

**EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN
LAGUNA FACULTATIVA PARA
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

ING. MELISA ROMINA BAUMANN

DICIEMBRE 2023

**EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA
FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES**

Universidad Tecnológica Nacional
Facultad Regional Villa María

Especialización en Ingeniería Ambiental



**EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA
FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS
RESIDUALES**

**Tesina presentada para alcanzar el título de Especialista en Ingeniería
Ambiental**

Tesista: Ing. Melisa Romina Baumann.

Director: Jorge Daniel Elia.

Co-director: Mg. Graciela Marín.

Villa María, DICIEMBRE 2023.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

RESUMEN

La determinación de clorofila α en muestras de agua permite una estimación de la concentración de algas fitoplanctónicas (algas microscópicas) y es comúnmente utilizada para evaluar el estado trófico de los ambientes acuáticos (Yupanqui Poma et al., 2012). Para estimar la clorofila existen diferentes métodos, procedimientos y modelos matemáticos, desarrollados con el objeto de minimizar los errores ocasionados por la presencia de otros pigmentos fotosintéticos y de algunos compuestos químicos en el agua (SMWW, APHA, 2019).

El objetivo de esta investigación fue evaluar el comportamiento de las lagunas facultativas secundarias de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Cloacales e Industriales, mediante la determinación de clorofila α (Alpha). Se evaluó el nivel de eutrofización y el comportamiento de la laguna en general. Para la extracción de clorofila se aplicó el método analítico correspondiente a 10200 H Chlorophyll del Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed (SMWW), APHA, 2019. Se determinó la concentración de clorofila α , mediante espectrofotometría UV-visible, utilizando las conocidas propiedades ópticas de este pigmento fotosintético. Luego, se aplicó la ecuación tricromática de Jeffrey y Humphrey. Los resultados se evaluaron con la aplicación del Software Excel. Finalmente, mediante el empleo de un microscopio se observó la población de organismos clorofílicos presentes. Además, se relacionaron parámetros físicos, químicos y biológicos, como indicadores de calidad y contaminación, tales como pH, DBO (demanda bioquímica de oxígeno), DQO (demanda química de oxígeno), sólidos disueltos.

Se demostró que, mediante un adecuado protocolo de extracción, se obtiene una rápida y efectiva estimación de la biomasa de algas que puede ser utilizada para aplicar una clasificación trófica, lo que también puede ser obtenido por medio del conteo y estimación de dimensiones geométricas al microscopio (Hernández et al., 2011). Los resultados obtenidos en la determinación de la clorofila α , indican que el sistema se clasifica como eutrófico. Los valores determinados se encuentran por debajo del rango óptimo de funcionamiento satisfactorio, razón por lo cual se estima que la laguna no se encuentra lo suficientemente eutrofizada. A pesar de ello, presenta una tonalidad verdosa siendo uno de los signos de buen funcionamiento en las lagunas facultativas debido a la presencia de algas. Todos los parámetros físicos, químicos y biológicos medidos como indicadores de calidad y contaminación, estuvieron dentro de los rangos establecidos estándares acordes a lo establecido a las lagunas facultativas.

Palabras Claves: Algas, Pigmentos Fotosintéticos, Biomasa, Eutrofización, Aguas Residuales.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

ABSTRACT

The determination of chlorophyll α in water samples allows an estimation of the concentration of phytoplankton algae (microscopic algae) and is commonly used to assess the trophic status of aquatic environments (Yupanqui Poma et al., 2012). To estimate chlorophyll, there are different methods, procedures and mathematical models, developed in order to minimize errors caused by the presence of other photosynthetic pigments and some chemical compounds in the water (SMWW, APHA, 2019).

The objective of this research was to evaluate the behavior of the secondary facultative lagoons of a Sewage and Industrial Wastewater Treatment Plant, through the determination of chlorophyll α (Alpha). The level of eutrophication and the overall behavior of the lagoon were evaluated. For the extraction of chlorophyll, the analytical method corresponding to 10200 H Chlorophyll del Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed (SMWW), APHA, 2019. The concentration of chlorophyll α was determined by UV-visible spectrophotometry, using the well-known optical properties of this photosynthetic pigment. Then, the trichromatic equation of Jeffrey y Humphrey. The results were evaluated with the application of Excel software. Finally, the population of chlorophyll organisms present was observed under a microscope. In addition, physical, chemical and biological parameters were related, such as quality and pollution indicators, such as pH, DBO (Biochemical Oxygen Demand), DQO (Chemical Oxygen Demand), dissolved solids.

It was demonstrated that, through an adequate extraction protocol, a rapid and effective estimation of the algae biomass is obtained, which can be used to apply a trophic classification, which can also be obtained by counting and estimating geometric dimensions under the microscope (Hernández et al., 2011). The results obtained in the determination of chlorophyll α indicate that the system is classified as eutrophic. The determined values are below the optimal range of satisfactory operation, which is why it is estimated that the lagoon is not sufficiently eutrophicated. Despite this, it has a greenish hue, being one of the signs of good functioning in facultative lagoons due to the presence of algae. All physical, chemical and biological parameters measured as indicators of quality and contamination were within the established standard ranges in accordance with the provisions of the optional lagoons.

Keywords: Algae, Photothetic pigments, Biomass, eutrophication, Wastewater.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

ÍNDICE GENERAL

1- INTRODUCCIÓN	1
1.1- PLANTEO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	1
2 - OBJETIVOS	2
2.1 - OBJETIVO GENERAL	2
2. 2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3 - DESARROLLO	2
3.1- FUNDAMENTO TEÓRICO	2
3.1.1 - Contaminación del agua. Eutrofización	2
3.1.2 - Lagunas de estabilización. Clasificación. Lagunas Facultativas	3
3.1.3 - Evaluación de la Calidad del Efluente	5
3.1.4 - Microbiología de las lagunas facultativas	8
3.1.5 - Proceso de depuración de las lagunas facultativas. Factores que lo afectan	9
3.1.6 - Las algas. El fitoplancton. Importancia de su desarrollo en la depuración	12
3.1.6.1 - Características Generales	12
3.1.6.2 - Clasificación de las algas	13
3.1.6.3 - Características Citológicas de las Algas	14
3.1.6.4 - Pigmentos fotosintéticos de las algas. Efecto de la luz	16
3.1.6.5 - Espectros de absorción. Signatura espectral	20
3.1.6.6 - Proceso de fotosíntesis de las Algas	21
3. 2 - SELECCIÓN DEL METODO DE DETERMINACIÓN DE CLOROFILAS	23
3.2.1 - Generalidades de la determinación de clorofila	23
4. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
4.1 - ÁREA DE ESTUDIO. MUESTREO. TÉCNICAS APLICADAS	26



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

4.2 - TÉCNICA ANALÍTICA. MATERIALES Y MÉTODOS. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO	26
4.3 - DESARROLLO EXPERIMENTAL	29
4.3.1 - Determinación de clorofilas	29
4.3.2 - Observación <i>al microscopio</i> de muestras de la laguna facultativa	32
5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 - RESULTADOS DE MEDICIÓN DE CLOROFILAS	33
5.2 - RESULTADOS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS	34
5.3 - OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD EVALUADOS A LAS MUESTRAS	35
5.4 - DISCUSIÓN	35
6 - CONCLUSIONES	38
7 - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	39
ANEXO 1	41



1- INTRODUCCIÓN

1.1- PLANTEO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

El agua es un recurso limitado y primario para la vida, en la cantidad y calidad adecuada ayuda al desarrollo sostenible. Debido al crecimiento industrial y poblacional se ve afectada en estos aspectos por la contaminación, generando cambios físicos y químicos en el ecosistema (Castrillon Usuga, 2022). Es por ello que la preocupación de los países por contar con agua suficiente en cantidad y calidad para sus diferentes actividades es cada vez mayor. Los lagos y embalses proveen el agua para el consumo humano y permiten realizar una serie de funciones ambientales sumamente valiosas (Bonansea et al., 2012).

El acelerado desarrollo poblacional y la gran demanda del recurso hídrico dan lugar a la contaminación de las aguas y, por ende, la pérdida de la vida acuática en ríos. Esta problemática requiere de estudios urgentes que ayuden a tomar medidas para recuperar las aguas residuales y darles un uso productivo en el desarrollo de la vida terrestre (Marín et al., 2022).

Las algas juegan un rol muy importante en los cuerpos de agua y en el medio ambiente en general, y, debido a la alteración de los ecosistemas por el impacto antropogénico, consisten en una alternativa verde para el tratamiento de las aguas principalmente por la alteración masiva de los ciclos biogeoquímicos de sus elementos químicos. El 99,9% de la biomasa de las algas está formada por seis principales elementos, carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, azufre y fósforo. Sus elementos trazas son calcio, potasio, sodio, cloro, magnesio, hierro y silicio, denominación atribuida a que son necesarios solo en cantidades catalíticas. Todos los elementos que se incorporan en la materia orgánica son eventualmente reciclados a formas inorgánicas por medio de la mineralización. Ecológicamente, el aspecto más importante del reciclaje en los cuerpos de agua es la tasa a la cual se reciclan los nutrientes que limitan el crecimiento. Entre los nutrientes que se encuentran en bajas concentraciones, pero que son requeridos para el crecimiento del fitoplancton se mencionan: nitrato (NO_3), hierro, fosfato (PO_4) y silicio disuelto [$\text{Si}(\text{OH})_4$]. Las algas son importantes para el ciclo biogeoquímico debido a la captación, asimilación y producción de carbono, oxígeno, nitrógeno, fósforo, silicio y azufre (Guamán Bumeo et al., 2016).

La clorofila es un pigmento verde que presentan los vegetales, algunas algas protistas y cianobacterias, es la encargada de absorber la luz para realizar la fotosíntesis. Las algas al poseer este pigmento, y debido a la fotosíntesis, logran generar oxígeno, pero este a su vez, degrada la materia orgánica que se encuentra en el agua, provocando malos olores y colores desagradables, por lo que la clorofila se vuelve un parámetro para evaluar la calidad del agua, brindando información de la cantidad de algas y el estado trófico del medio. Los ríos, cascadas y lagos están expuestos a contaminación debido a residuos del trabajo humano (ganadería, agricultura, vertimientos de aguas residuales no tratadas) por lo que se genera un desequilibrio ambiental que generalmente conlleva a una carga de nutrientes que provoca la eutrofización de las aguas, principalmente Nitrógeno (N) y Fósforo (P), originando un crecimiento descontrolado de algas fitoplanctónicas (Castrillón Usuga, 2022).

La tecnología de depuración de aguas residuales conocida con el nombre genérico de Lagunaje, se caracteriza por reproducir en estanques, condiciones que permitan el desarrollo de una población saludable de algas, ya que el oxígeno para la remoción bacteriana de la demanda biológica de oxígeno (DBO) es generado mayormente por la fotosíntesis de las algas; de la misma manera que se dan los fenómenos de autodepuración de forma natural en ríos y lagos. Mediante la determinación de clorofila se puede evaluar las lagunas de estabilización, ya que proporciona información en cuanto a la cantidad de algas presentes en la laguna. Si existe un exceso en la población de algas se generará, principalmente, malos olores y colores desagradables; y, por el contrario, si existe poca cantidad de algas, no se producirá el oxígeno necesario para la oxidación de la materia orgánica (Caldera et al., 2013).

Este trabajo de Especialización se estructura de acuerdo a los objetivos del Proyecto PID “Caracterización Y Seguimiento Físicoquímico, Biológico Y Microbiológico Del Curso De Agua Superficial Según Aportes Antropogénicos. Aplicación De Tecnologías Para El Mejoramiento De Calidad De Aportes



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Puntuales”, como una tendiente a evaluar parámetros de calidad de efluentes, entre ellos los relacionados con la presencia de algas, y determinación de la clorofila, en lagunas Facultativas Secundarias.

2 - OBJETIVOS

2.1 - OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta investigación es evaluar el comportamiento de las lagunas facultativas secundarias de una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales Cloacales e Industriales, mediante la determinación de clorofila α (Alpha).

2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Poner a punto la técnica de determinación de Clorofila según el método de referencia 10200 H. Chlorophyll del “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 23 ed. en el laboratorio de la UTN FRVM
- Determinar clorofila en muestras extradidas de una laguna facultativa de tratamiento de aguas residuales.
- Evaluar el nivel de eutrofización de la laguna según los niveles de clorofila medidos.
- Observar al microscopio la presencia de organismos clorofílicos y las algas presentes en la muestra.
- Relacionar valores de los parámetros físicos, químicos y biológicos, medidos como indicadores de calidad y contaminación, como pH, DBO (demanda bioquímica de oxígeno), DQO (demanda química de oxígeno), solidos disueltos totales (SDT), solidos disueltos fijos (SDF) y solidos disueltos volátiles (SDV).

3 - DESARROLLO

3.1 - FUNDAMENTO TEÓRICO

3.1.1- Contaminación del agua. Eutrofización.

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud) el agua está contaminada cuando su composición se haya alterado de modo que no reúna las condiciones necesarias para ser utilizada beneficiosamente en el consumo del hombre y de los animales. La contaminación de las aguas puede proceder de fuentes naturales o de actividades humanas. En la actualidad, la más importante, sin duda es la provocada por el hombre, es decir la contaminación de origen antropogénico. El desarrollo y la industrialización suponen un mayor uso de agua y como consecuencia, la gran generación de residuos, muchos de los cuales terminan en los cuerpos de agua, sumado al uso de medios de transporte fluviales y marítimos que, en muchas ocasiones, son causas de contaminación (Yupanqui Poma et al., 2012).

Las aguas superficiales son en general más vulnerables a la contaminación de origen antropogénico que las aguas subterráneas, debido a su exposición directa a la actividad humana. Por otra parte, una fuente superficial puede restaurarse más rápidamente que una fuente subterránea a través de ciclos de escorrentía estacionales. Los efectos sobre la calidad serán distintos para lagos y embalses que, para ríos, y diferentes para acuíferos de roca o de arena y grava. En los cursos de agua, los microorganismos descomponedores mantienen siempre el mismo nivel de concentración de las diferentes sustancias que puedan estar disueltas en el medio. Las bacterias y las algas son los dos componentes biológicos principales, y su interacción constituye el efecto ecológico más importante sobre el proceso denominado autodepuración del agua. Cuando la cantidad de contaminantes es excesiva, la autodepuración resulta insuficiente; y es aquí donde se da la eutrofización del cuerpo de agua (Yupanqui Poma et al., 2012).

La eutrofización se refiere a un proceso de acumulación de nutrientes que da lugar a una modificación progresiva del equilibrio biológico del ecosistema. Este exceso de nutrientes provoca el deterioro de la calidad del agua y la proliferación de microalgas y plantas acuáticas, incluidas las cianobacterias productoras de toxinas.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Para evaluar el estado ambiental de un sistema acuático son utilizadas diferentes variables, entre ellas algunas de carácter biológicas relacionadas con los productores primarios, como el fitoplancton. Estas variables comprometen dos tipos de estimación, la concentración de la clorofila α y el biovolumen geométrico basado en la morfología de las algas. La primera se utiliza para estimar en forma indirecta la biomasa de las comunidades fitoplanctónicas ya que es el principal pigmento fotosintético presente en los diferentes grupos de algas, también es un indicador del estado fisiológico del fitoplancton y del estado trófico de los sistemas acuáticos, mientras que la segunda es reconocida como un factor altamente potente para evaluar la ecología y los patrones de distribución de las comunidades fitoplanctónicas, considerando el volumen de las formas dimensionales en combinación con el conteo al microscopio (Hernández et al., 2011),.

La concentración de clorofila α es uno de los métodos biológicos más utilizados para determinar la calidad del agua superficial, y por lo tanto el nivel de eutrofización, en base a estos niveles los cuerpos de agua se clasifican de manera trófica (**Tabla 1**); donde:

Tabla 1: Nivel de eutrofización según concentración de clorofila (Castrillon Usuga., 2022).

Eutrofización	Concentración de clorofila
Sistema oligotrófico	[0,3 – 3] mg Clorofila a/m ³
Sistema mesotrófico	[3 – 15] mg Clorofila a /m ³
Sistema eutrófico	[15 a 500] mg Clorofila a /m ³ .

La determinación de clorofila α es la que se va a emplear y desarrollar a lo largo de este trabajo.

3.1.2- Lagunas de estabilización. Clasificación. Lagunas Facultativas

Las lagunas de estabilización son el método más simple de tratamiento de aguas residuales que existe. Son estanques relativamente grandes y de poca profundidad, provistos de estructuras en tierra abiertas al sol y al aire. Generalmente presentan forma rectangular o cuadrada.

Las lagunas tienen como objetivos:

- Remover de las aguas residuales la materia orgánica que ocasiona la contaminación,
- Eliminar microorganismos patógenos que representan un grave peligro para la salud,
- Utilizar su efluente para reutilización, con otras finalidades.

Todo esto, se logra a través de procesos naturales con la participación de microorganismos. Ninguna energía externa, además de la originada por la luz solar, es requerida para este proceso (Correa Restrepo., 2008).

Las bacterias y las algas son los dos componentes biológicos principales de las lagunas, y su interacción constituye el efecto ecológico más importante sobre el proceso de autodepuración. El funcionamiento de estas lagunas consiste en un tratamiento biológico simple, eficiente y de bajo costo, en el que la estabilización de la materia orgánica se logra por medio de oxidación bacteriológica (oxidación aeróbica o fermentación anaerobia) y/o reducción algal fotosintética. El crecimiento algal representa, por una parte, el suministro adecuado de oxígeno fotosintético para la actividad aerobia bacteriana, y, por otra, la necesidad de removerlas del efluente para impedir que aumenten su concentración de sólidos suspendidos y de materia orgánica biodegradable. La población algal se representa usualmente por la concentración de clorofila α (Correa Restrepo., 2008).

Las lagunas de estabilización son usualmente el método más recomendable para tratamiento de aguas residuales (AR) de origen doméstico y municipal en países en vías de desarrollo. En lugares donde el clima es más favorable para su operación, las lagunas son opciones de bajo costo (usualmente la alternativa más económica), que requieren poco mantenimiento, presentan alta eficiencia, y el tratamiento



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

es totalmente natural y altamente sostenible. Las lagunas de estabilización generalmente descritas en la literatura, se clasifican en tres tipos: Lagunas Anaerobias, Lagunas Facultativas y Lagunas de Maduración. A su vez, existen dos tipos de lagunas facultativas, las primarias que reciben agua residual procedente de un proceso previo de pre-tratamiento, y las secundarias, donde ingresa el efluente de un tratamiento primario (Metcalf & Eddy.,1991).

En este trabajo, nos encontramos con Lagunas Facultativas secundarias. Este tipo, representa la variante más simple de los sistemas de lagunas de estabilización. Básicamente, son estanques diseñados para producir condiciones que permitan el desarrollo de una población saludable de algas, ya que las dos fuentes de oxígeno son la actividad fotosintética de las algas y la reaireación a través de la superficie. La finalidad de estas lagunas es la estabilización de la materia orgánica en un medio oxigenado proporcionando principalmente por las algas presentes, y de esta manera obtener un efluente de la mayor calidad posible, en el que se haya alcanzado una elevada estabilización de la materia orgánica, y una reducción en el contenido en nutrientes y bacterias coliformes.

El proceso consiste en la retención de las aguas residuales por un período de tiempo largo, o suficiente, para que se desarrollen los procesos naturales de estabilización de la materia orgánica (MO). Las principales ventajas de las lagunas facultativas están asociadas, por tanto, a la predominancia de los fenómenos naturales (Metcalf & Eddy.,1991). Puesto que las algas necesitan luz para generar oxígeno, y la difusión de éste en el agua es muy lenta, las lagunas tienen normalmente poca profundidad, para facilitar así un ambiente oxigenado en la mayor parte del perfil vertical. La profundidad a la cual se anula el contenido de oxígeno disuelto se llama oxipausa y varía a lo largo del día y del año. Algunos autores expresan que las lagunas facultativas presentan una profundidad que varía de 1,5 a 2,5m y TRH (tiempo de retención hidráulico) próximos a 10 días; de 0 a 1,5 m y TRH del orden de 20 días, y de 1,0 a 2,0m y TRH, en torno de 15 a 35 días. Los menores TRH se adoptan en regiones donde la temperatura del líquido es más elevada, lo que reduce el volumen requerido (Matsumoto & Sánchez Ortiz., 2010).

