

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 005-2018/UCSS/FIA

Siendo las 10:00 am. horas, del día 07 de abril de 2018, en la Biblioteca ubicada en el local central - Universidad Católica Sedes Sapientiae - Lima, los miembros del Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|--|-----------------|
| 1. Ing. Quím. Julián Alberto Álvarez Paredes | Presidente |
| 2. Blga. Monica Velásquez Espinoza | Primer Miembro |
| 3. Ing. Amb. Mabel Teodora Borda Olivas | Segundo Miembro |
| 4. Blga. Heidi Isabel Sánchez Torres | Asesora |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada: "EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEPURADORA DE *Chlorella vulgaris* Beyerinck INMOVILIZADA EN ALGINATO PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA CIUDAD DE HUAURA-LIMA"; que presenta el bachiller en Ciencias Ambientales, el Sr. **Juan Enrique Tante Valderrama**, cumpliendo así con los requerimientos exigidos en el reglamento para la modalidad de titulación; la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

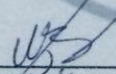
Terminada la sustentación, el Jurado luego de deliberar, acuerda:

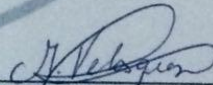
APROBAR

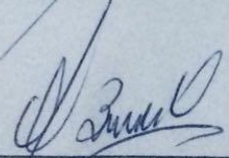
DESAPROBAR


La tesis, con el calificativo de... **MUY BUENA**... y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare EXPEDITA para conferirle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Firmado en Lima, 07 de abril de 2018.


Ing. Quím. Julián Alberto Álvarez Paredes
PRESIDENTE


Blga. Monica Velásquez Espinoza
1° MIEMBRO


Ing. Amb. Mabel Teodora Borda Olivas
2° MIEMBRO


Blga. Heidi Isabel Sánchez Torres
ASESORA

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL



TESIS DE INVESTIGACIÓN

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DEPURADORA DE
Chlorella vulgaris Beyerinck INMOVILIZADA EN ALGINATO
PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA
CIUDAD DE HUAURA-LIMA”**

EJECUTOR:

Bach. JUAN ENRIQUE TANTTE VALDERRAMA

ASESORA:

Mg. HEIDI ISABEL SÁNCHEZ TORRES

HUACHO – PERÚ

2018

DEDICATORIA

A mis padres, hermanos,
a mis familiares, amigos y mejores amigos
también a todas aquellas personas que me apoyaron
incondicionalmente y creyeron en mí.

AGRADECIMIENTOS

Quiero empezar agradeciendo en primer lugar a mis padres Luis Alberto Tante Marsano y Ada Valderrama Camacho, quienes han aguantado mis caprichos y me han brindado todo su apoyo desde un inicio, haciendo posible que acabe mi carrera y esta tesis.

Agradezco a mi hermana Brenda Tante Valderrama quien me apoyo y ayudo más de lo que ella cree, también a mis hermanos Luis Augusto y Bruno Francisco Tante Valderrama el cual con su apoyo anímico me permitió seguir adelante.

Gracias también a mi Tía Blanca Tante Marsano y mi primo Giampier Roman Tante, quienes me ayudaron y apoyaron mucho durante toda mi carrera y la realización de esta tesis.

Quiero dar mi más sincero agradecimiento a mi asesora de tesis, la Mg. Heidi Isabel Sánchez Torres, por su apoyo y paciencia durante los ciclos que me enseñó y también durante la realización de esta tesis, quiero agradecer al Blgo. Armando Chiclla Salazar, por sus conocimientos brindados y apoyo en esta tesis, y a ambos agradecerles por esa amistad incondicional.

Agradezco también a Alvaro Gonzales Bisso gran amigo y colega, agradecer a su familia por brindarme su amistad y acogerme en su hogar, hicieron que me sienta cómodo mientras estuve lejos de mi familia.

Asimismo agradezco a los profesores que me brindaron sus conocimientos a lo largo de la carrera, gracias a mis amigos quienes me brindaron su amistad incondicional y apoyaron de una u otra forma.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CARÁTULA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE APÉNDICES	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	xiii
CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.1. REVISIÓN DE LITERATURA	1
1.2. BASES TEÓRICAS	6
1.2.1. Microalgas	6
1.2.1.1. Características generales	6
1.2.1.2. Metabolismo Algal	6
1.2.2. Sistemas de cultivo de microalgas	8
1.2.2.1. Factores para el crecimiento de microalgas en cultivo	8
1.2.2.2. Luz	8
1.2.2.3. Nutrientes	9
1.2.2.4. pH	9
1.2.2.5. Oxígeno	10
1.2.2.6. Agitación	11
1.2.2.7. Temperatura	11
1.2.3. Características generales de <i>Chlorella vulgaris</i>	11
1.2.3.1. Descripción morfológica y taxonómica	11

1.2.3.2. Componentes celulares	12
1.2.3.3. Reproducción	14
1.2.3.4. Composición primaria	15
1.2.4. Detoxificación de metales pesados	23
1.2.5 Alginato	24
1.2.6 Inmovilización	25
1.2.7 Aguas residuales domésticas	26
1.2.7.1. Clasificación	26
a) Aguas residuales domésticas	26
b) Aguas residuales industriales	26
c) Aguas residuales municipales	27
1.2.8. Cuenca del río Huaura	27
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACION	28
2.1.1. Área de estudio	28
2.1.2. Descripción del experimento	29
2.1.2.1. Cultivo y obtención de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i>	29
2.1.2.2. Cinética de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> .	30
2.1.2.3. Construcción de los fotobiorreactores	32
2.1.2.4. Toma de muestras de aguas residuales del río Huaura	34
2.1.2.5. Caracterización del agua residual	35
2.1.2.6. Medición de pH <i>in situ</i> del agua del río Huaura	36
2.1.2.7. Medición de la conductividad y temperatura	37
2.1.2.8. Preparación de los efluentes	37
2.1.2.9. Inmovilización de las microalgas	37
2.1.2.10. Medición de nitrógeno, fósforo y plomo	40
2.1.3. Tratamientos	41
2.1.4. Unidades experimentales	43
2.1.5. Análisis estadístico	43
2.2. MATERIALES	44
2.2.1. Material biológico	44

2.2.2. Materiales de laboratorio	44
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
3.1. RESULTADOS	46
3.1.1. Obtención de biomasa de la microalga	46
3.1.2. Crecimiento de <i>Chlorella Vulgaris</i> en el medio hidropónico	46
3.1.3. Caracterización fisicoquímica del agua residual del río Huaura	47
3.1.4. Variación de la concentración de plomo	48
3.1.5. Variación de la concentración de nitrógeno total (NT)	50
3.1.6. Variación de la concentración de fósforo total (PT)	52
3.1.7. Remoción de plomo por parte de la microalga inmovilizada <i>C. vulgaris</i>	54
3.1.8. Remoción de NT por parte de la microalga inmovilizada <i>C. vulgaris</i>	56
3.1.9. Remoción de PT por parte de la microalga inmovilizada <i>C. vulgaris</i>	58
3.2. DISCUSIÓN	60
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	64
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
TERMINOLOGÍA	74
APÉNDICES	76

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Taxonomía del Chlorella vulgaris</i>	12
Tabla 2. <i>Composición de azúcares simples de la pared celular.</i>	18
Tabla 3. <i>Pigmentos potenciales contenidos en C. vulgaris</i>	20
Tabla 4. <i>Perfil de minerales de Chlorella vulgaris</i>	22
Tabla 5. <i>Perfil de vitaminas en Chlorella vulgaris</i>	22
Tabla 6. <i>Tratamientos experimentales</i>	41
Tabla 7. <i>Concentración de contaminantes por tratamiento</i>	42
Tabla 8. <i>Parámetros cinéticos de crecimiento</i>	46
Tabla 9. <i>Resultados fisicoquímicos</i>	48
Tabla 10. <i>Variación en la concentración de plomo en los tratamientos</i>	50
Tabla 11. <i>Variación en la concentración de nitrógeno en los tratamientos</i>	51
Tabla 12. <i>Variación en la concentración de fósforo en los tratamientos</i>	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Esquema de la ultraestructura de <i>C. vulgaris</i> mostrando sus diferentes orgánulos	14
Figura 2. Fase de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	15
Figura 3. Mecanismo general de detoxificación de metales mediado por metalotioneínas de clase III	24
Figura 4. Ubicación de la toma de muestra en el río Huaura a la altura del puente Huaura.	29
Figura 5. A: Inoculación de la cepa de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> al medio con solución hidropónica. B: Cepa ya inoculada en los frascos Erlenmeyer.	30
Figura 6. A: conteo de microalgas con la cámara de Neubauer en el día cero con una concentración de 7×10^5 . B: conteo de microalgas con la cámara de Neubauer en el día 14 con una concentración de 1×10^7 .	32
Figura 7. Componentes del fotobiorreactor, la estructura está formada por PVC, en su interior se encuentran luces led resistentes al agua con la manguera conectada a una bomba de que suministra aire continuamente.	33
Figura 8. Fotobiorreactor trabajando fase de prueba en la depuración de aguas residuales.	34
Figura 9. Potenciómetro midiendo el pH del agua residual recolectada del Río Huaura.	36
Figura 10. Homogenización de la mezcla de alginato de sodio en presencia de calor	38
Figura 11. A: Preparación del alginato de sodio al 4%. B: El beaker con el alginato de sodio enfriándose a temperatura ambiente, la probeta contiene microalgas de <i>C. vulgaris</i> en una concentración de 1×10^7	38

Figura 12. Procedimiento para la obtención de células de <i>C. vulgaris</i> inmovilizadas en esferas de alginato de sodio.	39
Figura 13. Microalgas inmovilizadas en esferas de alginato post enjuague con agua destilada para quitar trazas de coluro de calcio.	39
Figura 14. Fotómetro mostrando resultados de parámetros tomados del Río Huaura el día 11-10-16 A.1: resultado de Pb (plomo), A.2 resultado de N (Nitrógeno), A.3: resultado de P (Fósforo).	40
Figura 15. Fotobiorreactores encendidos. De izquierda a derecha T1, T2, T3, T4 y T Control.	42
Figura 16. Unidades experimentales.	43
Figura 17. Replicación de la biomasa microalgal.	44
Figura 18. Curva de crecimiento de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> mostrando la ecuación de la curva	47
Figura 19. Concentración de Plomo en los tratamientos	50
Figura 20. Concentración de Nitrógeno en los tratamientos.	52
Figura 21. Concentración de Fósforo en los tratamientos.	54
Figura 22. Porcentaje de remoción de Plomo	56
Figura 23. Porcentaje de remoción de Nitrógeno	58
Figura 24. Porcentaje de remoción de Fósforo	59

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
APÉNDICE 1. FÓRMULA PARA EL CÁLCULO DE PARÁMETROS DE REMOCIÓN DE N-NO₃ Y PO₄³⁻	76
APÉNDICE 2. FÓRMULA PARA EL CONTEO MICROALGAL	76
APÉNDICE 3. PRUEBA DE TUKEY PARA LA CONCENTRACIÓN DE Pb	77
APÉNDICE 4. ANOVA DE UN FACTOR PARA Pb	79
APÉNDICE 5. PRUEBA DE TUKEY PARA LA CONCENTRACIÓN (NT)	80
APÉNDICE 6. ANOVA DE UN FACTOR PARA (NT)	82
APÉNDICE 7. PRUEBA DE TUKEY PARA LA CONCENTRACIÓN (PT)	83
APÉNDICE 8. ANOVA DE UN FACTOR PARA (PT)	85
APÉNDICE 9. PRUEBA DE TUKEY PARA REMOCION DE Pb	86
APÉNDICE 10. PRUEBA DE TUKEY PARA REMOCION DE NT	88
APÉNDICE 11. PRUEBA DE TUKEY PARA REMOCION DE PT	90
APÉNDICE 12. CONTEO MICROALGAL DESDE EL DÍA 0 AL 15	92
APÉNDICE 13. TABLA DE ECA PARA AGUAS	93
APÉNDICE 14. MAPA DE LA CUENCA DEL RÍO HUAURA	94
APÉNDICE 15. COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN HIDROPÓNICA	95
APÉNDICE 16. REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA INVESTIGACIÓN	96

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de depurar el nitrógeno, fósforo y plomo de aguas residuales domésticas de la ciudad de Huaura, mediante la aplicación de la microalga *Chlorella vulgaris* Beyerinck inmovilizada en esferas de alginato. Se replicó la cepa de *Chlorella vulgaris* haciendo conteos diarios mediante la cámara de Neubauer hasta llegar a una concentración de $1,4 \times 10^7$ cel/ml, para posteriormente inmovilizarla en alginato de sodio. Se empleó fotobiorreactores de luz interna con aireación constante. La capacidad de remoción se evaluó durante 30 días, tomando muestras cada semana y analizando los niveles de nutrientes (fósforo y nitrógeno), así como los niveles de plomo mediante espectrofotometría. El experimento contó con 15 unidades experimentales para un control y cuatro tratamientos con distintas concentraciones de nutrientes y plomo. El tratamiento 2 fue el que tuvo mayor porcentaje de remoción de plomo y fósforo, con un 66 y 75 por ciento respectivamente, en cuanto al nitrógeno, todos los tratamientos removieron el nitrógeno dejándolo en una concentración menor a 0,5mg/l. El mayor porcentaje de depuración se dio entre la primera y segunda semana.

Palabras clave: microalgas, remoción, inmovilización, aguas residuales.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the capacity of purifying the nitrogen, phosphorus and plumb of waste water from the city of Huaura, by applying the microalga *Chlorella vulgaris* immobilized on alginate spheres. The strain of *Chlorella vulgaris* was replicated, counting daily through the Neubauer chamber until reaching a concentration of $1,4 \times 10^7$ cel/ml, to later immobilize it in sodium alginate. Internal light photobioreactors were used with constant aeration. The removal capacity was evaluated for 30 days, taking samples every week and analyzing nutrient levels (phosphorus and nitrogen) as well as plumb levels by spectrophotometry. The experiment had 15 experimental units for one control and four treatments with different concentrations of nutrients and plumb. Treatment two had the highest percentage of removal of plumb and phosphorus, with 66 and 75 percent respectively, about the nitrogen, all treatments removed the nitrogen, leaving it in a concentration smaller than 0,5mg / L. The highest percentage of clearance was between the first and second week.

Key words: microalgae, removal, immobilization, wastewaters.

INTRODUCCIÓN

La contaminación de los ríos es la problemática más antigua de contaminación ambiental, causada por el incremento de las actividades industriales que generan aguas residuales y tienen una gran repercusión cuando son vertidos a los ecosistemas acuáticos, debido mayormente a los metales pesados y una alta carga de nutrientes que generan procesos de eutrofización y posteriormente la pérdida del ecosistema.

La composición compleja de los efluentes obliga a desarrollar tecnologías novedosas para su tratamiento, como para mitigar la eutrofización que se da por enriquecimiento de nutrientes (nitrógeno y fósforo) y la eliminación de sustancias tóxicas como los metales pesados, mediante el uso de sistemas basados en membranas, los que han sido ampliamente estudiados debido a que tienen ventajas muy positivas respecto a los métodos tradicionales (Pellon et al., 2003).

