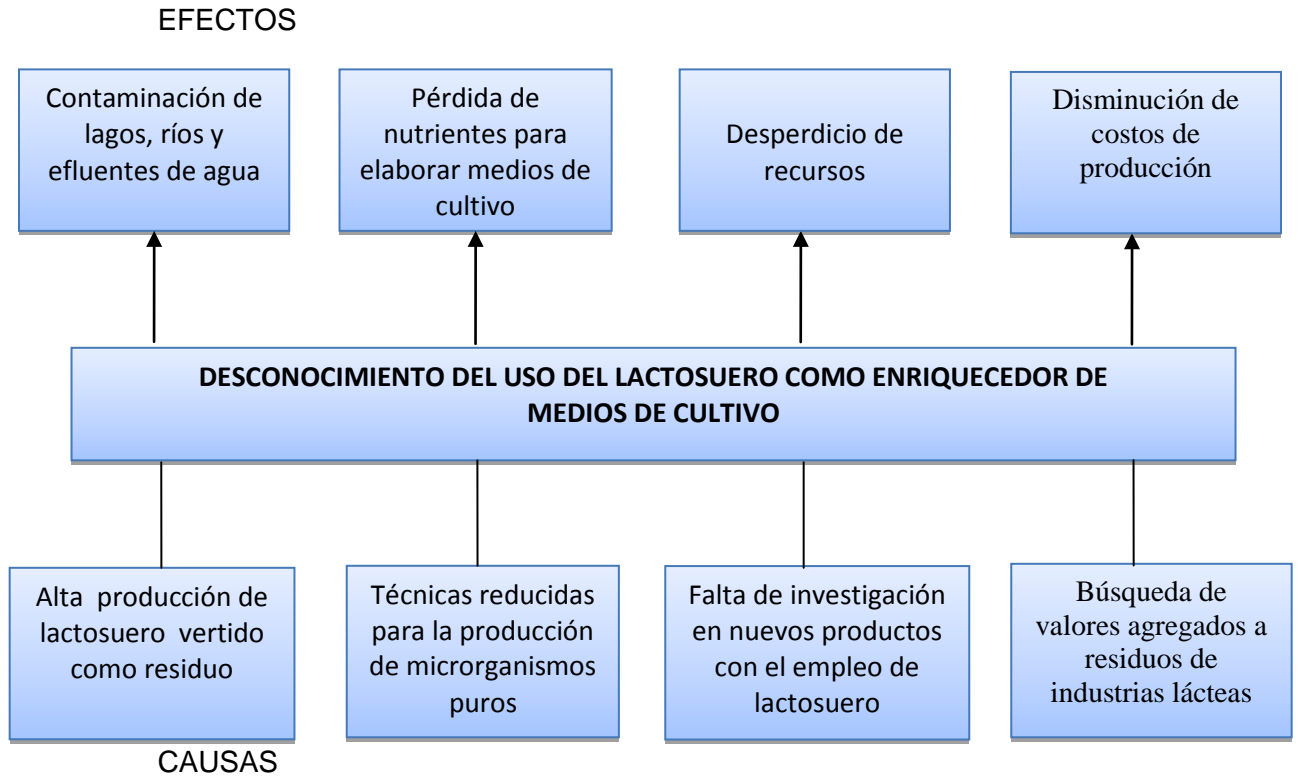


Figura 3: Arbol de problema: Desconocimiento del lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo
Elaborado por: Monserrath León, 2011

1.2.3 Prognosis

Al no realizar este proyecto se continuará eliminando irresponsablemente gran cantidad de lactosuero, lo cual promueve el alto índice de contaminación de lagunas, ríos y demás efluentes de agua, indispensables para cultivos, animales y salud humana.

El lactosuero, al ser aprovechado como enriquecedor para medios de cultivo en el crecimiento de microorganismos, permitirá un método de producción más adecuado y económico, contribuyendo a la vez con la disminución del impacto ambiental que este desecho provoca.

Si no se implementan nuevas alternativas para el uso de este desecho se desperdicia una potencial materia prima rica en proteínas y azúcares a más de la pérdida económica a nivel industrial, por lo cual es importante evaluar la efectividad del crecimiento de microorganismos benéficos como las cianobacterias en un medio enriquecido con lactosuero.

Existe una grave contaminación ambiental provocada por la industria a nivel mundial, que se debe empezar a corregir.

1.2.4 Formulación del problema

¿Es el lactosuero un efectivo enriquecedor de medios de cultivo para obtener un buen rendimiento en el crecimiento de cianobacterias?

1.2.5 Preguntas directrices

- ¿Cómo influyen los nutrientes del lactosuero en el enriquecimiento de los medios de cultivo utilizados para el crecimiento cianobacterias?
- ¿Cuáles son las concentraciones de lactosuero que presentan mayor efectividad en el crecimiento de cianobacterias?
- ¿Cuál es el tratamiento que presenta el máximo valor en UFC determinados en la cámara de neuvauer?
- ¿Para qué realizar la curva de crecimiento con el mejor tratamiento obtenido?

1.2.6 Delimitación

Campo Científico: Biotecnología

Área: Bioquímica

Sub-área: Microbiología Industrial

Sector: Producción de cianobacterias a partir de lactosuero

Sub-sector: Producción de algas

Temporal: Noviembre 2011 – Mayo 2012.

Espacial: Universidad Técnica de Ambato, Laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos

1.3 Justificación

En la actualidad la mayor preocupación de la humanidad a nivel mundial es la contaminación del medio ambiente, por ser la principal causa del daño a la salud.

El agua es uno de los recursos naturales de vital importancia para la sociedad por lo que su conservación debe ser a diario un objetivo principal, es importante buscar soluciones para disminuir la potencial contaminación que sufre a nivel doméstico e industrial. Una de las áreas productivas que causan dicha contaminación son las industrias lácteas por la generación de lactosuero en la producción de quesos.

En la provincia de Tungurahua se encuentran instaladas múltiples industrias lácteas de las cuales se genera un alto volumen de lactosuero, un desecho líquido que contiene gran cantidad de materia orgánica, la cual al ser eliminada a efluentes de agua, contribuirá al crecimiento de microorganismos patógenos, peligrosos para su consumo afectando a la agricultura, salud pública y sanidad animal.

Por otra parte, el lactosuero puede ser aprovechado como aporte de nutrientes para el crecimiento de importantes microorganismos de interés industrial, con la contribución de un significativo porcentaje de nutrientes, logrando así una producción más limpia como una alternativa para el uso de este residuo.

Además, es importante conocer el beneficio económico que aportaría el lactosuero en los medios de cultivo al permitir el crecimiento de microorganismos como las *Cianobacterias*.

Este tipo de producción de microorganismos también favorecerá a personas dedicadas a esta actividad con un ahorro significativo de materia prima y recursos económicos.

Por ello amerita comprobar si existe un aporte en el rendimiento de producción, para lo cual es necesario realizar pruebas comparativas del desarrollo de los diferentes microorganismos en los medios de cultivo en condiciones de laboratorio.

Esta investigación proporcionará un beneficio directo a las poblaciones en las que se encuentran instaladas las industrias lácteas que no cuentan con sistemas de tratamiento previo de desechos líquidos que se producen diariamente, debido a que se contribuirá con la disminución de la contaminación y pérdida de flora y fauna que el lactosuero provoca en las zonas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

- Aprovechar los nutrientes que contiene el lactosuero como enriquecedor en medios de cultivo para el crecimiento de cianobacterias

1.4.2 Objetivos Específicos

- Elaborar un medio de cultivo para el crecimiento de Cianobacterias enriquecido con lactosuero en diferentes porcentajes.
- Determinar el crecimiento de los microorganismos de cada tratamiento mediante recuento en la cámara de Neubauer.
- Analizar cuál es el mejor tratamiento para la elaboración de la curva de crecimiento.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes Investigativos

2.1.1. LACTOSUERO

El lactosuero se define como “la sustancia líquida obtenida por separación del coágulo de leche en la elaboración de queso” (Foegeding y Luck, 2002). Es el líquido que se produce después de la precipitación de la leche de la caseína. (Jelen, 2003).

La industria láctea es considerada una de las más importantes de la economía en países industrializados y en vías de desarrollo. Aproximadamente el 90% de la leche utilizada en la industrias productoras de queso es eliminada como lactosuero, el cual contiene cerca de 55% de los ingredientes de la leche como la lactosa, proteínas solubles, lípidos y sales minerales.

Ya han sido desarrolladas algunas propuestas para la utilización de este residuo, pero las estadísticas indican que la mayor cantidad de este desecho es descartado como efluente creando de esta lo cual afecta física y químicamente la estructura del suelo, lo que provoca una importante disminución en la agricultura, y en el agua disminuye la diversidad biológica al agotarse el oxígeno disuelto (Aider et al., 2009).

El gran contenido de nutrientes que contiene el lactosuero genera aproximadamente 3,5 kg de demanda biológica de oxígeno (DBO) y 6,8 kg de demanda química de oxígeno (DQO) por cada 100 kg de lactosuero

líquido (Muñi et al., 2005), siendo la lactosa, el principal componente de sólidos que contribuye al alto número de DBO y DQO (Ghaly y Kamal, 2004).

2.1.1.1. Propiedades del lactosuero

Las proteínas que se encuentran presentes en este residuo han sido previamente evaluadas para la seguridad y consumo de alimentos en humanos. Una posible explicación de los efectos de las proteínas de lactosuero sobre el consumo de alimentos puede estar en los péptidos presentes y sus acciones fisiológicas relevantes al consumirlos regularmente (Chung et al., 2009).

Tabla 2: Composición de Lactosuero dulce y ácido

Componente	Lactosuero dulce (g/L)	Lactosuero ácido (g/L)
Sólidos totales	63,0- 70,0	63,0- 70,0
Lactosa	46,0- 52,0	44,0- 46,0
Proteína	6,0- 10,0	6,0- 8,0
Calcio	0,4- 0,6	1,2- 1,6
Fosfatos	1,0- 3,0	2,0- 4,5
Lactato	2,0	6,4
Cloruros	1,1	1,1

Fuente: Panesar, et al., 2007

Los productos lácteos que se encuentran dentro del sector agroalimentario, se ha convertido en uno de los factores más importantes de la cadena alimenticia. Machado-Allison (2002).

Los productos de mayor comercialización a nivel internacional son leche en polvo, entera y descremada, quesos y mantequillas, siendo estos dos últimos productos, los que generan un mayor impacto ambiental.

El suero lácteo, tiene un constituyente mayoritario, el agua: 94-95%, todos los procesos industriales actuales, se polarizan a la eliminación del agua,

recoger las sales minerales, cristalizar la lactosa, y recuperar en su total valor biológico las proteínas de los sueros, sin alterar sus cualidades.

Tabla 3: Composición de aminoácidos, expresados en 100 g. de proteína de los sueros lácteos.

Aminoácidos	Vaca	Oveja	Cabra
Ácido aspártico	8,50	10,00	9,80
Treonina	5,30	7,00	6,50
Serina	4,40	5,40	5,90
Ácido glutámico	16,30	15,00	15,20
Prolina	6,00	5,50	5,40
Glicina	2,00	2,50	2,70
Alanina	4,20	6,20	5,80
Valina	5,50	5,40	5,70
Metionina	1,70	2,20	2,30
Isoleucina	5,40	5,30	5,30
Leucina	9,00	9,10	9,30
Tirosina	4,10	4,30	4,30
Fenilalanina	5,00	4,90	5,10
Lisina	8,10	8,50	8,30
Histidina	1,60	1,60	1,70
Arginina	2,30	2,40	2,40
Cistina	1,40	2,30	2,20
Triptófano	1,20	1,80	1,70

Fuente: Ronda, 2000

2.1.1.2. Impacto ambiental generado por el lactosuero

El impacto ambiental de la industria de productos derivados de lácteos se enfoca en los efluentes líquidos que contienen un alto porcentaje de materia orgánica proporcionada por la pérdida de producto durante el procesamiento y los lodos producidos en su tratamiento, y los efectos que se provocan dependen tanto del nivel de tratamiento de los efluentes como de las características del cuerpo receptor, (CONAMA-Región Metropolitana,1998).

Al igual que otras industrias de producción de bienes agrícolas, el sector de lácteos ha sufrido grandes cambios en los últimos años para incrementar su rendimiento, lo que ha traído como consecuencia una mayor generación de descargas líquidas, sólidas y gaseosas.

Correspondientemente las restricciones ambientales se tornan cada vez más severas, lo que ha obligado a la industria a realizar acciones dirigidas al cumplimiento de dichas normativas.

Los principales contaminantes de la industria de derivados lácteos provienen de los procesos de producción de queso (suero) y mantequilla (suero y agua de lavado de la mantequilla).

Habitualmente, el manejo de los desechos que se producen se concentran en reducir el impacto ambiental ocasionado por los efluentes a través de plantas de tratamiento, práctica conocida como “al final del tubo”, cuyos elevados costos de inversión, operación y mantenimiento, resulta económicamente insostenible para la mayoría de las empresas.

Además, como el manejo y disposición de las descargas no forma parte del proceso productivo de la empresa, se ve como un gasto y no como una inversión a largo plazo y no justificable con las dificultades financieras con las que pueden atravesar las empresas. (Najul et al, 2001).

Considerando la carga contaminante de diversos fluyentes, el valor de un equivalente-habitante se corresponde a la elaboración de:

- 3-8 kg de productos cárnicos.
- 1 kg de mantequilla.
- 35 litros de leche de vaca.
- 1 kg de queso sin suero.
- kg de conservas de frutas o verduras.
- 0,3-1,0 kg de azúcar de remolacha.
- 0,15-0,25 kg de celulosa.
- 1-10 kg de papel.
- 0,25-0,30 litros de suero.

Es decir, 0,25-0,30 litros de suero sin depurar equivalen, aproximadamente, a la contaminación de las aguas residuales correspondientes a un habitante en un día.

Por tanto, una industria quesera media que produzca diariamente 400.000 litros de suero sin depurar, está produciendo una contaminación diaria similar a una población de 1.250.000 habitantes.

La eliminación de los sueros lácteos a los ríos está prohibida, moral y legalmente, por lo tanto hay que seguir dos caminos: aprovechamiento íntegro del suero, o depuración.

2.1.2. CIANOBACTERIAS

2.1.2.1. GENERALIDADES

Las cianófitas son consideradas de gran importancia por haber sido dominantes de la Tierra durante más de 1500 millones de años por que

contribuyeron a la oxigenación de la atmosfera primitiva del planeta. (Puzl & Gross, 2004)

Las cianobacterias o cianofíceas (algas azules), son microorganismos procariontes, aeróbicos y fotoautótrofos. La fotosíntesis es su principal modo de obtención de energía.

La estructura fina de las cianobacterias es bien conocida. Son organismos fotoautótrofos, que realizan la fotosíntesis con liberación de oxígeno, presentan clorofila *a* como pigmento fotosintético primario y ficobiliproteínas como pigmentos auxiliares (Bryant, 1986; Whitton y Potts, 2000).

Metabólicamente se caracterizan y distinguen de otros procariontes, por ser foto autótrofos oxigénicos, es decir, son organismos fotosintéticos que producen O₂.

2.1.2.2. ANTECEDENTES

Los cultivos comerciales de fotoautótrofos a gran escala iniciaron en los años 60 en Japón con la producción de *Chlorella*. Posteriormente, en los años 70 se estableció el cultivo de *Arthrospira*, utilizada para la nutrición humana y animal, en el lago de Texcoco por Sosa Texcoco S.A. en México.

Para 1980, en Asia existían 46 fábricas de gran escala que producían más de 1000 kg de microalgas (*Chlorella* principalmente) por mes. Durante los mismos años, la producción a gran escala de cianobacterias había iniciado en la India. De esta manera, en un periodo de 30 años, la industria de la biotecnología algal creció y se diversificó en gran medida (Spolaore et al., 2006)

A partir de la escasez de alimento en el mundo, entre 1935-1940, surge el interés de desarrollar sistemas algales tendientes a encontrar nuevas

fuentes de proteínas. Entre las diferentes fuentes no convencionales de proteínas, las microalgas probablemente tengan la más larga historia.

Durante la II Guerra Mundial científicos alemanes empezaron a cultivar microalgas masivamente para obtener lípidos y proteínas, reconociendo a la biomasa algal como un suplemento alimentario importante. (Venkataraman y col. 1985).

Además, las microalgas juegan desde los años 40 un papel importante en acuicultura (Goldman 1979)

Consecuentemente, ya en los años 60, fue notable el éxito obtenido con la producción comercial de *Chlorella* en Japón y Taiwán como alimento natural (Soong, 1980).