Uno de los signos de buen funcionamiento en las lagunas facultativas, es el desarrollo de un color verde brillante debido a la presencia de algas. La estabilización de las aguas residuales se lleva a cabo mediante una combinación de bacterias facultativas, anaerobias y aerobias. En un estanque facultativo existen tres zonas (**Figura 1**):

(1) *una zona superficial*, en la que existen bacterias aerobias y algas en una relación simbiótica. Allí las bacterias utilizan el oxígeno suministrado por las algas para metabolizar en forma aeróbica los compuestos orgánicos. En este proceso se liberan nutrientes solubles (nitratos, fosfatos) y dióxido de carbono en grandes cantidades, los cuales son utilizados por las algas para sintetizar su alimento y reproducirse, y de esta forma, la actividad de ambas es mutuamente beneficiosa,

(2) *una zona inferior anaerobia*, en la que se descomponen activamente los sólidos acumulados por acción de las bacterias anaerobias

(3) *una zona intermedia*, que es parcialmente aerobia y anaerobia. Allí la descomposición de los residuos orgánicos la llevan a cabo las bacterias facultativas. (Matsumoto & Sánchez Ortiz., 2010).



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

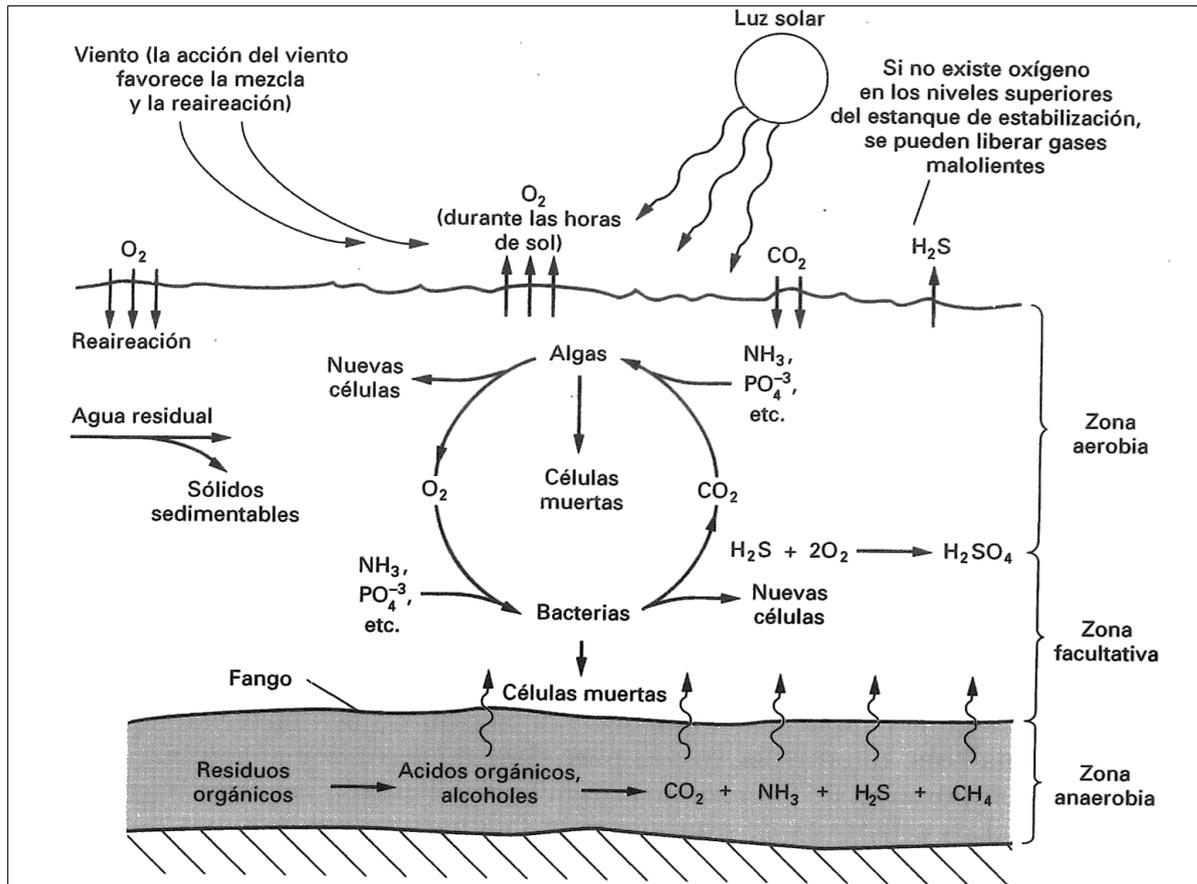


Figura 1: Zonas que se encuentran en las lagunas facultativas (Metcalf & Eddy.,1991).

Cuando el agua residual que contiene materia orgánica en solución o en suspensión se pone en contacto con una población de microorganismos, éstos la utilizan para efectos de derivar de dicha materia orgánica la energía necesaria para sus procesos vitales, y para asegurar la conservación de la especie con la generación de más microorganismos.

Los estanques de estabilización facultativos secundarios, se alimentan con agua residual procedente de un proceso previo de desbaste o con el efluente de un tratamiento primario. Los sólidos de gran tamaño sedimentan para formar una capa de fango anaerobio. Los materiales orgánicos sólidos y coloidales se oxidan por la acción de las bacterias aerobias y facultativas empleando el oxígeno generado por las abundantes algas presentes cerca de la superficie. El dióxido de carbono que se produce durante la oxidación orgánica, sirve como fuente de carbono para las algas. La descomposición anaerobia de los sólidos de la capa de fango, genera compuestos orgánicos disueltos y gases tales como el CO_2 , el H_2S y el CH_4 , que o bien se oxidan por las bacterias aerobias, o se liberan a la atmósfera. La eliminación de la DBO carbonosa, la coagulación de los sólidos coloidales no sedimentables, y la estabilización de la materia orgánica se consiguen biológicamente, gracias a la acción de una variedad de microorganismos, principalmente bacterias. Los microorganismos se utilizan para convertir la materia orgánica carbonosa coloidal y disuelta en diferentes gases y tejido celular (Metcalf & Eddy.,1991).

3.1.3- Evaluación de la Calidad del Efluente

La calidad del agua residual se puede analizar teniendo en cuenta parámetros físicos, químicos y biológicos. Los físicos abarcan las determinaciones de sólidos, turbiedad, color, olor y temperatura; los químicos corresponden aquellos donde el agua tiene la capacidad de disolverlos, como alcalinidad, sólidos disueltos, cloruros, durezas, materia orgánica, DQO (demanda química de oxígeno) y nutrientes, mientras que los biológicos, consideran la DBO (demanda bioquímica de oxígeno), determinaciones de clorofilas



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

y otras especies biológicas, como indicadores de contaminación. A continuación, se explican algunos de ellos.

Turbiedad: Es causada por la presencia de materia suspendida, como arcilla, arena, materia orgánica finamente dividida, algas y otros organismos microscópicos. Expresa la propiedad que tiene una muestra de desviar la luz de su recorrido en línea recta. Esta desviación, es el resultado del choque de los rayos de luz que viajan en línea recta con las partículas suspendidas. A mayor cantidad de estas partículas suspendidas, mayor turbiedad del cuerpo de agua (Yupanqui Poma et al., 2012).

Temperatura: Es una variable que se relaciona con la radiación solar y afecta, tanto, a la velocidad de la fotosíntesis como el metabolismo de las bacterias responsables de la remoción de la materia orgánica. Ambos fenómenos, son retardados por las bajas temperaturas. Cuanto más elevada es la temperatura ambiente en relación con la del cuerpo de agua, mayor será el gradiente térmico, y, por lo tanto, más notoria será la estratificación térmica del sistema. Este factor, también tiene influencia en la tasa de reducción bacteriana, implicando que la tasa de mortalidad de coliformes fecales en lagunas de estabilización es altamente dependiente de la temperatura, a mayor temperatura mayor será la remoción de estos microorganismos (Correa Restrepo., 2008).

Conductividad eléctrica: Es la medida de la capacidad del agua para conducir la corriente eléctrica. Este parámetro, depende de la concentración total de sustancias iónicas disueltas en el agua y de la temperatura a la cual se determina (Yupanqui Poma et al., 2012).

Potencial de Hidrógeno (pH): Las bacterias son altamente susceptibles, tanto al pH, como a la temperatura. Los potenciales muy altos o muy bajos les son fatales. El pH de las lagunas varía entre 6 y 9, siendo el óptimo para el desarrollo de los microorganismos alrededor de 7. El pH, es un factor que ejerce un evidente efecto sobre la velocidad de crecimiento de las microalgas, siendo específico para cada especie. Además, este parámetro influye indirectamente en el crecimiento por su efecto sobre la disociación y solubilidad de los distintos componentes del medio en el que crecen las microalgas. El valor de pH en las lagunas viene determinado fundamentalmente por la actividad fotosintética del fitoplancton y la degradación de la materia orgánica por las bacterias. Las algas consumen anhídrido carbónico en la fotosíntesis, lo que desplaza el equilibrio de los carbonatos y da lugar a un aumento del pH. Por otra parte, la degradación de la materia orgánica conduce a la formación de dióxido de carbono como producto final, lo que causa una disminución de pH. El desarrollo de un pH demasiado alto hace que la actividad bacterial disminuya, se reduce la producción de CO₂ y se limita el proceso simbiótico (Correa Restrepo., 2008).

Debido a que la fotosíntesis depende de la radiación solar, el pH de las lagunas presenta variaciones durante el día y el año. Cuanto mayor es la intensidad luminosa, los valores del pH son más altos. Estas variaciones diarias son muy marcadas en verano, cuando pueden alcanzarse valores de pH en torno a 9 o mayores (Guamán Bumeo et al., 2016).

Oxígeno disuelto (OD): Las concentraciones de OD en las lagunas son el reflejo de la intensa actividad fotosintética. Dependiendo de cada estanque, en una laguna facultativa, la capa oxigenada superficial presenta una variación diurna de OD y puede que el oxígeno disminuya notablemente durante la noche, pero también puede ocurrir que se observen concentraciones de sobresaturación de OD durante el día hasta valores determinados. Además de las variaciones diarias en el contenido en oxígeno disuelto, éste presenta también variaciones importantes en profundidad. La profundidad a la que se anula el oxígeno disuelto se llama oxipausa, y su posición depende de la actividad fotosintética, del consumo de oxígeno por las bacterias, de la temperatura y del grado de mezcla inducido, principalmente por el viento (Correa Restrepo., 2008).

Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅): La DBO es una prueba empírica que se realiza para conocer la cantidad de oxígeno que los microorganismos, especialmente las bacterias (aeróbicas o anaeróbicas), los hongos y el plancton, consumen durante la degradación de las sustancias orgánicas contenidas en los cuerpos de agua en los que habitan. Al ser descargada una cantidad determinada de materia orgánica en el agua, tanto los microorganismos que acompañan los residuos, como los existentes en el agua, se alimentan, crecen y reproducen a partir de dichos residuos orgánicos. Para ello necesitan determinada



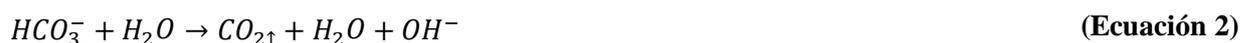
EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

cantidad de oxígeno que por tanto consumen, y ese consumo constituye una demanda que es precisamente la DBO. La DBO es un proceso biológico, depende de la temperatura (se realiza a 20°C) y por lo tanto requiere de tiempo, 5 días de manera estándar, denominándose DBO₅. Esta determinación se usa ampliamente para evaluar la eficiencia de las plantas de tratamiento en la remoción de la materia orgánica (Yupanqui Poma et al., 2012).

Demanda Química de Oxígeno (DQO): Es la cantidad de oxígeno necesaria para oxidar la materia orgánica por medios químicos y convertirla en CO₂ y H₂O. Cuanto mayor es la DQO, más contaminada está el agua. La DQO es una prueba que solo toma alrededor de tres horas, por lo que los resultados se pueden tener en mucho menor tiempo que lo que requiere una prueba de DBO. Con la DQO se oxida completa la muestra, de manera que todo el material orgánico, biodegradable y no biodegradable, es químicamente oxidado. Para una muestra dada de agua, el valor de DQO siempre es mayor que el de DBO. La relación DQO/DBO arroja un índice de la biodegradabilidad de las materias orgánicas contenidas en el agua (Metcalf & Eddy., 1991).

Alcalinidad: Es la medida de la capacidad de neutralizar los ácidos, y se debe principalmente a sales de ácidos débiles o bases fuertes. Estas sustancias actúan como amortiguadores para resistir la caída de pH, resultante de la adición de ácidos. Debido a que depende principalmente del contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, la alcalinidad sirve para medir la presencia de estos constituyentes.

Una de las características más sobresalientes de las aguas residuales domésticas, es su contenido ácido o alcalino que es regulado o amortiguado por el sistema dióxido de carbono (CO₂)-bicarbonato (HCO₃⁻). La medida de este parámetro tiene especial interés porque permite medir el desplazamiento del equilibrio del sistema carbonatado H₂CO₃, HCO₃⁻, debido al cambio en la concentración de CO₂ y H⁺ ocasionados por la respiración bacteriana, fotosíntesis de las algas, transferencia de dióxido de carbono del aire a la base líquida y la oxidación de compuestos orgánicos solubles. De todos ellos, la fotosíntesis de las algas es el factor más significativo. Si el CO₂ producido por las bacterias no satisface los requerimientos de las algas durante el día, estas extraen el CO₂ de los bicarbonatos y carbonatos ocasionando un incremento en el pH de acuerdo a las siguientes reacciones de equilibrio (**Ecuación 1 y 2**) del sistema carbonato: (Yupanqui Poma et al., 2012).



Sólidos disueltos: Son todos los sólidos que se obtienen después de evaporar una muestra previamente filtrada, y puede determinarse gravimétricamente. El término sólidos disueltos, comprende, sólidos en solución verdadera y sólidos en estado coloidal no retenido en la filtración, ambos con partículas inferiores a 1 micrón. En general, están representados por un 40% de origen orgánico, es decir pequeñas cantidades de materia orgánica disuelta en el agua, y un 60% de origen inorgánico. Dentro de los inorgánicos, sus principales constituyentes son los cationes de calcio, magnesio, sodio y potasio y los aniones de carbonato, bicarbonato, cloro, sulfato y nitrato. Es importante tener en cuenta este parámetro, ya que las concentraciones de SDT demasiado altas o demasiado bajas pueden limitar el crecimiento de las plantas acuáticas y provocar la muerte de muchos organismos marinos (Yupanqui Poma et al., 2012).

Cloruros: El ion cloruro es uno de los aniones inorgánicos principales en aguas naturales y residuales. Este ion ingresa al agua en forma natural mediante el lavado que las aguas de lluvias realizan sobre el suelo, sin embargo, la concentración de cloruros en estos cuerpos de agua tiende a ser baja, salvo que hayan sido afectadas por eventos antrópicos. Un contenido de cloruro elevado en el agua interfiere en el crecimiento y desarrollo vegetal (Yupanqui Poma et al., 2012).

Nutrientes: Entre los nutrientes esenciales para el crecimiento algal, además del carbono, se mencionan generalmente nitrógeno orgánico, fósforo, azufre, calcio y magnesio. El nitrógeno ingresa a las lagunas de estabilización con el agua residual en forma de, nitrógeno amoniacal, nitrógeno orgánico y nitratos; además, algunas especies de algas pueden fijar nitrógeno atmosférico. Las proteínas son desunidas, mediante hidrólisis, en aminoácidos, los cuales son descompuestos por las bacterias en amoníaco. El



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

amoníaco soluble se combina con el ion H^+ para formar ion amonio, que luego de la oxidación mediante las bacterias nitrificantes produce nitritos y/o nitratos. Las algas, al utilizar amoníaco con fuente de nitrógeno para construir su material celular, remueven nitrógeno y disminuyen la demanda nitrogenada de oxígeno del agua residual. Otro nutriente importante en las lagunas de estabilización es el fósforo. Las algas utilizan fósforo inorgánico y lo asimilan en síntesis celular; las bacterias y las algas son fuente de fósforo orgánico a través de su respiración y descomposición. El azufre no es, como el nitrógeno y fósforo, uno de los nutrientes mayoritarios en las lagunas de estabilización, sin embargo, presenta una trascendencia importante en el proceso de depuración (Yupanqui Poma et al., 2012). En el agua residual bruta, los sulfatos son normalmente la única forma presente y mediante reducción bacteriana pasan a sulfuros. Esta transformación tiene lugar en medio anaerobio, pero también puede ocurrir en la zona anaerobia de las lagunas facultativas (Correa Restrepo., 2008).

Además de estos nutrientes, las microalgas requieren pequeñas cantidades de factores de crecimiento orgánicos, incluyendo algunas vitaminas como, la cobalamina, biotina y tiamina (Guamán Bumeo et al., 2016).

3.1.4- Microbiología de las lagunas facultativas.

En este tipo de lagunas se pueden encontrar múltiples microorganismos, desde anaerobios estrictos en el lodo del fondo, hasta aerobios estrictos en la zona inmediatamente adyacente a la superficie. Además de las algas, que se estudian con más detalle en este apartado por ser las principales suministradoras de oxígeno, las lagunas facultativas se convierten en el hábitat de otras formas de vida, como son bacterias, protozoos, hongos, insectos y otros animales y plantas más complejos, sin embargo, los seres vivos más adaptados al medio serán los microorganismos que puedan sobrevivir en las condiciones cambiantes de oxígeno disuelto típicas de estas lagunas a lo largo del día y del año (Correa Restrepo., 2008).

A continuación, se menciona parte de la microbiota de las lagunas:

Bacterias, son microorganismos unicelulares que se dividen por escisión celular. Las bacterias producen unos compuestos químicos llamados enzimas, cuya función es atacar o digerir tipos específicos de alimentos. Las bacterias exudan estas enzimas y absorben los alimentos de la disolución en la que viven. Si el medio contiene un suministro adecuado de alimentos, y otras condiciones ambientales favorables, las poblaciones bacterianas pueden duplicarse en cuestión de minutos. Por tanto, gran parte de la materia orgánica originalmente presente en el agua residual, puede convertirse rápidamente en materia celular viva. Los géneros de bacterias más comunes en lagunas de estabilización son *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus* y *Akaligenes*. Sin embargo, otros grupos de bacterias que desempeñan un papel fundamental en el tratamiento por otros métodos biológicos (fangos activados, lechos bacterianos) parecen tener mucha menos importancia en el lagunaje. Entre estos géneros destacan *Zooglea*, *Beggiatoa* y *Sphaerotilus* (Metcalf & Eddy.,1991).

Protozoos, están constituidos por formas unicelulares. Algunos son depredadores y sus presas más comunes son las bacterias, algas, hongos o incluso otros protozoos. La mayoría de estos microorganismos, poseen cilios, es decir, apéndices diminutos como pequeños pelos, cuyo movimiento les permite desplazarse en el medio acuático (*Paramecium*), o impulsar las partículas de alimento hacia sus cavidades digestivas (*Vorticella*). Los protozoos, a veces, poseen pedúnculos y viven anclados en materia sólida. Entre los tipos más frecuentes de protozoos en las lagunas, se mencionan, los del género *Vorticella* y *Opercularia*. Aunque en el pasado se creía que la contribución de los protozoos a la depuración en lagunas era pequeña, investigaciones recientes sugieren un papel más destacado. Esta contribución se debe a su consumo directo de materia orgánica, y especialmente a su actividad depredadora sobre las bacterias, lo que estimula el crecimiento adicional de las poblaciones bacterianas (Castrillon Usuga., 2022).