A diferencia de los procesos físicos y químicos que resultan ser onerosos, el empleo de procesos con biomasa surge como alternativa económica y amigable con el ambiente. La biotecnología ambiental mediante la aplicación de la biorremediación algal permite el tratamiento de efluentes contaminados, las investigaciones acerca de este tipo de tratamiento biológico han evidenciado que resultan eficientes en la eliminación o biotransformación de los contaminantes.

Las algas como organismos fotosintetizadores, capturan contaminantes orgánicos, además algunos minerales en bajas concentraciones, mediante el uso de algunas de sus rutas metabólicas. Asimismo, tienen la capacidad de concentrar y acumular grandes cantidades de los

contaminantes en distintas estructuras citoplasmáticas, sin que esto llegue a ocasionarles algún efecto tóxico (Pellon et al., 2003).

La microalga *Chlorella vulgaris* tiene un gran potencial aplicado a la salud, alimentación, biocombustibles y biorremediación (Santos, Gonzales y Martín, 2014). Una de las características más resaltantes de esta microalga es su alta tasa y velocidad de crecimiento en un periodo de tiempo corto, resultando una alternativa atractiva para la obtención de biomasa, nutrientes y de captación de iones metálicos de las aguas residuales (Infante et al., 2012).

El objetivo de la presente investigación es evaluar la capacidad depuradora de la microalga *Chlorella vulgaris* en el tratamiento de aguas residuales domésticas vertidas al Río Huaura.

Objetivos específicos

- Cultivar y obtener biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Inmovilizar la cepa de la microalga *Chlorella vulgaris* en esferas de alginato de sodio.
- Caracterizar fisicoquímicamente el agua residual de la ciudad de Huaura.
- Determinar la remoción de fósforo y nitrógeno en el agua residual proveniente del río Huaura luego del tratamiento por *Chlorella vulgaris* inmovilizada.
- Determinar la remoción de plomo en el agua residual proveniente del río Huaura luego del tratamiento por *Chlorella vulgaris* inmovilizada.

CAPÍTULO I: REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Álvarez y Gallardo (1989) se evaluó la dinámica temporal de las comunidades de algas y la competencia entre especies, para lo cual se utilizó agua obtenida de un tratamiento biológico secundario con lodos activos, donde se inoculó un cultivo mixto de *Chlorella saccharophila* y *Scenedesmus acutus*. Para estimar el número de células, se hizo un recuento usando un microscopio invertido y se evaluaron los parámetros de clorofila-a mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 560 nm. Mientras que, para la producción primaria, se estimó el valor de la respiración empleando un electrodo de oxígeno, mientras que la biomasa algal se determinó mediante el peso seco. En el transcurso del experimento se identificó la especie *Oscillatoria amphibia*, el autor sugiere que esta especie probablemente haya aparecido a partir de estados estivales en el agua residual. Esta alga desplazó a *C. saccharophila*, ya que tuvo mejor adaptación a la luz y a los nutrientes. Todos los procesos fisicoquímicos presentaron una respuesta óptima a una temperatura de 30 °C, mientras que a 25 °C fue más lento. El fósforo y el CO₂ como fuente de carbono controlaron el crecimiento de las algas a las condiciones anteriormente mencionadas. La producción primaria presentó máximos en los minutos posteriores al encendido de la luz.

Los metales pesados son contaminantes tóxicos para la salud de las personas, y estos pueden encontrarse en forma iónica disueltos en el agua. Existen diversos tratamientos para la remoción de estos iones, pero debido a su alto costo es difícil que las empresas adopten estas tecnologías como sistemas de tratamiento para sus aguas residuales. En una investigación realizada por Sánchez, Garza, Almaguer, Sáenz y Liñán (2008),

aplicando biotecnología algal, realizó un estudio cinético de isotermas de adsorción de metales como el Ni (II) y Zn (II), en el que se utilizó la biomasa de *Chlorella* sp., inmovilizada en una matriz de alginato. Como punto de partida generó biomasa, para lo cual se empleó el medio de cultivo BG-11, se inoculó 5ml de cepa pura de *Chlorella* sp., y se mantuvo durante 20 días con iluminación constante. Al cabo de 20 días se procedió a inmovilizar la microalga, y para este proceso se mezcló el cultivo de *Chlorella* sp. y alginato de calcio al tres por ciento en relación 1:1; luego dicha mezcla se dejó caer en una solución de CaCl 0,1 M y se obtuvo biomasa de *Chlorella* sp. en forma de pellets, paralelamente se preparó estándares de los metales Ni (II) y Zn (II) en intervalos de 10-500 mg/l. El experimento presentó nueve unidades experimentales, cada unidad contó con 10 ml de los estándares de Ni y Zn y 10 pellets de la biomasa inmovilizada. La solución se mantuvo en agitación constante en intervalos de 0,5-120 min. Posteriormente se filtraron y se analizaron con la técnica de espectroscopia de absorción atómica (AAS) por triplicado. Para el caso de la desorción se tomaron los pellets usados anteriormente y se colocaron en una solución de 10 ml de HCl 0,1 M y se mantuvo en agitación constante durante dos horas. Los datos obtenidos se ajustaron a los modelos matemáticos de Freundlich y Langmuir, pero las isotermas experimentales se adaptaron mejor al modelo de Freundlich, donde la capacidad máxima de adsorción para la biomasa fue de 66,16 mg/g para el Ni (II) y 126,9 mg/g para el Zn (II).

En una investigación realizada por Hernández, Rodríguez, Lozano y Castilla (2010), se evaluó la remoción de nutrientes: amonio (NH_4^+) y ortofosfato (PO_4^{3-}) usando 3 cultivos diferentes, *Chlorella vulgaris*, *Spirulina subsalsa* y un cultivo mixto integrado por *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp. y *Chlamydomonas* sp. Estos cultivos estuvieron libres e inmovilizados en dos soportes, uno de origen vegetal (lufa) y otro sintético (polietileno), siendo la lufa el soporte más eficiente en producción de biomasa algal, así como también en la fijación de las microalgas. En los tres cultivos se analizó la remoción de nutrientes a bajas concentraciones (10 mg NH_4 /l y 5 mg PO_4^{3-}) y altas concentraciones (25 mg NH_4^+ /l y 10 mg PO_4^{3-} /l). En cuanto al consumo de nutrientes, el cultivo libre de *C. vulgaris* a baja concentración, presentó la mayor capacidad de remoción con un 50 por ciento para

el nutriente NH_4^+ y un 74 por ciento para PO_4^{-3} ; mientras que en alta concentración se obtuvo una mejor respuesta con el cultivo mixto con 68 por ciento para el nutriente NH_4^+ y 76 por ciento para el nutriente PO_4^{-3} . En los cultivos inmovilizados sobre lufa, el alga *C. vulgaris* y el cultivo mixto presentaron el mayor consumo de nutrientes, siendo de 70 y 99,9 por ciento para NH_4^+ y para PO_4^{-3} del 72,1 y 89,9 por ciento, respectivamente. Los autores concluyeron que el empleo de un soporte natural facilitó la cosecha de la biomasa algal y permitió que el tratamiento sea un sistema continuo, además se redujo costos al optimizar el proceso. Por lo tanto, el sistema de biorremediación de aguas residuales a gran escala para esta investigación resultó ser económico y eficiente.

Estudios recientes acerca la tolerancia a metales pesados en microalgas realizados por García, Rocha y Cobarrubiass (2011), demostraron que las microalgas de la familia Bacillariophyceae (diatomeas) y Euglenoidea, soportan altas concentraciones de compuestos metálicos. En esta investigación se empleó muestras de DAM (Drenaje Acido Minero) de Sonora, México. Se determinó en el laboratorio Cu_2^+ soluble, macronutrientes (Na^+ , K^+ , Mg_2^+ , Cl^- , Ca_2^+ , SO_2^{-4} , PO_3^{-4} , NO_3^- , nutrientes esenciales que constituyen las células) y micronutrientes (cofactores involucrados en reacciones enzimáticas durante el proceso de la fotosíntesis). También se evaluó los factores fisicoquímicos de pH, potencial redox, temperatura e intensidad luminosa. Los resultados mostraron una concentración entre 200 y 900 mg/l de Cu, y un pH menor a 3. Se encontraron otros nueve metales, entre ellos: As, Cd, Co, Pb, Fe y Si.

Las microalgas de las familias Bacillariophyceae (diatomeas) y Euglenoidea, particularmente los géneros *Pinnularia* y *Euglena* expuestas a este medio resultaron tener gran tolerancia al cobre, observándose un desarrollo óptimo de células en presencia de alto contenido de cobre.

En un estudio realizado por Pizarro (2012), en el que se evaluó la biorremediación de los nutrientes: nitrito, amonio y fosfato, generados de la actividad piscícola mediante el empleo de la biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*. Se determinó la eficiencia de remoción de dichos nutrientes disueltos en un efluente producido por la crianza de jurel (*Seriola lalandi*). La especie *C. vulgaris* fue analizada en condiciones experimentales en interior (con luz artificial) y al aire libre (con luz natural). La microalga fue cultivada en estaques de 50 litros de capacidad, se usaron concentraciones altas y bajas del efluente como tratamientos, y el control experimental fue agua de mar filtrada y esterilizada. Durante el proceso se midieron parámetros fisicoquímicos de pH, temperatura e intensidad de luz. El alga *C. vulgaris* registró una alta remoción del nutriente nitrito sobre los otros nutrientes, alcanzando valores de 91,67 por ciento y 88,41 por ciento, en las condiciones en interior y al aire libre, respectivamente. Por su parte, el nitrato fue removido en un 57,47 por ciento y 29,31 por ciento para las condiciones en interior y al aire libre. En cuanto al porcentaje de remoción de amonio los valores fueron de 42,22 por ciento para ambos tratamientos. Finalmente se registraron porcentajes de remoción de 65,78 por ciento en condiciones en interior y un 75,78 por ciento al aire libre en fosfato.

Castro y Villamizar (2012) evaluaron materiales co-inmovilizantes para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* UTEX 1803 en aguas residuales industriales (vinaza). Estas aguas son el resultado de la destilación de caña de azúcar y su nivel de pH se encuentra entre cuatro a cinco. Las vinazas cuando son vertidas a cuerpos de agua causan eutrofización ya que tienen alto contenido de materia orgánica. El experimento constó de tres fases, la primera donde se evaluó tres tipos de materiales para co-inmovilizar; luffa, poliuretano de 1cm de grosor y poliuretano de baja densidad de 1cm de grosor. En esta fase se sometieron los soportes a la acción de la vinaza para ver su durabilidad y su capacidad de recuperar biomasa, la luffa presentó un alto grado de degradación al ser un material orgánico, y entre los poliuretanos, el de baja densidad tuvo mejor durabilidad, demostrando ser reciclable. En la segunda fase se usó el poliuretano de baja densidad con 1 cm, 2 cm y 4 cm de grosor, con la finalidad de probar

el grado de resistencia y la recuperación de biomasa, para ello se sumergió en vinaza sin diluir durante diez días, una vez comprobada su durabilidad se procedió a la tercera fase, que consistió en la inoculación de la cepa en el soporte en contacto con la vinaza sin diluir durante cinco días, y tomando muestras de la biomasa cada 24 horas. Los resultados para la extracción de biomasa fueron de $18,67 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$ (1cm); $21,67 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$ (2cm); $21,3494 \text{ g/l}\cdot\text{d}^{-1}$ (4cm). El estudio concluye que el polietileno de 2cm fue el que tuvo mejor eficiencia, demostrando que la microalga *Chlorella vulgaris* puede desarrollarse en ambientes ácidos.

En cuanto a la remoción de nutrientes en aguas residuales, las algas están siendo ampliamente usadas. La dificultad que se encuentra en este proceso es la separación de la biomasa algal producida en el efluente. Medina, Gutzeit y Neis (2014) realizaron estudios basados en la formación de flocs bacterio-algal. En el experimento se usó agua residual sintética en una cámara sin aireación, y factores como la temperatura se mantuvieron constantes a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Se empleó 20 tipos de especies de algas, donde la que predominó fue *Chlorella vulgaris*. Los parámetros analizados fueron principalmente oxígeno, pH, temperatura, carbono orgánico disuelto, nitrógeno total y fósforo total. En los resultados se logró la formación del floc sedimentable, y la remoción de materia orgánica fue similar a métodos convencionales, pero con mejoras para la eliminación de nitrógeno y fósforo.

La remoción de metales pesados entre ellos el cadmio, ha sido determinada en una investigación realizada por Piña (2014) quien realizó un experimento para evaluar la capacidad de extracción de diferentes concentraciones de cadmio (2,5; 5; 10 y 20 ppm de Cd) usando la microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. Se emplearon matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml de medio de cultivo conteniendo TAP (Tris-Acetate-Phosphate), y se tomaron muestras cada 24 horas durante 8 días. Se evaluó el crecimiento de la microalga, concentración de clorofila y la capacidad de remoción del metal por este organismo. Las muestras se tomaron a los tiempos 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72,

96 y 120 horas. Los resultados obtenidos indicaron una notable eficiencia de remoción para todas las concentraciones evaluadas. Se encontró, un máximo de remoción a las 3 horas en las concentraciones más bajas y a las 6 horas en las más altas, con una eficiencia de 50 a 70 por ciento.

1.2. BASES TEÓRICAS ESPECIALIZADAS

1.2.1. Microalgas

1.2.1.1. Características generales

Bajo el término de microalga se incluyen aquellos microorganismos capaces de llevar a cabo la fotosíntesis. En esta categoría quedan agrupadas tanto las cianobacterias (conocidas tradicionalmente como algas verdeazuladas) como las algas, tradicionalmente algas verdes, rojas y doradas (Ruiz, 2011).

Las microalgas son generalmente organismos unicelulares y/o coloniales fotoautótrofos, es decir, organismos que emplean los fotones provenientes de la luz solar para fijar carbono inorgánico en forma de carbono orgánico. Sin embargo, algunas especies de microalgas son capaces de crecer empleando la materia orgánica como fuente de carbono.

1.2.1.2. Metabolismo algal

En el metabolismo fotoautotrófico, la única fuente de energía para la producción de biomasa donde la energía luminosa y la única fuente de carbono son los compuestos inorgánicos. En contraste, en el metabolismo heterotrófico, las células utilizan compuestos orgánicos como fuente de energía y carbono. Mientras que en el metabolismo fotoheterotrófico la fuente de energía es la luz,

que es necesaria para que las microalgas puedan utilizar los compuestos orgánicos como fuente de carbono (Markou & Gergakakis, 2011).

Por último, en el metabolismo mixotrófico la principal fuente de energía es la luz, los compuestos orgánicos y el CO₂ son esenciales. El crecimiento fotoautotrófico, fotoheterotrófico y mixotrófico se ven influidos por la intensidad de la luz y por la concentración de la fuente de carbono, mientras que el crecimiento heterotrófico está influenciado sólo por la concentración de la sustancia orgánica (Markou & Gergakakis, 2011). Por lo tanto, existen algas que pueden desarrollarse bajo ausencia de luz, como por ejemplo la especie *Chlorella protothecoides*.