Uno de los usos potenciales de la actividad biológica de los compuestos obtenidos de las cianobacterias es su capacidad de producir sustancias antibióticas (Torres-Ariño, 2001).

2.1.2.3. CARACTERISTICAS

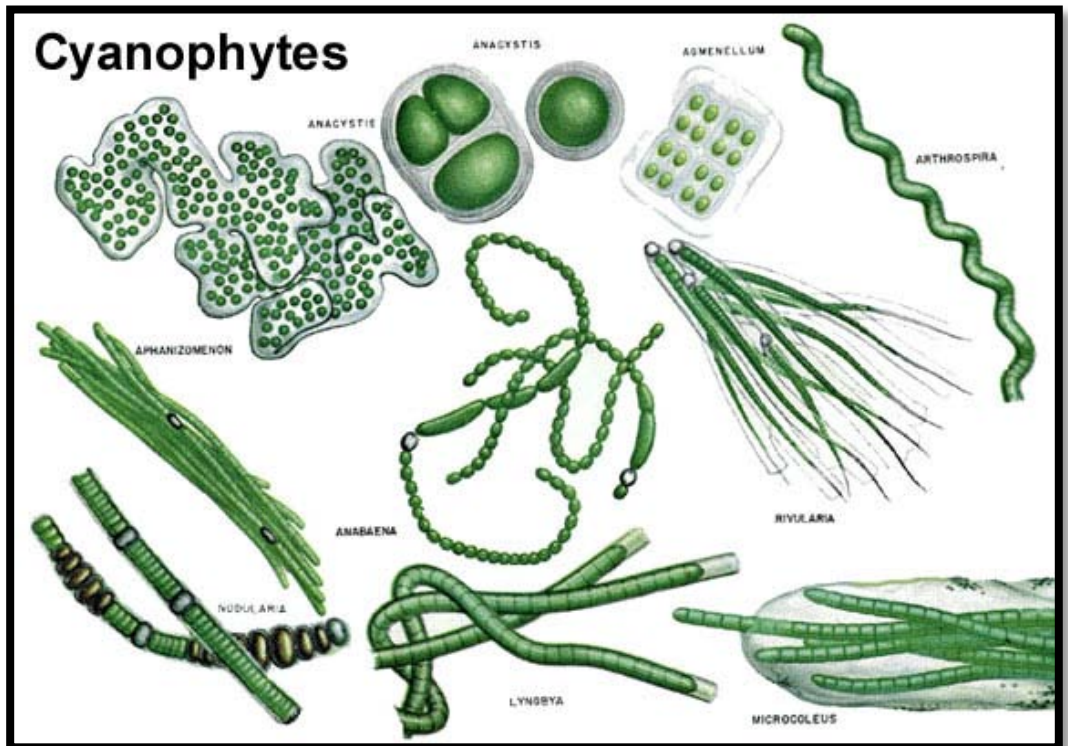
La característica más importante que poseen las cianófitas es su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, pues son capaces de convertir el N_2 en amonio, que puede ser posteriormente utilizado para la formación de aminoácidos, proteínas y otros compuestos orgánicos nitrogenados.

La fijación del nitrógeno se lo realiza en células especializadas denominadas heterocistes, que contienen la enzima nitrogenasa, la cual se encarga de producir y distribuir nitrógeno en el caso de no existir lo suficiente. (Pulz & Gross, 2004)

2.1.2.4. CLASIFICACION

Las cianobacterias se ubican en el Phylum Cyanophyta y se dividen básicamente en cinco grupos morfológicos (Lee, 1999; Madigan et al., 2004)


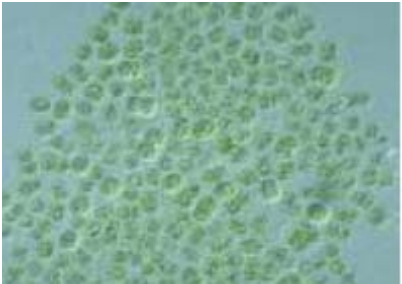
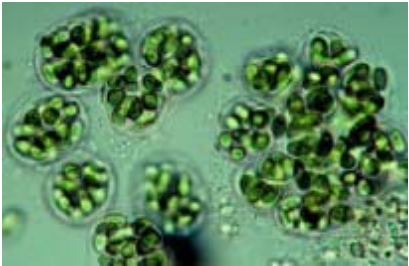
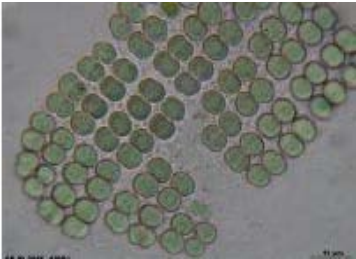
Figura 3: Grupos morfológicos de las cianobacterias



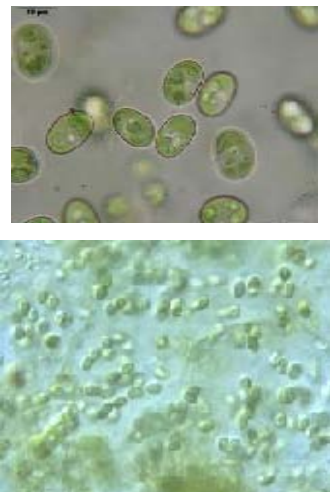


Fuente: Madigan et al., 2004

El número de especies conocidas de cianobacterias ronda las 2.000; una parte importante de ellas son unicelulares. El resto de las cianobacterias son pluricelulares, constituyendo filamentos simples entre cuyas células existe intercambio de sustancias, a través de estructuras similares a los plasmodesmos.

Tabla 4: Clasificación morfológica de las cianobacterias

Ejemplares	Algunos Géneros	Descripción
	Chroococcus	cenobio globular con numerosas células esféricas unidas por capas mucilaginosas
	Microcystis	cenobio de forma irregular, células esféricas o alargadas
	Gloeocapsa	cenobios planos con un número de células múltiplo de dos, unidas por capas concéntricas mucilaginosas.
	Merismopedia	cenobios en planos rectangulares ordenados

	<p>Dermocarpa</p>	<p>Unicelular fija, se reproducen por endósporas</p>
	<p>Chamaesiphon</p>	<p>células aisladas en grupos, fija al sustrato por un peduncilo reproducción por exosporas</p>
	<p>Pleurocapsa</p>	<p>son células vegetativas agrupadas en hilera que llevan a cabo la fotosíntesis. Su multiplicación es por endosporas.</p>
	<p><i>Aphanothece</i></p>	<p>rebaño flotante de cianobacterias. Diminutas, elípticas o casi esféricas, cada célula vive junto a las demás, formando una colonia casi globosa, pero de contornos irregulares, todas juntas, pero lo suficientemente separadas para no hacerse sombra ni robar los nutrientes, el oxígeno o el nitrógeno que pudieran necesitar sus vecinas.</p>

Fuente: Wagner, 2005

2.1.2.5. FACTORES DE CRECIMIENTO

Durante los años 60 y 70 , varios grupos dedicados a la investigación tanto de países desarrollados como en vías de desarrollo se dedicaron a intentar producir biomasa con buenos rendimientos que pudieran equipararse a los obtenidos con microorganismos no autótrofos (principalmente levaduras).

En el transcurso de los años se pudieron diversificar las áreas donde las microalgas eucariotas y cianobacterias cultivadas masivamente tienen aplicaciones prometedoras.

El cultivo intensivo de microalgas ha sido posible en gran medida gracias al desarrollo de nuevos diseños de fotobiorreactores (Contreras – Flores et al., 2003)

Existen dos diseños básicos para la producción de microorganismos fotoautotróficos los sistemas abiertos en los que el cultivo está expuesto a la atmosfera y los sistemas cerrados, comúnmente denominados fotobiorreactores , en los que el cultivo tiene poco o ningún tipo de contacto con el ambiente atmosférico (Grobbelaar, 2000).

Cuando las condiciones ambientales son desfavorables, las cianobacterias mueren, produciéndose la lisis celular y la liberación de las toxinas al medio (Paerl, 1996).

Para controlar los factores que inciden en el crecimiento de los microorganismos es necesaria la implementación de un fotobiorreactor que permita el seguimiento de las condiciones en las que se encuentra el medio.

2.1.2.5.1. Fotobiorreactores

Los fotobiorreactores pueden ser definidos como sistemas de cultivo para microorganismos fotoautótrofos, en los cuales gran cantidad de luz (más del 90%) no incide directamente sobre la superficie del cultivo, pero pasa a través de la pared transparente del reactor para llegar al cultivo celular.

En consecuencia los fotobiorreactores no permiten o limitan fuertemente, el intercambio directo de gases contaminantes entre el cultivo y la atmosfera (Tredici, 2004).

2.1.2.5.2. Nutrientes

Las Cianobacterias presentan tres tipos de nutrición:

- a) Quimioheterótrofos facultativos, utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía además de ser capaces de crecer en la oscuridad fototroficamente en la luz.
- b) Fotótrofos obligados, no pueden utilizar compuestos orgánicos como fuentes de energía y carbono.
- c) Fotoheterótrofos, utilizan la luz como medio de energía y moléculas orgánicas simples como fuente de carbono, pero no lo hacen en la oscuridad.

Su facilidad de crecimiento favorece su aparición tanto en el suelo como en el medio acuático, preferentemente en los ambientes dulceacuícolas de aguas alcalinas o neutras con pH entre 6 y 9, y temperaturas entre 15 y 30°C. Prefieren una alta concentración de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. (Mez et al., 1997)

2.1.2.5.3. Medios de Cultivo

Si una población microbiana mixta se introduce en un medio selectivo líquido hay una competencia directa por los nutrientes entre los miembros de la población que se desarrolla.

Por ello, los medios de enriquecimiento líquidos tienen a seleccionar los microorganismos de más elevada tasa de crecimiento entre todos los miembros de la población que se ha introducido, y que son capaces de crecer bajo las condiciones suministradas. (Stanier R., 1992)

Hay muchas recetas de medios de cultivos para el crecimiento y mantenimiento de cianobacterias y microalgas en laboratorio. Las principales consideraciones para desarrollar estas formulaciones son:

La concentración total de sal depende del origen ecológico del organismo (agua dulce, suelo, ambientes marinos, o hipersalinos, etc).

La composición y concentración de los componentes iónicos mayoritarios tales como el K, Mg, Na, Ca, sulfato y fosfato.

El crecimiento es altamente dependiente de la disponibilidad de nitrógeno. Las fuentes de nitrógeno más utilizadas son: nitrato, amonio o urea; todo depende de la especie y del pH óptimo de crecimiento. En el caso de cianobacterias fijadoras de nitrógeno no es necesaria la presencia de estas fuentes.

La fuente de carbono más comúnmente utilizada es el CO₂ gaseoso suministrado en diferentes proporciones con el aire (0,03-5%). Otra fuente es el bicarbonato o el carbonato, todo dependerá del pH de cultivo óptimo del organismo.

Elementos traza. Para la estabilidad de la mezcla de estos elementos traza se utilizan agentes quelantes tales como el citrato y el EDTA. Vitaminas y pH.

2.1.2.5.4. Iluminación

Generalmente al realizar cultivos en grandes cantidades la luz se transforma en un limitante. (Yun y Park 2001), por lo cual es necesario tener en claro la gran dependencia de la luz para la actividad metabólica de microalgas y cianobacterias pues es de gran importancia para la producción de estos microorganismos y de los metabolitos de importancia económica que se producen en su crecimiento. (Jeon *et al.* 2005)

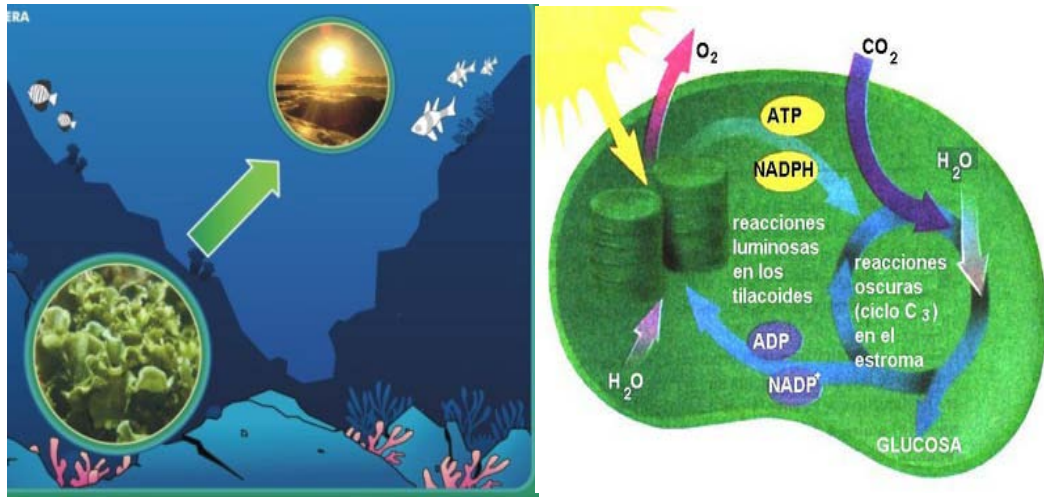
La radiación solar está formada por dos tipos de radiación UV – A y UV – B, de las cuales esta última provoca alteraciones en las células de los autótrofos (Gao *et al.*, 2004)

- a) Fotoblanqueamiento de la clorofila a
- b) Degradación de las proteínas receptoras de luz
- c) Inhibición de la fijación del N₂
- d) Afectación del crecimiento
- e) Daño en el ADN

Para realizar la fotosíntesis utilizan la luz proveniente del sol, sin embargo, para los cultivos a nivel de laboratorio no pueden ser contralados debido a la variabilidad en la intensidad que se presenta durante el día.

En cultivos de microorganismos fotoautótrofos, la intensidad de la luz determina la velocidad a la que se realiza la fotosíntesis y por tanto la velocidad de crecimiento.

Figura 4: Proceso de fotosíntesis en algas, fase luminosa y fase oscura



Fuente: Wagner, 2005

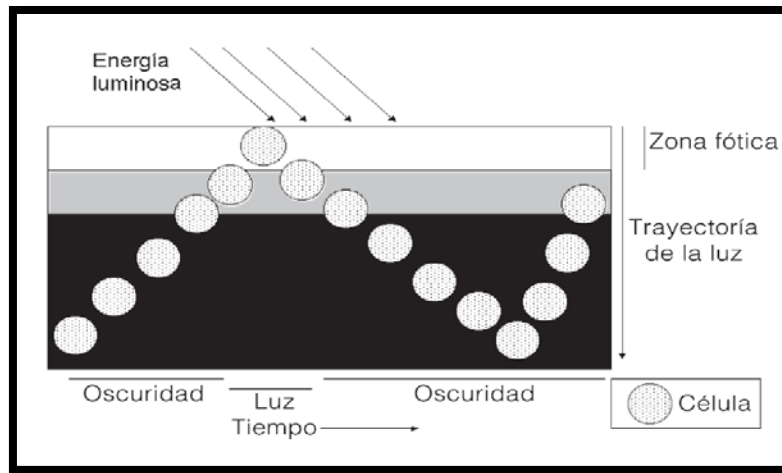
En todos los cultivos de microalgas y cianobacterias las células que se encuentran más cercanas a la luz impiden el paso de la misma a aquellas que están alejadas de la superficie.

En ciertos cultivos se ha estimado que la luz penetra de 1 a 2 mm más allá de la superficie, por lo que la zona fótica es del 10 al 30% del volumen del cultivo (Contreras – Flores et al., 2003).

Contreras – Flores et al. (2003) lograron una mayor producción de cultivos de *Spirulina platensis* al reducir el diámetro del reactor (1-3 cm), y con ello disminuyeron la trayectoria de la luz e incrementaron la frecuencia con la que las células fueron expuestas a la luz.