Hongos (mohos y levaduras), Los hongos contribuyen también a la degradación de la materia orgánica, y son organismos no fotosintéticos y heterótrofos. Los hongos acuáticos, al igual que las bacterias, son seres saprofitos, es decir, que se alimentan de materia muerta. El proceso de alimentación lo llevan a cabo por liberación de enzimas que atacan las sustancias nutritivas en su entorno, y después absorben los productos



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

resultantes. Sin embargo, y a diferencia de las bacterias, el pH óptimo para el crecimiento de mohos y levaduras está en el intervalo 5-6, lo que, a efectos del lagunaje se traduce en una participación escasa en la depuración, ya que el pH del medio se encuentra entre 6 y 9 (Correa Restrepo., 2008).

Insectos, otros animales y plantas, aunque hay una gran variedad de insectos que pueden vivir en el hábitat constituido por las lagunas de estabilización, muy pocos de ellos contribuyen en alguna medida a la depuración, y la mayoría se pueden considerar más bien molestias a evitar en lo posible. Entre aquellos que pueden contribuir a la depuración se destacan, las larvas de la mosca de agua (*Chironomidae*), que son muy abundantes en algunas lagunas, especialmente cuando ya se ha alcanzado un buen grado de depuración. Estas larvas tienen un color rojo brillante, y resultan fácilmente visibles en la zona próxima a las orillas, donde viven en gran número. Se alimentan de materia detrítica, y en algunas especies, de los detritos acumulados en el fondo de las lagunas. Los zapateros (*Corixidae*) se alimentan también de materia detrítica, y a veces son muy numerosos en las lagunas. Estos insectos necesitan un soporte para la puesta de sus huevos, por lo que en lagunas correctamente operadas, en las que se eliminan las plantas de las orillas, su presencia es muy escasa. Esto mismo ocurre con los mosquitos, que prácticamente no están presentes en lagunas de estabilización en las que no haya vegetación emergente (Metcalf & Eddy., 1991).

Otros seres vivos como los *rotíferos* y *cladóceros* son beneficiosos para las lagunas, ya que se alimentan de algas, protozoos, bacterias y otras materias en suspensión, y contribuyen efectivamente a la clarificación de las aguas. Su acción permite una mejor iluminación a profundidades superiores, y por tanto, el crecimiento de algas y la oxigenación de capas inferiores de las lagunas. Sin embargo, cuando el número de rotíferos se incrementa a niveles superiores a los normales, se observa un efecto negativo en la calidad del agua, ocasionando un aumento en los niveles de amonio, ortofosfato soluble, nitratos y nitritos. Asimismo, la presencia de un gran número de estos organismos, que consumen algas, disminuyen la cantidad de oxígeno disuelto en el agua a niveles de riesgo. Entre los *cladóceros* está la pulga de agua, que aparece en ocasiones en grandes cantidades en las lagunas de maduración (Madigan et al., 1978).

3.1.5- Proceso de depuración de las lagunas facultativas. Factores que lo afectan.

Las lagunas de estabilización operan con concentraciones reducidas de biomasa que ejerce su acción a lo largo de periodos prolongados. La eliminación de la materia orgánica es el resultado de una serie compleja de procesos físicos, químicos y biológicos, entre los cuales se pueden destacar dos grandes grupos:

- Sedimentación de los sólidos en suspensión, que suelen representar una parte importante de la materia orgánica contenida en el agua residual (40-60 % como DBO₅), produciendo una eliminación del 75-80 % de la DBO₅ del efluente,
- Transformaciones biológicas, que determinan la oxidación de la materia orgánica contenida en el agua residual (Metcalf & Eddy., 1991).

En los estanques aerobios fotosintéticos, el oxígeno se suministra por aireación natural a través de la superficie y por fotosíntesis de las algas. Con excepción de la población de algas, la comunidad biológica presente en los estanques de estabilización es similar a la existente en los sistemas de fangos activados. Los procesos biológicos más importantes que tienen lugar en una laguna son:

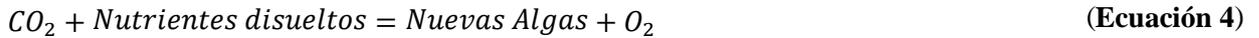
Oxidación de la materia orgánica por bacterias aerobias. Desde el punto de vista de la depuración, las bacterias se pueden describir como pequeños reactores bioquímicos, capaces de autorregularse. La respiración bacteriana provoca la degradación de la DBO₅ del agua residual, la oxidación biológica es la conversión bacteriana de los compuestos orgánicos hasta compuestos inorgánicos oxidados, proceso que se conoce con el nombre de mineralización. Las bacterias oxidan los productos de desecho para conseguir la energía y materias primas necesarias para la síntesis de las moléculas complejas de las que están formadas (proteínas, polisacáridos, etc). El proceso global de oxidación bacteriana puede describirse mediante la ecuación siguiente:





EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Producción fotosintética de oxígeno. Por su parte, la fotosíntesis algal produce, a partir de CO_2 y nutrientes disueltos, nuevas algas, y O_2 , que es utilizado en la respiración bacteriana (**Ecuación 4**).



El oxígeno liberado por las algas en el proceso de fotosíntesis es utilizado por las bacterias en la degradación aerobia de la materia orgánica. Los nutrientes y el dióxido de carbono liberados en este proceso de degradación los emplean, a su vez, las algas. Esta relación ciclo-simbiótica se ilustra en la **Figura 2**. Como se menciona en párrafos anteriores, la presencia de animales superiores tales como los rotíferos y protozoos, cumplen la función de mejorar el efluente. El grupo específico de algas, animales o especies bacterianas presentes en cualquier zona de un estanque depende de factores tales como la carga orgánica, el grado de mezclado, el pH, los nutrientes, la luz solar, y la temperatura. Este último factor ejerce un efecto muy importante sobre los estanques aerobios, particularmente en regiones con inviernos fríos (Metcalf & Eddy.,1991). Cuando no existe luz solar, algunas algas son capaces de ejecutar metabolismos quimiosintéticos como las bacterias y, por lo tanto, requieren oxígeno para el proceso de oxidación. Por otra parte, las algas pueden padecer metabolismo endógeno para obtener energía mediante la descomposición de su propio protoplasma (Correa Restrepo., 2008).

Combinando la actividad de las algas y de las bacterias (**Ecuación 3** y **Ecuación 4**), el proceso global es el siguiente:



Los organismos anaerobios y aerobios trabajan juntos para lograr reducciones de DBO hasta de 75%. Se obtiene una estabilización de la materia orgánica, que se traduce en fuertes descensos de la DBO y DQO del agua a su paso por las lagunas facultativas. En la **Figura 2** se visualiza un esquema simplificado de los principales procesos por los que tiene lugar la depuración en lagunas facultativas.

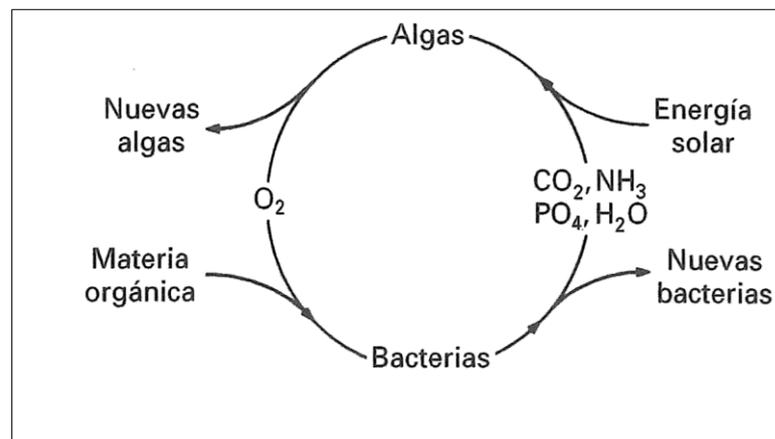


Figura 2: Representación esquemática de la relación simbiótica entre bacterias y algas en un estanque de estabilización de alta carga (Metcalf & Eddy.,1991).

Dado que la actividad de algas y bacterias es el fundamento de la depuración del agua residual, cualquier variable que afecte esta actividad repercutirá en el tratamiento. Las condiciones hidráulicas y biológicas pueden ser afectadas por una serie de factores naturales no controlables; dentro de los cuales se pueden mencionar fenómenos meteorológicos y variables intrínsecas a las condiciones locales como:

Vientos, la acción de los vientos en las lagunas facultativas es importante ya que tienen gran influencia en la homogenización de la masa líquida. Permiten mayor contacto del AR afluente con los microorganismos existentes en las lagunas y ayudan a la movilidad de las algas productoras de oxígeno;



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Temperatura, como ocurre con todos los procesos biológicos, este factor presenta una influencia marcada en todas las etapas. Afecta la velocidad de la fotosíntesis y el metabolismo de las bacterias responsables por la depuración de las AR.

Para el caso de las bacterias, la velocidad de la depuración aumenta con la temperatura. Mientras que, en lo que respecta a las algas, se han detectado retardaciones importantes en la actividad fotosintética a temperaturas elevadas menos productivas que las algas verdes (*cloroficeas*) a las que sustituyen. Puesto que este fenómeno coincide con una gran actividad de las bacterias, y, por tanto, grandes consumos de oxígeno, pueden desarrollarse zonas anaerobias en las lagunas facultativas en épocas muy calurosas, especialmente si el calentamiento se produce de forma brusca (Metcalf & Eddy, 1991).

Si bien las bacterias pueden sobrevivir en un intervalo bastante amplio de temperaturas, el crecimiento óptimo se suele producir en un intervalo muy restringido (**Tabla 2**).

Tabla 2: Clasificación de las bacterias según la temperatura de su crecimiento óptimo (Metcalf & Eddy, 1991).

Bacterias	Temperatura óptima de crecimiento
Psicrófilas	(-10 a 30 °C)
Mesófilas	(20 a 50 °C)
Termófilas	(35 a 75 °C)

Las temperaturas por debajo de la óptima, tienen efectos más importantes sobre el su crecimiento, que las superiores a ellas. Una caída de 10°C reduce la actividad microbiana en un 50%, la producción óptima de oxígeno por las algas, se obtiene con temperaturas de 20°C a 25°C. Además de afectar la viscosidad y la velocidad de las reacciones químicas, la temperatura es un factor que interviene en el diseño de las plantas de tratamiento de agua (coagulación, sedimentación, actividad microbiana, etc.). La mayoría de las reacciones que ocurren en el rango de temperaturas en el cual hay óptima actividad biológica, sufre una duplicación en la velocidad a la cual procede la reacción por cada 10°C de aumento. Asimismo, tiene una gran influencia sobre las tasas de reacción de los cambios biológicos y químicos que ocurren en el agua. En consecuencia, produce una alta influencia sobre la reproducción, crecimiento y el estado fisiológico de todas las especies vivas presentes. Por otro lado, la temperatura desempeña un rol fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas al regular o afectar distintos factores abióticos como son: la solubilidad de los nutrientes, solubilidad de gases, el estado físico de nutrientes, el grado de toxicidad de xenobióticos y propiedades fisicoquímicas del medio acuoso como el pH, el potencial redox, la densidad y la viscosidad (Marín et al., 2022).

Precipitaciones, El efecto inmediato de la lluvia es provocar un aumento del caudal de entrada, dilución de las AR, disminución del TRH. Cuando la lluvia es fuerte, la turbulencia que ésta genera, da lugar a que las lagunas aparezcan revueltas. El oxígeno disuelto suele bajar después de las tormentas debido a la demanda adicional de oxígeno provocada por los sólidos arrastrados por el agua de lluvia y los sedimentos de las lagunas que se mezclan con la columna de agua. Este último fenómeno es, especialmente importante en días cálidos, cuando la caída de tormentas provoca el enfriamiento superficial de las lagunas, generando cambios súbitos en la temperatura de la masa líquida y el desprendimiento de fangos hacia la superficie. Otro efecto de la lluvia es una cierta oxigenación en la zona superficial de las lagunas, debida tanto al propio contenido en oxígeno de la lluvia como a la turbulencia que provoca con su caída, junto con el arrastre de la población de algas, alterando el rendimiento de una laguna (Madigan et al., 1978).

Evaporación, la repercusión principal de este factor es que provoca una reducción de la altura de la lámina de agua hasta niveles no aconsejables para su operación, con la posterior concentración de sólidos que propicia el desarrollo de vegetaciones emergentes y un menor TRH;

Radiación solar, la luz es fundamental para la actividad fotosintética. Esta depende no sólo de la luz que alcanza la superficie del agua, sino de la que penetra en profundidad. Dado que el medio es normalmente



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

muy turbio, debido sobre todo a la presencia de las mismas algas (este fenómeno se conoce como autosombreado), la luz que penetra en la laguna se atenúa rápidamente y se anula a poca distancia de la superficie. Por esta razón la profundidad de las lagunas debe ser pequeña, garantizando así que la mayor parte de la columna de agua va a contar con cierto grado de iluminación. Puesto que la intensidad de la luz varía a lo largo del día y a lo largo del año, la velocidad de crecimiento de las algas varía de la misma forma. Este fenómeno da lugar a dos efectos fundamentales: el oxígeno disuelto y el pH del agua presentan valores mínimos al final de la noche, y aumentan durante las horas de luz solar hasta alcanzar valores máximos a media tarde. A partir de este punto, los valores decrecen de nuevo a lo largo de la noche. Esta evolución se observa mejor durante la primavera y verano, cuando la actividad fotosintética es más intensa (Matsumoto & Sánchez Ortiz., 2010).

De todos ellos, los dos factores más importantes que influyen el grado de mezcla en una laguna de estabilización son el viento y la temperatura, pues la mezcla minimiza la posibilidad de ocurrencia de cortocircuitos o de zonas estancadas, y asegura una razonable y uniforme distribución en el sentido vertical de la DBO, las algas y, por ende, del OD (Matsumoto & Sánchez Ortiz., 2010).

Mientras que para el caso de los factores químicos cabe resaltar la importancia del pH, como indicador del medio líquido en las lagunas, pues éstas necesitan de un medio ambiente ligeramente ácido o alcalino de acuerdo con el sistema para el cual hayan sido proyectadas. El pH elevado junto con otros factores como la radiación solar favorece la disminución o mortalidad de las bacterias entéricas (Matsumoto & Sánchez Ortiz., 2010).

3.1.6- Las algas. El fitoplancton. Importancia de su desarrollo en la depuración.

3.1.6.1- Características Generales.

Las algas son un grupo de microorganismos que están presentes en todos los cuerpos de agua, como lagos, lagunas, estanques, ríos y mares. Además, se encuentran en el suelo y en la mayoría de los ambientes terrestres, incluyendo aquellos con condiciones extremas, permitiéndoles crear ciertas características para adaptarse a una gran cantidad de ambientes. Hay 72.500 especies y 16 clases. Aunque las algas de agua dulce presentan una distribución casi universal, sólo unos pocos de los géneros identificados en las lagunas de estabilización están presentes en ellas en forma persistente y tienen una influencia importante en el proceso de depuración. Taxonómicamente, las algas se dividen de acuerdo a los pigmentos que presentan en, algas verdes, doradas y rojas. En las lagunas de estabilización, las más frecuentes son las verdes y las doradas (Guamán Bumeo et al., 2016).

Normalmente, las algas presentes en las lagunas de estabilización son unicelulares y se multiplican por escisión celular. La mayor parte del oxígeno de las lagunas es generado por la actividad fotosintética de las algas. Este oxígeno es liberado en forma de burbujas muy pequeñas. La presencia de algas en niveles adecuados, asegura el funcionamiento de la fase aerobia de las lagunas. Cuando se pierde el equilibrio ecológico, se corre el riesgo de producir el predominio de la fase anaerobia, que trae como consecuencia una reducción de la eficiencia del sistema. Por otro lado, durante el final de la primavera y verano, cuando la fotosíntesis es más activa, pueden alcanzarse condiciones de supersaturación, que se manifiestan por la tendencia al burbujeo del agua cuando se agita o se introduce algún objeto extraño en ella. Las algas absorben nutrientes solubles provenientes de la alimentación, o, de la descomposición bacteriana de la materia orgánica (Metcalf & Eddy.,1991).

En las lagunas se pueden encontrar algas móviles, dotadas de flagelos que les permiten desplazarse, e inmóviles, que dependen de las corrientes internas del estanque para moverse de una zona a otra. Las algas móviles presentan ventajas con respecto a las inmóviles, en especial en relación con su adaptabilidad a los medios turbios generados por la misma presencia de algas, puesto que pueden emigrar a profundidades con un adecuado nivel de iluminación.

Las poblaciones de algas verdes predominan en las lagunas durante el otoño, invierno y primavera, mientras que las algas verdiazules pueden hacerlo durante los meses de verano. Generalmente, las algas verdes móviles, tales como *Chlamydomonas* y *Euglena*, suelen ser dominantes en lagunas en las que la



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

penetración de luz es limitada, situación corriente en la mayoría de las lagunas facultativas. Las verdiazules, parecen empezar a predominar durante el principio del verano cuando aumenta la duración del día y la temperatura, y disminuye la concentración de nitrógeno inorgánico (NO_3 , NH_4^+) y dióxido de carbono libre. El predominio de algas verdiazules resulta perjudicial para el funcionamiento de las lagunas, ya que son menos productivas que las algas verdes. Entre los géneros de algas verdiazules que pueden resultar predominantes en las lagunas durante el verano están las *Anacystis*, que forman colonias de microorganismos rodeados de una sustancia mucosa. Los gases atrapados en estos agregados dan lugar a que floten hacia la superficie, donde pueden generar problemas de olores. Las algas del género *Oscillatoria* suelen aparecer en grandes cantidades en lagunas con excesiva carga orgánica y acumulación de fangos. La *Spirulina*, otra alga verdiazul, se ha observado como especie dominante en lagunas con largos tiempos de residencia y en las que la fuerte evaporación provoca una gran concentración de sales. Cuando la mineralización de la carga orgánica está más avanzada, se observan poblaciones mixtas de *Pediastrum*, *Scenedesmus* y *Chlorella*, y en fases aún más avanzadas de tratamiento, se dan las condiciones necesarias para el desarrollo de *diatomeas*, que confieren una coloración amarillenta a las aguas. Este fenómeno es más corriente en las lagunas de maduración (Kumar Patel et al., 2022).

En el **Anexo I (Figura 22)** pueden observarse ejemplos de crisofitas, algas verdes, algas rojas y diatomeas.

Las algas son una rica fuente de proteínas, lípidos y pigmentos, generalmente son autótrofas y contienen como pigmento fotosintético primario a la clorofila α , esto las hace capaces de convertir la energía solar y sintetizar compuestos de carbono (Guamán Bumeo et al., 2016). Las algas depuran el agua residual con energía solar, capturan CO_2 y convierten contaminantes en compuestos de valor. Además, pueden crecer rápidamente como una capa suspendida en la superficie del agua, reproducirse y hacer frente a las duras condiciones ambientales (Kumar Patel et al., 2022).

El término fitoplancton se refiere a un grupo diverso de algas que habitan en los cuerpos de agua. Se caracterizan por su baja capacidad de movimiento, aunque algunas poseen cierto poder de locomoción, desplazándose mediante flagelos y otros mecanismos. En general, estos organismos son transportados en forma pasiva por el movimiento de las masas de agua, siendo distribuidos ampliamente en aguas oceánicas, costeras, estuarinas y lacustres. Se concentran, principalmente, en la parte superior de la columna de agua (zona fótica), donde se favorecen los procesos de fotosíntesis y constituye la puerta de entrada de la energía solar a los ecosistemas acuáticos. Debido a los procesos adaptativos convergentes al medio físico altamente estable y heterogéneo en el que habitan, las microalgas son consideradas como las principales productoras primarias en estos ecosistemas, por cuanto a través de éstas se genera materia orgánica y energía, la que queda disponible para los distintos niveles tróficos presentes en los cuerpos de agua (Rosas Riedel., 2007).