La composición de las microalgas (su contenido en lípidos, carbohidratos y proteínas) es variable y puede ser manipulada mediante varios parámetros durante su proceso de cultivo, dependiendo además de la especie considerada. En general, las cianobacterias tienen un contenido lipídico de hasta un 20 por ciento, mientras que el contenido de lípidos de las algas procariotas oscila entre el 20 y el 50 por ciento en peso seco.

Las microalgas son las plantas con mayor crecimiento de la tierra (100 veces más rápido que los árboles) y pueden crecer en distintos ambientes tanto de pH como de temperatura.

1.2.2. Sistemas de Cultivo de Microalgas

1.2.2.1. Factores para el crecimiento de microalgas en cultivo

Los factores influyentes en el crecimiento de las microalgas son comunes, sin embargo, cada especie y subespecie de microalga presenta sus características propias respecto a las condiciones óptimas de crecimiento, así como productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de sistemas de cultivo. La productividad de las microalgas está determinada, principalmente, por el pH del medio, la salinidad, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y el tipo de luz, la densidad celular del cultivo, la temperatura y la contaminación o la depredación por otros organismos. En promedio, las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. Sin embargo, en fase exponencial algunas algas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3,5 horas (Brenan, 2010).

1.2.2.2. Luz

La disponibilidad de luz es el principal factor limitante de los cultivos fotoautótrofos de microalgas. Los nutrientes inorgánicos e incluso el CO₂ pueden ser incorporados al medio de cultivo en exceso, de forma que nunca sean limitantes al crecimiento. Por el contrario, la luz debe ser continuamente suministrada al cultivo, ya que la energía radiante no se puede acumular (Molina, 1996).

Los organismos fotosintéticos sólo emplean la fracción del espectro de luz solar que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 y 700 nm, lo que supone un 40 por ciento de la radiación total del sol. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de conversión de energía lumínica en biomasa de alrededor del uno por ciento. Sin embargo, en el caso de las

microalgas se han demostrado eficiencias de conversión luz-biomasa entre uno y cuatro por ciento en sistemas abiertos como estanques y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (Stephens & Ross, 2010).

1.2.2.3. Nutrientes

En función de los nutrientes empleados, las microalgas se pueden clasificar en autótrofas, heterótrofas, o mixotróficas. Es importante destacar que un déficit de nutrientes provoca en las microalgas una acumulación de lípidos siempre que haya luz y CO₂ disponibles (Rodolfi & Zittelli, 2009).

Las microalgas autótrofas pueden emplear como fuente de carbono el CO₂ presente en la atmósfera o en gases de escape, así como los iones bicarbonato (HCO₃⁻) mediante la enzima anhidrasa carbónica. Estas son capaces de tolerar hasta unas 150.000 ppmv de CO₂ en aire de media, aunque hay especies de microalgas como *Chlorella*, que han demostrado que toleran hasta 400.000 ppmv.

El nitrógeno es otro de los macronutrientes esenciales en el crecimiento de las microalgas. El contenido en nitrógeno de la biomasa algal puede suponer desde uno por ciento hasta más del diez por ciento, en función de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. Las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio generalmente en forma de urea, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno (NO_x).

El fósforo es tomado del medio en forma de ortofosfatos (P-PO₄⁻³), cuya concentración en equilibrio con las formas protonadas depende del pH del medio. Factores como un pH excesivamente alto o bajo, o la ausencia de iones como

potasio, sodio o magnesio, ralentizan la toma de fosfatos por parte de las microalgas.

Las microalgas requieren, para su crecimiento, de otros macro y micronutrientes. Aparte del C, N y P, otros elementos son necesarios para el cultivo de microalgas, tanto macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg y Ca) como micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se), tal como se observa en la composición elemental de las células microalgales. Muchos de dichos elementos traza son relevantes en reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo (Richmond, 2004).

1.2.2.4. pH

El pH del medio influye tanto en la proporción de las especies del equilibrio químico del CO₂, y por tanto, en la alcalinidad del medio, como en la forma química en que se encuentran algunos nutrientes y micronutrientes necesarios. Cada especie de microalga tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas esté más habituada a asimilar. El pH en la mayoría de los cultivos de microalgas se encuentra entre siete y nueve, con un óptimo entre 8,2–8,7 (García, 2014).

1.2.2.5. Oxígeno

El nivel de oxígeno disuelto es un parámetro que debe ser controlado en el cultivo de microalgas, ya que altas concentraciones de oxígeno disuelto pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo. Esta inhibición se ve favorecida por un déficit de CO₂ y por la alta radiación y temperatura.

1.2.2.6. Agitación

La agitación facilita la eficiencia en el transporte, impidiendo la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del reactor, homogeniza el pH y asegura la distribución de los gases y de la luz.

1.2.2.7. Temperatura

En el crecimiento de las microalgas, la temperatura es un factor por considerar, puesto que influye en los coeficientes de velocidad de las reacciones biosintéticas (Richmond, 1986). La relación entre temperatura y velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente hasta alcanzar una temperatura óptima. A pesar de tener una gran variedad de microalgas, muchas de ellas son capaces de desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, como la especie *Chlorella* que puede crecer entre 5 y 42°C, todas ellas presentan un rango fuera del cual se ven inhibidas e incluso mueren.

1.2.3. Características Generales de *Chlorella vulgaris*

1.2.3.1. Descripción morfológica y taxonómica

El género *Chlorella* agrupa a las algas verdes unicelulares dentro del filo Chlorophyta. Tiene forma esférica, midiendo de dos a diez μm de diámetro, y no posee flagelo. La *Chlorella* contiene pigmentos verdes fotosintetizadores con la clorofila-a y -b en su cloroplasto. A través de la fotosíntesis se multiplica rápidamente, requiriendo sólo dióxido de carbono, agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales (Delgadillo, 2014). En la Tabla 1 se presenta la taxonomía de *Chlorella vulgaris*.

Tabla 1

Taxonomía de Chlorella vulgaris

CARACTERÍSTICA	DESCRIPCIÓN
Reino	<i>protista (Primoplantae)</i>
División	<i>Chlorophyta</i>
Clase	<i>Trebouxiophyceae</i>
Orden	<i>Chlorellales</i>
Familia	<i>Chlorellaceae</i>
Género	<i>Chlorella</i>
Especie	<i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck

Fuente: (Algae Base, 2015)

1.2.3.2. Componentes celulares

a. Pared celular

La rigidez preserva la integridad de la célula y es básicamente una protección contra los contaminantes y el medio ambiente. Durante su formación temprana es autoesporangia, la nueva membrana celular formada permanece frágil, formando dos nanómetros (nm) de una capa fina unilaminar densa de electrones. La pared celular de la célula hija aumenta gradualmente entre 17-21 nm después de la maduración, donde una capa de microfibrilla se forma representando una capa de quitosano compuesto de glucosamina, que es responsable de su rigidez. En la fase madura, el espesor de la pared celular y la composición no son constantes porque pueden cambiar según el crecimiento y las condiciones ambientales. Además, algunos reportes explican que la rigidez de la pared celular se enfoca en la presencia de una capa de polipropileno, aunque generalmente se acepta que *C. vulgaris* tiene una pared celular unilaminar que carece de esporopolenina, que es un carotenoide polimerizado extremadamente resistente que se encuentra en la pared celular de *Haematococcus pluvialis* y *Chlorella fusca*. Sin embargo, un estudio de

realizado en la microalga *C. vulgaris* por Martínez, Ascaso & Orús (1991), reportaron la presencia de esporopolenina observando una capa trilaminar externa y detectaron residuos resistentes después de ser sometida a acetólisis.

b. Citoplasma

Se trata de una sustancia gelificada confinada dentro de la barrera de la membrana celular y está compuesto de agua, minerales y proteínas solubles. *C. vulgaris* en su interior tiene orgánulos como mitocondria, un pequeño núcleo, vacuolas, cloroplastos y el aparato de Golgi (Solomon, Berg y Martin, 1999).

c. Mitocondria

Cada mitocondria contiene algo de material genético, el aparato respiratorio y una membrana de capa doble; el exterior de la membrana rodea todo el orgánulo y está compuesto de proteínas y fosfolípidos en igual cantidad. Sin embargo, en el interior de la membrana está compuesto de tres veces más proteínas que fosfolípidos, el cual rodea el espacio interno llamado matriz, que contiene la mayoría de proteínas mitocondriales (Solomon et al., 1999).

d. Cloroplasto

La microalga *C. vulgaris* tiene un solo cloroplasto con una membrana de doble envoltura compuesta de fosfolípidos; el exterior de la membrana es permeable para metabolitos y iones, pero el interior de la membrana tiene una función más específica en el transporte de proteínas. Los gránulos de almidón, compuestos de amilasa y amilopectina, pueden formarse dentro del cloroplasto, especialmente en condiciones de crecimiento desfavorable.

El pirenoide contiene altos niveles de ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (RuBisCO) y es el centro de fijación del dióxido de carbono. El cloroplasto también almacena un grupo de tilacoides fusionados donde la clorofila del pigmento dominante se sintetiza enmascarando el color de otros pigmentos como la luteína. Durante el estrés del nitrógeno, los glóbulos lipídicos se acumulan principalmente en el citoplasma y el cloroplasto (Van den Hoek, Mann y Jahns, 1995).

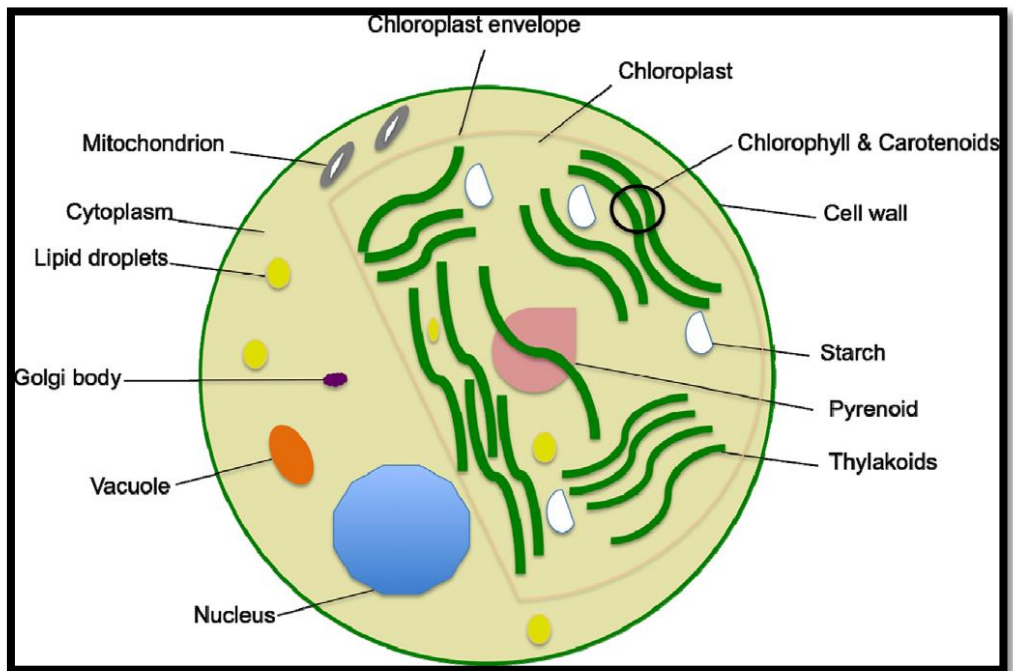


Figura 1. Esquema de la ultraestructura de *C. vulgaris* mostrando sus diferentes orgánulos.

Fuente: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014.

1.2.3.3. Reproducción

La microalga *C. vulgaris* es una célula de reproducción no móvil (autoesporas) que se reproduce asexualmente y rápida. Así, dentro de 24h, una célula de *Chlorella vulgaris* crecida en condiciones óptimas se multiplica por auto esporulación, la cual es la reproducción más común en algas.

De esta manera, cuatro células hijas son formadas dentro de la pared celular de la célula madre (ver Figura 2). Después de la maduración de estas recién formadas células, la madre rompe la pared celular, permitiendo así la liberación de las células hijas, el resto de la célula madre será consumido como alimento por las nuevas células hijas (Yamamoto et al., 2004).

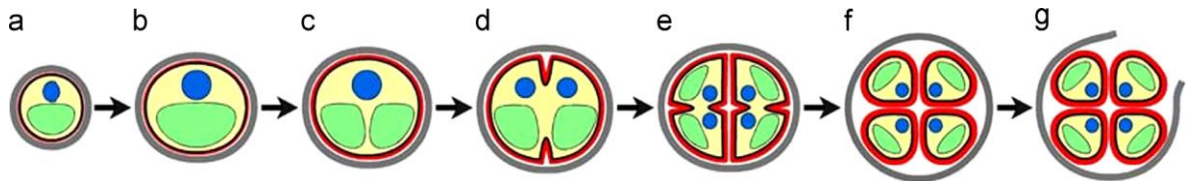


Figura 2. La imagen muestra las diferentes fases de la formación de las células hijas en *Chlorella vulgaris*: (a) fase de crecimiento temprano de la célula (b) fase de crecimiento tardío de la célula (c) fase de división del cloroplasto (d) fase de división del protoplasto temprano (e) fase tardía de la división del protoplasto (f) fase de la maduración de células hijas y (g) fase de incubación.

Fuente: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014.

1.2.3.4. Composición primaria

a. Proteínas

Las proteínas son de importancia central en la química y composición de la microalga. Están involucradas en roles principales como el crecimiento, mensajeros químicos, regulador de la actividad celular y defensa contra invasores externos (Solomon et al., 1999).

El total de proteínas contenidas en la madurez de *C. vulgaris* representa entre 42 a 58 por ciento de la biomasa seca, varía de acuerdo a las condiciones de crecimiento. Las proteínas tienen múltiples roles, alrededor del 20 por ciento de las proteínas totales están ligadas a la pared celular, más del 50 por ciento están

en el interior y 30 por ciento migran afuera y adentro de la célula (Morris, Almarales, Carrillo & Bermudez, 2008).

Su peso molecular revelado por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato) comprende entre 12 y 120 kDa, con una mayoría entre 39 y 75 kDa después de un crecimiento bajo condiciones autotróficas o heterotróficas. Sin embargo, el pico más alto se observó en células crecidas en condiciones autotróficas.

La calidad nutricional de la proteína es determinada por su perfil de aminoácidos, y como en la mayoría de las microalgas, el perfil de *C. vulgaris* compara favorablemente e incluso mejor al perfil estándar para la nutrición humana propuesta por la OMS y la FAO, porque las células de *Chlorella vulgaris* sintetizan aminoácidos esenciales y no esenciales. Además, independientemente del procedimiento de extracción, las proteínas de *C. vulgaris* muestran una excelente capacidad emulsionante que es comparable e incluso mejor que ingredientes comerciales. Los resultados muestran que la capacidad emulsionante de las proteínas de *C. vulgaris* extraídas a un pH=7 fueron 3090 ± 50 ml aceite/g de proteína con una estabilidad de $70 \pm 1,0$ por ciento. Por lo tanto, las proteínas de *C. vulgaris* abren la puerta para una valorización adicional de esta microalga en el mercado, especialmente en el sector alimenticio.