La trayectoria de la luz es la distancia transversal que debe recorrer un fotón para pasar a través de un fotobiorreactor (Richmond, 1993),

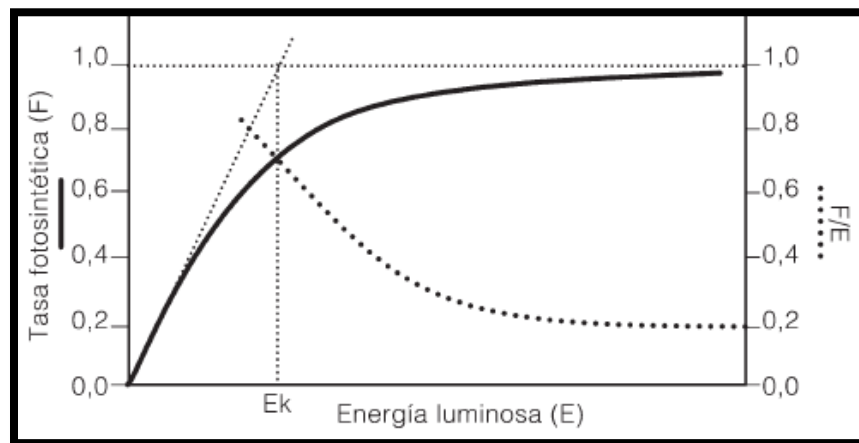
Figura 5: Trayectoria de la luz y de los ciclos luz/oscuridad



Fuente: (Richmond, 2000).

La rapidez de la fotosíntesis aumenta con la intensidad de la luz, pero niveles de energía incidente superiores a cierto valor (E_k) inducen solo pequeños cambios en la tasa de fotosíntesis celular (F) (Figura 5).

Figura 6: Efecto de energía luminosa (E) en la tasa fotosintética (F) y en la eficiencia fotosintética (F/E)



Fuente: (Richmond, 2000).

La curva dosis – respuesta describe lo que sucede cuando la luz es el factor limitante y todas las células reciben la misma cantidad de energía luminosa, como sucede en una capa celular delgada o en cultivos de muy baja densidad celular. (Richmond, 2000).

2.1.2.5.5. Dinámica de Fluido

El mezclado puede inducirse de muy diversas maneras; sin embargo, los sistemas basados en la aireación (columnas burbujeadas o airlift) son usados en fotobiorreactores sencillos y porque pueden diseñarse para inducir un esfuerzo de corte pequeño que no cause daño mecánico a las células (Richmond et al.,1993).

2.1.2.5.6. Temperatura

La selección de la temperatura puede usarse también con gran efectividad para el aislamiento de cianobacterias, que se parecen mucho a las algas en los aspectos nutritivos y metabólicos.

Las cianobacterias se encuentran a diferentes rangos de temperatura y muchas son mesófilas con óptimos de crecimiento entre los 20 - 35°C (Waterbury et al.,1986).

Tanto las algas como las cianobacterias pueden crecer en un medio mineral simple incubado en presencia de luz a 25° C.

2.1.2.5.7. Control de pH

La relación entre el pH y el crecimiento de algunas especies de cianobacterias favorece el mayor crecimiento o establecimiento de los organismos biológicos a condiciones ligeramente alcalinas como lo observado por Morales, 2002 cuando en desarrollado in vitro la producción de exopolisacáridos (EPS) se vio favorecido en un rango de pH entre 8 y 10.

Así también la cianobacteria sp. que se cultiva para alimento por su alto contenido proteico, es desarrollado a pH alcalino como condición óptima de crecimiento (Ramírez- Moreno 2006).

2.1.2.5.8. Importancia

Las microalgas y cianobacterias han sido estudiadas ampliamente debido a varios beneficios que estas poseen, como por ejemplo, la producción de biomasa como una fuente de compuestos químicos que posee un gran valor económico (Ventosa y Nieto 1995) además de muchos otros usos.

Cada vez aumenta más el interés por el desarrollo de procesos que permita el eficiente cultivo de microalgas y cianobacterias, debido a que son como una fuente de sustancias de uso industrial y farmacológico de gran valor económico; tales como clorofila, carotenoides, ficobiliproteínas, proteínas, exopolisacáridos y otros metabolitos biológicamente activos (Hejazi y Wijffles 2004, Dayananda et al. 2007).

Los pigmentos fotosintéticos que presentan son la clorofila a y otros pigmentos accesorios que son a la vez protectores como las ficobilinas y carotenoides, los cuales están asociados a las membranas. (Puzl & Gross, 2004)

Varias especies de cianobacterias en ambientes acuáticos, pueden producir potentes toxinas; sin embargo, dentro de la misma especie, pueden existir cepas productoras y no productoras.

En muchos casos, las toxinas son metabolitos secundarios en la formación de los fotopigmentos, que se acumulan en el citoplasma en determinadas situaciones (Paerl, 1996).

La producción de estas endotoxinas es máxima cuando las condiciones de crecimiento son óptimas, por este motivo, se observa una producción directamente proporcional al aumento de la biomasa (Robillot et al., 2000).

Se ha establecido también la factibilidad del uso del cultivo de estos microorganismos para ensayos biológicos y fisiológicos, lo cual ha demostrado que son adecuados para estudiar los efectos de distintos agentes químicos sobre los organismos (Acosta, 2006)

2.2. Fundamentación Filosófica

La presente investigación estará basada en el paradigma positivista como modelo de la investigación científica, el cual se deriva de los avances de las ciencias naturales y el empleo del método experimental.

Permite la verificación y la predicción de la hipótesis de investigación, la sobrevaloración del experimento, el empleo de métodos cuantitativos y de técnicas estadísticas para el procesamiento de la información, pues busca la relación causa efecto. Utiliza el laboratorio como escenario, orientando la investigación a la verificación, dando gran énfasis al análisis de resultados.

Este paradigma pone su acento en lo observable y medible, en donde subyace el observado en el proceso de evaluación, es decir lo que interesa aquí es producir información que sea de utilidad para el control.

2.3. Fundamentación Legal

2.3.1. LEY PARA LA CONSERVACIÓN Y USO SUSTENTABLE DE LA BIODIVERSIDAD

La constitución de la república del Ecuador considera que:

Artículo 3.- Es deber primordial del Estado proteger el Medio Ambiente.

Artículo 20.- El inicio de toda actividad que suponga riesgo ambiental debe contar con licencia respectiva, otorgada por el Ministerio del ramo, quien podrá otorgar o negar la emisión de la misma.

Art. 86 .- declara de interés público a la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y el patrimonio genético del país, a la recuperación de espacios naturales degradados, al establecimiento de un Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas que garanticen la conservación de la biodiversidad y el mantenimiento de los servicios ecológicos.

Que, los Arts. 89, 242 y 248 de la Constitución Política de la República declaran respectivamente que el Estado tomará medidas orientadas a regular, bajo estrictas normas de bioseguridad, la propagación en el medio ambiente, la experimentación, el uso, la comercialización y la importación de organismos genéticamente modificados; que la organización y funcionamiento de la economía responderá, entre otros principios, al de sustentabilidad; y ratifica el derecho soberano del Estado sobre la biodiversidad, promoviendo su conservación y utilización sustentable con la participación de las poblaciones involucradas, y de conformidad con los convenios y tratados internacionales.

2.3.2. Ley de Gestión Ambiental

Constituye el cuerpo legal específico más importante de control ambiental en el país. Está relacionada directamente con la prevención, control y sanción a las actividades contaminantes a los recursos naturales, así como determina las obligaciones, niveles de participación de los sectores públicos y privados en la gestión ambiental y señala los límites permisibles, controles y sanciones dentro de este campo.

Artículo 86.- Declara de interés público la Preservación del Medio Ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país; así como la prevención de la

contaminación ambiental, la recuperación de los espacios naturales degradados; el manejo sustentable de los recursos naturales.

Por otro lado en el Plan Nacional del Buen Vivir se destaca que: Un segundo eje de trabajo debe prevenir y enfrentar los niveles de contaminación tanto de los espacios terrestres, acuáticos y atmosféricos, de las zonas urbanas, rurales y marinas.

2.3.3. TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION SECUNDARIA (TULAS)

TULAS, Libro I: “De la Autoridad Ambiental” y “De la Estructura Orgánica del MA”: Competencia MAE: Formular, promover y coordinar políticas de Estado, dirigidas hacia el desarrollo sustentable y la competitividad del país.

Proteger el derecho de la población a vivir en un ambiente sano; y Asegurar la conservación y uso sustentable del capital natural del país.

Dirigir la gestión ambiental integral, en el ámbito del distrito regional, promoviendo el uso sustentable y la conservación a través de políticas, normas e instrumentos de fomento y control de la calidad ambiental del país.

Acuerdo Interinstitucional

Competencias del Comité de Residuos: Asesorar al SNDGA, armonizar los roles y las competencias de las instituciones del Estado en la Gestión de residuos; Promover el reordenamiento jurídico.

Priorizar los temas de acción y los recursos que guardan relación con el tema de residuos en el Ecuador; Coordinar la participación de instancias similares de otros ámbitos, niveles o sectores, en tanto sea preciso que se relacionen con el sector de los residuos.

Monitorear los proyectos sectoriales referentes a la gestión de residuos que se encuentren en marcha; Desarrollar medidas o acciones orientadas a controlar los aspectos negativos de la gestión de residuos en el Ecuador.

Actuar coordinadamente frente a situaciones de emergencia; Estructurar un Plan Básico Anual, estableciendo metas, responsabilidades y compromisos tendientes a obtener un adecuado manejo de residuos en el Ecuador.

Reglamentar su operatividad con el fin de lograr un funcionamiento adecuado.

2.3.4. LIBRO VI DE LA CALIDAD AMBIENTAL

SISTEMA UNICO DE MANEJO AMBIENTAL

También llamado SUMA, dentro del capítulo VI, del control ambiental, sección I. Estudios ambientales; manifiesta la obligatoriedad de la realización de estudios ambientales previo, durante y al finalizar las actividades productivas. Entre estos se puede citar a los Estudios de Impacto Ambiental (EIA), Auditoria Ambiental (AA) y Plan de Manejo Ambiental (PMA).

La norma técnica de calidad ambiental y de descarga de efluente del anexo I, del SUMA, determina prohibiciones, los parámetros y límites de descarga máximos permisibles para e alcantarillado.

Los criterios generales para la descarga de efluentes, a los cuerpos de agua y a la alcantarilla se encuentran detallados en el Art. 4.2 del mismo libro.

2.3.5. Objetivos Nacionales para el buen vivir

Objetivo 4: Garantizar los derechos de la naturaleza y promover un ambiente sano y sustentable

Política 4.4. Prevenir, controlar y mitigar la contaminación ambiental como aporte para el mejoramiento de la calidad de vida.

- a. Aplicar normas y estándares de manejo, disposición y tratamiento de residuos sólidos domiciliarios, industriales y hospitalarios, y sustancias químicas para prevenir y reducir las posibilidades de afectación de la calidad ambiental.
- b. Desarrollar y aplicar programas de recuperación de ciclos vitales y remediación de pasivos ambientales, tanto a nivel terrestre como marino, a través de la aplicación de tecnologías amigables y buenas prácticas ambientales y sociales, especialmente en las zonas de concesiones petroleras y mineras otorgadas por el Estado ecuatoriano.
- c. Implementar acciones de descontaminación atmosférica y restauración de niveles aceptables de calidad de aire con el objetivo de proteger la salud de las personas y su bienestar.
- d. Reducir progresivamente los riesgos para la salud y el ambiente asociados a los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs).
- e. Regular criterios de preservación, conservación, ahorro y usos sustentables del agua e implementar normas para controlar y enfrentar la contaminación de los cuerpos de agua mediante la aplicación de condiciones explícitas para el otorgamiento de las autorizaciones de uso y aprovechamiento.

2.3.6. Legislación de Aguas

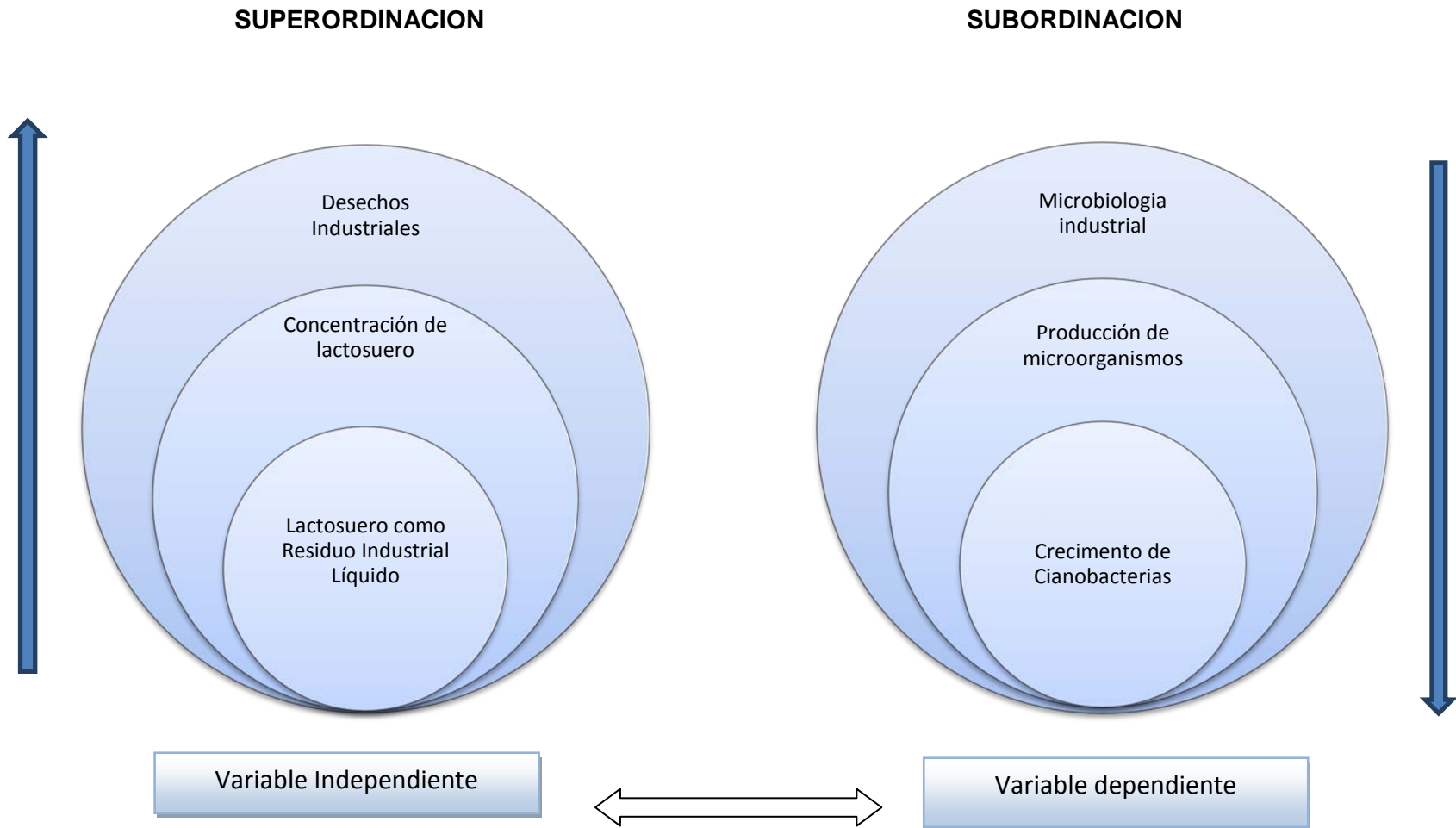
Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua – Libro VI, Anexo1

La norma tiene como objetivo la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en lo relativo al recurso agua.

La presente norma técnica determina o establece:

- Los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado;
- Los criterios de calidad de las aguas para sus distintos usos; y,
- Métodos y procedimientos para determinar la presencia de contaminantes en el agua.

2.4. Categorías fundamentales



2.5. Hipótesis

2.5.1. Hipótesis Nula H_0

A mayor cantidad de nutrientes de lactosuero no es mayor el crecimiento de microorganismos (Cianobacterias) en el medio de cultivo.

2.5.2. Hipotesis Alternativa H_1

A mayor cantidad de nutrientes de lactosuero es mayor el crecimiento de microorganismos (Cianobacterias) en el medio de cultivo.

2.6. Señalamiento de Variables

2.6.1. Variable Independiente

Lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo

2.6.2. Variable Dependiente:

Crecimiento de Cianobacterias en UFC.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Enfoque

El modelo de enfoque de este estudio es cuantitativo, por su profundo apego a la tradicionalidad de la ciencia, ya que existe una metodología que permitirá la obtención de datos mediante el análisis y control de las variables independientes de manera numérica, los que llevarán a determinar el aporte del lactosuero como nutriente en medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos. Por ello se realizarán pruebas experimentales a escala de laboratorio para conocer los beneficios que se podrán obtener a partir de este residuo.

3.2. Modalidad Básica de Investigación

La modalidad básica de esta investigación es experimental porque se tiene como propósito examinar y evaluar los efectos que se manifiestan en la variable dependiente cuando se manipula la variable independiente, es decir, se trata de probar una relación entre causa y efecto.