Estas poblaciones fitoplanctónicas sufren fluctuaciones cualitativas y cuantitativas a lo largo del año, evidentes en diferentes escalas espacio-temporales asociadas a cambios en los factores ambientales y estacionales, entre otros (Rosas Riedel., 2007). La luz del sol, más fuerte en primavera, así como los aportes de sedimentos ricos en nutrientes del agua dulce que descargan los ríos, hacen que tengan lugar concentraciones de fitoplancton de gran intensidad durante esta época del año. Además de los espectaculares *blooms* primaverales, también ocurren eventos similares durante el verano cuando, debido a las condiciones atmosféricas, tiene lugar el fenómeno de afloramiento o *upwelling* producido por el viento. Durante el otoño y el invierno, las variaciones de Clorofila α dependen de factores como el aporte de nutrientes transportados por los ríos o las ocurrencias de temporales en el océano que mezclen las aguas superficiales con las aguas profundas (Metcalf & Eddy, 1991).

3.1.6.2- Clasificación de las algas

Dependiendo de su tamaño se clasifican en cuatro grupos:

- *Picoplancton* (0,2 - 2 μm), con una alta tasa de crecimiento, y, habilidad de colonizar rápidamente ambientes acuáticos.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

- *Nanoplancton* (2 - 20 μm), son organismos eucariotas unicelulares flagelados y son el principal alimento del micro y macrozooplancton. Tienen una alta tasa de crecimiento, por lo que están involucradas en el desarrollo de grandes florecimientos algales.
- *Microplancton* (20 - 200 μm), son el principal alimento de crustáceos, así como de peces omnívoros pelágicos y benthicos. La tasa de crecimiento es moderada a baja.
- *Macroplancton* ($> 200 \mu\text{m}$), tienen características biológicas similares al microplancton y están representadas por las algas verde azuladas coloniales (Guamán Bumeo et al., 2016).

3.1.6.3- Características Citológicas de las Algas

A continuación, se exponen las características citológicas de las algas:

Organización celular: En función a las características citológicas, las algas se clasifican en procariotas y eucariotas. Las procariotas carecen de organelos con membranas (como las cianobacterias) y su ADN se encuentra en una sola molécula circular en el citoplasma (son algas verdes-azules) (**Figura 4.b**). Mientras que las eucariotas se caracterizan por presentar una pared celular compuesta de polisacáridos y de contener organelos rodeados por una membrana (mitocondrias, retículo endoplásmico, complejo de Golgi y lisosomas). Estas últimas, además, contienen una fina estructura de cloroplastos (tilacoides), presencia de flagelos y una estructura donde se encuentra el material genético de la célula rodeada por una doble membrana, denominada núcleo (**Figura 4.a**) (Guamán Bumeo et al., 2016).

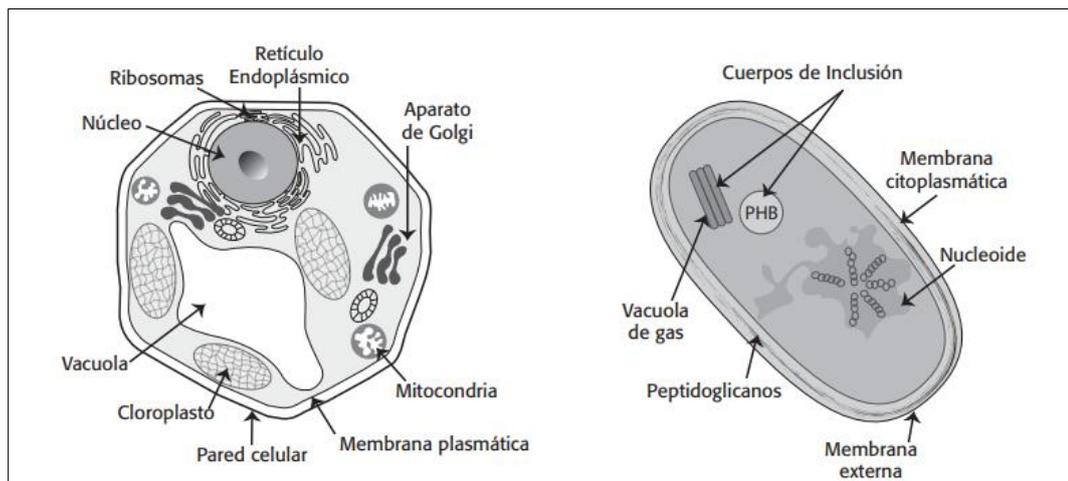


Figura 4.a Célula Eucariota – **b.** Célula Procariota. (Dreckmann et al., 2013)

Composición de la pared celular: La cobertura externa de las algas forma una estructura continua llamada pared celular (Guamán Bumeo et al., 2016), la cual generalmente, está compuesta de celulosa y glicoproteínas. Las diatomeas, presentan una pared celular de sílice, y, las algas verdes-azules presentan una pared celular de mureína.

Otros grupos, presentan, además, incrustaciones de carbonato de calcio. Las euglenoides, carecen de pared celular, sin embargo, presentan un periplasto o película semirrígida alrededor de la célula, este hecho les da la apariencia como de células desnudas. En las macroalgas, es posible encontrar otros compuestos polisacáridos tales como alginatos, agares y carragenanos, propiedad que les confiere importancia en la industria (Dreckmann et al., 2013).

Estructuras de locomoción: Las algas, con excepción de las verdes-azules y las rojas, presentan en algún momento de su ciclo de vida, estructuras de locomoción denominadas flagelos. En los diferentes grupos de algas, estos órganos varían tanto en número como en forma, sin embargo, típicamente presentan dos flagelos o múltiples de dos, que pueden ser isocontos (**Figura 5.e, 5.f**), anisocontos (**Figura 5.c, 5.d**), o heterocontos (**Figura 5.a, 5.b**).



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Es importante destacar que, algunas especies, presentan solamente un flagelo por célula (**Figura 5.h**) mientras que otras, presentan múltiples flagelos organizados de manera de corona en el ápice de las células, arreglo que se denomina estefenaconto (**Figura 5.g**) (Dreckmann et al., 2013).

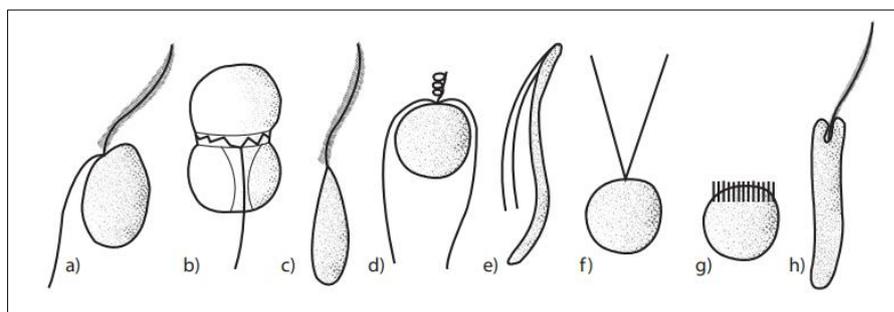


Figura 5. Tipos de flagelos en las células algales. **a. b.** Heterocontos – **c.d.** Anisocontos – **e.f.** Isocontos – **g.** Múltiples flagelos (Estefenaconto) – **h.** Un solo flagelo (Dreckmann et al., 2013).

Sustancias de reserva: Las algas contienen productos de almacenamiento para carbohidratos de bajo y alto peso molecular. Los de alto peso molecular, son compuestos como el almidón, mientras que, los de bajo peso molecular son azúcares como la sucrosa y trehalosa. También pueden contener reservas de proteínas como la cianoficina, producto de almacenamiento importante de nitrógeno fijado, estas solo se encuentran en las algas verdes-azules. Los lípidos, también están presentes en las algas, y parecen estar en mayor cantidad en los dinoflagelados y diatomeas. Las polifosfatos representan un gran producto de almacenamiento de las microalgas, ya que son importantes en el consumo de fosfato (Guamán Bumeo et al., 2016).

Nutrición: Teniendo en cuenta la forma de nutrición, las algas se pueden clasificar en autótrofas, heterótrofas, mixotróficas y auxotróficas. La mayor parte de ellas son autótrofas (fotoautótrofas o quimioautótrofos), esto quiere decir que su metabolismo depende del aparato fotosintético, usando la luz solar como recurso de energía y el CO₂ como recurso de carbono para la producción de carbohidratos y Adenosin Trifosfato (ATP). La fotosíntesis es su principal vía de nutrición. Sin embargo, existen grupos que presentan una forma de nutrición heterótrofa. Estas algas, pueden obtener el carbono orgánico del ambiente, ya sea tomando sustancias disueltas (osmotrofia) o engullendo bacterias y otras células como presa (fagotrofia) (Guamán Bumeo et al., 2016).

Algunos organismos presentan un tipo de nutrición mezclada de autotrofia y heterotrofia, la cual se denomina mixotrofia, y a los organismos que la presentan se les denomina mixótrofos (Dreckmann et al., 2013). Las algas auxotróficas, por el contrario, no pueden sintetizar los componentes esenciales como las vitaminas del complejo B12 o ácidos grasos, y tienen que importarlos (Guamán Bumeo et al., 2016).

Reproducción: Las algas pueden reproducirse por dos vías, la asexual, que, en el caso de las algas verde-azules, es típicamente fisión binaria y en otras algas unicelulares es mitosis, y la sexual en donde se puede observar oogamia, isogamia o anisogamia. El método de reproducción asexual consiste simplemente en la división repetida de un mismo organismo resultando en el incremento de la biomasa en una población (puede ser división de una sola célula o fragmentación de una colonia), no implica recombinación genética (Guamán Bumeo et al., 2016). Contrariamente, la reproducción sexual implica la recombinación genética y con ella el aumento de la variabilidad genética en una población (unión de gametos) (Dreckmann et al., 2013). Como caso excepcional, se mencionan las cianobacterias, las cuales pueden proliferar excesivamente y formar florecimientos, que son potencialmente tóxicos y proporcionan al agua olor y sabor desagradable (Oliva Martínez et al., 2014).

Ciclo Celular: La duración del ciclo celular, desde el crecimiento y división de las células madres hasta las siguientes células hijas, varía considerablemente con las especies. Bajo condiciones óptimas de crecimiento, la duración del ciclo depende principalmente del tamaño celular. El picoplancton *Synechococcus*, presenta uno de los ciclos más cortos, aproximadamente puede durar 2 horas; mientras que, el ciclo de microalgas nanoplanctónicas grandes como *Chlamydomonas* y *Chlorella* puede llegar a



durar cerca de 6 horas. Por otro lado, el ciclo de microorganismos simples como los dinoflagelados y formas coloniales, tienen ciclos mucho más largos (Guamán Bumeo et al., 2016). Generalmente, la mayoría de las algas presentan ciclos cortos e incluyen la formación de esporas de resistencia, con las cuales sobreviven durante periodos desfavorables y como una forma de conservar su diversidad genética (Oliva Martínez et al., 2014).

Pigmentos fotosintéticos: Son moléculas con una gran capacidad de absorber de la energía los fotones y posibilitar la fotosíntesis. Estos pigmentos, se organizan en estructuras captadoras de luz denominadas antenas, constituidos por pigmentos unidos a proteínas, las cuales están rodeando a los centros de reacción clorofila α (chl α), cuya función es transformar la energía fotónica en electroquímica; además están acompañados de otros pigmentos accesorios, cuya función es ampliar el espectro de absorción de los pigmentos primarios y, en el caso de algunos tipos y en ciertas circunstancias, pueden servir como protección frente a la luz excesiva (Rosas Riedel., 2007).

Diferentes factores bióticos y abióticos como la irradiación de la luz, la duración del fotoperíodo, la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura, la salinidad, la presencia de metales pesados, los pesticidas, etc; pueden afectar la producción de pigmentos de algas (Castrillon Usuga., 2022). Generalmente, se producen durante el crecimiento vegetativo, sin embargo, algunos informes también abordan su producción en condiciones de estrés, como la astaxantina (exceso de luz y nitrógeno) y la cantaxantina (exceso salino) (Kumar Patel et al., 2022).

Los pigmentos presentes en organismos del fitoplancton incluyen numerosos grupos de compuestos con diversas características físicas y químicas. Fundamentalmente, los pigmentos de las plantas se dividen en 3 grupos: clorofilas (a, b, c1, c2, c3), carotenoides (carotenos y sus derivados oxigenados conocidos como xantofilas), y ficobiliproteínas (aloficocianinas, ficocianinas, ficoeritrinas). Estos compuestos poseen distintas características, una de las más importantes, es la capacidad de absorber luz a diferentes longitudes de onda, ya que de esto depende el rango efectivo de acción del pigmento (Rosas Riedel., 2007).

3.1.6.4- Pigmentos fotosintéticos de las algas. Efecto de la luz

La clorofila es un pigmento verde que presentan los vegetales, algunas algas protistas y cianobacterias, es la encargada de absorber la luz para realizar la fotosíntesis (Castrillon Usuga., 2022). Los pigmentos son sustancias que absorben luz, su color esta dado por las longitudes de onda que reflejan, es decir por los colores no absorbidos. El pigmento verde, común a todas las células fotosintéticas absorbe todas las longitudes de onda excepto, las de color verde, color que es reflejado y captada por nuestros ojos. Las hojas pueden llegar a contener hasta 1 g de clorofila m^{-2} , aunque esta concentración es muy variable entre especies y sobre todo depende, entre otros factores, del estado nutricional, de la edad o la historia lumínica previa de la planta (Manrique Reol., 2003). Este pigmento se ubica en la membrana tilacoides (Rosas Riedel., 2007).

La estructura de la molécula de clorofila tiene dos partes (**Figura 6**): un anillo de porfirina (sustituida con pequeños grupos enlazados, sustituyentes) y una cadena larga constituida por un alcohol fitol. Es un tetrapirrol, con cuatro anillos pentagonales de pirrol enlazados para formar un anillo mayor que es la porfirina. La porfirina de la clorofila lleva un átomo de magnesio (Mg^{2+}) en el centro. La cadena del alcohol está compuesta por 20 átomos de carbono con un doble enlace ($C_{20}H_{39}OH$), lo cual le confiere a la molécula la característica de ser altamente hidrofóbica (repele al agua), y le otorga la propiedad de unirse a los dominios apolares de las proteínas que anclan el sistema a la membrana tilacoidal (Rosas Riedel., 2007). La cadena del fitol sirve para anclar la molécula de clorofila en la estructura anfipática de los complejos moleculares en que residen las clorofilas (Yupanqui Poma et al., 2012).



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

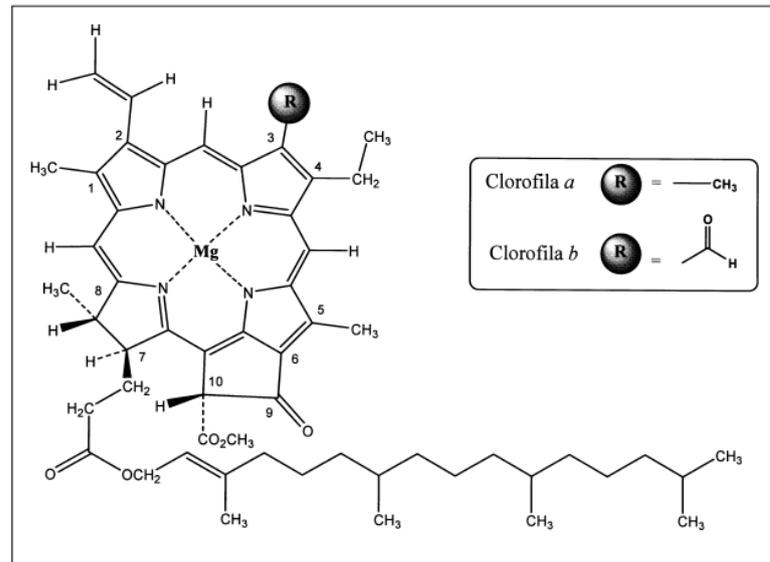


Figura 6. Estructura molecular de la clorofila (Bonansea et al., 2012).

Existen varios tipos de clorofilas y, debido a su configuración, captan la radiación luminosa en la zona del azul o del rojo; por ello son de color verde y dan al reino de las plantas ese color característico. A continuación, se describen los distintos tipos de Clorofilas:

Clorofila a : Fórmula molecular: $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$. Es uno de los principales pigmentos fotosintéticos, todas las plantas, algas y cianobacterias lo contienen. Se encuentra en los cloroplastos, vinculada al centro activo de los complejos moleculares, llamados fotosistemas, y tienen como única y crucial, la función de absorber luz y convertirla en energía química durante la fotosíntesis, se diferencia de la clorofila b en el radical de la posición 3 del grupo tetrapirrólico.

Debido a que la clorofila a tiene la función central en la fotosíntesis, al resto de los pigmentos se los conoce como pigmentos accesorios, estos incluyen otras clorofilas, así como demás pigmentos, como los carotenoides (Calsin Maihuire et al., 2022).

Clorofila b : Fórmula molecular: $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$. Como se mencionó anteriormente, se diferencia de la clorofila a en los sustituyentes de carbono C-3. En la clorofila a , el anillo de porfirina contiene un grupo metilo ($-CH_3$) en el C-3, y la clorofila b contiene un grupo aldehído ($-CHO$), que reemplaza al grupo metil- CH_3 (Bonansea et al., 2012). Este tipo de clorofila caracteriza a los plastos de las algas verdes y de sus descendientes las plantas terrestres. También se encuentran en algunos grupos de protistas y en las cianobacterias (Calsin Maihuire et al., 2022).

La clorofila b se sintetiza a través de la oxidación del grupo metilo de la clorofila a , a un grupo aldehído, esto se da debido a una enzima llamada oxigenasa, la cual cataliza la conversión del grupo metilo al grupo aldehído (**Figura 6**) (Bonansea et al., 2012).

Clorofila c : Fórmula molecular: $C_{35}H_{30}MgN_4O_5$. Es un tipo de pigmento color azul-verdoso. Se encuentra en los miembros fotosintéticos de *Chromistas*, el cual abarca grupos de algas pardas, diatomeas o haptófitos; así como en los dinoflagelados. Esta se diferencia de los demás tipos gracias a su estructura de anillo de porfirina y al no tener una cola isoprenoide. Este tipo de clorofila maneja a su vez subtipos denominados clorofila $c1$, $c2$.

- **Clorofila $c1$:** este pigmento posee un espectro similar al de su variante $c2$, pero, todos los máximos de absorción (454, 583 y 630 nm en éter dietílico) se desplazan de 4 a 6 nanómetros a longitudes de onda más largas.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

- *Clorofila c2*: es la forma más común de clorofila *c*. Se diferencia de la clorofila *c1* en sus máximos de absorción, éstos son alrededor de 447, 580, 627 nm y 450, 581, 629 nm en éter dietílico y acetona respectivamente (Calsin Maihuire et al., 2022).

Clorofila d: Este tipo, es de naturaleza poco común, se sabe que absorbe luz de forma diferente, más cerca del infrarrojo que del visible. Generalmente, se encuentra en algas rojas y en algunas cianobacterias (cianobacteria *Acaryochloris marina*, la cual vive en simbiosis en arrecifes de coral y de forma libre sobre otros organismos, casualmente algas rojas). La clorofila *d* sustituye en esta cianobacteria a la clorofila α como colector central de la energía luminosa (Calsin Maihuire et al., 2022).

Clorofila f: Este tipo fue descubierto recientemente, en el año 2010 en Australia Occidental. Tiene la particularidad de tener un espectro de absorción desplazado hacia el rojo, es decir que absorbe más radiación infrarroja (alrededor de 700 nm) que otras clorofilas; sin embargo, también absorbe longitudes de onda en azul y ultravioleta (entre 350 y 450 nm). Estudios indican que su estructura sería la de una clorofila α con un grupo aldehído C_2 -CHO en su lugar de metilo -CH₃, o 2-formil-clorofila α . Por el momento, se desconoce la distribución de esta clorofila en el ecosistema (Calsin Maihuire et al., 2022).