La extracción de proteínas es técnicamente la misma para todas las microalgas y se realiza principalmente por solubilización de proteínas en soluciones alcalinas. La purificación puede seguirse precipitando las proteínas solubilizada con ácido tricloroacético (25 por ciento TCA) o ácido clorhídrico (0,1 N HCl) (Chronakis, Galatanu, Nylander & Lindman, 2000).

b. Lípidos

Los lípidos son un grupo heterogéneo de compuestos que no están definidos por su estructura sino más bien por el hecho que son solubles en solventes no polares y relativamente insolubles en agua (Bajguz, 2000). En condiciones de crecimiento óptimo *C. vulgaris* puede alcanzar 5 a 40 por ciento de lípidos por peso de biomasa seca, y están principalmente compuestas por glicolípidos, ceras, hidrocarburos, fosfolípidos, y en pequeñas cantidades ácidos grasos libres. Estos compuestos son sintetizados por el cloroplasto y también localizados en la pared celular y en las membranas de los orgánulos (membranas del cloroplasto y mitocondria). Sin embargo, en condiciones desfavorables de crecimiento, el contenido de lípidos (principalmente compuesto por triacigliceroles) puede alcanzar el 58 por ciento (Mata, Martins, & Caetano, 2010). A diferencia de otros lípidos, los triacigliceroles no juegan un papel estructural, sino que se acumulan como gotitas en el citoplasma y en el espacio inter-tilacoides del cloroplasto.

Liu & Zhou (2008) optimizaron un método que detecta la acumulación de gotitas de lípidos dentro de la célula de *C. vulgaris* después de cada fase de crecimiento. El método se basa en la tinción de la célula con el colorante rojo de nilo, donde se observa la acumulación de lípidos con un microscopio fluorescente que emite luz azul y revela las gotitas de lípidos, especialmente lípidos neutrales. Esta técnica mostró una correlación entre la cantidad de lípidos acumulados y la intensidad fluorescente. Sin embargo, de acuerdo a Chen, Sommerfeld y Hu (2011) sin una ruptura celular, este método podría ser inefectivo debido a la presencia de una gruesa pared celular de algunas microalgas que pueden prevenir el completo acceso de reactivos dentro de la célula. Así, la ruptura celular es necesaria para prevenir errores en la mensuración y cuantificación.

c. Carbohidratos

Los carbohidratos representan un grupo reducido de azúcares y polisacáridos como almidón y celulosa. El almidón es el polisacárido más abundante en *C. vulgaris*.

Los carbohidratos complejos se encuentran localizados en el cloroplasto y están compuestos de amilasa y amilopectina, junto con otros azúcares sirven como almacén de energía para las células. La celulosa es un polisacárido estructural de alta resistencia, el cual se encuentra en la pared celular como una barrera fibrosa de protección. Además, uno de los más importantes polisacáridos presentes en *C. vulgaris* es el β 1-3glucano, el cual tiene múltiples beneficios nutricionales y en la salud (Lordn et al., 2011).

Tabla 2

Composición de azúcares simples de la pared celular

Azúcares neutrales	Porcentaje (%)
Ramnosa	45-54
Arabinosa	2-9
Xilosa	7-19
Manosa	2-7
Galactosa	14-26
Glucosa	1-4

Fuente: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014

d. Pigmentos

El pigmento más abundante en *C. vulgaris* es la clorofila, la cual puede alcanzar entre uno a dos por ciento de peso seco y está situado en los tilacoides. La microalga *C. vulgaris* también contiene cantidades enormes de carotenoides

(Tabla 3) del tipo b-caroteno por ejemplo está asociado con las gotitas de lípidos en los cloroplastos, y los carotenoides primarios están asociados con la clorofila en los tilacoides donde capturan la energía lumínica y la transfieren dentro de la fotosíntesis. Sin embargo, como en plantas terrestres, algunos pigmentos actúan como fotoreceptores para proteger las moléculas de clorofila de la degradación y el blanqueamiento durante exposiciones fuertes de radiación y oxígeno (Solomon et al., 1999). Estos pigmentos tienen múltiples propiedades terapéuticas, como actividad antioxidante, efecto protector contra la degeneración de retina, regulador de colesterol en la sangre, prevención de enfermedades crónicas (cáncer de colon y cardiovascular) y fortifica el sistema inmunológico. La feofitina es bioquímicamente similar a la clorofila, pero carece del ion Mg^{++} ; pueden formarse después de la degradación de la clorofila durante el crecimiento de la célula microalgal o durante duras condiciones de extracción. Además, estos pigmentos son lipofílicos y su extracción y su extracción es generalmente asociada con extracción de lípidos. Muchos estudios trabajaron en la optimización del proceso de extracción de pigmentos usando solventes (dimetilformamida, diclorometano, acetona, hexano, y etanol), soxhlet, extracción asistida con ultrasonido, y extracción de líquido presurizado (PLE), que mostró una extracción simultánea útil de carotenoides y clorofila, y también y también minimizó la formación de feofinita en altas temperaturas ($>110\text{ }^{\circ}C$). Además, la extracción con SC- CO_2 (dióxido de carbono supercrítico) fue llevada a cabo para mejorar la recuperación de carotenoides, y las mejores condiciones fueron 35 MPa y 40 a $45^{\circ}C$ en células trituradas, y bajo estas condiciones el extracto fue dorado y límpido a diferencia de los solventes de extracción; así que usando el SC- CO_2 , se pudo lograr la más alta selectividad. Esta hipótesis fue confirmada por Kitada et al. (2009), usando diferentes condiciones óptimas (50MPa y $80^{\circ}C$) porque el estudio fue llevado en células enteras; así que las condiciones más fuertes eran requeridas. Además, un co-solvente como el etanol al 5 por ciento ha sido añadido como un aumentador de presión para incrementar el rendimiento de extracción. Análisis y cuantificación son llevados por cromatografía líquida de alto rendimiento

(HPLC) y espectrofotometría usando ecuaciones específicas o por el trazado de la curva de calibración para cada pigmento

Tabla 3

Pigmentos potenciales contenidos en C. vulgaris

Pigmentos	$\mu\text{g g}^{-1}(\text{dw})$
B-caroteno	7-12000
Astaxantina	550000
Cantaxantina	362000
Luteína	52-3830
Clorofila-a	250-9630
Clorofila-b	72-570
Feofitina-a	2310-5640

Fuente: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014

e. Minerales y vitaminas

Los minerales son determinados después de la incineración de la biomasa y se analiza por espectrofotometría de absorción atómica (Tabla 4). Juegan un papel muy importante. Por ejemplo, el catión de potasio es importante para la nutrición humana; está asociado con el balance del fluido celular, metabolismo de carbohidratos, síntesis de proteína y pulsos nerviosos. Además, es usado como fertilizante en la agricultura en forma de cloruro de potasio (KCl), sulfato (K_2SO_4) o nitrato (KNO_3). El magnesio es importante para mantener la normalidad y constancia en la actividad nerviosa y la contracción muscular; por lo tanto, la deficiencia de magnesio en el organismo humano puede dirigir a la depresión y síntomas de comportamiento suicida. El zinc es un componente esencial de las enzimas, el cual participa en muchos procesos metabólicos incluyendo la síntesis de carbohidratos, lípidos, proteínas y también es un cofactor de la enzima superóxido dismutasa, que está involucrada en la protección contra el proceso oxidativo.

Las vitaminas que son clasificadas como solubles en agua (C y B) y solubles en grasas (A, D, E y K) *C. vulgaris* tiene un perfil importante de vitaminas (Tabla 5) que son elementos clave para el crecimiento y diferenciación celular en el cuerpo humano (vitamina A), y tiene actividad antioxidante que actúa como eliminador de radicales junto con la mejora de la circulación sanguínea y el control de las funciones musculares (vitamina E y C). El complejo de vitamina B ocupa el mayor número en organismos vivos, y es un factor importante para la actividad de las enzimas en el metabolismo, promueve el crecimiento de glóbulos rojos, reduce el riesgo de cáncer al páncreas, y mejora la salud de la piel, cabello y músculos. El perfil de vitaminas es sensible en condiciones de crecimiento; así la mejor concentración fue lograda después de 24h de crecimiento autotrófico con 10 por ciento de CO₂, pero durante las condiciones heterotróficas el contenido de vitaminas fue más alto que el autotrófico debido a la presencia de glucosa en el medio y uso como fuente de carbono para la producción de compuestos orgánicos. Otra posible explicación para el alto contenido de vitaminas podría ser las alteraciones en la ultraestructura del aparato fotosintético el cual está ligado con cambios en los componentes celulares.

Tabla 4

Perfil de minerales de C. vulgaris

Minerales	g/100g
Microelementos	
Na	1,35
K	2,15
Ca	0,27
Mg	0,44
P	0,96
Macroelementos	
Cr	tr
Cu	0,19
Zn	0,55
Mn	0,4
Se	tr
I	0,13
Fe	0,68

Fuente: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014

Tabla 5

Perfil de vitaminas en C. vulgaris

Vitaminas	mg/100g
B1 (tiamina)	1,5
B2 (Riboflavina)	4,8
B3 (Niacina)	23,8
B5 (Ácido pantoteico)	1,3
B6 (Piridoxina)	1,7
B7 (Biotina)	1961,6
B9 (Ácido fólico)	26,9
B12 (Cobalamina)	125,9
C (Ácido ascórbico)	15,6
E (Tocoferol)	20
A (Retinol)	13,2

Fuente: Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014

1.2.4. Detoxificación de Metales Pesados Expresados a Través de la Metalotioneína

Entre los mecanismos que mejor han destacado los protistas, plantas algas y hongos es el proceso de detoxificación por metales tóxicos, esto a través de la captura de metales por medio del glutatión reducido (GHS) y la síntesis de metalotioneínas de clase III (MtIII) mediante la fitoquelatina sintasa (PCS), siendo el Cadmio el mayor inductor de este sistema pero también por Ag, Pb, Cu, Hg, Au y Zn. Se han encontrado estas Mt (III) en varias especies de microalgas. Estas proteínas se pueden unir a diversos metales en el citosol, según el organismo, los complejos Mt (III)-metal y GHS-metal son transportados de forma activa dentro de la vacuola. Las metalotioneínas también funcionan como apoenzimas con la consecuente activación con cofactores de iones metálicos que intervienen en la detoxificación de metales tóxicos como se ve en la Figura 3.

Los complejos de Mt (III) según la inclusión de iones sulfuro pueden ser: (I) la forma de bajo peso molecular (LMW) que se caracteriza porque el metal tiene preferencia por su unión con grupos tiol (-SH) y (II) el complejo de alto peso molecular (HMW) donde los iones de sulfuro inorgánico (S^{2-}), están incorporados para formar nanopartículas que se conoce comúnmente como biomineralización (Cortés, Sánchez y Bartolome, 2017).

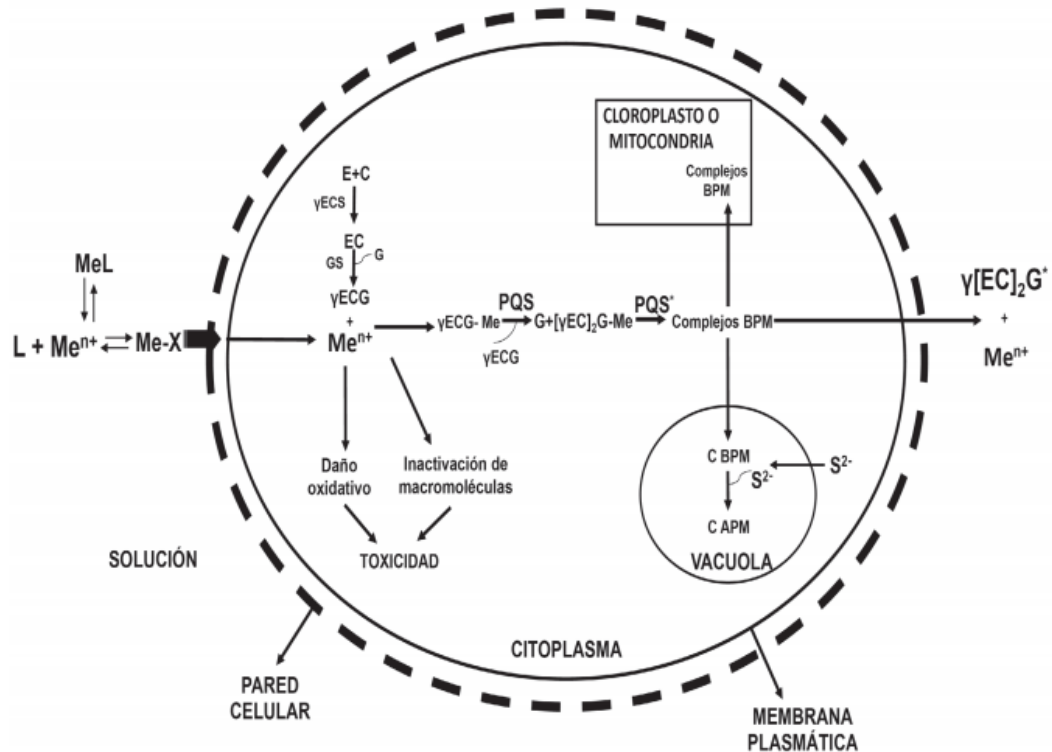


Figura 3. Mecanismo general de detoxificación de metales mediado por metalotioneínas de clase III (Mt (III)) en microalgas. Complejo metálico en solución (MeL), ion metálico libre (Me^{n+}), ligando biótico extracelular (X), ácido glutámico (E), cisteína (C), glicina (G), Glutatión sintetasa (GS), gamma glutamilcisteína (γEC), Glutatión (γECG), Metalotioneína $n=2$ ($\gamma [EC]_2 G$), Complejos de Bajo Peso Molecular (CBPM), Complejos de Alto Peso Molecular (CAPM), fitoquelatina sintetasa (PQS), gamma glutamilcisteína sintetasa (γECS).

Fuente: Cortés et al., 2017.

1.2.5. Alginato

El alginato es un polisacárido que se extrae de las algas pardas, conocidas como algas marrones. El alginato es una macromolécula formada por la unión de dos monosacáridos, ambos con un grupo ácido, el ácido glucurónico y el ácido manurónico, de tipo orgánico. Estos son derivados del ácido algínico. La síntesis de alginato se da a partir de la fructuosa (Perengues & Valdez, 2017).

El intercambio iónico se da cuando un ion de la disolución se intercambia por otro ion de igual signo que se encuentra unido a una partícula sólida inmóvil. En el caso del alginato, al entrecruzarse las cadenas del polímero con el cloruro de calcio está ocurriendo una reacción de intercambio iónico, donde el sodio es reemplazado por el calcio, dando al gel su consistencia sólida. Dado que la reacción se supone reversible, es posible en principio reemplazar el calcio por otros iones. Por ejemplo, si las partículas de alginato se dejan en una solución que contenga iones de aluminio Al^{3+} , el aluminio puede intercambiarse con el calcio, por su mayor valencia, el gel de alginato de aluminio tiene mayor dureza que el alginato de calcio (Gonzales, 2009).