Sera necesario emplear también una investigación de laboratorio, dado que el máximo objetivo es el control del proceso para la obtención de datos confiables, por lo que se realizará un ambiente controlado y óptimo para el crecimiento de los diferentes microorganismos.

3.3. Nivel o tipo de Investigación

La investigación será de tipo experimental debido a que se ocupará una metodología cuantitativa, para lo cual se aplica un razonamiento hipotético - deductivo, la cual será desarrollada en el laboratorio para la obtención de datos numéricos y el manejo de los mismos mediante pruebas estadísticas que permitan comprobar las hipótesis.

La investigación experimental consiste en la manipulación de una variable experimental no comprobada, el investigador provoca una situación para introducir las variables de estudio que serán manipuladas en condiciones rigurosamente controladas

3.4. Población y Muestra

3.4.1. Población

La población de la presente investigación fue obtenida basándose en los datos diarios de producción de la Industria láctea PROLACBEN ubicada en la Parroquia Cunchibamba perteneciente a la ciudad de Ambato, en donde se genera 1000 L/día aproximadamente, como producto de la elaboración de quesos.

3.4.2. Muestra

Para determinar la cantidad de muestra de la investigación se empleó la siguiente ecuación:

$$n = Z_{\alpha}^2 * \frac{N * p * q}{i^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Dónde:

n = tamaño de la muestra

Z_{α} = Nivel de confiabilidad, al 95% de aceptación.

N = población

p = probabilidad de ocurrencia (0.5)

q = probabilidad de no ocurrencia (0.5)

i = error de muestro (0.1)

$$n = 1.96^2 * \frac{1000 \text{ lt} * 0.5 * 0.5}{0.1^2 * (1000 - 1) + 1.96^2 * 0.5 * 0.5}$$

n = 9.51 L de lactosuero

El tamaño de la muestra fue 9.51 L de lactosuero para la ejecución completa de la parte experimental en la elaboración de los medios de cultivo para el crecimiento de Cianobacterias.

3.5. Operacionalización de Variables

Tabla 5: Operacionalización de variables

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES			
HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES	INDICES
A mayor cantidad de nutrientes de lactosuero es mayor el crecimiento de microorganismos (Cianobacterias) en el medio de cultivo.	Independiente Aprovechamiento del lactosuero como enriquecedor de medios de cultivo	Porcentaje de lactosuero en medios de cultivo	% ml lactosuero/litro de medio de cultivo
	Dependiente Crecimiento de Cianobacterias	Crecimiento de cianobacterias Control de acidez	Conteo de UFC pH

Elaborado por: Monserrath León C.

3.6. Recolección de Información

Los ensayos de este estudio fueron realizados en los laboratorios de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato.

El lactosuero utilizado fue recolectado en la industria láctea PROLACBEN ubicada en la Parroquia Cunchibamba, en el horario de 11:00 am a 12:00 pm

en recipientes estériles de la cual se originan como residuo 1000 L de lactosuero diario, como producto de la elaboración de quesos.

La recolección del agua que se empleó como inóculo para el cultivo de Cianobacterias se realizó en la laguna de “La Moya” ubicada en el Cantón Pelileo de la provincia de Tungurahua.

3.6.1. Equipo de Reacción

El equipo fue armado por 75 botellas de vidrio de 500 ml, 15 m de manguera de hule fina para pecera conectadas al motor con extensión a cada una de las botellas, 100 g de algodón para evitar contaminación del medio, 7 lámparas fluorescentes de 110 w, ubicadas a cada lado de las botellas para asegurar la iluminación completa hacia los medios de cultivo.

En la boca de cada botella se colocó algodón con la finalidad de evitar el ingreso de objetos extraños al proceso y contaminación del medio de cultivo.

La ubicación de las botellas con cada tratamiento fue totalmente aleatorizado con el fin de comprobar la igualdad de condiciones físicas en el equipo de reacción.

3.6.2. Elaboración de Medios de Cultivo

Existen variedad de alternativas para el cultivo de algas. Pero es necesario utilizar un medio con los nutrientes selectivos de ciertos grupos de microorganismos.

El medio que se utilizó en este estudio fue específico para el crecimiento de algas verde azules o cianobacterias.

El lactosuero fue sometido a decantación durante 24 h, con el propósito retirar la mayor cantidad de grasa aun contenida en este residuo. Posteriormente se realizó el proceso de pasteurización para evitar el crecimiento de microorganismos no deseados.

Tabla 6: Medio BG11, ATCC MEDIUM 616 para el crecimiento de cianobacterias

Medio BG11	
NaNO₃	1.5 g
K₂HPO₄	0.04 g
MgSO₄·7H₂O	0.075 g
CaCl₂·2H₂O	0.036 g
Ácido Cítrico	0.006 g
Citrato férrico de amonio	0.006 g
EDTA	0.001 g
NaCO₃	0.02 g
Elementos traza	1.0 ml
Agua destilada	1.0 L

El pH del medio fue de 7.1, después de ser esterilizado en autoclave

Tabla 7: Mezcla elementos traza

H₃BO₃	2.86 g
MnCl₂·4H₂O	1.81 g
ZnSO₄·7H₂O	0.222 g
NaMoO₄·2H₂O	0.39 g
CuSO₄·5H₂O	0.079 g
Co(NO₃)₂·6H₂O	49.4 mg
Agua destilada	1.0 L

El medio de cultivo utilizado específico para el crecimiento de algas verde – azules, en el anexo A se indican los cálculos realizados para cada tratamiento condicionado a un volumen de 250 ml por cada botella, basados en la fórmula de molaridad.

Los medios de cultivo se elaboraron empleando el lactosuero en diferentes porcentajes: 0%, 25%, 50%, 75%, 100%, respectivamente para cada tratamiento.

3.6.3. Aireación

Al cultivo se le suministró una corriente de aire continuo con el objetivo de garantizar la agitación y oxigenación del sistema.

La aireación del medio de cultivo fue generada por un motor apto (Tabla 7) para abastecer al reactor completo, conformado por 75 botellas con 250 ml de medio de cultivo.

Se realizó la conexión con mangueras de hule a cada botella para el paso adecuado de aire, el cual permitió la oxigenación del medio de cultivo favoreciendo con la agitación del mismo.

Figura 7: Equipo de reacción armado – Biorreactor para el crecimiento de *Chlorella*



Tabla 8: Características del motor utilizado para la aireación

Motor THOMAS Air Division	
Modelo	107CA18
Potencia	315 V
Frecuencia	60 Hz
Resistencia	1.55 A

A cada extensión de manguera que tomó contacto con el medio de cultivo se colocó un shiglor de cocina (figura 8) de igual diámetro, de esta manera se controló y equiparó la corriente de aire a todo el equipo.

Figura 8: Shiglor de cocina doméstica



Figura 9: Cruces para pecera



La aireación fue uno de los factores más importantes para el crecimiento de las cianobacterias, no únicamente por la oxigenación que proporcionó al medio de cultivo, sino también por inducir el mezclado del sistema por medio de una columna burbujeada; evitando de esta manera la precipitación de sustancias solidas en la base de los recipientes.

Se debe prevenir la inclusión de objetos extraños y contaminantes al medio de cultivo colocando un filtro en la entrada de aire del motor.

3.6.4. Iluminación

Al exponer los cultivos a la luz del día puede obtenerse una iluminación relativamente incontrolada y discontinua. Debe evitarse la luz directa del sol, debido a que la intensidad puede ser muy elevada y la temperatura puede subir hasta un punto en el que el crecimiento se detiene.

La mayor parte de los microorganismos fototróficos soportan la luz continua y generan un crecimiento más rápido, por lo que es una ventaja utilizar en este estudio luz artificial generada por lámparas fluorescentes de 15 watts, apto para el cultivo de algas y cianobacterias, además de cumplir con el propósito de obtener un sistema controlado de iluminación durante las 24 horas del día.

La iluminación de los medios de cultivo fue constante durante todo el transcurso de crecimiento de las cianobacterias.

La fotosíntesis realizada por las cianobacterias que crecieron en los medios de cultivo con lactosuero fue limitada, debido al alto índice de turbidez del medio en el que se desarrollaban, ya que la transparencia del agua es generalmente un índice importante que incide en las condiciones de productividad de los ecosistemas acuáticos, en este caso, la turbidez fue un factor limitante en la productividad, debido a que limita la cantidad de luz disponible para la fotosíntesis.

3.6.5. Temperatura y pH

Las lámparas fluorescentes que se utilizaron en el equipo de reacción tienen la ventaja práctica de producir relativamente poco calor, por lo que no resulta difícil mantener la temperatura conveniente para el crecimiento de las cianobacterias.

Este factor se controló cada 24 horas con un termómetro de mercurio, en este caso no existió mayor inconveniente debido a que en bibliografía de estudios anteriores el óptimo crecimiento se encuentra en un valor de 22 - 25 °C.

Las propiedades térmicas y el pH de los medios de cultivo, se analizaron en intervalos de 24 horas, con el propósito de controlar el ambiente adecuado para el desarrollo de Cianobacterias establecido en bibliografía.

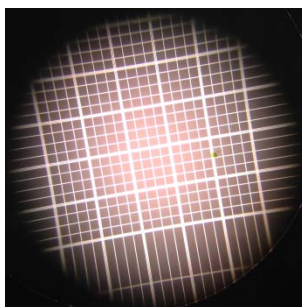
3.6.6. Conteo de UFC

Las Unidades formadoras de colonia fueron determinadas a través de la Cámara de Neubauer. Para contar las células de un cultivo líquido, se agregó una gota de éste, entre estas dos placas y se observó al microscopio óptico la cantidad de células presentes en un campo determinado de la grilla.

En base a la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo de la grilla, se calculó la concentración de células por unidad de volumen de la solución de medio de cultivo inicial.

El primer conteo de células se realizó a las 24 horas de inoculación, posteriormente con recuentos cada 48 horas, para una mejor apreciación de la población fue necesario realizar diluciones con el fin de facilitar la obtención de datos en el crecimiento de Cianobacterias.

Figura 10: Observación microscópica de la muestra de agua – inóculo.



3.6.7. Curva de crecimiento de los microorganismos

Con los tres mejores tratamientos obtenidos con recuentos en la Cámara de Neubauer se realizaron curvas de crecimiento en el programa Microsoft Excel.

3.7. PLAN DE PROCESAMIENTO

De acuerdo al problema de investigación planteado “APROVECHAMIENTO DE LACTOSUERO COMO ENRIQUECEDOR DE MEDIOS DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS”, en función de establecer la

relación entre los factores de estudio: Nutrientes y Lactosuero se consideró adecuado aplicar un diseño factorial A * B, con tres repeticiones.

Factor A: NUTRIENTES

Factor B: LACTOSUERO

a₀ 0%

b₀ 0%

a₁ 25%

b₁ 25%

a₂ 50%

b₂ 50%

a₃ 75%

b₃ 75%

a₄ 100%

b₄ 100%

En la tabla 9 se muestran los tratamientos que resultaron de la combinación de los factores de estudio.

Tabla 9: Tratamientos en estudio.

Tratamientos	A: Nutrientes	B: Lactosuero
a₀ b₀	0%	0%
a₀ b₁	0%	25%
a₀ b₂	0%	50%
a₀ b₃	0%	75%
a₀ b₄	0%	100%
a₁ b₀	25%	0%
a₁ b₁	25%	25%
a₁ b₂	25%	50%
a₁ b₃	25%	75%
a₁ b₄	25%	100%
a₂ b₀	50%	0%
a₂ b₁	50%	25%
a₂ b₂	50%	50%
a₂ b₃	50%	75%
a₂ b₄	50%	100%
a₃ b₀	75%	0%
a₃ b₁	75%	25%

$a_3 b_2$	75%	50%
$a_3 b_3$	75%	75%
$a_3 b_4$	75%	100%
$a_4 b_0$	100%	0%
$a_4 b_1$	100%	25%
$a_4 b_2$	100%	50%
$a_4 b_3$	100%	75%
$a_4 b_4$	100%	100%

3.8. ANALISIS DE LA INFORMACION

Mediante los datos obtenidos se procesó con el paquete informático Infostat para el análisis estadístico con un nivel de confianza del 95 % y un alfa del 5% en la prueba estadística de Tukey.

CAPITULO IV

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1. DATOS DE CRECIMIENTO DE CHLORELLA EN UFC

En el anexo B se encuentran los datos obtenidos del conteo de cada medio de cultivo en la cámara de Neubauer durante la experimentación. Esta técnica permitió controlar el crecimiento de cianobacterias cada 24 horas, realizándose tres controles de todos los tratamientos.

En ésta tabla de datos se observa que el crecimiento de cada tratamiento dependiendo de la cantidad de nutrientes tiene una variación significativa, lo cual se demuestra en el tratamiento a_1b_0 que al ser un medio que no contiene mayor cantidad de nutrientes, el crecimiento fue lento alcanzando al final un valor insignificante; mientras que en tratamientos como a_1b_4 , a_2b_1 , a_4b_2 los resultados fueron altos y favorables.

Se demuestra que en los tratamientos cuyo medio de cultivo está compuesto por lactosuero los datos de crecimiento en UFC son mayores.

Sin embargo los datos de cada tratamiento en las tres replicas son distintos debido a la posición que se encuentra cada botella dentro del fotobioreactor, ya que las condiciones pueden variar de forma mínima afectando el crecimiento de manera uniforme.

4.2. ANALISIS ESTADISTICO

En el anexo C se realiza la diferencia de datos (crecimiento final – crecimiento inicial) de las réplicas de cada tratamiento, con lo que se obtiene un valor real

de crecimiento en el medio de cultivo, con los resultados correspondientes se ingresan en el programa estadístico Infostat.

En el anexo D1 se encuentra la tabla de análisis de varianza realizada en el programa de infostat. En esta investigación se aplicó un diseño AxB para establecer el tratamiento con mejores resultados en proporción de nutrientes, la cual indica que el mejor resultado es de un porcentaje de 25% de nutrientes y 100% lactosuero, lo cual acredita los resultados obtenidos en la tabla de sats del conteo de unidades formadoras de colonias.

La tabla de ANOVA muestra que existe diferencia significativa en cada uno de los tratamientos, se comprobaron los resultados a través de la prueba de Tukey para ambos factores Anexo D2 con un intervalo de confianza del 95%. Lo cual demuestra que el lactosuero es un efectivo enriquecedor para el crecimiento de cepas de *Chlorella*.

En el Anexo D3 se observa el grafico estadístico de barras de todos los tratamientos en el que se muestra de manera clara los medios de cultivo con mejores resultados, observándolo desde el valor más bajo que tiene un bajo índice de nutrientes del lactosuero hasta el más alto que corresponde a la réplica 1 del tratamiento 4.1.

4.3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE CIANOBACTERIAS

Las curvas de crecimiento que se encuentran en el Anexo E se realizaron de los cinco mejores resultados obteniendo ecuaciones polinómicas de cuarto orden, obteniendo un coeficiente de correlación igual a 1, lo cual permite valorar la forma de crecimiento en el que se desarrollaron las cianobacterias en cada medio de cultivo.

En las curvas se puede identificar cada una de las fases de crecimiento en Cianobacterias en la cual la fase de latencia se expresa en los primeros días mientras de acondicionan los microorganismos al medio de cultivo, luego se identifica la fase exponencial en la que se puede observar un crecimiento extremo, la cual se produce entre el tercer y cuarto día y finalmente se obtiene la fase estacionaria en donde ya existe limitación de nutrientes para producirse posteriormente la muerte.

En el Anexo E2 se evidencian las curvas de los cinco mejores tratamientos juntos en la que se diferencia cada tratamiento en el que se puede comprobar de que el medio de cultivo compuesto por el 25% de nutrientes y el 100% de lactosuero fue el más eficiente.