Pigmentos accesorios: Carotenoides:

En algas y plantas, los carotenoides se encuentran ubicados en los tilacoides de los cloroplastos. (Rosas Riedel., 2007). Son derivados tetraterpénicos que presentan dobles enlaces conjugados y un anillo ciclohexano sustituido insaturado en cada extremo de la cadena lineal. Son sustancias de color anaranjado con un máximo de absorción a 530 nm. Estos compuestos presentan en las plantas una doble función: como pigmentos accesorios, en la captación de energía lumínica y como moléculas capaces de disipar la energía de excitación excedente en forma de calor evitando daños importantes. Mientras que como transductores de energía hacia los centros de reacción no son muy eficientes (30 % - 40 % de eficiencia), como disipadores de la energía absorbida en exceso por la clorofila son altamente eficientes (Manrique Reol., 2003) (**Figura 7**). Debido a la presencia de estas características, son fuertes cromóforos. Cada cromóforo es responsable del espectro de absorción característico y del color de la molécula. La larga cadena de hidrocarburos, proporciona a estos compuestos la propiedad de ser insolubles en agua, pero sí solubles en solventes grasos (Rosas Riedel., 2007).

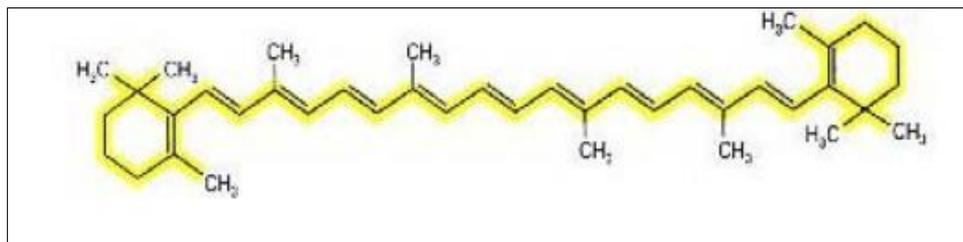


Figura 7. Estructura molecular del carotenoide (Rosas Riedel., 2007).

Los carotenoides se dividen en dos principales grupos:

Carotenos: Son hidrocarburos insaturados. Están formados por 40 átomos de carbono consistente en 8 unidades de isoprenos. Estas unidades poseen una estructura central en forma de cadena, con 14 átomos de carbono y 7 enlaces dobles conjugados, además de, 4 grupos metilo en forma de cadenas laterales (Rosas Riedel., 2007). La cadena central, lleva en uno o en los dos extremos, un anillo ciclohexano sustituido insaturado. Son sustancias solubles en solventes orgánicos, de color anaranjado, absorben en el rango de 400-530 nm con un máximo de absorción a 530 nm (Geraldo Noriega & Guevara Lam., 2021). La función más importante no es precisamente la de actuar como pigmento accesorio, sino en la disipación de la energía en exceso y en la detoxificación de las formas reactivas del oxígeno que se segregan durante la fotosíntesis (Manrique Reol., 2003). Existen carotenos α , β , γ , ϵ ., de los cuales el β -caroteno es el que



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

está presente en todos los grupos de algas, mientras que los demás carotenos, solo están presentes en grupos de algas más reducidos.

Xantófilas: Son derivados oxigenados (Guamán Bumeo et al., 2016).

Pigmentos fotosintéticos: Ficobiliproteínas

Son proteínas fluorescentes que contienen grupos tetrapirrólicos, covalentemente unidos a una apoproteína (Rosas Riedel., 2007). Son pigmentos rojos o azules solubles en agua, localizados en o dentro de las membranas fotosintéticas. La molécula pigmentada o cromóforo es una tetrapirrol y en combinación con la proteína no pigmentada (apoproteína) forman la ficobiliproteína (Guamán Bumeo et al., 2016).

El cuerpo básico de estas moléculas consiste en cuatro anillos de pirrol, unidos entre sí por puentes de metilo, pero en este caso no forman un anillo cerrado como en la clorofila, por lo tanto, no hay un átomo metálico en posición central (**Figura 8**). Los anillos de pirrol llevan en los carbonos 1 y 8 un carbón por átomo de oxígeno, en 4 y 5 un resto propiónico que a través de sus grupos carboxilos estén unidos el grupo cromóforo a la proteína por medio de enlaces peptídicos. Los anillos de pirrol y los puentes de metilo forman un sistema de dobles enlaces conjugados entre átomos de carbono y de nitrógeno. En una misma especie suelen estar presentes dos tipos de ficobiliproteínas, aunque, en general, predomina una de ellas. La *aloficocianina* y las *ficocianinas*; a su vez, las más importantes son las ficocianinas (azul) y las ficoeritrinas (roja), ambas se encuentran presentes en distintas proporciones en las cianobacterias, en las rodofíceas y en los criptófitos enmascarando a la clorofila. Absorben intensamente zonas variables de entre 480 a 670 nm. La ficocianina tiene su máximo de absorción en los 618 nm, en el caso de la ficoeritrina entre 540 y 570 nm, captando así longitudes de onda poco utilizadas por las clorofilas (Rosas Riedel., 2007).

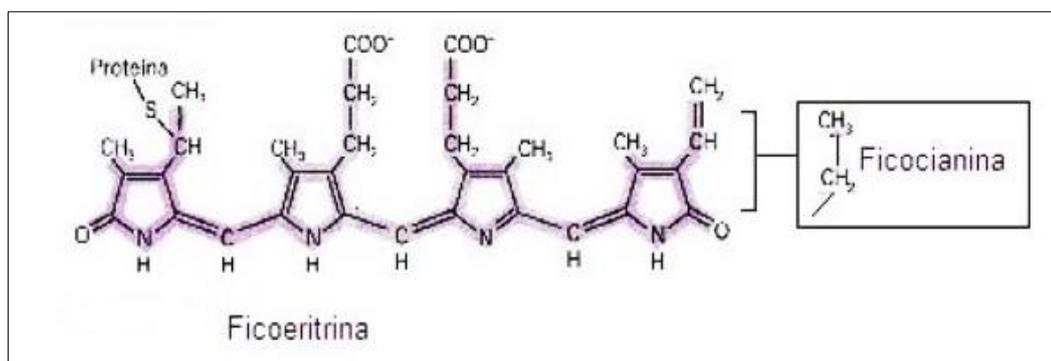


Figura 8. Estructura molecular de la Ficobiliproteína.

En una formación vegetal más o menos densa, las hojas se superponen en niveles o capas sombreándose unas a otras. La luz es rápidamente absorbida por las primeras capas de hojas y lo que consigue penetrar hasta las capas más bajas (1 a 2% de la luz incidente) es una luz no sólo progresivamente menos intensa, sino empobrecida en aquellas longitudes de onda que ya han sido absorbidas más arriba o, según se mire, enriquecida en las longitudes de onda transmitidas a través del dosel. Esta desigual distribución en la luz que llega a las distintas partes de las plantas tiene consecuencias directas en la composición pigmentaria de las mismas. Para sobrellevar los cambios lumínicos que a nivel hoja puede representar diferencias de hasta uno o dos órdenes de magnitud, las plantas han desarrollado mecanismos que les permite adaptarse o aclimatarse, según los casos (Manrique Reol., 2003).

Los pigmentos fotosintéticos se encuentran agrupados en sistemas funcionales denominados fotosistemas. Cada fotosistema consiste, en promedio, de unas 200 moléculas de clorofila y unas 50 moléculas de carotenoides. De todas estas ellas, solo unas pocas, mayoritariamente clorofilas, asociadas con el centro de reacción son capaces de transducir la energía luminosa en energía electroquímica. El resto de pigmentos, también mayoritariamente clorofilas, actúan como captadores de la luz y se denominan moléculas antena. La luz es absorbida por las moléculas antena y se va transfiriendo por resonancia hasta



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

que alcanzan el centro de reacción. Esta transferencia se realiza con una altísima eficacia (Rosas Riedel., 2007).

En algas y plantas superiores existen dos tipos de fotosistemas, cada uno con su centro de reacción y su grupo de moléculas antena: el PSI, cuya molécula activa del centro de reacción, un dímero de clorofila α especializada, tiene un máximo de absorción a 700 nm (P_{700}) y el PSII, cuya molécula activa del centro de reacción, probablemente una molécula de clorofila α especializada, tiene un máximo a 680nm (P_{680}) (Rosas Riedel., 2007).

Como se ha mencionado anteriormente, la función primordial de la clorofila es la de absorber energía lumínica; forma parte fundamental de la maquinaria captadora de luz en los tilacoides, y, además, del centro de reacción que inicia. Cuando una molécula de clorofila capta un fotón de luz, un electrón pasa de su estado basal a otro excitado, de mayor nivel energético. Este estado excitado de la clorofila es estable por muy poco tiempo (10^{-9} seg.) e inmediatamente puede suceder una de estas tres transiciones:

- Los electrones pueden moverse a orbitales más alejados del núcleo, a una distancia proporcional a la energía del fotón absorbido; y a esa energía de excitación utilizarla en la fotosíntesis (Streit et al., 2005)
- Retornar a su nivel básico emitiendo la energía en forma de calor y no emitiendo ningún tipo de fotón;
- Emitir un fotón de mayor longitud de onda que la absorbida en un proceso que se conoce como fluorescencia, en lugar de volver a su estado básico emitiendo calor.

Cualquiera de estas tres transiciones tiene como consecuencia la disipación de la energía absorbida (Manrique Reol., 2003).

El ambiente lumínico en el que crece la planta es de fundamental importancia, ya que la adaptación de las plantas a este ambiente depende del ajuste de su sistema fotosintético, para que la luz ambiental sea aprovechada de la forma más eficiente posible. Las respuestas de estas adaptaciones se reflejan en el crecimiento general de la planta. La luz tiene el efecto de ralentizar el deterioro de las clorofilas y las proteínas. La cicloheximina, un inhibidor de la síntesis de proteínas por parte de los ribosomas citoplasmáticos, previene la pérdida de clorofilas en la oscuridad. Las clorofilas se degradan rápidamente en las hojas en oscuridad total, sin embargo, su descomposición se retrasa notablemente por la incidencia de luz blanca débil ($0,5 \mu\text{mol fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Las plantas que crecen en ambientes con mucha luz a menudo tienen características estructurales y químicas que reducen la cantidad de luz que llega al cloroplasto. El exceso de luz puede inhibir la fotosíntesis a través de dos procesos: fotoinhibición y fotooxidación. La fotoinhibición implica daño a los centros de reacción, especialmente PSII (fotosistema II), cuando están sobreexcitados. En Fotosistema II, hay pérdida de proteína (D1) involucrada en la transferencia de electrones entre P_{680} (centro de reacción PSII) y PQ (Plastoquinona). Esta proteína se puede recuperar más tarde (proceso reversible). Mientras que la fotooxidación es un proceso irreversible e involucra directamente a los pigmentos receptores de luz, los cuales, al absorber mucha luz, permanecen excitados por mucho tiempo e interactúan con el O_2 produciendo radicales libres, como el superóxido (O_2^-), que pueden destruir los pigmentos. Hay algunas defensas bioquímicas utilizadas por las plantas, como la enzima superóxido dismutasa (SOD) que destruye los radicales libres. Sin embargo, estas defensas son insuficientes si se prolonga la exposición a la luz intensa (Streit et al., 2005).

3.1.6.5- Espectros de absorción. Signatura espectral

Las clorofilas tienen típicamente dos puntos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm de longitud de onda), y otro en el rojo (600-700nm); sin embargo, reflejan la parte media del espectro, la más nutrida y correspondiente al color verde (500-600 nm). Esta es la razón por la que las clorofilas tienen color verde (Estruch Benito., 2010).



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Aunque las clorofilas α y b tienen funciones muy similares, difieren levemente en la composición química, lo que genera diferencias en las longitudes de onda óptimas. Como se mencionó anteriormente, la clorofila α tiene un grupo metilo en el carbono 3, mientras que la clorofila b posee un grupo aldehído en el mismo carbono 3, estas diferencias hacen que la clorofila α tenga un rango óptimo de absorción de 400-450 nm y 650-700 nm aproximadamente, mientras que la clorofila b tiene sus rangos óptimos entre 450-475 nm y 630-570 nm (Figura 9) (Geraldo Noriega & Guevara Lam., 2021). Sus espectros de absorción son suficientemente diferentes como para permitir que los dos pigmentos complementen sus rangos de absorción en la región visible. La mayoría de las plantas contienen el doble de clorofila α que clorofila b . La gran eficiencia que presentan estas moléculas como fotorreceptores se debe a la presencia alternante de enlaces simples y dobles en su estructura (Rosas Riedel., 2007).

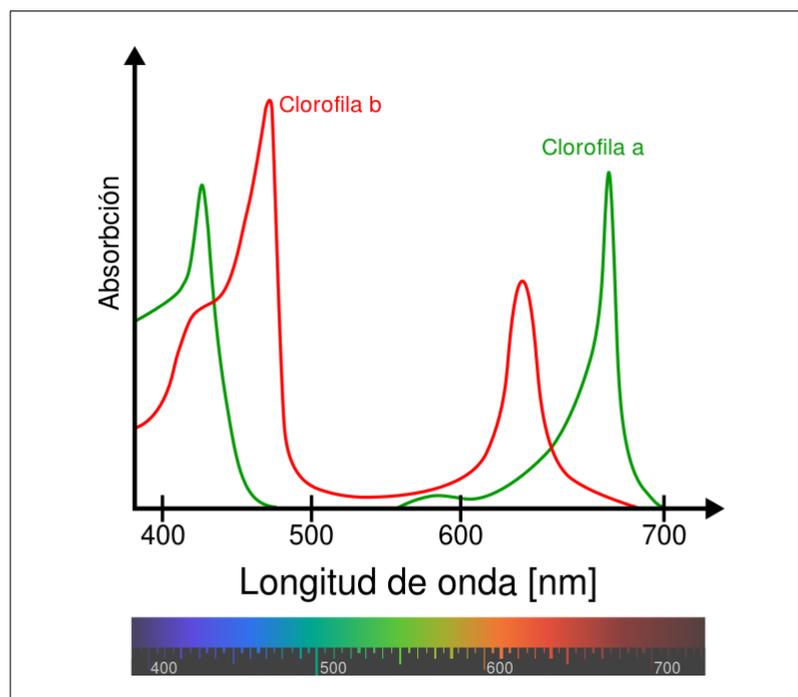


Figura 9. Espectro de absorción de la clorofila (Estruch Benito, 2010).

3.1.6.6- Proceso de Fotosíntesis de las Algas

La fotosíntesis es un proceso que no solo proporciona hidratos de carbono para la producción de energía en las plantas y los animales, sino que constituye también la principal vía a través de la cual el carbono vuelve a entrar en la biosfera, es decir, el principal medio de fijación del carbono. Además, constituye la principal fuente de oxígeno en la atmósfera terrestre (Yupanqui Poma et al., 2012). Mediante este proceso, las plantas convierten la energía de la luz en energía química, todo gracias a la capacidad de la clorofila de absorber fotones de luz (energía solar) con la consiguiente excitación de un electrón. Ese electrón excitado cede su energía, volviendo al estado normal, a algún pigmento accesorio, donde se repite el fenómeno. Al final, el electrón excitado facilita la reducción de una molécula, quedando así completada la conversión de una pequeña cantidad de energía luminosa en energía química, y, liberar oxígeno molecular y generar energía bioquímica. La disminución de la clorofila durante la fotosíntesis es la consecuencia de exponerse a condiciones de estrés, las cuales destruyen la ultraestructura del cloroplasto y reducen la actividad fotosintética (Calsin Maihuire et al., 2022). En la **Ecuación 6**, se observa la reacción fotosintética general:



Donde $[CH_2O]$ indica un hidrato de carbono general.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Dado que la combustión de los hidratos de carbono para producir CO_2 es un proceso oxidativo, la inversa, es decir la conversión del CO_2 en hidratos de carbono consiste en un proceso de reducción (reacción REDOX). En la reacción precedente, el H_2O es el agente reductor último, como ocurre en las plantas, en la mayoría de las algas y en las cianobacterias. Sin embargo, en muchas bacterias existen procesos fotosintéticos que utilizan otros agentes reductores (Yupanqui Poma et al., 2012).

La fotosíntesis en los vegetales y algas se produce en el interior de unos orgánulos denominados cloroplastos, estos se encuentran en las células de las hojas y algunos tallos de los vegetales. Cada célula puede contener entre 20 y 50 de estos orgánulos. Las algas eucariotas tienen también cloroplastos, pero a menudo, solo presentan uno muy grande (Calsin Maihuire et al., 2022).

Como las mitocondrias, los cloroplastos son semiautónomos, poseen propio DNA que codifica algunas de sus proteínas, existen muchos datos que indican que los cloroplastos han evolucionado a partir de organismos unicelulares similares a las cianobacterias. Estos fotosintetizadores procariontes, no contienen cloroplastos, sino que contienen estructuras membranosas que desempeñan el mismo papel que las membranas de los cloroplastos (Calsin Maihuire et al., 2022).

Los cloroplastos contienen una membrana externa, libremente permeable, y una membrana interna con una permeabilidad selectiva (**Figura 10**). La membrana interna encierra un material denominado estroma; dentro del cual están inmersas múltiples estructuras membranosas en forma de sacos planos denominados, tilacoides que a menudo están apilados, formando unidades denominadas granas. Estas unidades individuales están interconectadas de manera irregular mediante unas extensiones de los tilacoides denominados lamelas del estroma. La membrana tilacoide encierra un espacio interior, la luz del tilacoide (Yupanqui Poma et al., 2012).

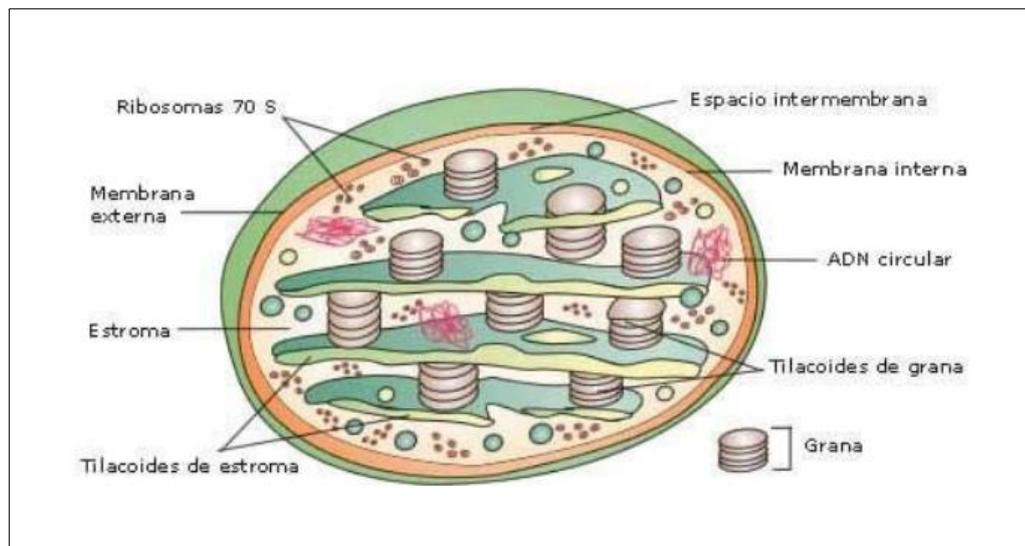


Figura 10. Estructura interna del cloroplasto (Yupanqui Poma et al., 2012).

La división dentro de un cloroplasto es sencilla. La absorción de la luz y todas las reacciones luminosas se producen dentro de las membranas tilacoides o sobre ellas (Yupanqui Poma et al., 2012). Dichas membranas absorben la luz a través de grupos de pigmentos, de entre los cuales el pigmento implicado directamente en las reacciones luminosas es la clorofila (el cual se encuentra dentro de los cloroplastos). Aquí es donde tienen lugar las dos reacciones importantes, la fotoquímica (en las membranas tilacoides) y la bioquímica (en el estroma del cloroplasto).