1.2.6. Inmovilización

El término inmovilización de células se refiere a células físicamente confinadas en una región definida en el espacio, reteniendo sus propiedades. Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización las células pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en distintos procesos químicos. La inmovilización es una técnica capaz de reutilizar o dar uso continuo de biocatalizadores y células. Por lo tanto, la sencillez y el bajo costo de los métodos de inmovilización juegan un papel importante en la selección de protocolos de inmovilización. Es por ello que por medio de la inmovilización es posible no solo controlar la ubicación de las células sino también modificar sus propiedades selectivamente (Fajardo, Osuna, Villa, Minakata y Ibarra, 2011).

Para inmovilizar algas, hay que tener en cuenta un aspecto muy importante, el soporte inmovilizador permita el paso de luz para que las células capten eficientemente la energía necesaria para su proceso fotosintético. Existen dos tipos de inmovilización: Pasivos, basados en la capacidad que tienen ciertas algas de

adherirse a superficies como esponjas, estropajos entre otros, el segundo tipo de inmovilización es el activo, este a su vez puede ser: por floculación, fijación química y atrapamiento con geles. En el primer caso, las algas se tratan con quitosano (un polímero natural derivado de la quitina) a fin de precipitar las células. Este método tiene el inconveniente de ser muy poco estable, de manera que la inmovilización es temporal. En el segundo caso, la fijación química, se utiliza glutaraldehído o resinas, pero existe la desventaja entre la interacción química de las células causando daños en su superficie y por lo tanto reduciendo drásticamente su viabilidad (Moreno, 2008).

1.2.7. Aguas Residuales Domésticas

Son aquellas aguas cuyas características originales han sido modificadas por actividades humanas y que por su calidad requieren un tratamiento previo, antes de ser reusadas, vertidas a un cuerpo natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado.

1.2.7.1. Clasificación

a. Aguas residuales domésticas

Son aquellas de origen residencial y comercial que contienen desechos fisiológicos, entre otros, provenientes de la actividad humana, y deben ser dispuestas adecuadamente.

b. Aguas residuales industriales

Son aquellas que resultan del desarrollo de un proceso productivo, incluyéndose a las provenientes de la actividad minera, agrícola, energética, agroindustrial, entre otras.

c. Aguas residuales municipales

Son aquellas aguas residuales domésticas que pueden estar mezcladas con aguas de drenaje pluvial o con aguas residuales de origen industrial previamente tratadas, para ser admitidas en los sistemas de alcantarillado de tipo combinado.

1.2.8. Cuenca del Río Huaura

Limita por el norte con las cuencas de los ríos Supe y Pativilca, por el sur con la cuenca del río Chancay, por el este con las cuencas de los ríos Marañón, Huallaga y Mantaro y por el oeste con el Océano Pacífico. Comprende 33 735 hectáreas de tierras cultivadas, y abarca todos los pisos ecológicos de 0 msnm (costa del Pacífico) hasta los 5 200 m.s.n.m. (planicies andinas). Su área de cuenca es de 5700 km². Véase en Apéndice 14.

El río Huaura tiene una longitud de aproximadamente 158,3 km, presentando una pendiente promedio de tres por ciento, y la capacidad máxima de captación del valle se estima en 40,68 m³/s, el caudal medio mensual del río Huaura es de 25,3 m³/s, mientras que para el río Chico de 1,8 m³/s (afluente más importante de las 15 existentes) (Autoridad Nacional del Agua [ANA], 2011).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Área de Estudio

Las cuatro muestras de agua para los ensayos de la presente investigación fueron colectadas cerca a la desembocadura del río Huaura, con las coordenadas UTM-WGS84 216130E 8774569N, como se muestra en la Figura 4. Este punto se encuentra en la provincia de Huaura, distrito de Huaura, y es donde se concentra la mayor cantidad de población de ese distrito.

Se realizó la colecta en ese punto por presentar tubos desaguadores que vierten aguas residuales domésticas de la ciudad sin un previo tratamiento, el punto se encuentra en la parte baja de la cuenca, a unos tres kilómetros de la desembocadura en el Pacífico.

Aguas abajo del punto de muestreo, en la zona de Carquín Chico las personas usan el agua del río para lavar y regar vegetales, así como para dar de beber sus animales de crianza doméstica.



Figura 4. Ubicación de la toma de muestra en el río Huaura a la altura del puente Huaura.

Fuente: Google Earth, 2016.

2.1.2. Descripción del Experimento

2.1.2.1. Cultivo y obtención de biomasa de *Chlorella vulgaris*

A partir de una cepa de *Chlorella vulgaris* donada por el laboratorio de microbiología de la Universidad Ricardo Palma. Antes de realizar la siembra de la cepa se desinfectó el ambiente para evitar que otros microorganismos estén presentes, posteriormente se procedió a masificar mediante cultivo batch y se empleó como medio de cultivo la solución hidropónica La Molina® siguiendo la proporción de 2,5 ml/l de solución A y 1 ml/l de solución B disuelta en agua destilada usando matraces debidamente esterilizados. El proceso de obtención de biomasa se muestra en la Figura 5.

Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivo para realizar un conteo celular mediante la cámara de Neubauer, hasta obtener la concentración celular de $1,4 \times 10^7$ células/ml, siendo esta concentración la más usada en investigaciones similares. Así mismo, con los datos obtenidos se realizó la curva de crecimiento para estimar la tasa de crecimiento exponencial a la que alcanza dicha concentración celular.

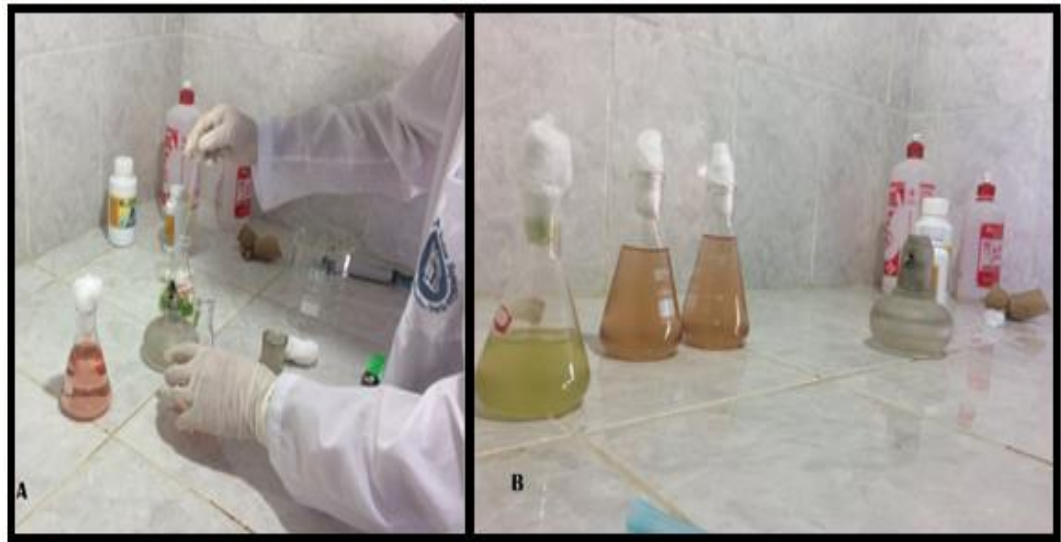


Figura 5. A: Inoculación de la cepa de la microalga *Chlorella vulgaris* al medio con solución hidropónica. B: Cepa ya inoculada en los frascos Erlenmeyer.

2.1.2.2. Cinética de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*

El crecimiento poblacional de la microalga *C. vulgaris* se estimó mediante el conteo de las células cada 24h y durante quince días. Se determinó la cinética de crecimiento de la microalga colocando una alícuota de cultivo en la cámara de conteo de Neubauer como se observa en la Figura 6. Con los datos obtenidos se realizó una curva de crecimiento y se determinó los parámetros cinéticos: tasa máxima de crecimiento durante la fase exponencial, tiempo de aplicación y capacidad de carga (Sánchez, 2014).

Tasa de crecimiento continuo: para la estimación de la tasa de crecimiento se usó la siguiente fórmula:

$$\ln N_t = a + bt$$

Donde:

$$a = \ln N_0$$

$$b = r$$

Que es el equivalente a la siguiente ecuación:

$$N_t = N_0 e^{\mu t}$$

Donde:

N_t = Población final

N_0 = Población inicial

e = Constante neperiano

μ = Tasa de crecimiento exponencial

T = Tiempo

Tiempo de duplicación (T)

$$T = \frac{\ln(2)}{r}$$

Donde r : tasa de crecimiento exponencial.

Ecuación logística:

$$N_t = \frac{K}{1 - \left(1 - \frac{K}{N_0}\right) e^{-ut}}$$

Dónde:

N_t = Población en el tiempo t

μ_{max} = Tasa máxima de crecimiento

K = Capacidad de carga del cultivo.

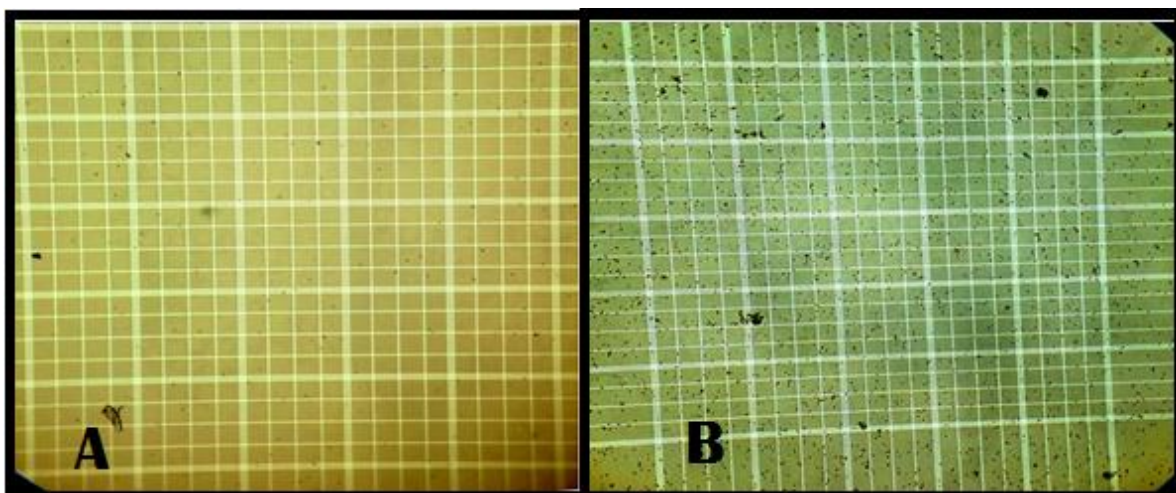


Figura 6. A: Cuadrantes de la cámara de Neubauer con células de *C. vulgaris* al inicio del experimento con una concentración de $1,5 \times 10^5$. B: Cuadrantes de la cámara de Neubauer con células de *C. vulgaris* al día 15 con una concentración de $1,4 \times 10^7$ células /ml.

2.1.2.3. Construcción de los fotobiorreactores

Para la construcción de los soportes de los fotobiorreactores se usaron fracciones de tubos de policloruro de vinilo (PVC) de cuatro pulgadas, tal como se observa en la Figura 7. Los fotobiorreactores fueron construidos a partir de mangas de

polipropileno de alta densidad de cuatro micras de espesor debidamente selladas al calor.

Como fuente de luz se utilizó luces led de 72 W, como se observa en la Figura 7. Las luces se ubicaron en el centro del fotobiorreactor con una cubierta especial que evitó su contacto con el agua, y se incorporó un flujo de aire continuo generado por un aireador tipo *blower* para calcular la cantidad de aire suministrado, se realizó un experimento, el cual consistió en medir el desplazamiento del agua en cada una de las salidas de aire de las bombas, para ello se usó una probeta de 500 ml y un recipiente de 4 L, tanto la probeta como el recipiente se llenaron con agua, posteriormente la probeta fue invertida y se colocó dentro del recipiente, después se instaló una conexión de la manguerita a la bomba y se encendió para determinar la cantidad de aire desplazada de la probeta, y así obtener el flujo de aire que ingresaba a cada fotobiorreactor por unidad de tiempo en ml/min, posteriormente se hizo la conversión a L/h (Sánchez, 2014).

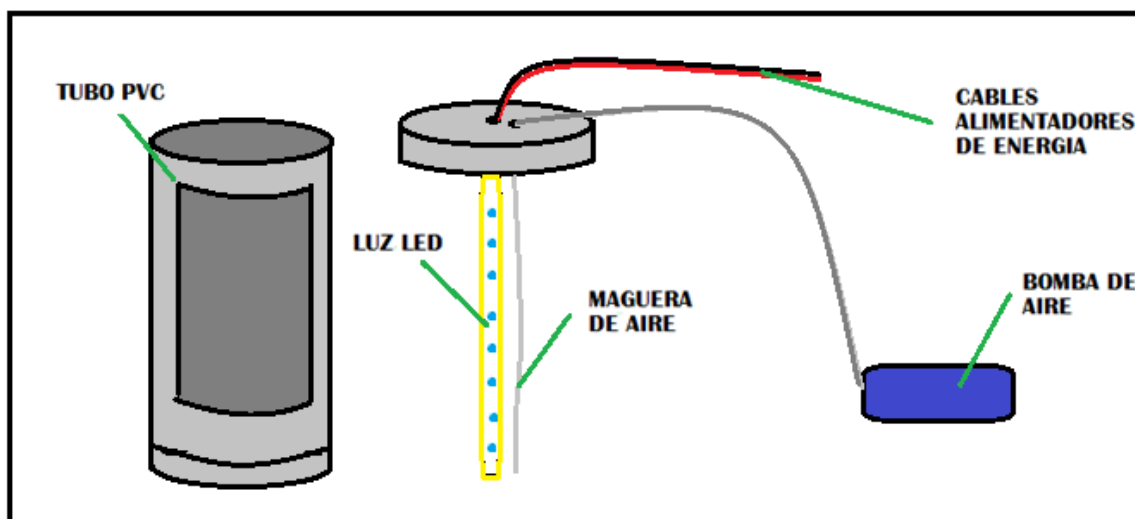


Figura 7. Componentes del fotobiorreactor. Estructura está formada por PVC, en su interior se encuentran luces led con la manguera conectada a una bomba de que suministra aire continuamente.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 8. Fotobiorreactor trabajando fase de prueba en la depuración de aguas residuales.

2.1.2.4. Toma de muestras de aguas residuales del río Huaura

Las cuatro muestras fueron tomadas del efluente de aguas residuales provenientes de la ciudad de Huaura, cuyas coordenadas son UTM-WGS84 216130E 8774569N; al llegar al punto de muestreo se procedió a realizar las siguientes acciones siguiendo el protocolo nacional de monitoreo de la calidad en cuerpos naturales de agua superficial (ANA, 2011).

Se tomó en cuenta las características del entorno al cuerpo de agua superficial, donde se observó la presencia de residuos, vegetación acuática, actividades humanas entre otros factores que podrían modificar las características naturales del medio ambiente. Posteriormente se tomó lectura de las coordenadas de ubicación del punto de monitoreo.