4.4. VERIFICACION DE LA HIPOTESIS

De acuerdo a la tabla de varianza realizada en el programa Infostat Anexo D:

- Se ha rechaza la hipótesis nula que señala que la concentración de lactosuero no influye en el crecimiento de las Cianobacterias.
- En consecuencia, se acepta la hipótesis alternativa, es decir que la concentración de lactosuero si influye sobre el crecimiento de las Cianobacterias.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- El lactosuero fue un eficiente enriquecedor de los medios de cultivo debido a que aceleró el crecimiento de las cianobacterias por la gran cantidad de materia orgánica que lo constituye, convirtiéndose en un medio económico para la producción de *Chlorella*.
- Los medios de cultivo que fueron elaborados para cada tratamiento permitieron determinar las propiedades y cantidad de nutrientes esenciales para el crecimiento de las cianobacterias. El lactosuero no cumple con los nutrientes completos para el óptimo crecimiento de las cianobacterias, razón por la cual es necesaria la combinación del lactosuero con los nutrientes del medio de cultivo específico para las Cianobaterias en este caso de *Chlorella* con el objetivo de completar las necesidades nutricionales de los microorganismos para su adecuado desarrollo.
- El crecimiento de cada tratamiento se determinó mediante conteo de micoorganismos con la ayuda de la Cámara de Neubauer, controlando las UFC cada 24 horas, de esta manera se comprobó la hipótesis alternativa, pues en los tratamientos que fueron preparados con mayor porcentaje de lactosuero los datos de crecimiento fueron más altos.
- El tratamiento que presento las condiciones óptimas para el crecimiento de las cianobacterias a un nivel de confianza del 95 % y un alfa del 5% en la prueba estadística de Tukey, fue la combinación a_1b_4 que corresponde al 25% de nutrientes con un 100% de lactosuero en 250 ml de medio líquido, lo cual demuestra que el lactosuero es un efectivo medio para el crecimiento de Cianobacterias a nivel de laboratorio.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda preparar técnicas de aislamiento y obtención de cultivos puros de cianobacterias primordialmente de *Chlorella* para evitar contaminación en el medio de cultivo.
- Se recomienda evaluar las propiedades físicas y químicas del lactosuero que benefician al crecimiento de las cianobacterias y son utilizadas como nutrientes.
- Se recomienda evaluar cuál es la cantidad de luz artificial óptima para la fotosíntesis de las cianobacterias en el medio de cultivo con alto índice de turbidez. El crecimiento en las tres replicas no fue el mismo, es importante el porcentaje del haz de luz que penetra en el medio de cultivo, debido a que el lactosuero posee un alto grado de turbidez es importante que la luz y la agitación tengan alta intensidad.
- Elaborar técnicas que eliminen la cantidad total de grasa del lactosuero para la elaboración de los medios de cultivo.
- Se recomienda realizar estudios prácticos para evaluar la óptima corriente de aire y temperatura en la producción eficaz de *Chlorella* con adecuados filtros de aire que permitan evitar el ingreso de objetos extraños y contaminantes.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1. DATOS INFORMATIVOS

Título: “Producción de *Chlorella* en medios de cultivo enriquecidos con lactosuero para la producción de suplementos nutritivos”

- **Institución Ejecutora:** Estudiantes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos de la Universidad Técnica de Ambato,
- **Beneficiarios:** Centros de Investigación Científica, Industrias de alimentos, Industrias lácteas, Estudiantes de las carreras de Ingeniería en Alimentos y Bioquímica
- **Ubicación:** Ambato - Ecuador.
- **Tiempo estimado de Ejecución:** 6 Meses
- **Equipo técnico responsable:** Monserrath León, Ing. Gladys Navas
- **Costo:** 1485 usd

6.2. ANTECEDENTES

Las cianobacterias son microorganismos fotosintéticos que al igual que las microalgas y las plantas superiores utilizan la luz, CO₂, agua y otros nutrientes en la obtención de su energía necesaria para desarrollarse y crecer. Se presentan como organismos simples dada su ultra – estructura por lo que están clasificadas como procariotas, de ahí su semejanza con las bacterias.

También se las conoce como algas verde azules por la coloración que las identifica y por su capacidad de llevar a cabo la fotosíntesis con producción de oxígeno, por lo que se incluyen dentro de la categoría de las algas.

Su nombre lo reciben del prefijo griego “*cyanos*” que significa azul aludiendo a su coloración verde oliva azuladas (López – Cortez, 1990).

La obtención de proteína a partir de productos alimenticios de fácil accesibilidad, bajo costo y alto rendimiento ha llevado a plantear investigaciones en la búsqueda de este importante alimento a partir de organismos unicelulares (De la Torre, 1985).

En los últimos años, un creciente interés en el estudio de microorganismos como microalgas, algunos hongos y bacterias han sido de gran importancia debido a la posibilidad de aplicación comercial en distintas áreas como la nutrición, la salud humana y animal, el tratamiento de aguas residuales y la obtención de compuestos de interés en las industrias alimentarias, químicas y farmacéuticas (Bruno, 2001; Grobbelaar, 2004; Richmond, 2004).

Actualmente varias especies de microalgas son cultivadas comercialmente en algunos países y la biomasa producida ha sido utilizada en la industria de alimentos. El mercado de alimentos funcionales, utilizando microalgas en panes, yogurt y bebidas, presenta rápido desarrollo en países como Francia, Estados Unidos, China y Tailandia (Pulz y Gross, 2004).

Chlorella vulgaris ha sido utilizada por su calidad proteica (Morris *et al.*, 1999) e incluso presenta propiedades antitumorales (Noda *et al.*, 1996).

Actualmente, representa un sistema biológico ideal para diferentes líneas de investigación y además presenta una alta eficiencia por su fácil adaptación en condiciones de laboratorio.

Por otro lado en estudios recientes se comprobó que el lactosuero bovino tiene un componente importante que es la α -lactoalbúmina que posee una función bioquímica por su participación en reacciones enzimáticas, y una función nutricional ya que forma parte de la composición de la leche materna.(Brodbeck et al., 1967)

La diferencias entre la leche de vaca y la leche humana es la concentración proteica. La leche humana aporta 14-16 g/L de proteínas durante los primeros días de lactación, 8-10 g de proteínas /L a los 3-4 meses y de 7 a 8 g/L a partir del sexto mes, mientras que la leche de vaca contiene 32 g/L de proteínas (Haug, et al., 2007).

Las estructuras completas de la α -lactoalbúmina bovina y humana en las dos especies son muy similares teniendo un 72% de homología en la secuencia lo cual minimiza la posibilidad de que la α -lactoalbúmina bovina tenga propiedades antigénicas comparadas con otras proteínas lácteas como $\lambda\beta$ - lactoglobulina.

Las proteínas del lactosuero también influyen en el sistema inmune, pues estas proteínas son capaces de aumentar la respuesta inmune no específica y específica (Gomez, et al, 2002 y Saint – Sauveur, et al. 2008). Es importante valorar la actividad biológica beneficiosa , este hecho es de gran trascendencia desde el punto de vista nutricional al ser esta proteína una fuente natural de triptófano y cisteína.

La alta concentración de aminoácidos precursores de glutatión parece ser la causa de los efectos inmunológicos producidos (Madureira, et al.,2007).

Según diversos autores, la α -lactoalbúmina posee actividad prebiótica debido a que estimula el crecimiento de bifidobacterias, uno de los grupos microbianos indicadores de la salud intestinal de los niños, estos péptidos poseen un efecto inhibitorio sobre *Bacteroides*, *Clostridium* y *E. coli*, llegando a ser la reducción de estas bacterias potencialmente patógenas

Son varios los estudios *in vitro* que demuestran que existe actividad antimicrobiana de los péptidos que se producen tras la digestión de la α -lactoalbúmina ya que indicaron que tanto la pepsina como la tripsina liberan péptidos a partir de la α -lactoalbúmina capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, et al., (Pihlanto et al., 1999)

6.3. JUSTIFICACION

En el mundo actual hay unos mil millones de personas que apenas consiguen la alimentación necesaria para llevar una vida saludable y productiva. Indudablemente existe una escasez crónica de alimentos nutritivos a nivel mundial, es por ello la importancia de producir suplementos alimenticios con un sistema más económico.

La búsqueda de nuevas alternativas para la alimentación animal y humana es un aspecto importante que debe ser manejado con responsabilidad. Una alimentación adecuada es importante para una buena salud.

Esta es la razón por la que cada vez más se despierta el interés de investigar y aplicar el campo de la biotecnología a la alimentación.

Se ha comprobado que ciertas microalgas son una fuente de sustancias con alto valor nutritivo como vitaminas, ácidos grasos o aminoácidos esenciales, que son complementos excepcionales para la alimentación y pueden aportar efectos beneficiosos para las personas.

Chlorella es un alga rica en vitaminas, ácidos grasos, aminoácidos esenciales y polisacáridos, de ahí su importancia como ingrediente activo para alimentos que puedan reforzar las carencias nutricionales de colectivos deficitarios en defensas, tales como niños ancianos, o en situaciones especiales de estrés o enfermedad para otros colectivos poblacionales.

6.4. OBJETIVOS

6.4.1. Objetivo General

- Producir *Chlorella* en un medio de cultivo enriquecido con lactosuero para la elaboración de suplementos nutritivos

6.4.2. Objetivos Específicos

- Elaborar un medio de cultivo líquido enriquecido con lactosuero.
- Producir biomasa pura de *Chlorella* mediante un fotobioreactor de columna burbujeada
- Analizar la cantidad de proteína presente en el producto final.

6.5. ANALISIS DE FACTIBILIDAD

El proyecto de investigación es de tipo sociológico, ya que contribuye con investigaciones y estudios que se pueden realizar con los datos expuestos en este trabajo, tanto para industrias lácteas, plantas procesadoras de alimentos, Estudiantes de Biotecnología, Ingeniería en Alimentos y afines, entre otros.

Tabla 10: Costos de Investigación

CONCEPTO	VALOR (USD)
Graduando	600
Tutor	250
Materiales, equipos, reactivos	750
Publicaciones	100
Subtotal	1700
Imprevistos (10%)	170
Total	1870

6.6. FUNDAMENTACION

Las nuevas alternativas de producción de proteínas están basados en algas como *Chlorella* que ya en investigaciones previas se conocen las propiedades nutritivas y ventajas para la salud que estas poseen.

El proceso de obtención de esta biomasa es simple, económica y se basa en protocolos ya establecidos.

Sin embargo con la presente propuesta se obtendrán suplementos alimenticios de *Chlorella* con un valor agregado ya que se desarrollará en compuestos nutritivos que también están contenidos en el lactosuero como la α -lactoalbumina la cual contiene múltiples beneficios en el consumo humano, desde efectos de absorción de minerales hasta actividades carcinogénicas.

Los beneficios que se obtienen a través del consumo de estos suplementos alimenticios son múltiples permitiendo mejorar la calidad de vida de las personas, disminuyendo la incidencia de enfermedades gastrointestinales.

6.7. METODOLOGIA

6.7.1. Obtención y tratamiento de la biomasa

Para la obtención de biomasa se cultivara *Chlorella* en un medio de cultivo elaborado con el 25% de nutrientes de un medio específico para el crecimiento de *Chlorella* combinado con un 100% de lactosuero.

Lo cual se desarrollara en un fotobioreactor con columna de aire (para la eliminación de CO_2 y para un sistema de mezclado eficiente) en condiciones controladas de: luz, indispensable para la realización de fotosíntesis, temperatura (con una variación de entre 22y 25 °C) y pH (rango de acidez cuyo pH varía entre 7 y 9).

6.7.2. Medida de crecimiento

El control del crecimiento de las algas permite establecer la población (densidad) de células por mililitro que hay en un recipiente, y también determinar numéricamente el grado de división celular en un determinado tiempo en un medio de cultivo.

Los resultados permiten estimar en cierto modo la situación de un cultivo y relacionarlo con la curva de crecimiento de esa población algal.

El método empleado para contar algas es sencillo. Implica el uso de un dispositivo que permita el contaje como el hemocitómetro.

6.7.3. Filtrado

La filtración es un proceso de separación de sólidos en suspensión en un líquido a través de un medio poroso que retiene los sólidos, pero permite el paso del líquido.primario.

El medio de cultivo con las algas se filtra con micro filtros, aplicando un ligero vacío, que permite separar el agua restante y obtener un mayor concentrado de *Chorella*

6.7.4. Centrifugación de la suspensión algal

La centrifugación es un método por el cual se pueden separar sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una fuerza rotativa, la cual imprime a la mezcla con una fuerza mayor que la de la gravedad, provocando la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad.

La centrifugación puede utilizarse como método de separación de las microalgas de su medio de cultivo; para eso debe utilizarse una centrifugadora para lograr que las microalgas se depositen en el fondo del depósito

6.7.5. Secado

El concentrado de *Chlorella* es inyectado inmediatamente a un secador (spray dryer). El secador deshidrata en forma suave la *Chlorella* en pocos segundos, sin sobrepasar una temperatura de 50 grados Celcius. La biomasa seca es evacuada continuamente hacia el área de análisis.

6.7.6. Análisis bioquímico porcentual

Para el análisis bioquímico de la biomasa se tomaran muestras, que se caracterizarán en relación con: pérdidas por desecación, nitrógeno total, proteína bruta (micro-Kjeldahl, empleando 6,25 como factor de conversión para la estimación del contenido proteico), fibra cruda y cenizas, según los procedimientos de la Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Las proteínas verdaderas se cuantificarán por el método de Lowry y los carbohidratos por el de fenol-sulfúrico. El contenido de lípidos en la biomasa se evaluó como aconseja Kocher,⁷ luego de extraer los compuestos de bajo peso molecular con ácido perclórico 0,2 N en baño de hielo.

Los ácidos nucleicos totales se determinarán espectrofotométricamente en la región ultravioleta mediante el método de Rut,⁸ previa extracción con ácido perclórico 0,5 M. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

La composición de aminoácidos se realizará en un analizador automático (Alpha Plus, modelo 4151, LKB), después de la hidrólisis de las muestras con HCl 5,7 N a 110 °C durante 24 h. La cuantificación de triptófano se hizo mediante espectrofotometría UV de la cuarta derivada.

La digestibilidad de la proteína microalgal ser evaluada mediante la simulación in vitro del sistema enzimático tripsina-quimotripsina-peptidasa, a partir de los valores de pH de las suspensiones proteicas, registrados exactamente a los 10 min de iniciada la digestión enzimática.

6.8. Modelo Operativo (Plan de acción)

Tabla 11: Modelo operativo de la propuesta

FASES	Formulación de la propuesta	Desarrollo preliminar de la propuesta	Implementación de la propuesta	Evaluación de la propuesta
METAS	“Producir Chlorella en medios de cultivo enriquecidos con lactosuero para la elaboración de complejos nutritivos”	Cronograma de la propuesta	Ejecución de la propuesta	Comprobación del proceso
ACTIVIDADES	Revisión bibliográfica	Pruebas preliminares	Generación de biomasa Análisis bioquímico porcentual del producto	Cálculos estadísticos Evaluación de resultados
RESPONSABLES	Investigador	Investigador	Investigador	Investigador
RECURSOS	Humanos Técnicos Económicos	Humanos Técnicos Económicos	Humanos Técnicos Económicos	Humanos Técnicos Económicos
PRESUPUESTO (USD)	200	650	850	170
TIEMPO	1	2	2	1

6.9. ADMINISTRACION

La ejecución de la propuesta estará coordinada por los responsables del proyecto: Monserrath León e Ing. Gladys Navas.

Tabla 12: Administración de la propuesta

Indicadores a mejorar	Situación actual	Resultados esperados	Actividades	Responsables
"Identificación de Cianobacterias en vertimientos de aguas residuales provenientes de industrias lácteas"	Falta de información acerca de las Cianobacterias que se desarrollan en aguas residuales vertidas de industrias lácteas	Cuantificación de Cianobacterias dominantes en medios con lactosuero.	-Toma de las muestras -Siembra del inóculo -Identificación de los géneros de Cianobacterias presentes -Determinar los géneros productores de hepatotoxinas	Investigadores: Monserrath León Ing. Gladys Navas

Elaborado por: Monserrath León

6.10. PREVISION DE LA EVALUACION

Tabla 13: Previsión de la Evaluación

PREGUNTAS BASICAS	EXPLICACION
¿Quiénes solicitan evaluar?	Empresas alimenticias
	Centros de Investigación
	Plantas de producción de metabolitos
	Industrias lácteas
	Estudiantes de las carreras de Ingeniería en Alimentos e Ingeniería Bioquímica
¿Por qué evaluar?	Evitar la pérdida de nutrientes en residuos industriales como el lactosuero
	Producir suplementos alimenticios con un método más económico
¿Para qué evaluar?	Mejorar la calidad de vida de las personas en cuanto a la dieta y prevención de enfermedades
¿Qué evaluar?	Biomasa de <i>Chlorella</i>
	Nutrientes es lactosuero
	Contenido proteínico de Suplementos alimenticios
¿Quién evalúa?	Tutor
	Calificadores
¿Cuándo evaluar?	Todo el tiempo, desde la obtención de muestras hasta los resultados obtenidos
¿Cómo evaluar?	Utilizando técnicas de evaluación
¿Con qué evaluar?	Datos experimentales publicados

Elaborado por: Monserrath León

Bibliografía

Acosta, S. (2006). "Evaluación de un sistema de producción continua de microalgas. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, México. p. 25.