Dentro de dichos organelos, además de las clorofilas, se encuentran los ya mencionados, pigmentos accesorios; los cuales ayudan a absorber la luz y transferir la energía radiante a los centros de reacción (Calsin Maihuire et al., 2022).



3. 2- SELECCIÓN DEL METODO DE DETERMINACIÓN DE CLOROFILAS

3.2.1- Generalidades de la determinación de clorofila.

Para estimar la clorofila existen diferentes métodos, procedimientos y modelos matemáticos, todos ellos, básicamente implican su extracción y cuantificación o determinación.

Extracción de pigmentos.

Los métodos comúnmente empleados para la extracción de pigmentos de las algas, son principalmente técnicas fitoquímicas y su selección depende de varios parámetros como, la naturaleza bioquímica, la rapidez, la toxicidad y la disponibilidad del solvente, la reproducibilidad, la eficiencia de la extracción, la selectividad, la prevención de la transformación química de los compuestos extraídos y el costo (Duppeti et al., 2017).

Los pigmentos fotosintéticos son característicos de los diferentes grupos de algas, por lo tanto, su extracción es distinta. Básicamente, se recolecta una muestra de agua, se concentran los microorganismos clorofílicos, esto puede hacerse por filtración o centrifugación. Seguidamente, se deben romper mecánicamente las células recolectadas, macerando los filtros con un mortero de mano, o mediante congelación. Para la posterior extracción de clorofila de las células rotas, se emplean diferentes solventes. La facilidad con la que se eliminan las clorofilas de las células varía considerablemente con las diferentes algas. La literatura reporta distintos solventes, además de la aplicación de ecuaciones que utilizan distintas longitudes de onda. Así mismo algunas revisiones detalladas analizan los inconvenientes que ofrecen estos procedimientos en la exactitud de la cuantificación de la clorofila (Hernández et al., 2011).

Se pueden agrupar dos formas de extracción, una rápida, donde se pueden obtener resultados en menos de una hora. Consiste en una extracción en metanol al 100% por 15 min en un baño de agua caliente (55°C). Seguido de eso, se filtra la solución, se ajusta a un volumen determinado y se homogeniza. La otra forma, más lenta consiste en el uso de acetona o etanol, en ausencia de luz y a una temperatura aproximada de 4°C durante toda noche, o por 18-24 h (Peña Prieto., 2005). Los solventes más utilizados acetona, metanol, etanol, entre otros. Las moléculas de clorofila tienen enlaces no covalentes, muy frágiles, los cuales se rompen fácilmente cuando el tejido se macera en disolventes orgánicos, además de disolver los pigmentos, estos solventes son solubles en agua, es por ello que el carácter hidrofílico/hidrofóbico de una sustancia influye directamente en la elección del mejor disolvente para su extracción (Bonansea et al., 2012). Frecuentemente se utilizan solventes orgánicos polares, ya que estos rompen los enlaces lipídicos de la clorofila y las asociaciones con los lípidos de membrana, además de extraer los pigmentos en una solución. Por el contrario, los solventes no polares como el hexano y el éter de petróleo son los menos efectivos (Bonansea et al., 2012).

Se confirma la extracción del pigmento con la coloración verdosa fuerte que presenta el extracto, donde el filtrado cumple la función de eliminar la mayor cantidad de turbidez, compuesta por fragmentos de algas y porciones no diluidas para generar así, una muestra lo más homogénea y pura posible (Geraldo Noriega & Guevara Lam., 2021).

Dentro de las consideraciones metodológicas generales, se debe tener en cuenta que las clorofilas, carotenoides y biliproteínas son compuestos inestables, por lo que deben ser manejados cuidadosamente, para no alterar sus propiedades químicas. Son isomerizados y oxidados por la luz y el aire, lo cual hace que cambie su composición química y coloración (Rosas Riedel., 2007).

- Productos de degradación de la clorofila:

Las clorofilas presentan derivados naturales que son responsables del 40% de la sobreestimación de la clorofila α en la cuantificación, debido a que estos grupos presentan el mismo espectro de absorción o similar al de sus parentales, la concentración obtenida para la clorofila α será la suma de la clorofila α más



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

la de sus derivados. La presencia de estos feopigmentos derivados, es usualmente en células muertas dentro de una muestra o, por degradación que ocurre durante la extracción (Peña Prieto., 2005).

La degradación de las clorofilas forma parte del desarrollo de las algas, en la **Figura 11** se observa el esquema de descomposición:

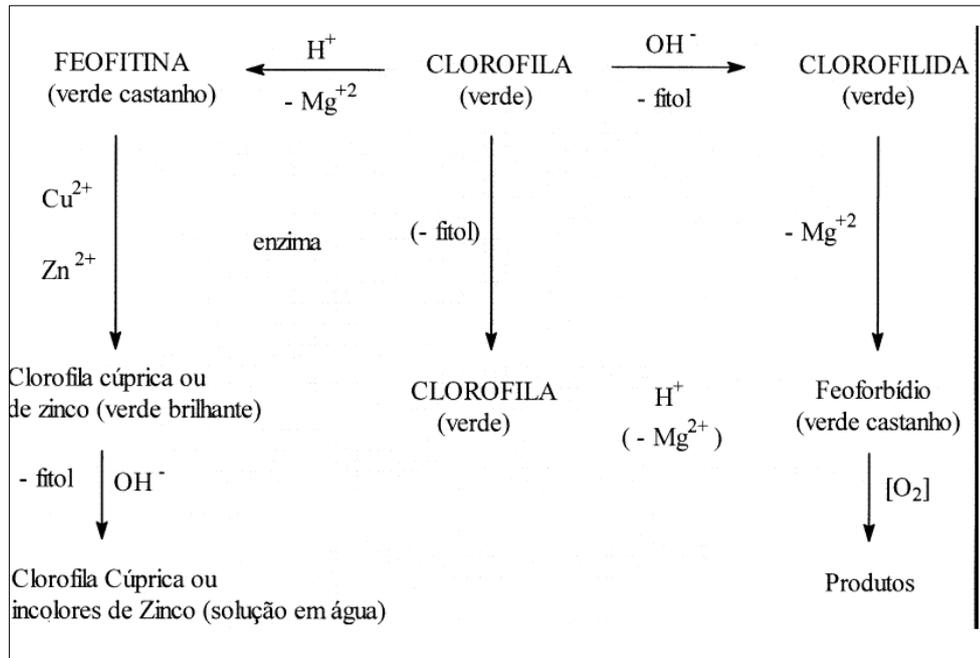


Figura 11. Productos de descomposición de la Clorofila (Streit et al., 2005)

La degradación de la clorofila inicia por factores externos, como el estrés hídrico, la luz, los cambios térmicos, el aumento de los niveles de etileno o una combinación de todos estos factores (Streit et al., 2005), y ocurre según dos mecanismos:

- Químicos: Genera productos libres de magnesio, feofitinas y feofórbidos. La acidez que se desarrolla en el medio, provoca que la digestión del zooplancton convierta la clorofila en feopigmentos siendo estos: feofitina, formada por la sustitución del ion Mg^{2+} por H^+ , y feoforbidos, que carecen tanto de magnesio como de la cadena fitol. En este último caso, la degradación de clorofilas a feoforbidas se ajusta a una reacción consecutiva, en la que las clorofilidas actúan como producto intermedio. En el caso de los carotenoides, por la misma razón, experimentan únicamente transformación aquellos componentes que por su estructura molecular son sensibles a la variación del pH (medio ácido) (Rosas Riedel., 2007).
- Enzimáticos: Los procesos de descomposición originados por las enzimas hidrolíticas del fitoplancton pueden convertir la clorofila en clorofilida. La enzima responsable es la clorofilasa (Gandul Rojas., 1992).

Debido a que la velocidad de reacción de la descomposición por feofitinización es la más alta, se considera el mecanismo más importante de degradación de la clorofila, y, por lo tanto, la feofitina el producto principal (Streit et al., 2005).

Una forma de evitar esta sobreestimación de la clorofila por la presencia de los productos de degradación es acidificando el extracto. Se basa en el cambio que se produce la absorbancia a 665nm al transformarse la clorofila en feopigmentos por acción de un ácido. Al acidificar el medio, incluso con ácidos débiles, el átomo de magnesio es liberado de la porfirina y es reemplazado por dos átomos de hidrógeno. Como



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

resultado la banda de absorción azul es cambiada ligeramente hacia la violeta, mientras que el espectro de absorción rojo cambia a longitudes de onda más largas y decrece casi en un 50%. De esta forma, se logra diferenciar entre clorofila a y los productos de degradación de los pigmentos libres de magnesio (Peña Prieto., 2005). A pesar de esto, la acidificación puede generar algunos inconvenientes como, para el caso que se emplee como solvente al metanol, la acidificación excesiva es muy difícil de controlar, por lo que en este caso no se recomienda. Por otro lado, cuando la acidificación es excesiva, puede ocurrir la ruptura de compuestos, como los epoxi-carotenos, los cuales, a su vez, se transforman en compuestos que absorben a longitudes de onda cercanos a 665-700 nm (región roja e infrarroja), introduciendo errores tanto en la lectura a 665nm, como en la corrección de turbidez a 750 nm (Madigan et al., 1978).

- Cuantificación/determinación de los pigmentos:

Para la cuantificación se pueden utilizar distintas técnicas: espectrofotométricas, fluorométricas, y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Los métodos cromatográficos permiten la cuantificación exacta de la clorofila y todos sus derivados (HPLC), sin embargo, este tipo de tecnología es de limitado acceso en laboratorios pequeños por sus altos costos. El método espectrofotométrico puede estar fuertemente sesgado por el estado fisiológico de la clorofila, pero es muy utilizado debido a que el equipo requerido se encuentra en cualquier laboratorio de análisis de agua. La fluorometría es más sensible que la espectrofotometría, requiere menos muestra y se puede utilizar para mediciones in vivo, sin embargo, estos métodos ópticos pueden subestimar o sobrestimar significativamente las concentraciones de clorofila α , en parte debido a la superposición de las bandas de absorción y fluorescencia de los pigmentos accesorios co-ocurrentes y productos de degradación de clorofila (Rivera et al., 2005).

En este informe se cuantifica el contenido de clorofila α empleando la técnica de espectrofotometría UV-visible, ya que permite agilizar el proceso de análisis y tiene una elevada eficacia en su medición. Este método asume que la clorofila a predomina, y las longitudes de onda que se seleccionan corresponden a puntos singulares de los espectros de absorción de los pigmentos puros. Normalmente, se trata de los máximos de absorción en la zona roja del espectro, región donde no hay interferencia por parte de los carotenos. Una vez que se tienen los extractos, la espectrofotometría proporciona de forma rápida la concentración de las distintas clorofilas, siendo necesario únicamente efectuar medidas de absorbancias a dos o tres longitudes de onda. La lectura se basa en medir la intensidad de luz que absorben estos pigmentos a una determinada longitud de onda (λ), que está directamente relacionada con la concentración de estos pigmentos en el extracto (Ley de Lambert-Bee) (Peña Prieto., 2005), mediante el uso de diferentes ecuaciones y coeficientes, las absorbancias se suman y se transforman en concentraciones pigmentarias de los diferentes pigmentos (clorofilas y carotenoides principalmente) (Rosas Riedel, 2007).

Las longitudes que se seleccionan corresponden a los puntos máximos de absorción de las clorofilas en la zona roja del espectro, región en la que no existe interferencia por parte de los carotenos. Para la lectura se sigue el método tricromático. Se fijan las longitudes de onda a 664, 647 y 630 nm correspondientes a las longitudes de absorción de las clorofilas α , b y c respectivamente. Adicionalmente, se realiza una lectura a 750nm a un blanco (solvente usado en la extracción) y a las muestras como una corrección de la turbidez. Cualquier diferencia de absorbancia entre el solvente de referencia y la muestra a esa longitud de onda, se toma como turbiedad y no debe ser superior a 0,005. Cabe señalar que los productos de degradación de la clorofila introducen errores en la cuantificación, ya que son indistinguibles espectrofotométricamente (Peña Prieto., 2005).

La ecuación utilizada en la cuantificación espectrofotométrica de clorofilas se encuentra estrechamente relacionada con la variedad de coeficientes determinados para una variedad de solventes, especialmente para acetona al 90%. En este caso, se emplea los coeficientes utilizados en la ecuación de Jeffrey y Humphrey, recomendada para muestras de fitoplancton que contienen clorofila c y son extraídas con acetona al 90%. Después de determinar la concentración del pigmento en el extracto, se calcula la cantidad de pigmento por unidad de volumen (Peña Prieto, 2005).



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Las ecuaciones tricromáticas a pesar de ser la más utilizadas, no son completamente útiles en la cuantificación de pigmentos en presencia de productos de degradación; teniendo como resultado sobreestimaciones de las clorofilas, es decir el valor que se obtenga será la suma de la clorofila α y de la clorofilida α (Peña Prieto, 2005).

4. METODOLOGÍA Y DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1- ÁREA DE ESTUDIO. MUESTREO. TÉCNICAS APLICADAS.

Las muestras fueron tomadas de las lagunas facultativas correspondientes a la planta de tratamiento de líquidos cloacales e industriales. Dichas lagunas corresponden al tratamiento secundario de la Planta en estudio.

Para desarrollar este trabajo, se toman 2 muestras de una laguna facultativa secundaria, durante los meses de julio y agosto del corriente año. Las muestras son extraídas a una profundidad de 10 cm por debajo de la superficie, en botellas plásticas boca ancha, de 3 litros. Se resguardan de la luz y refrigeran, hasta el comienzo de la determinación.

La determinación de clorofila se lleva a cabo en el Laboratorio de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María. En dicho laboratorio también se preparan las soluciones necesarias y se lleva a cabo la limpieza de los materiales para poder realizar el reporte de los resultados.

El método analítico aplicado para la extracción de clorofila es el correspondiente a la 10200 H Chlorophyll del Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed (SMWW), APHA, 2019. Este método sirve para determinar la clorofila a , b y c . Consiste básicamente en, recolectar una muestra de agua, filtrarla para eliminar las algas y concentrar los organismos clorofílicos, romper mecánicamente las células recolectadas y extraer la clorofila de las células rotas empleando un solvente orgánico. La facilidad con la que se eliminan las clorofilas de las células varía considerablemente con las diferentes algas. La determinación de clorofila α , se lleva a cabo empleando la técnica de espectrofotometría UV-visible, utilizando las conocidas propiedades ópticas de este pigmento fotosintético; bandas de absorción en el espectro visible en el entorno a la región del rojo (600-700 nm). Se aplica la ecuación de Jeffrey y Humphrey. Los resultados se evalúan con la aplicación del Software Excel. Finalmente, mediante el empleo de un microscopio Marca Carl Zeiss con cámara para Microscopia Digital. Modelo AxioCam 208 color, se observa e intenta determinar parte de la población de organismos clorofílicos presentes en las muestras de agua.

Además, se evalúan en el marco del Proyecto PID mencionado, otros parámetros de dichas muestras como pH, DBO₅, DQO, SDT, SDF y SDV a partir de “Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed”. los cuales se presentan en los Resultados.

4.2 – TÉCNICA ANALÍTICA. MATERIALES Y MÉTODOS. PROCEDIMIENTO ANALÍTICO.

Para la adaptación del protocolo se tuvo en cuenta lo descrito en el Método 10200 H. Chlorophyll “Standard Methods for examination of Water and Wastewater 23 Ed” donde se establecen el objeto, el alcance, algunas definiciones, principio del método, equipos, los reactivos necesarios para su desarrollo y el procedimiento, mismo que se tiene en cuenta para culminar el desarrollo experimental.

Para el procedimiento práctico, el SMWW divide la técnica en tres etapas:

- Etapa 1: Extracción de pigmentos
- Etapa 2: Determinación espectrofotométrica de clorofila
- Etapa 3: Cálculos



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

ETAPA 1: Extracción de pigmentos:

Equipos, materiales y reactivos:

Equipos:

- Equipo de Filtración: Portafiltro de policarbonato con reservorio 250 ml, Autoclavable. Marca: SARTORIUS STEDIM BIOTECH. Artículo:16510
- Bomba de diafragma MZ 1C. Marca: VACUUBRAND™. Modelo: 20724100
- Centrífuga de laboratorio. Marca GIUMELLI. Modelo: Z-29
- Heladera -20°C
- Heladera 4°C
- Balanza analítica

Materiales:

- Filtros de fibra de vidrio de 0,45 mm de porosidad, 47 mm de diámetro
- Tubos de centrífuga, graduados de 50 ml, con tapón de rosca.
- Probetas de 250 ml
- Pipetas de 10 ml
- Propipeta
- Pinza metálica
- Matraces aforados
- Papel aluminio
- Guantes

Reactivos:

- Carbonato de magnesio
- Acetona (grado reactivo BP 56°C)
- Agua destilada

Preparación de reactivos:

- Solución saturada de carbonato de magnesio: Agregar 1,0 g de MgCO₃ finamente pulverizado a 100 mL de agua destilada.
- Solución acuosa de acetona: Mezcle 90 partes de acetona (grado reactivo BP 56°C) con 10 partes de solución saturada de carbonato de magnesio.

Procedimiento de extracción:

- Agitar la muestra de agua en forma de 8
- Tomar 100 ml de la muestra
- Filtrar con filtros de vidrio en un ambiente oscuro y frío
- Retirar el filtro con ayuda de la pinza metálica, del equipo de filtración y colocarlo en un tubo de centrifuga cubierto con papel aluminio y tapa a rosca.
- Colocar el tubo, protegido de la luz, en heladera a -20°C durante 20 horas.
- Retirar el tubo y agregar 10 ml de solución acuosa de acetona. Agitar, para que el filtro quede embebido en la solución.
- Colocar el tubo con solución acuosa de acetona en heladera a 4°C por 24 horas.
- Retirar el tubo de la heladera y centrifugar durante 20 min a 500 g.
- Repetir el procedimiento para muestras de 50 ml, 25 ml y 15 ml.



ETAPA 2: Determinación espectrofotométrica de clorofila

Equipos, materiales y reactivos:

Equipos:

- Espectrofotómetro UV-Visible. Marca: Hach. Modelo: DR6000,

Materiales:

- Cubetas, con longitudes de paso óptico de 1cm.
- Pipetas de 0,1 y 5,0 ml

Reactivos:

- Solución acuosa de acetona

Procedimiento espectrofotométrico (método tricromático):

- Realizar una medida del blanco (solución acuosa de acetona) a las densidades ópticas (DO) de 750, 664, 647 y 630 nm.
- Transferir el extracto de clorofila a una cubeta de 1 cm y medir a las mismas DO que el blanco.

ETAPA 3: Cálculos

Las lecturas de densidad óptica a 664, 647 y 630 nm se utilizan para determinar la clorofila α , b y c , respectivamente. La lectura de OD a 750 nm es una corrección para la turbidez. Se debe restar esta lectura de cada uno de los valores de OD del pigmento de las otras longitudes de onda antes de usarlos en las ecuaciones de Jeffrey y Humphrey, de esta forma se elimina el efecto de la dispersión de la luz por las partículas en suspensión.

Mediante el empleo de las **ecuaciones 7, 8 y 9**, se calculan las concentraciones de clorofila α , b y c en el extracto, teniendo en cuenta las densidades ópticas corregidas:

$$C_a = 11,85 * DO(664) - 1,54 * DO(647) - 0,08 * DO(630) \quad \text{(Ecuación 7)}$$

$$C_b = 21,03 * DO(647) - 5,43 * DO(664) - 2,66 * DO(630) \quad \text{(Ecuación 8)}$$

$$C_c = 24,52 * DO(630) - 7,60 * DO(647) - 1,67 * DO(664) \quad \text{(Ecuación 9)}$$

Dónde:

C_a , C_b y C_c : Concentraciones de clorofila α , b y c , respectivamente, mg/L, y

$DO(664)$, $DO(647)$ y $DO(630)$: Densidades ópticas corregidas en las longitudes de onda respectivas.