Para el acondicionamiento se prepararon los recipientes a utilizar en la toma de muestra, teniendo en cuenta los parámetros a evaluar.

Los equipos fueron calibrados antes del inicio del trabajo de campo. Posteriormente, se realizó la medición enjuagando los electrodos con la muestra del efluente, estando el equipo apagado. Luego se realizó la medición agitando ligeramente el electrodo, dejando que se estabilice para realizar la lectura de la medición.

Concluida la medición de los parámetros en campo, se realizó el lavado de los electrodos con agua destilada, paso seguido se secó y se guardó adecuadamente. Los recipientes usados para trasladar muestras del efluente no contenían preservantes. Luego de la toma de muestras se procedió al etiquetar y pasar las muestras a una caja térmica (*cooler*) a 4 °C para su posterior análisis en laboratorio.

Posteriormente las muestras colectadas fueron filtradas 2 veces con papel filtro (Rundfilter 125 mm) para asegurar la completa remoción de partículas en suspensión, esterilizados en autoclave en matraces Erlenmeyer de 300 ml para evitar el crecimiento de algún microorganismo presente y luego guardados a 4 °C hasta su uso.

2.1.2.5. Caracterización del agua residual del río Huaura

La caracterización del agua residual del río Huaura se realizó en dos fases, en el sitio de la colecta y en el laboratorio de la Facultad de Ingeniería Agraria de la

Universidad Católica Sedes Sapientiae-sede Huacho. Se determinaron los valores de los parámetros *in situ*: pH, conductividad y temperatura, para dicho procedimiento se empleó como instrumento de medición un multiparámetro YSI® 556 MPS. En el laboratorio se realizó la medición de los valores de los parámetros *ex situ*: nitrógeno total, fósforo total, plomo (II) con el uso del fotómetro pHotoFlex STD ®.

2.1.2.6. Medición de pH *in situ* del agua del río Huaura

Para la medición del pH se usó el potenciómetro de campo marca Hanna pHep 4 (HI 98127) Waterproof debidamente calibrado, tal como se observa en la Figura 9.

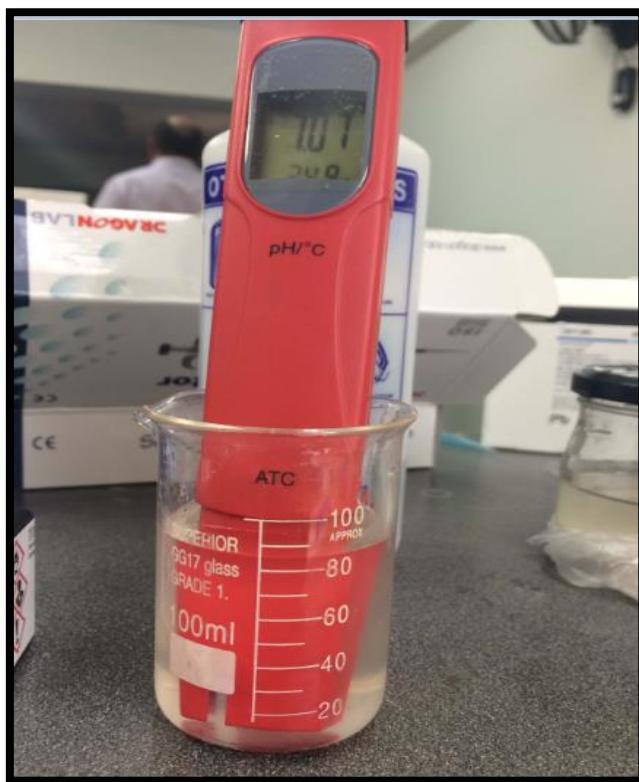


Figura 9. Medida del pH del agua residual recolectada del Río Huaura.

2.1.2.7. Medición *in situ* de la conductividad y temperatura del agua del río Huaura

Para la medición de la conductividad y temperatura se usó un multiparámetro YSI 556 MPS debidamente calibrado.

2.1.2.8. Preparación de los efluentes

Las muestras colectadas del efluente proveniente del desagadero en el río Huaura, fue filtrado dos veces con papel filtro (Rundfilter® 125 mm) para asegurar la completa remoción de partículas en suspensión.

Posteriormente las muestras fueron esterilizadas en una autoclave (temperatura de 121°C, 15 psi de presión, y durante 15 minutos) y contenidos en matraces Erlenmeyer de 300 ml, esto para evitar el crecimiento de algún microorganismo presente y luego guardados a una temperatura de cuatro grados centígrados para su posterior uso.

2.1.2.9. Inmovilización de las células de *Chlorella vulgaris* en alginato de sodio

Para la inmovilización se mezcló 100 mililitros (ml) de agua destilada en un beaker con cuatro gramos de alginato de sodio, como se muestra en la Figura 10. Posteriormente se calentó cuidadosamente la mezcla con la finalidad de disolver uniformemente el alginato hasta que perdió la apariencia grumosa, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente.

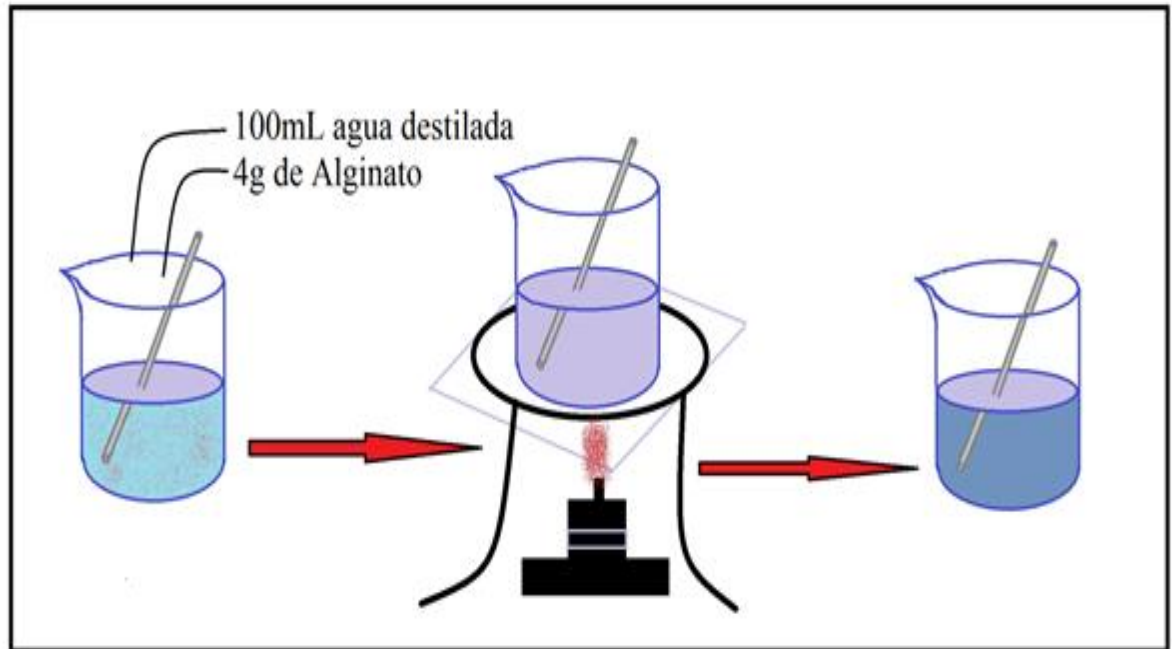


Figura 10. Homogenización de la mezcla de alginato de sodio en presencia de calor.

Fuente: Elaboración propia.

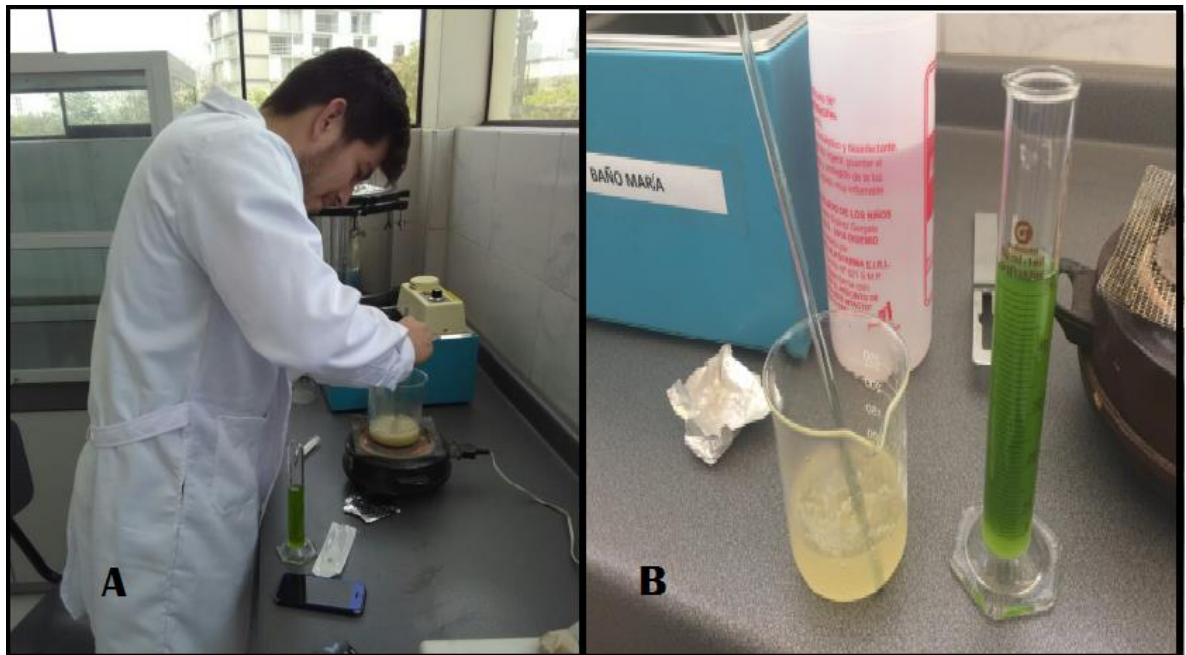


Figura 11. A: Preparación del alginato de sodio al cuatro por ciento. B: Incorporación de biomasa de *C. vulgaris* en una concentración de $1,4 \times 10^7$ al alginato de sodio en estado líquido.

Una vez que el alginato de sodio al cuatro por ciento se encontró a temperatura ambiente, se procedió a añadir 45 ml de un cultivo de la microalga *C. vulgaris*, en una concentración de 1×10^7 células/ml. Posteriormente esta mezcla se cargó en jeringas de una capacidad de 20 ml y se dejó caer gota a gota en una solución de cloruro de calcio (Cl_2Ca) 0,1 M, con la finalidad de obtener esferas como se muestra en la Figura 12.

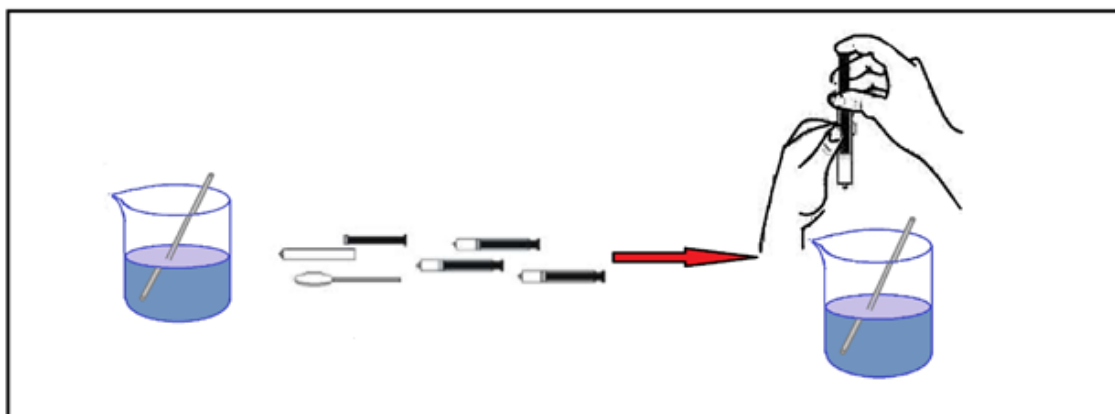


Figura 12. Procedimiento para la obtención de células de *C. vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato de sodio.

Fuente: Elaboración propia.



Figura 13. Microalgas inmovilizadas en esferas de alginato post enjuague con agua destilada para quitar trazas de cloruro de calcio.

2.1.2.10. Medición de Nitrógeno, fósforo y plomo

Cada semana se tomó una alícuota de 20 ml de los tratamientos, y se midió la concentración de NT, PO_4^{3-} y Pb, durante todo el periodo de experimentación. La medición de estos parámetros se realizó con la ayuda de un fotómetro WTW pFotoFlex ® y los resultados fueron expresados en mg/l. Con estos datos, se calculó el porcentaje de remoción según Aslan y Kapdan (2006). En el anexo 3 se detallan las fórmulas utilizadas para calcular dichos parámetros.



Figura 14. Fotómetro pFotoFlex WTW ®. Se muestran los resultados de parámetros de la muestra de agua tomados del Río. Resultado de Pb (plomo), A.2 resultado de N (Nitrógeno), A.3: resultado de P (Fósforo).

2.1.3. Tratamientos

Los tratamientos empleados se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6

Tratamientos experimentales. EA= 75 gramos de microalgas inmovilizadas en alginato de sodio

Tratamiento	EA + Dosis
T1	EA+100% AGUA RESIDUAL
T2	EA+50% AGUA RESIDUAL/50% AGUA DESIONIZADA
T3	EA+25% AGUA RESIDUAL/75% AGUA DESIONIZADA
T4	EA+12,5% AGUA RESIDUAL/87,5% AGUA DESIONIZADA
CONTROL	EA+100% AGUA DESIONIZADA

Fuente: Elaboración propia

Los tratamientos experimentales duraron 30 días, evaluándose cada siete días. Cada tratamiento y control tuvo dos replicas. El tratamiento control estuvo formado por 75 gramos de células de *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato de sodio más dos litros agua desionizada. El tratamiento uno contenía 75 gramos de células de *C. vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato más dos litros de agua residual proveniente del río Huaura. El tratamiento dos contenía 75 gramos de células de *C. vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato de sodio más una mezcla de un litro de agua residual del río Huara y un litro de agua desionizada. El tratamiento tres contenía 75 gramos de células de *C. vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato de sodio más una mezcla de un litro y medio de agua desionizada y medio litro de agua residual del río Huaura. El tratamiento cuatro contenía 75 gramos de células de *C. vulgaris* inmovilizadas en esferas de alginato de sodio más una mezcla de 1,75 litros de agua desionizada y 0,250 litros de agua residual del río Huaura. Todos los tratamientos y el control tuvieron una temperatura constante de

31±0,5 °C, mientras que la iluminación fue constante con un promedio de 4000 Lux, y un flujo de aireación constante de 38 l/h.



Figura 15. Fotobiorreactores encendidos. De izquierda a derecha T1,T2,T3,T4 y T Control.

La concentración de contaminantes en mg/l para cada tratamiento se detalla en la Tabla 7.