Aider, M., D. Halleux and I. Melnikova. (2009). Skim acidic milk whey cryoconcentration and assessment of its functional properties: Impact of processing conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10(3): 334-341.

Almécija, M., (2007). Obtención de la lactoferrina bovina mediante ultrafiltración de lactosuero. Tesis de Doctorado en Tecnología y Calidad de los Alimentos. Facultad de Química. Universidad de Granada, España.

Barba, V., Calispa J., Minda A., y Mosquera M. (2010). Biodegradación de suero lácteo de quesería. Universidad Central del Ecuador.

Briczinski, E., and Roberts R., (2002). Production of an exopolysaccharide-containing whey protein concentrate by fermentation of whey. *Journal of Dairy Science* 85(12): 3189-3197.

Brodbeck U, Denton WL, Tanahashi N, Ebner KE. (1967). The Isolation and Identification of the B Protein of Lactose Synthetase as α -Lactalbumin. *J Biol Chem.*; 242(7):1391-7.

Bryantt, D., (1986). The cyanobacterial photosynthetic apparatus comparison to those of higher plants and photosynthetic bacteria. In: Plant, T. & Li, W.K.W. Ed. *Photosynthetic picoplankton. Call. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 214:71–120.

<http://www3.espe.edu.ec:8700/bitstream/21000/572/1/T-ESPE-029603.pdf>

Bruno, J. 2001. Edible microalgae: a review of the health research. Center for Nutritional Psychology Press, Pacifica 3:56

- Carrillo, J. (2006). Mundo Lácteo. Disponible en:
http://www.alimentariaonline.com/media/MLC015_REUSOSUERO.pdf
- Castro, B. 2001. Sistemas Integrados de Tratamiento y Uso de Aguas Residuales en América Latina: Realidad y Potencial. Portoviejo. Ecuador. P. 2- Disponible en:
<http://www.cepis.org.pe/bvsaar/e/proyecto/generales/casos/portovie.pdf>
- CONAMA-Región Metropolitana. (1998). Guía para el control y prevención de la contaminación Industrial. Fabricación de productos lácteos, Santiago, Chile, 58 pp.
- Contreras-Flores C, Peña-Castro JM and Flores-Cotera LB. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 8: 450-456.
- Corporación Interamericana de Inversiones. (2008). Marco Legal Medioambiental, Ecuador, Disponible en:
http://ecofact.com/iictool/Marco_Legal_Ecuador.pdf
- Chung, S., P. Moughan, A. Awati and H. Morton. (2009). The influence of whey protein and glycomacropeptide on satiety in adult humans. *Physiology & Behavior* 96(1): 162–168.
- Dayanandaa C., Saradaa R., Usha Ranib M., Shamalab G. Ravishankara., (2007)., Autotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* for the production of hydrocarbons and exopolysaccharides in various media. *Biomass Bioenergy* 31: 87-93.
- De La Torre, M. 1985. Aprovechamiento de esquilmos agrícolas y desechos agroindustriales: Prospectiva de la biotecnología en México. Fundación Barrio Sierra, A.C. México p222-234
- Diario Hoy. 2010. “Los Ríos encuentran su Cause”. Disponible en :
<http://www.hoy.com.ec/zhechos/2003/libro/tema20.htm>

Diario La Hora. 2012. "Nuevos Sistemas de Alcantarillado", Noticias Tungurahua. Disponible en:

http://www.lahora.com.ec/index.php/noticias/show/1101416429/-1/Nuevos_sistemas_de_alcantarillado_.html

Foegeding, E. and P. Luck. 2002. Whey protein products. 1957-1960. In: Caballero, B., L. Trugo, P. Finglas (eds.). Encyclopedia of Foods Sciences and Nutrition. Academic Press, New York.

Gao J, BS Hooker, and DB Anderson. (2004). "Expression of Functional Human Coagulation Factor XIII A-domain in Plant Cell Suspensions and Whole Plants." *Protein Expression and Purification* 37(1):89-96.

Ghaly, A. and M. Kamal.(2004). Submerged yeast fermentation of acid cheese whey for protein production and pollution potential reduction. *Water Research* 38(3): 631-644.

Goldman, J. 1979b. Outdoor algal mass cultures. II. Photosynthetic yield limitations, *Water Res.*, L3, 119-136

Grobbelaar, J. 2004. Algal biotechnology: real opportunities for Africa. *South African Journal of Botany* 70(1):140-144

Gomez HF, Ochoa TJ, Herrera-Insua I, Carlin LG, Cleary TG. Lactoferrin protects rabbits from *Shigella flexneri*-induced inflammatory enteritis. *Infect Immun.* 2002; 70:7050–3.

Haug A, Høstmark AT, Harstad OM. (2007) Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids Health Dis.*; 6(25):1-16.

Hejazi, M. y Wijffels R., (2004). Milking microalgae. *Trends Biotechnol.* 22: 189-194 Disponible en:

<http://www.ots.ac.cr/tropiweb/attachments/volumes/vol56-2/01-Rosales-Crecimiento.pdf>

Jelen, P. 2003. Whey processing. Utilization and Products. 2739-2745. In: H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox (eds.). Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, London, UK.

Jeon, Y., Cho C. y Yun Y. (2005). Measurement of microalgal photosynthetic activity depending on light intensity and quality. *Biochem. Engin. J.* 27: 127-131.

La Cámara de Agricultura de la Primera Zona. "Proyecto de Análisis, Interpretación y Difusión de los resultados del III Censo Agropecuario Nacional, Proyecto SICA. Disponible en:

<http://www.agroecuador.com/HTML/Censo/Censo.htm>

Londoño, M. (2006). Aprovechamiento del suero ácido de queso doble crema para la elaboración de quesillo utilizando tres métodos de complementación de acidez con tres ácidos orgánicos. *Perspectivas en nutrición humana. Revista Perspectivas en Nutrición Humana-Escuela de Nutrición y Dietética-Universidad de Antioquia* 16: 11-20.

López-Cortés, A., 1990. Microbial Mats in tidal channels at San Carlos, Baja California Sur, México. *Geomicrobiol. J.* 8:69-85 p.

Madureira AR, Pereira CI, Gomes AMP, Pintado ME, Malcata FX. Bovine whey proteins-overview on their main biological properties. *Food Res Int.* 2007; 40:1197-211.

Machado Allison, C. (2002): *Cereales*, en Machado-Allison, C. (ed.), *Agronegocios en Venezuela*, Caracas, IESA.

Madigan et al. (2004). "Brock: Biología de los microorganismos". (10ª edición). Ed. Pearson-Prentice-Hall, Madrid.. pp 180-186

Mez K, Beattie KA, Codd GA, Hanselmann K, Hauser B, Naegeli H and Preisig HR (1997): Identification of a microcystin in benthic cyanobacteria linked to cattle deaths on alpine pastures in Switzerland. *European Journal of Phycology* 32, 111-117.

Morales, E., Rodríguez, M., García, D., Loreto, C. Y Marco, E. Crecimiento, producción de pigmentos y exopolisacáridos de la cianobacteria sp. PCC 7120 en función del pH y CO₂. *Interciencia.* 2002. Vol. N° 27(7): 373 – 378.

Muñi, A., G. Paez, J. Faría, J. Ferrer y E. Ramones. 2005. Eficiencia de un sistema de ultrafiltración/ nanofiltración tangencial en serie para el fraccionamiento y concentración del lactosuero. *Revista Científica* 15(4): 361–367.

Najul, M.; Ortega, E. y Sánchez, R. (2001). La Variable Ambiental en la Gestión Empresarial de la Industria Química y Petroquímica Venezolana, en *Tecnología y ambiente. El desafío competitivo de la industria química y petroquímica venezolana*. CENDES, Fundación Polar, Caracas. 211-238

Noda, K.; Ohno, N.; Tanaka, K. y Shoyama, Y. (1996). A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Médica* 62(5):423-426

Paerl H. and David F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*. Volume 35, 160-167.

Panesar, P., Kennedy J., Gandhi D. and Bunko K..(2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* 105: 1-14.

Pihlanto- Leppälä A, Marnila P, Hubert L, Rokka T, Korhonen HJ, Karp M. The effect of α -lactalbumin and β -lactoglobulin hydrolysates on the metabolic activity of *Escherichia coli* JM103. *J Appl Microbiol*. 1999; 87(4):540–5.

Puzl O. & Gross w., (2004), Valuable products from biotechnology of microalgae, US National Library of Medicine National Institutes of Health (NCBI). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300417>

Ramírez-Moreno L. Y Olivera-Ramírez R. Uso tradicional y actua de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). *Interciencia*. 2006. Vol. N° 31(9).

Richmond, A. (2000). "Microalgal biotechnology at the turn of the millenium: a personal view. *J. APPL. Phycol*. 12: 4441 – 451

Richmond, A. 2004. *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science. Oxford, p566

Richmond A, Boussiba S, Vonshak A, Kopel R., (1993). A new tubular reactor for mass production of microalgae outdoors. P: 327 – 332.

Robillot C., Winh J., Puiseus-Dao S. and Hennion M. (2000). Hepatotoxin production kinetic of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7820, as determined by HPLC- Mass Spectrometry and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3372-3378.

Ronda, E., (2000). Suero lácteo de quesería: El ayer y el Presente. Disponible en:

<http://www.racve.es/actividades/detalle/id/38>

Saint-Sauveur D, Gauthier SF, Boutin Y, Montoni A. Immunomodulating properties of a whey protein isolate, its enzymatic digest and peptide fractions. *Int Dairy J.* 2008; (18):260–70.

Soong, P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan, in *Algae Biomass*, Shelef and Soeder (Eds), Elsevier/North- Holland Biomedical Press, Amsterdam, 97-113.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng* 101(2):87-96.

Stanier, R. Ingraham, J., Wheelis, M., Painter, P., (1992), *Microbiología*, Segunda Edición, Editorial Reverté, S.A.

Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, Libro VI de la Calidad Ambiental, Capítulo IV del Proceso de Evaluación de Impactos Ambientales

Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria: Libro VI “De la Calidad Ambiental”; TítuloVII “Del cambio Climático”, ANEXO 7.

Torres-Ariño, A. (2001). Aislamiento y caracterización de cianobacterias marinas productoras de compuestos de interés biomédico . Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 94 p

Tredici, M. (2004). Mass production of microalgae: Photobioreactors. In: Richmond A, editor. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Oxford: Blackwell Publishing, p 178–214.

Valencia, E. 2010. "La Industria de la Leche y la Contaminación del Agua. Puebla – México. Pg 27-31 Disponible en :
<http://www.elementos.buap.mx/num73/htm/27.htm>

Venkataraman, L.V. ; Becker, E.W. 1985. Biotechnology and utilization of algae. The Indian experience. Ed. Sharada Press. New Delhi, India 257 pp.

Ventosa, A. y Nieto J., (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganism. World J. Microbiol. Biotechnol. 11: 85-94.

Wagner, R. 2005. Cyanobacteria, blue – Green algae. Disponible en:
<http://www.dr-ralf-wagner.de/index-englisch.htm>

Waterbury, J.; Watson, S.; Valois, F. & Franks, D. (1986), Bio cal and ecological characterization of marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. In: T. Plant and W.K. W. Li (Ed), Photosynthetic picoplankton. Can. Bull. Fish. aquat. Sci.. Vol N° 214:71-120

Whitton B. & M. Potts. 2000. Introduction to cyanobacteria, p. 1-11. *In* B. Whitton & M. Potts (eds.). The ecology of cyanobacteria. Kluwer Academic, Dordrecht, Países Bajos. pp. 1-19.

Yun, S. y Park J. (2001). Attenuation of monochromatic and polychromatic lights in *Chlorella vulgaris* suspensions. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: 765-770.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo A: Cálculos de molaridad para preparación del medio de cultivo en variación con cada tratamiento.

COMPUESTO	cantidad 1L	PM	g Soluta 100 ml	VOL	100%	75%	50%	25%	Total para cada botella	Total para 15 botellas	SOLUCIONES 0,1 M	
NaNO ₃	1,5	85			0,3750	0,2813	0,1875	0,0938			PESO	VOL
K ₂ HPO ₄	0,04	174	0,174	5,75	5,75	4,31	2,87	1,44	14,37	215,52	0,435	250
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075	246	0,246	7,62	7,62	5,72	3,81	1,91	19,05	285,82	1,23	500
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036	147	0,147	6,12	6,12	4,59	3,06	1,53	15,31	229,59	0,3675	250
Ácido cítrico	0,006	192	0,192	0,78	0,78	0,59	0,39	0,20	1,95	29,30	0,096	50
Na ₂ CO ₃	0,02	106	0,106	4,72	4,72	3,54	2,36	1,18	11,79	176,89	0,265	250
EDTA	0,001	292	0,292	0,09	0,09	0,06	0,04	0,02	0,21	3,21	0,073	50
Mezcla de metales traza	1				0,25	0,19	0,13	0,06	0,63	9,38		
Agua destilada	1											

Anexo B: datos de crecimiento de Chlorella en UFC

	PRIMER CONTROL						SEGUNDO CONTROL						TERCER CONTROL					
	REPLICA I		REPLICA II		REPLICA III		REPLICA I		REPLICA II		REPLICA III		REPLICA I		REPLICA II		REPLICA III	
	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.	Cod.	Crecim.
A0B0	1,1	22	1,2	48	1,3	29	1,1	176	1,2	456	1,3	52	1,1	1821	1,2	2650	1,3	84
A0B1	2,1	54	2,2	9	2,3	43	2,1	825	2,2	17	2,3	553	2,1	13603	2,2		2,3	10137
A0B2	3,1	523	3,2	124	3,3	892	3,1	3256	3,2	2375	3,3	4323	3,1	16430	3,2	12568	3,3	17841
A0B3	4,1	183	4,2	609	4,3	632	4,1	522	4,2	1998	4,3	2334	4,1	701	4,2	4275	4,3	5150
A0B4	5,1	895	5,2	1006	5,3	2152	5,1	7814	5,2	9654	5,3	12506	5,1	18450	5,2	22583	5,3	26043
A1B0	6,1	28	6,2	97	6,3	19	6,1	30	6,2	254	6,3	25	6,1	32	6,2	4125	6,3	29
A1B1	7,1	104	7,2	158	7,3	138	7,1	487	7,2	568	7,3	506	7,1	2956	7,2	16807	7,3	
A1B2	8,1	3737	8,2	2503	8,3	914	8,1	16703	8,2	12219	8,3	2794	8,1	35800	8,2	23412	8,3	3528
A1B3	9,1	2675	9,2	2412	9,3	2123	9,1	17787	9,2	2412	9,3	13000	9,1	56721	9,2	2987	9,3	48692
A1B4	10,1	1539	10,2	348	10,3	1204	10,1	26785	10,2	3137	10,3	20615	10,1	96000	10,2	21385	10,3	94417
A2B0	11,1	28	11,2	96	11,3	31	11,1	103	11,2	264	11,3	205	11,1	981	11,2	2527	11,3	1154
A2B1	12,1	983	12,2	1395	12,3	1142	12,1	14126	12,2	15873	12,3	10950	12,1	35612	12,2	36129	12,3	34562
A2B2	13,1	2063	13,2	6447	13,3	4865	13,1	11625	13,2	17866	13,3	15642	13,1	28471	13,2	35654	13,3	31908
A2B3	14,1	5693	14,2	3824	14,3	5851	14,1	19752	14,2	12788	14,3	19932	14,1	30673	14,2	25642	14,3	31046
A2B4	15,1	1825	15,2	1320	15,3	607	15,1	15250	15,2	14737	15,3	4806	15,1	25541	15,2	23750	15,3	12811
A3B0	16,1	21	16,2	35	16,3	41	16,1	87	16,2	108	16,3	98	16,1	119	16,2	575	16,3	203
A3B1	17,1	2365	17,2	2571	17,3	2460	17,1	9250	17,2	10566	17,3	10780	17,1	21984	17,2	22139	17,3	22469
A3B2	18,1	520	18,2	613	18,3	597	18,1	3987	18,2	4925	18,3	4790	18,1	16600	18,2	17085	18,3	16941
A3B3	19,1	1784	19,2	1292	19,3	2341	19,1	3991	19,2	3375	19,3	5480	19,1	4128	19,2	7942	19,3	8943
A3B4	20,1	2561	20,2	2835	20,3	2114	20,1	12600	20,2	13734	20,3	14363	20,1	32561	20,2	34823	20,3	33589
A4B0	21,1	90	21,2	105	21,3	87	21,1	92	21,2	650	21,3	102	21,1	95	21,2	1500	21,3	294
A4B1	22,1	174	22,2	263	22,3	230	22,1	1570	22,2	2655	22,3	2422	22,1	2024	22,2	8732	22,3	7513
A4B2	23,1	863	23,2	715	23,3	963	23,1	11000	23,2	10062	23,3	14100	23,1	34400	23,2	32156	23,3	37920
A4B3	24,1	520	24,2	189	24,3	597	24,1	11589	24,2	10105	24,3	9857	24,1	16600	24,2	17085	24,3	16941
A4B4	25,1	671	25,2	17589	25,3	21315	25,1	714	25,2	19681	25,3	22604	25,1	617	25,2	22481	25,3	31673