Una vez determinadas las concentraciones de pigmento en el extracto, con el empleo de la **Ecuación 10**, se calcula la cantidad de pigmento por unidad de volumen de la siguiente manera:

$$\text{Chlorophyll } a = \frac{C_a * \text{Volumen extracto}}{\text{Volumen de muestra}} \quad \text{(Ecuación 10)}$$



4.3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.3.1- Determinación de clorofilas

A continuación, se presentan los pasos o etapas seguidas en el desarrollo de la técnica descripta. En la **Figura 12**, se observa una de las muestras de agua extraídas de la laguna facultativa evaluada.

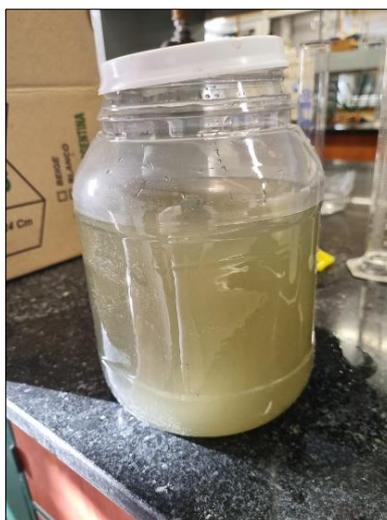


Figura 12. Muestra de agua tomada de la laguna facultativa en estudio.

Etapa 1: Extracción de pigmentos clorofílicos

Tabla 3. Descripción de las muestras analizadas.

Fecha muestreo	Denominación de la muestra	Volumen de filtración (ml)
01/08/2023	M0	15
01/08/2023	M1	25
01/08/2023	M2	50
08/08/2023	M3	100

En la **Tabla 3**, se observa la descripción de las muestras estudiadas. Una vez recolectadas, las muestras se conservan en frío (4°C) y se cubren con una bolsa plástica negra, para evitar la degradación de la clorofila por 24 horas. Todas las muestras se analizan por duplicado, pero al dar valores muy similares, se omiten los duplicados a fines prácticos.

Las muestras se concentran por filtración. Se utiliza un Portafiltro de policarbonato con reservorio de 250 ml, Autoclavable. Marca: SARTORIUS STEDIM BIOTECH. Artículo:16510, acoplado con una bomba de diafragma MZ 1C. Marca: VACUUBRAND™. Modelo: 20724100 y filtros de fibra de vidrio de 0,45 mm de porosidad, 47 mm de diámetro. El montaje del equipo de filtración se observa en la **Figura 13**.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.



Figura 13. Montaje del equipo de filtración

Una vez filtrados los volúmenes de muestras establecidos en la **Tabla 3**, se desmonta el equipo y con ayuda de una pinza metálica, se retiran los filtros del embudo, y se les extrae toda la humedad posible. En la **Figura 14**, se observa el desmontaje del equipo de filtración, y la concentración de clorofila en los filtros.

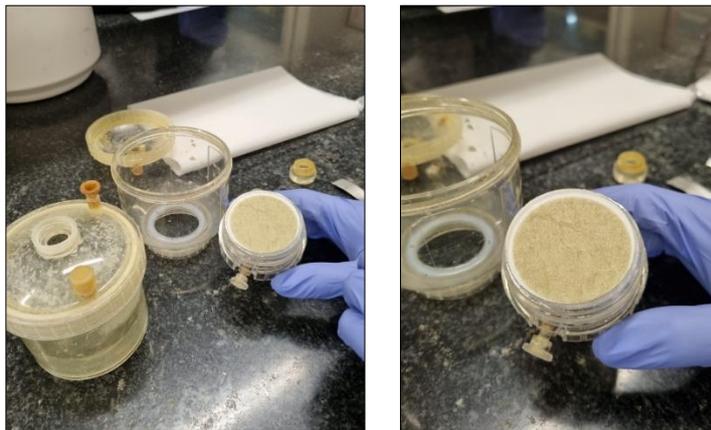


Figura 14. Desmontaje del equipo de filtración

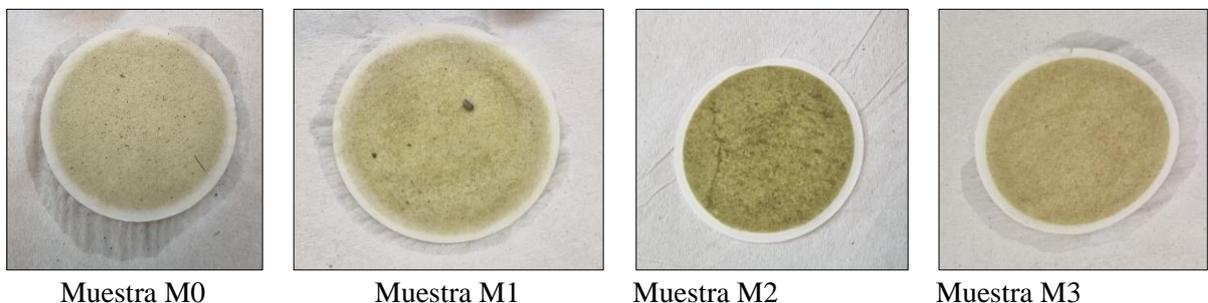


Figura 15. Concentración de Clorofila en cada una de las muestras en estudio

Para extraer la clorofila de las muestras, los filtros se pueden macerar con un mortero de mano, mediante ruptura del filtro, o congelar. En este caso, los filtros con el material retenido, se colocan en tubos Falcon de 50 ml, se cubren con papel aluminio para protegerlos de la exposición a la luz, y se congelan a -20°C por 20 horas, **Figura 16 a**). La congelación sirve para romper las células vegetales.



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Pasadas las 20 horas, se retiran los tubos del congelador, y para la posterior extracción de clorofila, se les adiciona 10 ml de la solución acuosa de acetona al 90%, se agitan los tubos para que el filtro quede embebido en la solución, **Figura 16 b)**, y se los deja reposar en heladera nuevamente, pero ahora a 4°C por 24 horas, siempre en oscuridad.

Se retiran las muestras de la heladera y, posteriormente se separa el extracto del precipitado. El SMWW propone dos técnicas para clarificar la muestra embebida en acetona, filtrando a través de un filtro desechable resistente a los solventes, o centrifugando. En este caso, las muestras se centrifugan. Se emplea una Centrífuga de laboratorio Marca GIUMELLI. Modelo: Z-29, y tubos fálcon graduados de 50 ml, con tapón de rosca. Todas las muestras se centrifugan durante 20 minutos a 500 g **Figura 16 c)**. Se deja decantar el extracto clarificado y se extrae para la determinación espectrofotométrica.

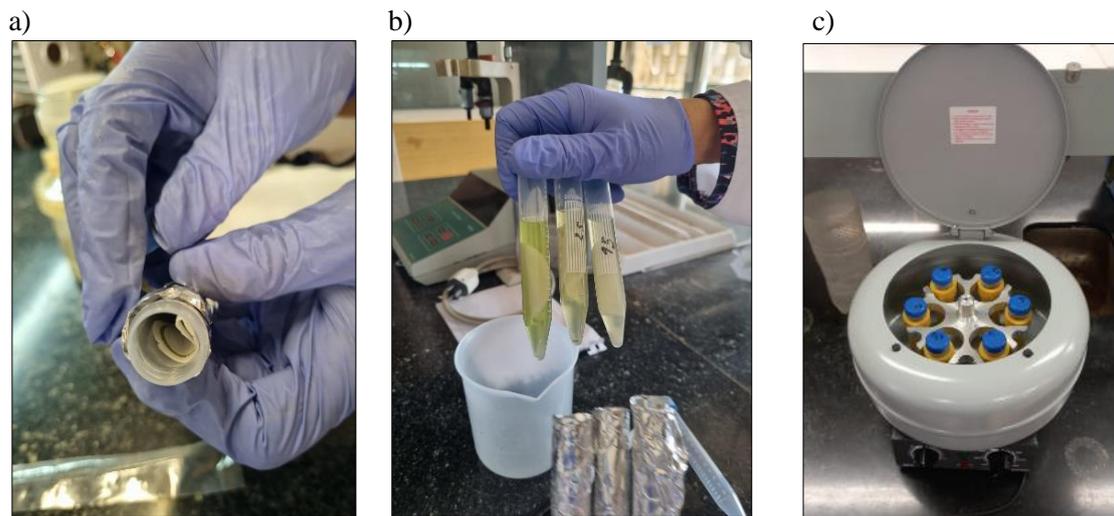


Figura 16. a) Congelación de los filtros con Clorofila. b) Adición de solución acuosa de acetona a las muestras. c) Centrifugación con Centrífuga de laboratorio Marca GIUMELLI. Modelo: Z-29

Etapa 2: Determinación espectrofotométrica

La determinación espectrofotométrica se lleva a cabo en un Espectrofotómetro UV-Visible. Marca: Hach. Modelo: DR6000 **Figura 17**. Primero se realiza una medición del blanco, para ello se emplea solución acuosa de acetona al 90%, previamente filtrada para evitar interferencia en el paso del haz de luz, y se miden las absorbancias a 750, 664, 647 y 630 nm. Seguidamente, ya filtrado el extracto, se miden las absorbancias de cada una de las muestras a las mismas longitudes de onda que el blanco, para ello, se transfiere el extracto a una cubeta de 1 cm. La lectura de OD a 750 nm es una corrección para la turbidez.

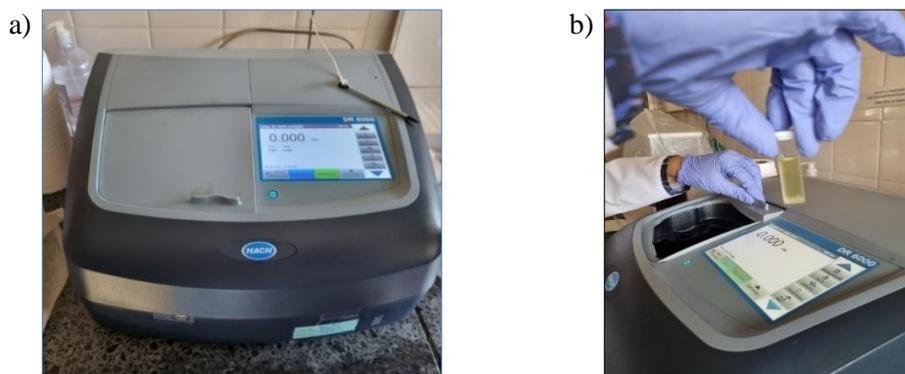


Figura 17. a) Espectrofotómetro UV-Visible. Marca: Hach. Modelo: DR6000. b) Medición por espectrofotometría.



Etapa 3: Cálculos.: Se observan en el apartado Resultados de medición de clorofilas 5.1

4.3.2 Observación *al microscopio* de muestras de la laguna facultativa.

La muestra se mantiene refrigerada a 4°C y protegida a la exposición de la luz. Se concentra por centrifugación (**Figura 18**) con Centrífuga de laboratorio Marca GIUMELLI. Modelo: Z-29, por 5min a 1000rpm.

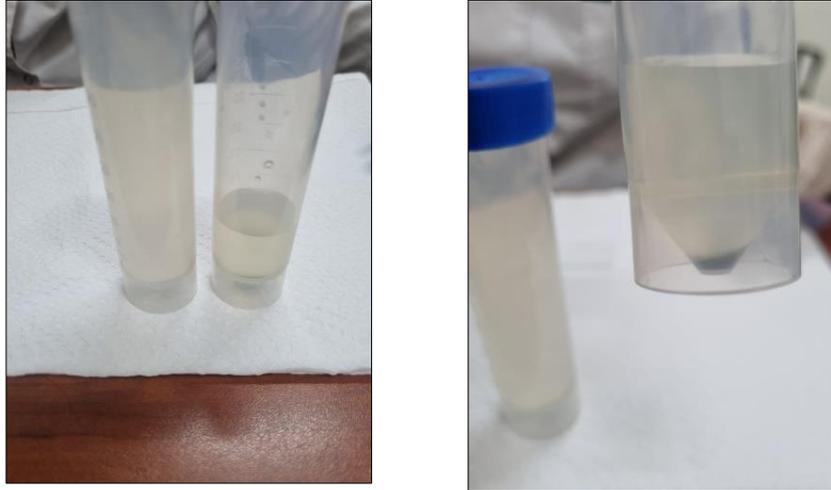


Figura 18: Concentración de la muestra

Se realiza la observación de las muestras de fitoplancton, para ello se utiliza un microscopio Marca Carl Zeiss con cámara para Microscopia Digital. Modelo AxioCam 208 color. Se realiza la preparación de la muestra de observación en el portaobjeto, **Figura 19**.



Figura 19: Preparación de la muestra en el portaobjeto



5- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1- RESULTADOS DE MEDICIÓN DE CLOROFILAS

En la **Tabla 4**, se observan las DO de cada una de las muestras, determinadas mediante espectrofotometría.

Tabla 4. DO determinadas por espectrofotometría

Muestra	DO en Absorbancia				
	λ (nm)	630	647	664	750
M0		0,042	0,060	0,148	0,022
M1		0,074	0,096	0,208	0,042
M2		0,171	0,220	0,415	0,125
M3		0,070	0,088	0,180	0,051

En la **Figura 20**, se trazan las curvas de longitudes de onda y absorbancias de cada una de las muestras estudiadas.

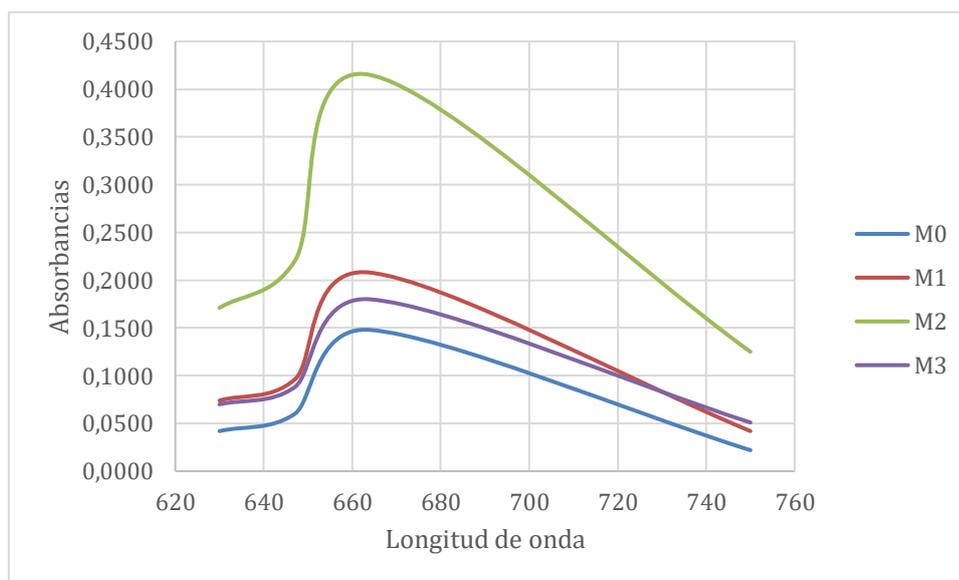


Figura 20. Grafica de resultados. Longitud de onda vs absorbancias.

La **Tabla 5**, contiene las concentraciones de clorofilas α , b y c calculadas para cada una de las muestras.

Tabla 5. Concentraciones de Clorofilas α , b y c .

Muestra Ref.	Volumen de filtración (ml)	Chl (a) mg/L	Chl (b) mg/L	Chl (c) mg/L
M0	15	1,432	0,062	-0,009
M1	25	1,881	0,149	0,097
M2	50	3,287	0,300	-0,078
M3	100	1,470	0,027	-0,031

A fines prácticos, los valores negativos no se tienen en cuenta.



Tabla 6. Cantidad de pigmento por unidad de volumen

Muestra Ref.	Volumen de filtración (ml)	Chl (a) mg/m ³	Chl (b) mg/m ³	Chl (c) mg/m ³
M0	15	955,32	41,173	-5,880
M1	25	752,55	59,648	64,680
M2	50	657,30	60,158	-15,676
M3	100	147,02	2,710	-3,0750

5.2 RESULTADOS DE OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA DE LAS MUESTRAS.

En la **Figura 21**, se presentan las imágenes obtenidas por microscopía.

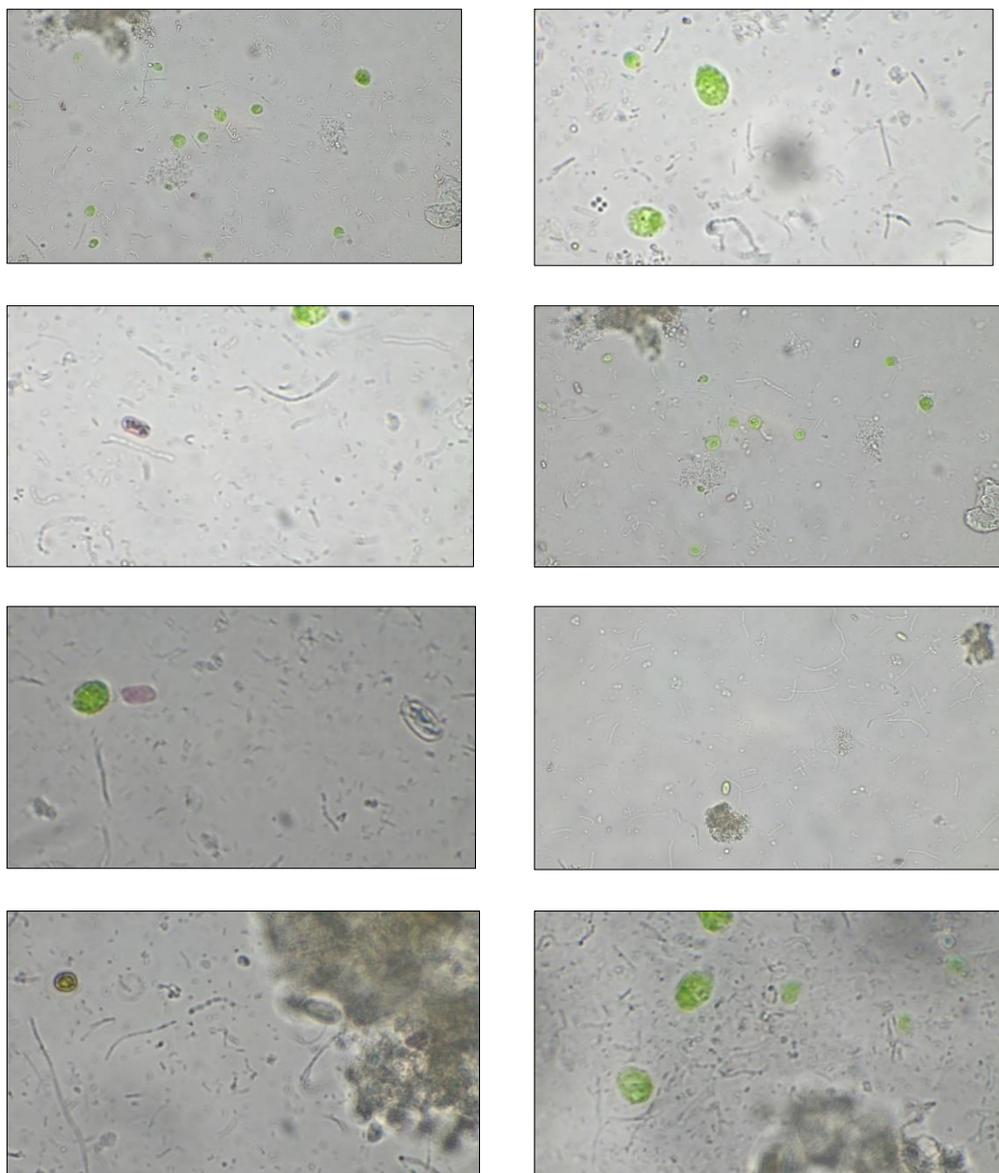


Figura 21: Observación de la muestra en el portaobjeto



En la **Figura 21**, se observan estructuras clorofílicas del tipo de la **Figura 22, Anexo I**.