Tabla 7

Concentración de contaminantes por tratamiento

Tratamiento	N	P	Pb
T1	8,09	0,38	0,66
T2	4,04	0,20	0,33
T3	2,02	0,10	0,17
T4	1,01	0,09	0,08
CONTROL	0,00	0,00	0,00

Fuente: Elaboración propia

2.1.4. Unidades Experimentales

Las unidades experimentales fueron 15 (incluyendo el control) fotobiorreactores (ver Figura 16) de polietileno de alta densidad cuyo contenido fueron las mezclas de células de *Chlorella vulgaris* inmovilizados en esferas de alginato de sodio con agua residual del río Huaura y agua desionizada. Se detallan en la Tabla 6.



Figura 16. Unidades experimentales. Fotobiorreactores conteniendo células de *C. vulgaris* en esferas de alginato de sodio.

2.1.5. Análisis Estadístico de Datos

Los datos obtenidos fueron procesados en el programa Microsoft Excel, para obtener las tablas y gráficos que permitieron analizar la dinámica de los parámetros evaluados en el experimento.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza de una vía, para evaluar la diferencia entre los tratamientos ($p \leq 0,05$) y los parámetros (plomo, nitrógeno y fósforo). Las diferencias significativas entre los tratamientos y las repeticiones se realizaron con una Prueba de Significancia DVS (diferencia verdaderamente significativa) de tukey (Daniel, 1993).

2.2. MATERIALES

2.2.1. Material Biológico

El material biológico estuvo constituido por la cepa de *Chlorella vulgaris* donada por el Laboratorio de microbiología de la Universidad Ricardo Palma.



Figura 17. Replicación de la biomasa microalgal.

2.2.2. Materiales de Laboratorio

A. Materiales de vidrio

Cinco pipetas de 10 ml, diez frascos de Erlenmeyer de 500 ml, una cámara de Neubauer, un termómetro ambiental.

B. Materiales de plástico

Dos botellas de plástico de 2 L, dos botellas de plástico de 7 L, un tubo PVC 4” una probeta de 500 ml, 5 jeringas de 20 ml.

C. Equipos

Quince aireadores para pecera AP-408A, autoclave , un fotómetro WTW pHotoFlex, un microscopio, multiparámetro YSI® 556 MPS , GPS Garmin, una pistola de soldar ALMOS, una balanza, un multímetro.

D. Reactivos

Hipoclorito de sodio, decolorador líquido comercial para acuario, alginato de sodio, cloruro de calcio (CaCl_2), kit de determinación de nitrógeno, kit de determinación de fósforo, kit de determinación de plomo, solución hidropónica La Molina®.

E. Otros

Alambre de estaño, cables mellizos, luces led, sierra, transformador de voltaje, mangueras de pecera, filtro de 0,22 mm de fibra de vidrio, fluorescentes de 40 Watts , algodón , tubos eppendorf, papel kraft , papel aluminio, agua destilada, agua desionizada.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Obtención de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*

La cepa obtenida en la Universidad Ricardo Palma de la microalga *Chlorella vulgaris* se bioaumentó de manera exponencial sin tener una fase de adaptación (fase lag) en el medio de cultivo, de $1,5 \times 10^5$ células/ml a $1,4 \times 10^7$ células/ml en un tiempo de 15 días. Véase Figura 18.

Tabla 8

Parámetros cinéticos de crecimiento

<i>Chlorella vulgaris</i>		
	r (días ⁻¹)	0,56
Parámetros cinéticos de crecimiento	K (cel.ml ⁻¹)	$6,147 \times 10^3$
	T_2 (días)	3,29

Fuente: Elaboración propia

3.1.2. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el medio hidropónico

Se realizó la cinética de crecimiento de la cepa de *C. vulgaris* determinado los siguientes parámetros cinéticos: detallados en la Tabla 8.

La tasa de crecimiento exponencial (r) fue de 0,56, mientras que la capacidad de carga del cultivo (K) fue de $6,147 \times 10^3$ cel/ml y el tiempo de duplicación (T_2) dio

como resultado 3,29 días, y del gráfico se puede observar que el crecimiento de la microalga *C. vulgaris* muestra una fase exponencial con una duración de ocho días, cuyo inicio se da a partir desde el día uno. La gráfica de la curva de crecimiento muestra una alta correlación lineal ($R^2= 0,9858$) ver Figura 18.

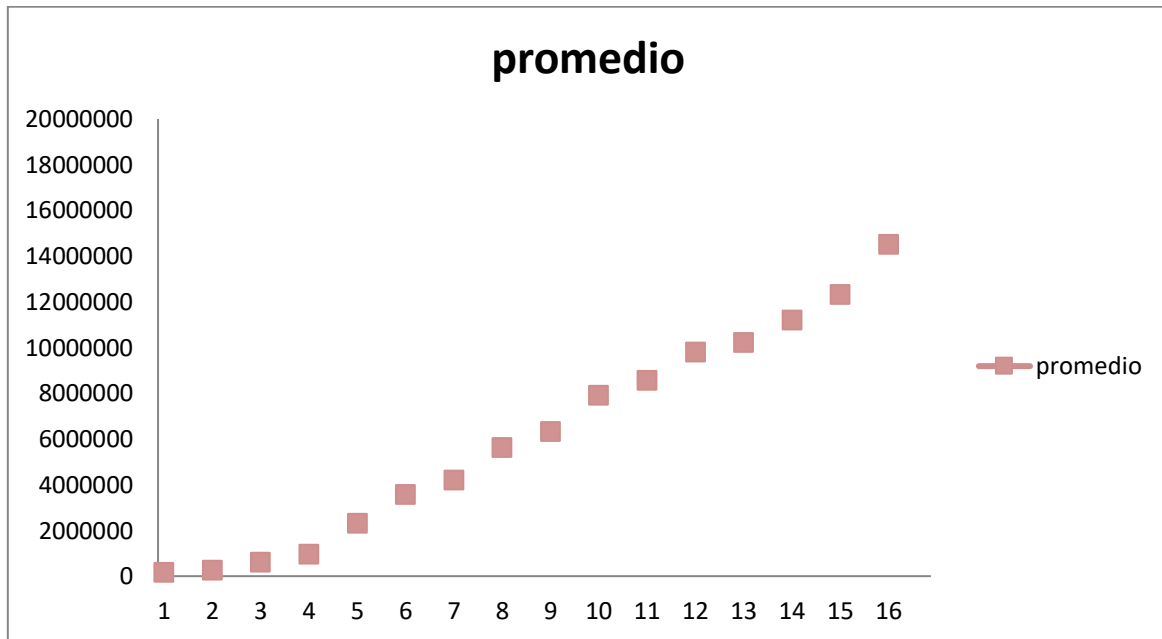


Figura 18. Curva de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en medio de cultivo alternativo basado en solución hidropónica la Molina A y B.

3.1.3. Caracterización fisicoquímica del agua residual del Río Huaura

Los valores fisicoquímicos que fueron obtenidos de las muestras colectadas del río Huaura se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9

Resultados fisicoquímicos

PARÁMETRO	UNIDAD	CANTIDAD
pH	-	7,8
Conductividad	($\mu\text{S}/\text{cm}^{-2}$)	740
Temperatura	($^{\circ}\text{C}$)	24
Nitrógeno	(mg/l)	8,09
Fósforo	(mg/l)	0,38
Plomo	(mg/l)	0,66

Fuente: Elaboración propia

3.1.4. Variación de la concentración de plomo

Se observó en la Tabla 10 que los valores de plomo iniciales para el control fue 0,00 mg/l manteniéndose constante durante todo el experimento a lo largo de 28 días. El tratamiento uno (T1) presentó una concentración inicial de $0,66 \pm 0,0001$ mg/l y se redujo significativamente hasta la semana 2 ($p < 0,05$), la semana tres y cuatro presentó una reducción no significativa ($p > 0,05$), el valor de la concentración final fue de $0,13 \pm 0,01$ mg/l en la semana cuatro. El tratamiento dos (T2) presentó una concentración inicial de $0,33 \pm 0,00$ mg/l. y una reducción significativa en la semana uno, dos y tres ($p < 0,05$), la semana cuatro presentó una reducción no significativa ($p = 0,288$) y una concentración final de $0,05 \pm 0,00$ mg/l. El tratamiento tres (T3) tuvo una concentración inicial de $0,17 \pm 0,0058$ mg/l con una reducción significativa en la semana uno, dos y tres ($p < 0,05$) la semana cuatro presentó una reducción no significativa ($p = 0,277$) con una concentración final de $0,06 \pm 0,0058$ mg/l. El tratamiento cuatro (T4) presentó una concentración inicial de $0,08 \pm 0,0058$ mg/l la primera semana presentó una reducción significativa ($p < 0,05$), las siguientes semanas se mantuvo constante la reducción ($p > 0,05$) la concentración final fue $0,04 \pm 0,0115$ mg/l en la semana cuatro; este último tratamiento fue el que presentó el menor valor de plomo en comparación con los otros tres tratamientos.

En la Figura 20 se observa la reducción de plomo en los cuatro tratamientos. Los valores iniciales y finales para plomo en los tratamientos T1, T2, T3 estuvieron por encima del valor máximo permitido según los estándares de calidad ambiental para agua, (D.S 004-2017-MINAM), mientras que la concentración final del T4 presentó un valor dentro del rango permitido por el ECA-Agua 0,05 mg/l.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que la reducción en la concentración de plomo presentó una influencia significativa en todas las semanas de todos los tratamientos ($p=0,000$) ver Apéndice 4.

Tabla 10

Variación en la concentración de plomo en los tratamientos ($\bar{X} \pm DS$)

semanas	T1	T2	T3	T4	CONTROL
Semana0	0,66±0,0000	0,33±0,0000	0,17±0,0058	0,08±0,0058	0,001±0,0000
Semana1	0,52±0,0100	0,31±0,0153	0,16±0,0100	0,07±0,0152	0,001±0,0000
Semana2	0,41±0,0208	0,25±0,0100	0,15±0,0058	0,07±0,0100	0,000±0,0000
Semana3	0,38±0,0252	0,28±0,0153	0,12±0,0100	0,06±0,0100	0,001±0,0000
Semana4	0,35±0,0100	0,11±0,0000	0,06±0,0058	0,04±0,0115	0,001±0,0000

Fuente: Elaboración propia

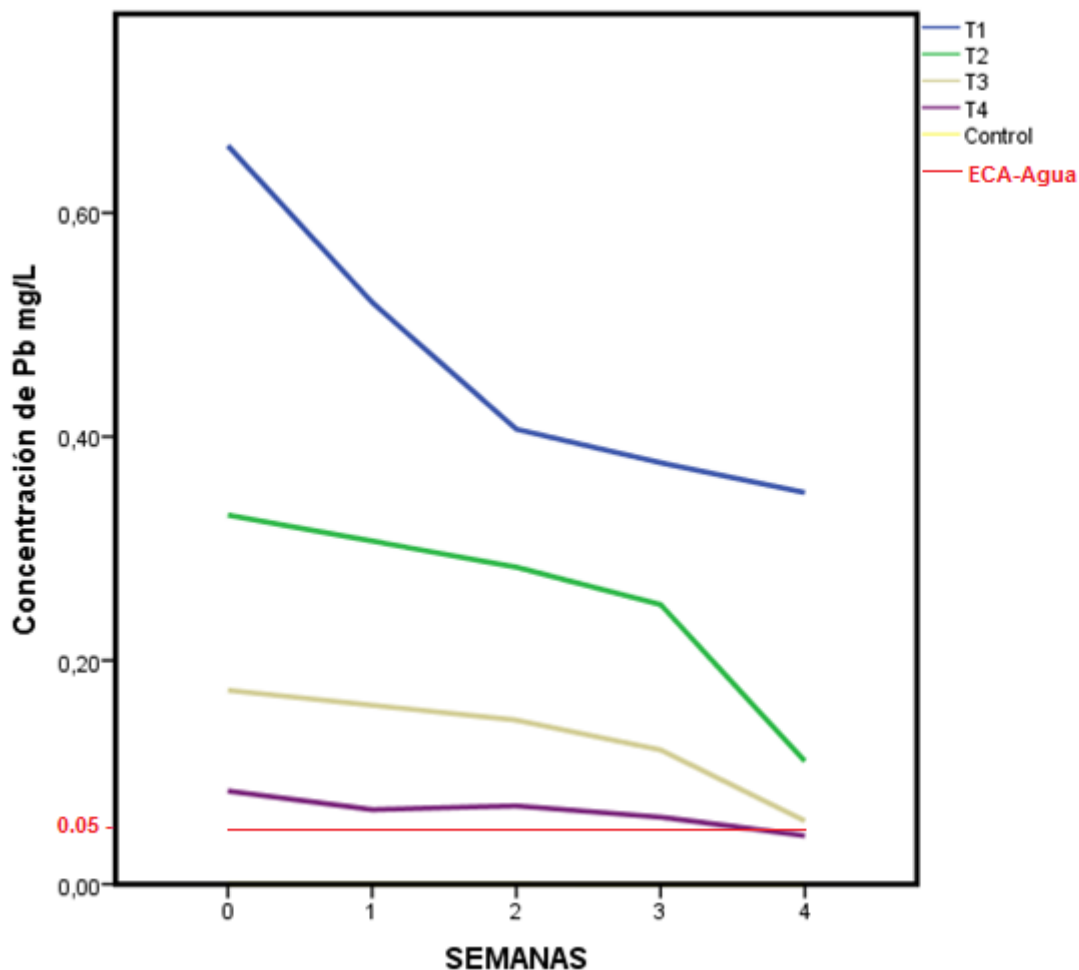


Figura 19. Concentración de Plomo en los tratamientos.

3.1.5. Variación de la concentración de nitrógeno total (NT)

Se observó en la Tabla 11 que los valores de nitrógeno total (NT) iniciales para el control fue $0,001 \pm 0,000$ mg/l manteniéndose constante durante todo el experimento a lo largo de 28 días. T1 presentó una concentración inicial de $8,09 \pm 0,0058$ mg/l con una reducción significativa durante las semanas uno, dos y tres ($p < 0,05$), en la semana cuatro la reducción no fue significativa ($p > 0,05$) y un valor final de $0,38 \pm 0,0058$ mg/l. T2 presentó una concentración inicial de $4,04 \pm 0,00$ mg/l. y una concentración final de $0,38 \pm 0,00$ mg/l en la semana cuatro, durante las cuatro semanas la reducción fue significativa ($p < 0,05$). T3 tuvo una concentración inicial de $2,02 \pm 0,0058$ mg/l y una concentración final de $0,41 \pm 0,0153$ mg/l en la

semana cuatro, durante las cuatro semanas la reducción fue significativa ($p < 0,05$). T4 presentó una concentración inicial de $1,02 \pm 0,01$ mg/l con una reducción significativa en la primera semana ($p < 0,05$), en las semanas dos, tres y cuatro presentó una reducción no significativa ($p > 0,05$) en la semana cuatro la concentración final de $0,38 \pm 0,0265$ mg/l.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que la reducción en la concentración de nitrógeno presentó una influencia significativa en todas las semanas de todo el tratamiento ($p = 0,000$) ver apéndice 6. En la Figura 20 se observa la reducción de nitrógeno en los cuatro tratamientos a lo largo de las cuatro semanas que duró el experimento.