Anexo C: Promedio de datos (UFC)

TRATAMIENTOS		DIFERENCIA DE DATOS DE LAS REPLICAS		
Código	Tratamiento	Crecim. Final	Crecim. inicial	Total
1.1	a ₀ b ₀	1821	22	1799
1.2	a ₀ b ₁	13603	54	13549
1.3	a ₀ b ₂	16430	523	15907
2.1	a ₀ b ₃	701	183	518
2.2	a ₀ b ₄	18450	895	17555
2.3	a ₁ b ₀	32	28	4
3.1	a ₁ b ₁	2956	104	2852
3.2	a ₁ b ₂	35800	3737	32063
3.3	a ₁ b ₃	56721	2675	54046
4.1	a ₁ b ₄	96000	1539	94461
4.2	a ₂ b ₀	981	28	953
4.3	a ₂ b ₁	35612	983	34629
5.1	a ₀ b ₂	28471	2063	26408
5.2	a ₂ b ₃	30673	5693	24980
5.3	a ₂ b ₄	25541	1825	23716
6.1	a ₃ b ₀	119	21	98
6.2	a ₃ b ₁	21984	2365	19619
6.3	a ₃ b ₂	16600	520	16080
7.1	a ₃ b ₃	4128	1784	2344
7.2	a ₃ b ₄	32561	2561	30000
7.3	a ₁ b ₀	95	90	5
8.1	a ₁ b ₁	2024	174	1850
8.2	a ₁ b ₂	34400	863	33537
8.3	a ₁ b ₃	29118	970	28148
9.1	a ₁ b ₄	21315	671	20644
9.2	a ₁ b ₀	2650	48	2602
9.3	a ₁ b ₁	17	9	8
10.1	a ₁ b ₂	12568	124	12444
10.2	a ₁ b ₃	4275	609	3666
10.3	a ₁ b ₄	22583	1006	21577
11.1	a ₂ b ₀	4125	97	4028
11.2	a ₂ b ₁	26807	158	26649
11.3	a ₂ b ₂	23412	2503	20909
12.1	a ₂ b ₃	2987	2412	575
12.2	a ₂ b ₄	21385	348	21037
12.3	a ₂ b ₀	2527	96	2431
13.1	a ₂ b ₁	36129	1395	34734

13.2	$a_2 b_2$	35654	6447	29207
13.3	$a_2 b_3$	25642	3824	21818
14.1	$a_2 b_4$	23759	1320	22439
14.2	$a_2 b_0$	575	35	540
14.3	$a_2 b_1$	22139	2571	19568
15.1	$a_2 b_2$	17085	613	16472
15.2	$a_2 b_3$	7842	1292	6550
15.3	$a_2 b_4$	34823	2835	31988
16.1	$a_3 b_0$	1500	105	1395
16.2	$a_3 b_1$	8732	263	8469
16.3	$a_3 b_2$	32156	715	31441
17.1	$a_3 b_3$	29525	1024	28501
17.2	$a_3 b_4$	22640	714	21926
17.3	$a_3 b_0$	1956	29	1927
18.1	$a_3 b_1$	10137	43	10094
18.2	$a_3 b_2$	17841	892	16949
18.3	$a_3 b_3$	5150	632	4518
19.1	$a_3 b_4$	26043	2152	23891
19.2	$a_3 b_0$	29	19	10
19.3	$a_3 b_1$	506	138	368
20.1	$a_3 b_2$	3528	814	2714
20.2	$a_3 b_3$	48692	2123	46569
20.3	$a_3 b_4$	94417	1204	93213
21.1	$a_4 b_0$	1154	31	1123
21.2	$a_4 b_1$	34562	1142	33420
21.3	$a_4 b_2$	31908	4865	27043
22.1	$a_4 b_3$	31046	5851	25195
22.2	$a_4 b_4$	12811	607	12204
22.3	$a_4 b_0$	203	41	162
23.1	$a_4 b_1$	22469	2460	20009
23.2	$a_4 b_2$	16941	597	16344
23.2	$a_4 b_3$	8943	2341	6602
24.1	$a_4 b_4$	33589	2114	31475
24.2	$a_4 b_0$	294	87	207
24.3	$a_4 b_1$	7513	230	7283
25.1	$a_4 b_2$	37920	963	36957
25.2	$a_4 b_3$	35412	977	34435
25.3	$a_4 b_4$	31673	617	31056

Anexo D

Anexo D1: Resultados del análisis estadístico en Infostat

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Conteo UFC	75	0,75	0,61	62,18

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18487732120,69	26	711066620,03	5,51	<0,0001
Factor A	2487639875,15	4	621909968,79	4,82	0,0024
Factor B	8083496561,41	4	2020874140,35	15,65	<0,0001
Replicas	263144108,35	2	131572054,17	1,02	0,3686
Factor A*Factor B	7653451575,79	16	478340723,49	3,70	0,0002
Error	6197232883,65	48	129109018,41		
Total	24684965004,35	74			

Anexo D2: Resultados Prueba de Tukey para el factor A y factor B

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11759,06890

Error: 129109018,4094 gl: 48

Factor A	Medias	n	E.E.	
1,00	9800,27	15	2933,81	A
4,00	14523,40	15	2933,81	A
5,00	19056,93	15	2933,81	A B
3,00	21353,33	15	2933,81	A B
2,00	26633,20	15	2933,81	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=11759,06890

Error: 129109018,4094 gl: 48

Factor B	Medias	n	E.E.	
1,00	1152,27	15	2933,81	A
2,00	15540,07	15	2933,81	B
4,00	19231,00	15	2933,81	B
3,00	22298,33	15	2933,81	B C
5,00	33145,47	15	2933,81	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

- Resultados prueba de Tukey para la combinacion AB

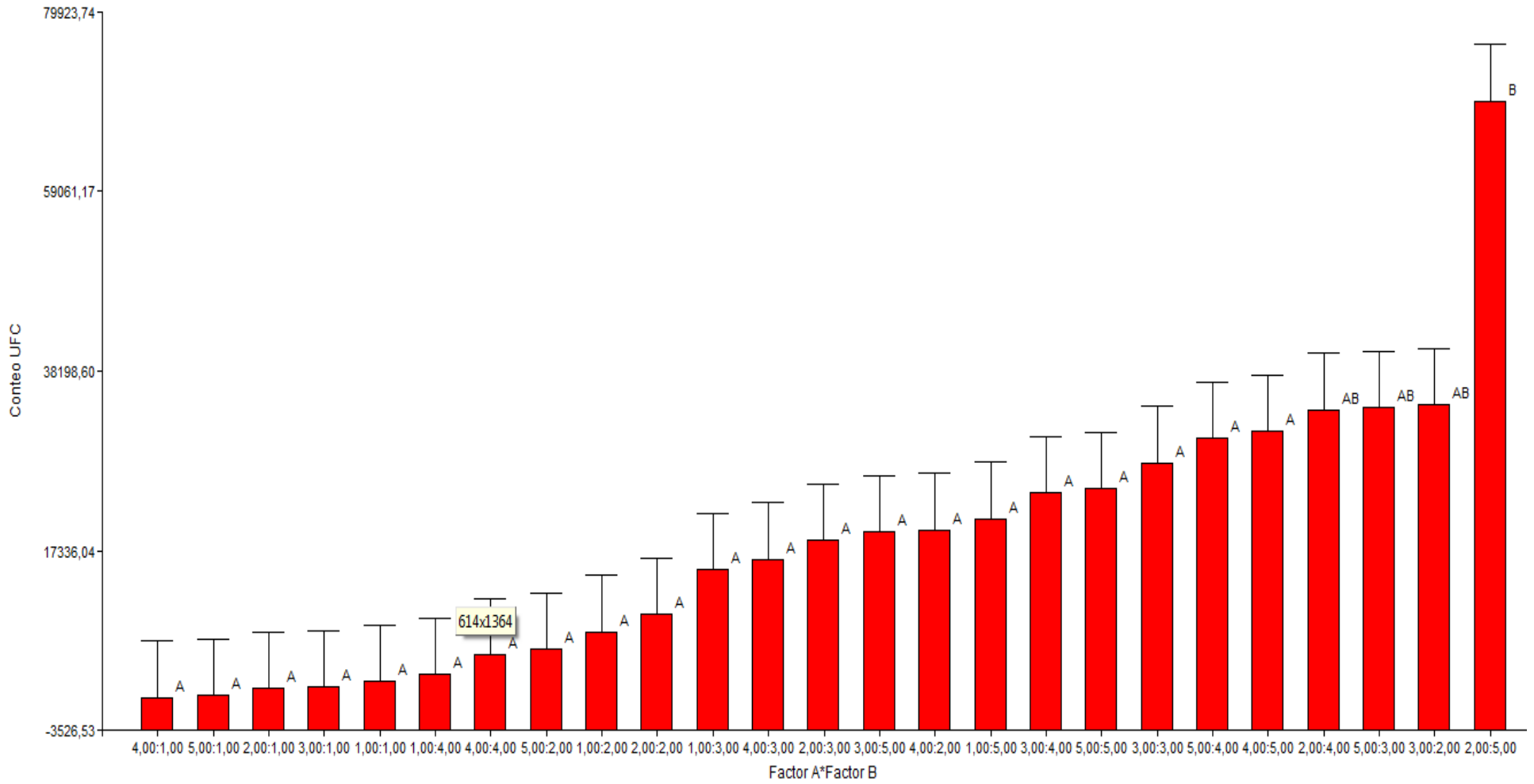
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=35980,03185

Error: 129109018,4094 gl: 48

Factor A	Factor B	Medias	n	E.E.	
4,00	1,00	266,67	3	6560,21	A
5,00	1,00	535,67	3	6560,21	A
2,00	1,00	1347,33	3	6560,21	A
3,00	1,00	1502,33	3	6560,21	A
1,00	1,00	2109,33	3	6560,21	A
1,00	4,00	2900,67	3	6560,21	A
4,00	4,00	5165,33	3	6560,21	A
5,00	2,00	5867,33	3	6560,21	A
1,00	2,00	7883,67	3	6560,21	A
2,00	2,00	9956,33	3	6560,21	A
1,00	3,00	15100,00	3	6560,21	A
4,00	3,00	16298,67	3	6560,21	A
2,00	3,00	18562,00	3	6560,21	A
3,00	5,00	19453,00	3	6560,21	A
4,00	2,00	19732,00	3	6560,21	A
1,00	5,00	21007,67	3	6560,21	A
3,00	4,00	23997,67	3	6560,21	A
5,00	5,00	24542,00	3	6560,21	A
3,00	3,00	27552,67	3	6560,21	A
5,00	4,00	30361,33	3	6560,21	A
4,00	5,00	31154,33	3	6560,21	A
2,00	4,00	33730,00	3	6560,21	A B
5,00	3,00	33978,33	3	6560,21	A B
3,00	2,00	34261,00	3	6560,21	A B
2,00	5,00	69570,33	3	6560,21	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Anexo D3: Grafico estadístico de crecimiento de cianobacterias sometidas a los distintos tratamientos.

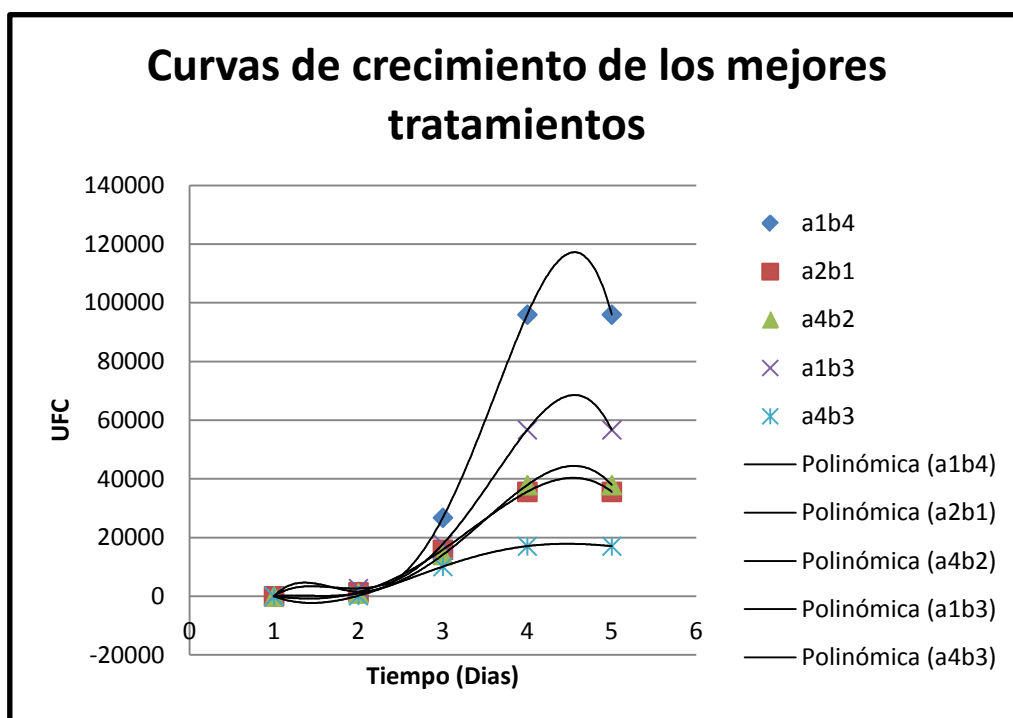


Anexo E

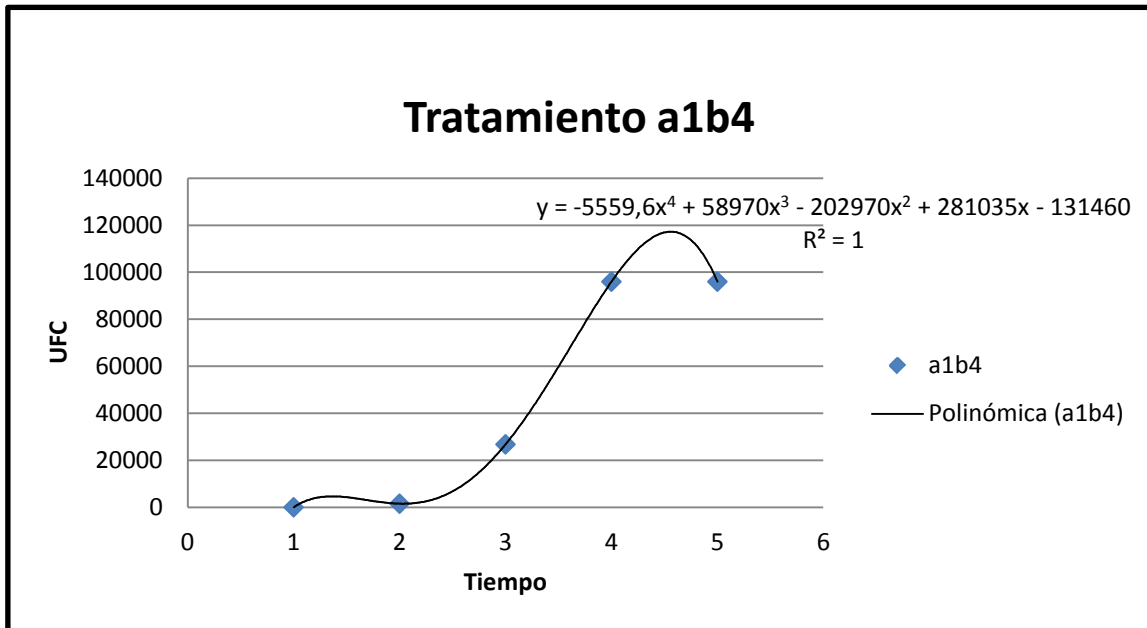
Anexo E.1: Tabla de datos de crecimiento de Cianobacterias de los tratamientos con los mejores resultados.