5.3 OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD EVALUADOS A LAS MUESTRAS.

Se muestran a continuación en la Tabla 7, parámetros de medición complementarios, que se realizan en este proyecto.

Tabla 7. Caracterización del efluente

Parámetro	Unidad	Resultados	
		Julio	Agosto
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/l	460	545
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/l	275	206
pH a 20° C	UpH	7	7
Sólidos Disueltos Totales	mg/l	1000	1136
Sólidos Disueltos Fijos	mg/l	648	664
Sólidos Disueltos Volátiles	mg/l	352	472

5.4- DISCUSIÓN

Para la determinación de clorofila existe un gran número de factores que deben tenerse en cuenta, tales como, condiciones de almacenamiento de las muestras previas a analizar, solventes orgánicos a utilizar, duración y temperatura de la extracción, presencia y tipo de disrupción celular empleada, entre otros. Todo esto sumado a que las clorofilas son pigmentos inestables, por lo que factores ambientales como estrés hídrico, pH, luz reducida, cambios enzimáticos, temperatura, se debe tener precaución durante el todo el procesamiento, a fin de mantener la integridad de la molécula de clorofila. Todas las manipulaciones deben realizarse rápidamente y en un ambiente con poca luz, o en la oscuridad, para evitar el fotoblanqueo (Streit et al., 2005).

Los resultados obtenidos en la determinación de la clorofila α por el método de tricromático en muestras de agua de una laguna facultativa secundaria, indican que el sistema se clasifica como eutrófico por presentar concentraciones superiores a 15mg/m³. Según Curtis et al., 2003, el rango de concentración de clorofila α que proporciona el funcionamiento satisfactorio de las lagunas facultativas es de 1000 a 3000 mg/m³. En este informe, la mayor concentración reportada es de 955,32mg/m³, para la muestra M0, por lo que se puede inferir que laguna no se encuentra lo suficientemente eutrofizada. Las bajas concentraciones de clorofilas *b* y *c*, **Tablas 5 y 6**, se relacionan con la baja abundancia en la que se presentan estos pigmentos en las distintas clases de microorganismos (Peña Prieto, 2005).

En relación a los factores que afectan el método espectrofotométrico, se ha mencionado, que, en ambientes altamente enriquecidos y productivos, la clorofila α se puede sobrestimar al incluir fenopigmentos que absorben cerca de la misma longitud de onda. Este método asume que la clorofila α predomina, y las longitudes de onda que se seleccionan corresponden a puntos singulares de los espectros de absorción de los pigmentos puros. Una forma de desestimar estos pigmentos es mediante la acidificación del medio para corregir la concentración aparente de clorofila α para la feofitina a, sin embargo, puede ocurrir que cuando la acidificación es excesiva, se rompen compuestos, como los epoxi carotenos, los cuales a su vez, se transforman en compuestos que absorben a longitudes de onda cercanos a 665-700 nm (región roja e infrarroja), introduciendo errores tanto en la lectura a 665nm, como en la corrección de turbidez a 750 nm (Madigan et al., 1978). Por esta razón que el estudio de los pigmentos degradados y otros componentes orgánicos e inorgánicos, merece especial atención en futuras investigaciones con el fin de establecer el papel de tales sustancias en las determinaciones de la clorofila α . A pesar del cuestionado uso de la ecuación tricromática de Jeffrey y Humprey, por no considerar los derivados de la clorofila, la tendencia de los resultados espectrofotométricos obtenidos y representados en las **Tablas 5 y 6**, independientemente de la sobreestimación, son altamente coherentes con lo establecido para las lagunas facultativas (Rivera et al., 2005).



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

En la **Tabla 6**, se observa que las concentraciones de Clorofila α disminuyen ligeramente al filtrar un mayor volumen. Por la tendencia observada y siguiendo el razonamiento de (Bravo Inclán & Tomasini Ortiz., 2010), se asume que, se obtienen mejores resultados al filtrar un mayor volumen, ya que se obtienen concentraciones más bajas de feofitina, y, por lo tanto, menor interferencia en la determinación.

En la **Figura 12**, se observa que la muestra extraída de la laguna presenta una tonalidad verdosa, pudiéndose pensar que existen grandes cantidades de algas, sin embargo, según Hernández et al., 2011, dicha tonalidad puede deberse a la presencia de *Cianophytas*, este tipo de algas no presenta una cantidad apreciable de clorofila α como para ser detectado por el método tricromático, pero es capaz de producir un pigmento hidrosoluble denominado ficocianina, que tiene la particularidad de otorgar un color verdoso al agua donde se encuentra, lo que explica el color verdoso en la laguna en estudio.

En la **Figura 21**, se observan las curvas de longitudes de onda vs absorbancias de cada una de las muestras analizadas. Si a esas curvas se las compara con el espectro de absorción característico de la clorofila α de la **Figura 9**, se puede observar uno de los picos máximos de absorción (650-700 nm aproximadamente) (Geraldo Noriega & Guevara Lam., 2021).

Las poblaciones de algas verdes predominan en las lagunas durante el otoño, invierno y primavera. Generalmente, las especies predominantes en las lagunas facultativas pertenecen al género *Cianophytas*, seguido de las *Clorophytas* y por último las *Crisophytas*, aunque éstas últimas resultan en muy poca cantidad en comparación con los otros géneros. Según Curtis et al., 2003, las *Cianophytas* son las especies predominantes en las lagunas facultativas, principalmente la *Spirulina*. Esta especie posee filamentos que se mueven en el agua con un lento movimiento deslizante, aunque no se sabe cómo se produce este movimiento ya que ellas carecen de flagelos o de cualquier otro medio visible de locomoción, sin embargo, éstas suelen flotar acumulándose en la superficie y en las esquinas de la laguna de acuerdo a la dirección del viento. Además, se sabe que las algas verdes móviles, tales como *Chlamydomonas* y *Euglena*, suelen ser dominantes en lagunas en las que la penetración de luz es limitada, situación corriente en la mayoría de las lagunas facultativas (Guamán Bumeo et al., 2016). Debido a que la observación al microscopio, es una tarea laboriosa y requiere especialistas en taxonomía y microscopía, a fines prácticos, solo se pudo visualizar la presencia de organismos clorofílicos y algas presentes en la muestra, sin poder ser identificados.

Los parámetros físicos y químicos como temperatura, pH, DBO, DQO y sólidos disueltos, deben ser uniformes durante un período de tiempo largo, debido a que las algas necesitan condiciones estables para su crecimiento (Metcalf & Eddy., 1991). Durante las estaciones de muestreo estudiadas (otoño – primavera), según Marín et al., 2022, se asume que las temperaturas presentes en la laguna se mantuvieron por debajo del promedio de 21,07 °C, entre 11,1°C y 19,6°C, encontrándose en el rango óptimo para el desarrollo de las bacterias y organismos psicrofílicos.

Los criterios de protección a la vida acuática fijan la variable pH entre 6 y 9. El pH tiene influencia en diversos equilibrios químicos que ocurren naturalmente durante el tratamiento de aguas. En los ecosistemas acuáticos, posee efectos directos sobre la fisiología de diversas especies, e indirectos en relación a la precipitación de elementos químicos tóxicos con metales pesados. También puede ejercer algún efecto en las salubridades de los nutrientes (Bonansea et al., 2012). El pH de las muestras se mantuvo en la neutralidad, indicando producción de CO₂, por lo que la laguna se encuentra en correcto funcionamiento, es decir, no existen efectos tóxicos o inhibitorios de crecimiento de los microorganismos presentes en ella (Peña Prieto., 2005).

La **Tabla 7** muestra la carga orgánica efluente, en términos de DBO y DQO. Las relaciones DQO/DBO arrojaron valores de 1,67 y 2,64, con un promedio de 2,15, lo que sugiere que las aguas residuales reciben efluentes que no afectan la biodegradabilidad de la materia orgánica al hacer que la relación DQO/DBO adquiera valores inferiores a 2,5 (Metcalf & Eddy., 1991). Otra consideración a tener en cuenta, es que cuando la carga orgánica es muy grande, la DBO excede la producción de oxígeno de las algas, y la laguna se torna totalmente anaerobia. A la hora de diseño, conviene que las lagunas de estabilización trabajen bajo condiciones definitivamente facultativas o definitivamente anaerobias, ya que el oxígeno es un tóxico para las bacterias anaerobias que realizan el proceso de degradación de la materia orgánica; y la falta de



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

oxígeno hace que desaparezcan las bacterias aerobias que realizan este proceso. Por consiguiente, se recomienda diseñar lagunas facultativas para cargas orgánicas menores a 300Kg DBO/ha/día y lagunas anaerobias para cargas orgánicas mayores a 1000Kg DBO/ha/día. Cuando la carga orgánica se encuentra entre los límites antes mencionados, se pueden presentar problemas como, malos olores o bacterias formadoras de sulfuros. En la **Tabla 7**, para ambas muestras se observan valores de DBO acordes a lo establecido para una laguna facultativa.

Finalmente, las concentraciones de los sólidos disueltos totales (SD), sólidos disueltos fijos (SDF) y de los sólidos disueltos volátiles (SDV) fueron los últimos parámetros tenidos en cuenta. Los elevados promedios arrojan valores de 1068, 656 y 412 mg/l, respectivamente, evidenciando una alta concentración de iones disueltos, lo cual indica una alta mineralización. Sin embargo, tal comportamiento puede corresponder a mediciones puntuales, que no reflejan el comportamiento de la laguna, esto puede refutarse teniendo en cuenta el parámetro de conductividad en conjunto (Peña Prieto., 2005).



6- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la determinación de la clorofila α por el método de tricromático, en muestras obtenidas de la laguna facultativa secundaria, indican que el sistema se clasifica como eutrófico. Los valores determinados se encuentran por debajo del rango óptimo de funcionamiento satisfactorio, razón por lo cual se concluye que la laguna no se encuentra lo suficientemente eutrofizada, a pesar de ello, presenta una tonalidad verdosa siendo uno de los signos de buen funcionamiento en las lagunas facultativas debido a la presencia de algas.

A pesar del gran número de factores que influyen en la determinación de Clorofila α , y, debido a que las clorofilas son pigmentos inestables, se logró poner a punto la técnica de determinación de Clorofila según el método de referencia 10200 H. Chlorophyll del "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater 23 Ed y, los resultados obtenidos son altamente coherentes con lo establecido para las lagunas facultativas.

La mayor concentración de clorofila α determinada en muestras extrahidas de una laguna facultativa de tratamiento de aguas residuales, arrojó un valor de $955,32\text{mg/m}^3$.

El sistema se clasifica como eutrófico por presentar concentraciones de clorofila α superiores a 15mg/m^3 .

Con respecto a la observación al microscopio, se visualiza la presencia de organismos clorofílicos y algas presentes en la muestra, aunque para determinar con precisión el tipo y especie a los que pertenecen, se requiere de especialistas en taxonomía y microscopía. A fines prácticos solo es una estimación que permite corroborar lo mencionado en otras investigaciones.

Los parámetros físicos, químicos y biológicos medidos como indicadores de calidad y contaminación, tales como temperatura, pH, DBO, DQO, y sólidos, durante el periodo de muestreo, se encuentran dentro de los rangos estándares acordes a lo establecido a las lagunas facultativas. La temperatura registrada indica el rango óptimo para el desarrollo de bacterias y organismos psicrófilos. El pH se mantiene en la neutralidad. Los valores de DBO y DQO, al igual que las relaciones DQO/DBO, sugieren que las aguas residuales reciben efluentes que no afectan la biodegradabilidad de la materia orgánica. Por último, los sólidos evidencian una alta concentración de iones disueltos, lo cual indica una alta mineralización.



7- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

APHA, AWWA, WEF, (2019) Standard Methods For The Examination Of Water And Wastewater (SMWW) Ed. 23th.

Metcalf & Eddy., 1991. "Wastewater Engineering: Treatment, Disposal And Reuse". 3^{ra} ed.

Castrillon Usuga., 2022 "Determinación por método espectrofotométrico y tratamiento bioquímico de Clorofila α en laboratorio ambiental de CORNARE" <https://bibliotecadigital.udea.edu.co>

Kumar Patel et al., 2022. "Algae as an emerging source of bioactive pigments" <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.126910>

Duppeta et al., 2017. "Rapid assessment of algal biomass and pigment contents using diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics". <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.016>

Rivera et al., 2005. "Comparación de la estimación de la clorofila-a mediante los métodos espectrofotométrico y fluorométrico" ISSN 0120-548X. Acta biol.Colomb. vol.10 n°2

Guamán Bumeo et al., 2016. "Catálogo de microalgas y cianobacterias de agua dulce del Ecuador".

Manrique Reol., 2003 "Los pigmentos fotosintéticos, algo más que la captación de luz para la fotosíntesis" <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012108>

Yupanqui Poma et al., 2012 "Determinación de Clorofila α , y ensayos fisicoquímicos en aguas del lago Titicaca" Repositorio Institucional. Universidad Mayor de San Andrés.

Calsin Maihuire et al., 2022. "CLOROFILA. Química Inorgánica" Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa

Bonanse et al., 2012. "Concentración de Clorofila- α y límite de zona fótica en el embalse Río Tercero (Argentina) utilizando imágenes del satélite CBERS-2B". <http://dx.doi.org/10.4136/ambi-agua.847>

Streit et al., 2005 "As Clorofilas" <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>

Estruch Benito., 2010. "Análisis de la Clorofila α en el agua a partir de una imagen multiespectral Quickbird en la zona costera de Gandia" <http://hdl.handle.net/10251/9176>

Hernández et al., 2011. "Relación entre la determinación del pigmento Clorofila α y el Biovolumen geométrico algal en un lago de planicie de inundación" <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=43021583015>

Dreckmann et al., 2013. "Manual de prácticas de laboratorio. Biología de las algas" Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/>

Oliva Martínez et al., 2014. "Biodiversity of inland 39 iste phytoplankton in Mexico" <http://dx.doi.org/10.7550/rmb.32706>

Geraldo Noriega & Guevara Lam., 2021. "Extracción y determinación de pigmentos fotosintéticos" <http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.15408.28161>

Rosas Riedel., 2007. "Pigmentos fotosintéticos en la columna de agua determinados mediante técnicas espectroscópicas y cromatográficas (HPLC-RP): Variabilidad espacio-temporal y efectos de radiación uv". Universidad Austral de Chile. <http://cybertesis.uach.cl/>



EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.

Gandul Rojas., 1992. “Degradación de Clorofilas y Carotenoides durante la elaboración de aceitunas verdes de mesa” <https://dialnet.unirioja.es>

Matsumoto & Sánchez Ortiz., 2010. “Eficiencia del tratamiento de aguas residuales por lagunas facultativas e implicaciones en la salud pública” On-line 40istema ISSN 2389-7066 Univ. Salud vol.12 n°.1

Madigan et al., 1978. “Brock. Biología de los microorganismos” 14^{ta} ed.

Marín et al., 2022. “Eficiencia del tratamiento de aguas residuales por lagunas facultativas secundarias. Evaluación estacional”. <http://www.frvn.utn.edu.ar> PROIMCA – PRODECA 2022

Caldera et al., 2013. “Distribución de la concentración de clorofila a en laguna facultativa para tratamiento de aguas residuales”

Curtis et al., 2003. “Light penetration in waste stabilization ponds”. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90188-0](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90188-0)

Bravo Inclán & Tomasini Ortiz., 2010. “Experiencias en la determinación de Clorofila *a* y Feopigmentos por Espectrofotometría”. 3er Congreso Nacional AMICA. Villahermosa Tabasco.

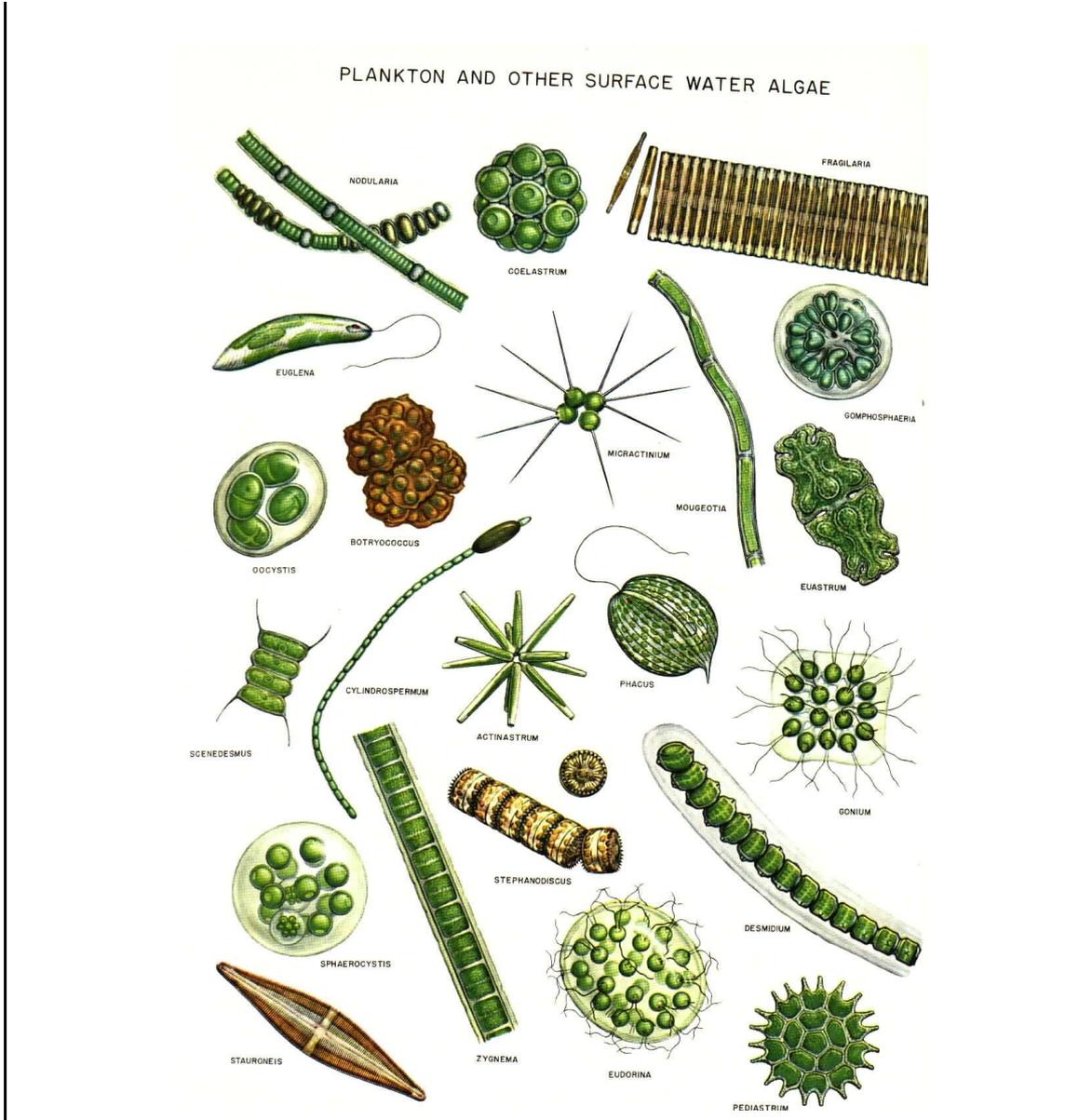
Correa Restrepo., 2008. “Evaluación y monitoreo del 40 istema de lagunas de Estabilización del Municipio de Santa Fé de Antioquia, Colombia. <https://bibliotecadigital.udea.edu.co/>

Peña Prieto., 2005. “Cuantificación espacio-temporal de la comunidad fitoplactónica y los pigmentos fotosintéticos en el lago de Tota- Boyacá, Colombia”.



ANEXO I

IMÁGENES EJEMPLOS DE CRISOFITAS, ALGAS VERDES, ALGAS ROJAS Y DIATOMEAS





EVALUACIÓN DE CLOROFILA α EN LAGUNA FACULTATIVA PARA TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.



Figura 22. Estructuras clorofílicas: Crisofitas, Algas Verdes, Algas Rojas Y Diatomeas