código	Tratamiento	C1	C2	C3	C4	C5
10.1	a_1b_4	16	1539	26785	96000	96000
12.2	a_2b_1	16	1395	15873	35612	35612
23.3	a_4b_2	16	963	14100	37920	37920
9.1	a_1b_3	16	2675	17787	56721	56721
24.3	a_4b_3	16	189	10105	17085	17085

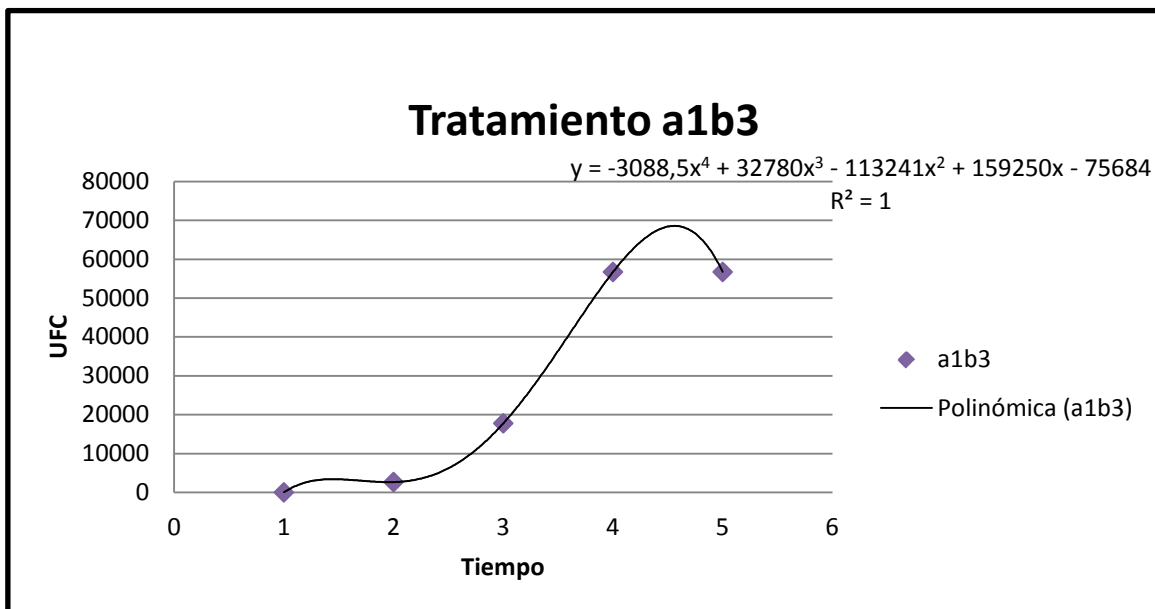
Anexo E.2: Curva de crecimiento de los resultados de los cinco mejores tratamientos obtenidos.



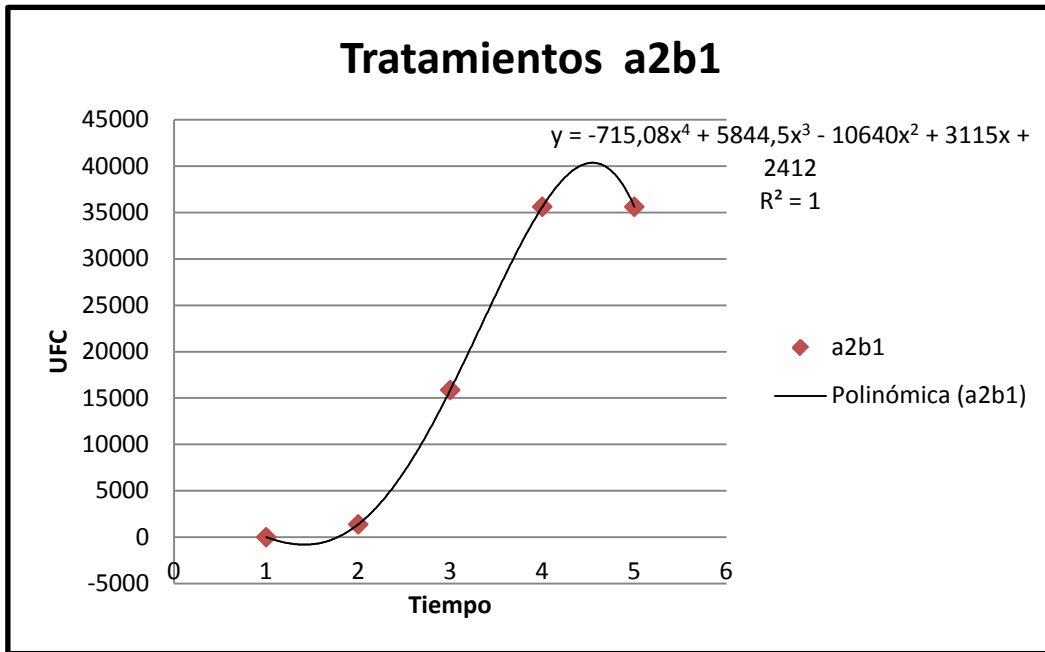
Anexo E.3: Curva de crecimiento del tratamiento a₁b₄



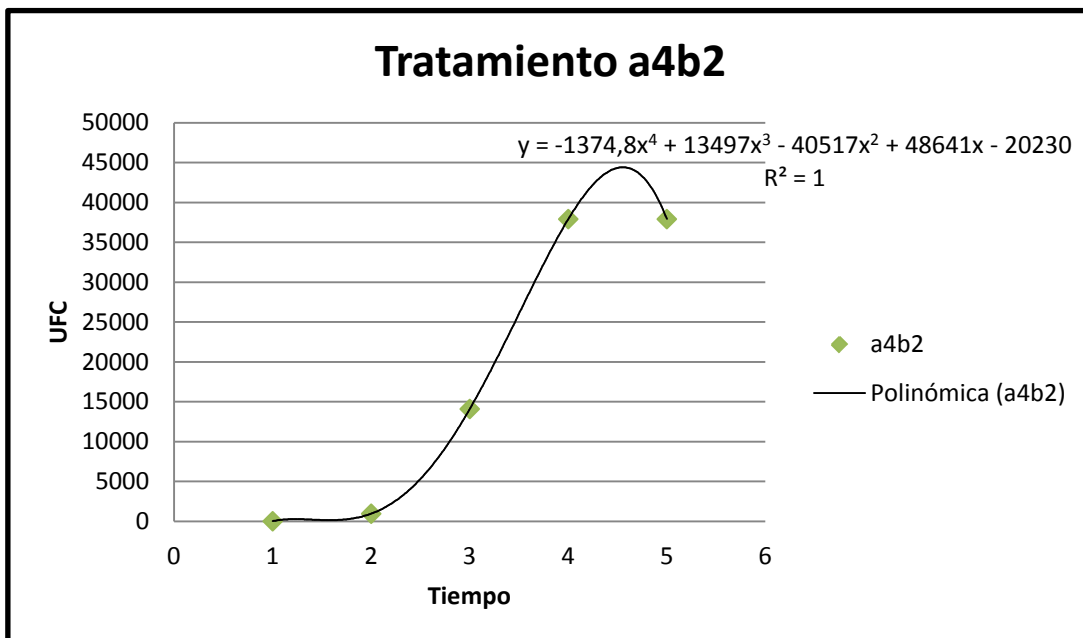
Anexo E.4: Curva de crecimiento del tratamiento a₁b₃



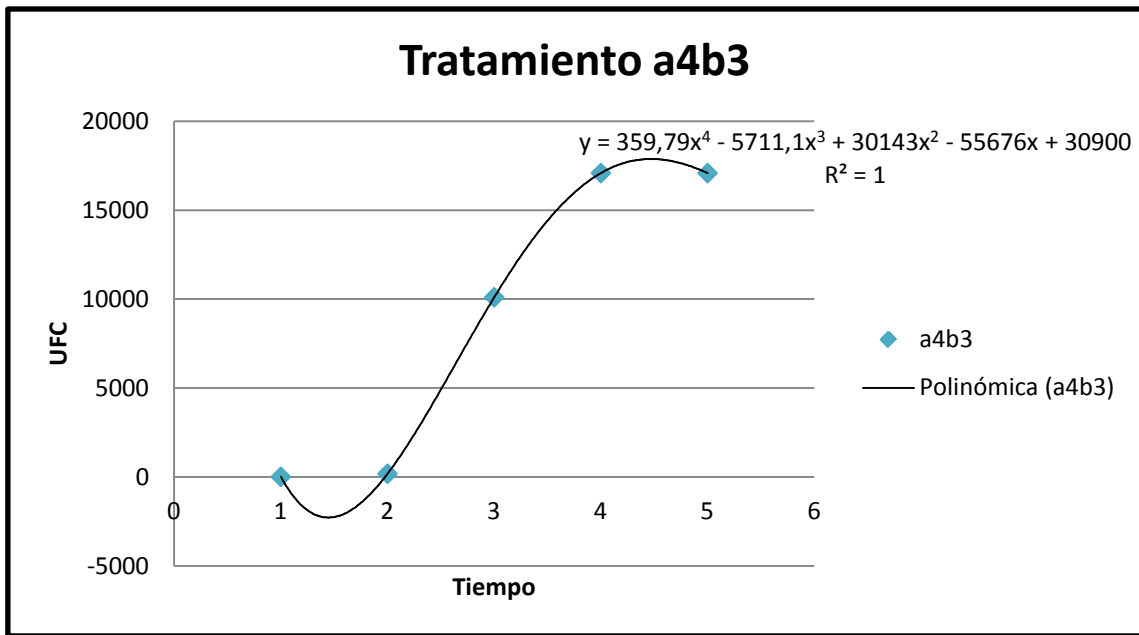
Anexo E.5: Curva de crecimiento del tratamiento a₂b₁



Anexo E.6: Curva de crecimiento del tratamiento a₄b₂

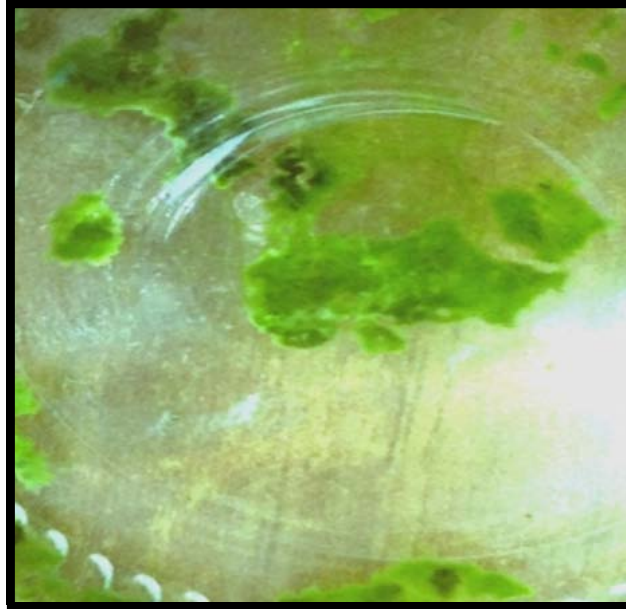


Anexo E.7: Curva de crecimiento del tratamiento a₄b₃



ANEXO F

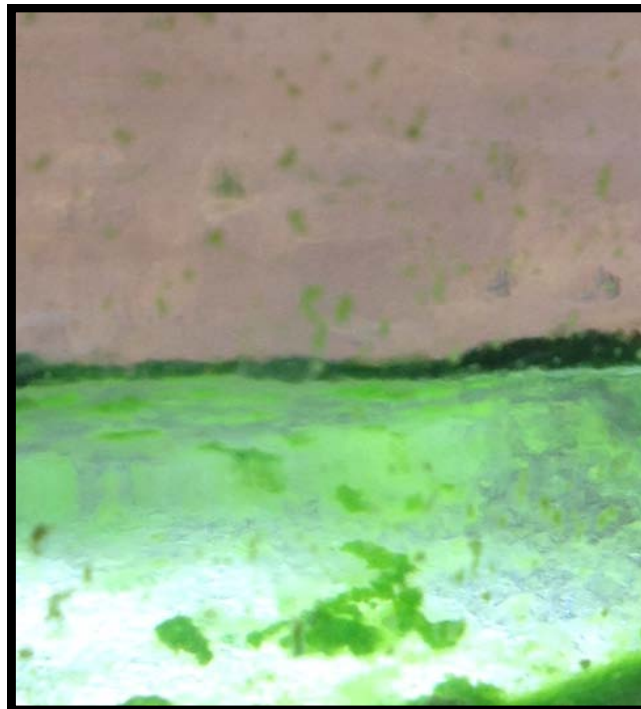
Fografía 1: Crecimiento de *Chlorella* en el inoculo 30 días después



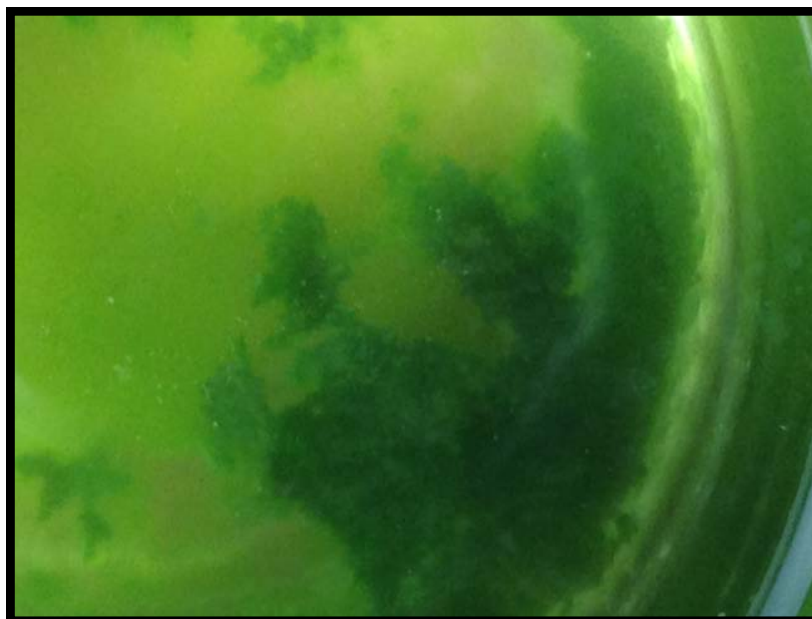
Fografía 2: Crecimiento de *Chlorella*



Fografía 3: Crecimiento de *Chlorella*



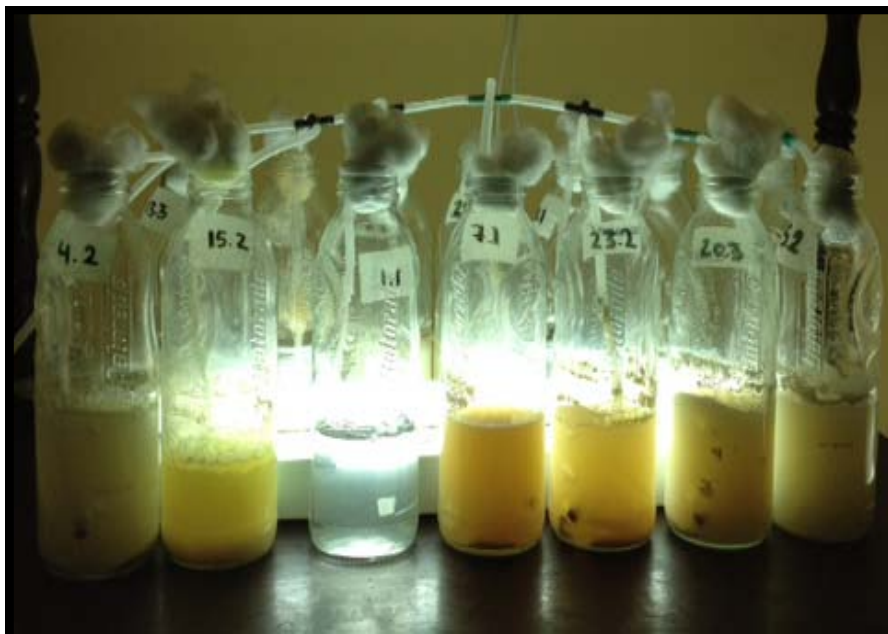
Fografía 4: Crecimiento de *Chlorella* 25% de nutrientes 50% lactosuero 30 días después



Fografía 5: Tratamientos primera práctica, lactosuero sin previo tratamiento de decantación de grasa



Fografía 6: Tratamientos primera práctica, lactosuero sin previo tratamiento de decantación de grasa



Fografía 7: Equipo de reacción de tratamientos



Fografía 8: Crecimiento de *Chlorella* 25% de nutrientes 100% lactosuero primera semana