Tabla 11

Variación en la concentración de nitrógeno en los tratamientos ($\bar{X} \pm DS$)

Semanas	T1	T2	T3	T4	CONTROL
Semana0	$8,09 \pm 0,0058$	$4,04 \pm 0,000$	$2,02 \pm 0,0058$	$1,02 \pm 0,0100$	$0,01 \pm 0,0058$
Semana1	$2,33 \pm 0,1528$	$1,93 \pm 0,0173$	$0,89 \pm 0,0200$	$0,47 \pm 0,0173$	$0,03 \pm 0,0100$
Semana2	$1,84 \pm 0,0173$	$1,64 \pm 0,0058$	$0,57 \pm 0,0153$	$0,44 \pm 0,0209$	$0,04 \pm 0,0115$
Semana3	$0,46 \pm 0,0231$	$0,42 \pm 0,0058$	$0,47 \pm 0,0153$	$0,41 \pm 0,0200$	$0,06 \pm 0,0153$
Semana4	$0,38 \pm 0,0058$	$0,38 \pm 0,0153$	$0,41 \pm 0,0153$	$0,38 \pm 0,0265$	$0,09 \pm 0,0100$

Fuente: Elaboración propia

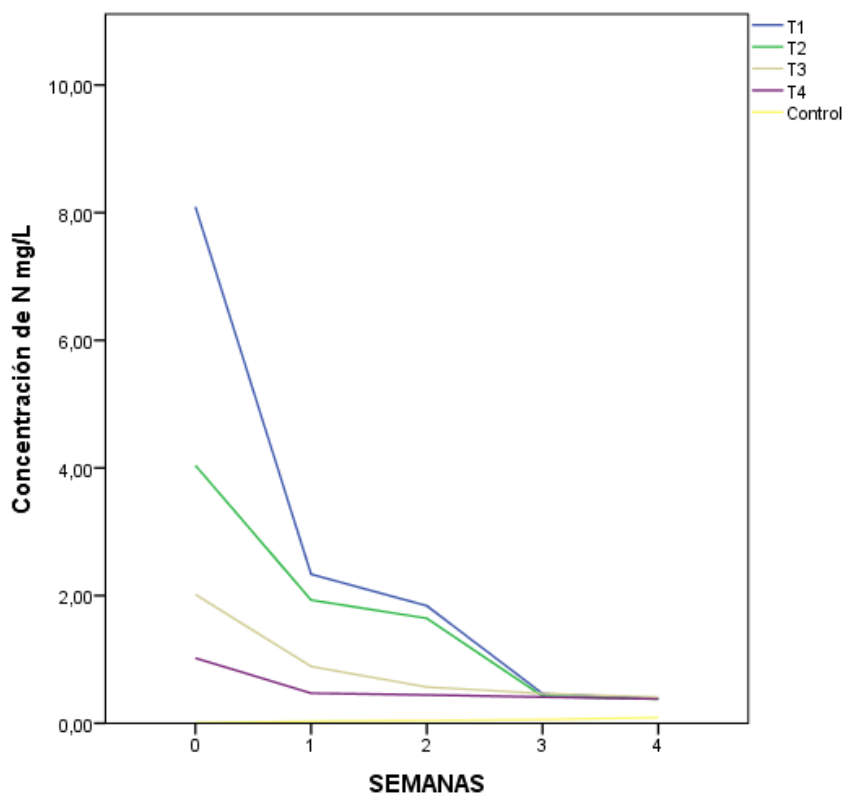


Figura 20. Concentración de Nitrógeno en los tratamientos.

3.1.6. Variación de la concentración de fósforo total (PT)

Se observó en la Tabla 12 que los valores de fósforo total (PT) iniciales para el control fue $0,001 \pm 0,0058$ mg/l y una concentración final de $0,07 \pm 0,0158$ mg/l. T1 presentó una concentración inicial de $0,38 \pm 0,0058$ mg/l y un valor final de $0,13 \pm 0,00153$ mg/l en la semana cuatro, durante las cuatro semanas la reducción fue significativa ($p < 0,05$). T2 presentó una concentración inicial de $0,20 \pm 0,0058$ mg/l. Las semanas uno, dos y tres la reducción no fue significativa ($p > 0,05$), la semana cuatro presentó una reducción significativa ($p < 0,05$) y una concentración final de $0,05 \pm 0,0058$ mg/l. T3 tuvo una concentración inicial de $0,11 \pm 0,01$ mg/l y una concentración final de $0,07 \pm 0,0058$ mg/l en la semana cuatro, durante las cuatro semanas de experimentación la reducción se mantuvo constante ($p > 0,05$). T4 presentó una concentración inicial de $0,08 \pm 0,0058$ mg/l y una concentración final de

0,04±0,01 mg/l en la semana cuatro, durante las cuatro semanas de experimentación la reducción se mantuvo constante ($p>0,05$).

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que la reducción en la concentración de fósforo presentó una influencia significativa en todas las semanas de todos los tratamientos ($p=0,000$) (ver apéndice 8). En la Figura 21 se observa la reducción de nitrógeno en los cuatro tratamientos a lo largo de las cuatro semanas que duró el experimento.

Tabla 12

Variación en la concentración de fósforo en los tratamientos ($\bar{x}\pm DS$)

Semanas	T1	T2	T3	T4	CONTROL
Semana0	0,38±0,0058	0,20±0,0058	0,11±0,0100	0,08±0,0058	0,002±0,0011
Semana1	0,33±0,0058	0,16±0,0058	0,09±0,0153	0,05±0,0100	0,03±0,0011
Semana2	0,26±0,0058	0,15±0,0058	0,08±0,0153	0,04±0,0058	0,04±0,0100
Semana3	0,17±0,0058	0,14±0,0173	0,08±0,0153	0,04±0,0100	0,05±0,0100
Semana4	0,13±0,0153	0,05±0,0058	0,07±0,0058	0,04±0,0153	0,07±0,0153

Fuente: Elaboración propia

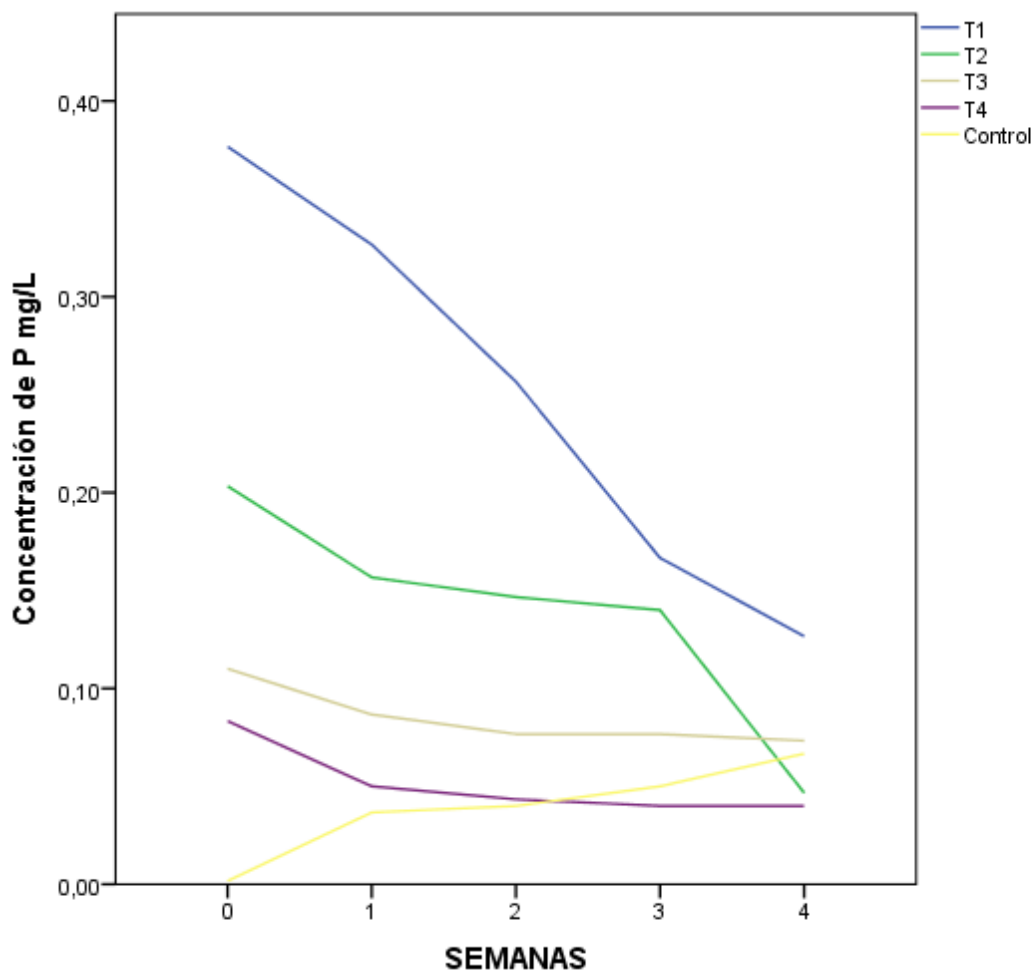


Figura 21. Concentración de Fósforo en los tratamientos.

3.1.7. Remoción de plomo por parte de la microalga inmovilizada *Chlorella vulgaris*

Para la medición de la remoción de plomo se tomaron semanalmente tres alícuotas de 10ml del efluente tratado con la microalga inmovilizada. En la primera semana se observó en T1 una remoción de $2,21 \pm 0,0115$ por ciento de Pb, en la segunda semana se incrementó a un $37,89 \pm 0,0252$ por ciento la remoción de plomo, la tercera y cuarta semana presentaron un ligero incremento de remoción llegando a un valor $46,67 \pm 0,0200$ por ciento, siendo el tratamiento con porcentaje de remoción más bajo, durante las cuatro semanas el porcentaje de remoción de plomo fue significativo ($p < 0,05$).

T2 mostró en su primera semana una remoción de plomo de $9,09 \pm 0,02$ por ciento, en la segunda semana y tercera semana tuvo un ligero incremento a un $24,24 \pm 0,1514$, para la cuarta semana aumentó hasta un $66,67 \pm 0,006$, siendo este tratamiento el que obtuvo el mayor porcentaje de remoción de plomo (véase Tabla 10) durante las cuatro semanas el porcentaje de remoción de plomo fue significativo ($p < 0,05$).

T3 tuvo una remoción de plomo muy baja de $5,89 \pm 0,0200$ por ciento, durante la segunda semana incremento el porcentaje de remoción a un $11,76 \pm 0,03$ por ciento, para la tercera semana llegó hasta un $29,4 \pm 0,3512$ por ciento de remoción, en la cuarta semana se observó un incremento hasta un $64,7 \pm 0,0231$ por ciento, durante las cuatro semanas el porcentaje de remoción de plomo fue significativo ($p < 0,05$).

En la primera semana T4 tuvo un porcentaje de remoción de $12,5 \pm 0,0462$, mientras que en la segunda semana este porcentaje no fue significativo ($p > 0,05$) y se mantuvo constante (ver Figura 22) para la tercera semana el porcentaje aumentó a un $25,01 \pm 0,0252$ por ciento, y para la cuarta semana duplicó ese porcentaje llegando a remover un $50,01 \pm 0,5400$ por ciento de plomo, desde la semana dos hasta la semana cuatro el porcentaje de remoción fue significativo ($p < 0,05$).

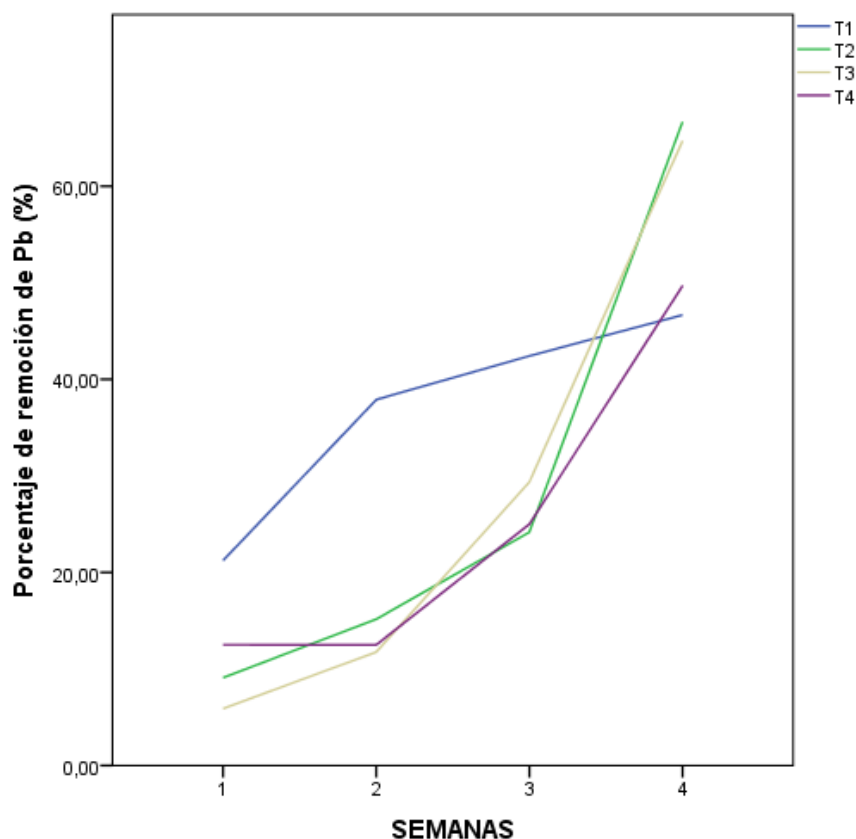


Figura 22. Porcentaje de remoción de Plomo.

3.1.8. Remoción de nitrógeno total por parte de la microalga inmovilizada *Chlorella vulgaris*

T1 la primera semana se observó un alto porcentaje de remoción de nitrógeno siendo de $71,19 \pm 0,0200$ por ciento, la segunda semana aumentó ligeramente a un $77,25 \pm 0,0100$ por ciento, en la tercera semana el porcentaje de remoción llegó a un $94,3 \pm 0,0200$ por ciento y para la cuarta semana este porcentaje se incrementó en uno por ciento llegando a un $95,3 \pm 0,0173$ por ciento, siendo este tratamiento el que obtuvo el mayor porcentaje de remoción (Ver Tabla 11).

Se observó en T2 que la remoción de nitrógeno para la primera semana fue de $52,2 \pm 0,0252$ por ciento. La segunda semana tuvo un ligero incremento a un

59,4±0,0200 por ciento, mientras que para la tercera semana se incrementó considerablemente a un 89,61±0,0208, sin embargo para la cuarta semana llegó hasta un 90,6±0,0300 por ciento.

T3 tuvo un porcentaje de remoción muy similar a T2 durante la primera semana teniendo un porcentaje de remoción de 55,95±0,0115 por ciento, en la segunda semana la remoción de nitrógeno llegó hasta un 71,78±0,0200 por ciento, la tercera semana se incrementó ligeramente hasta un 76,74±0,0100 por ciento, en la cuarta semana el porcentaje de remoción para este tratamiento llegó a un valor de 79,7±0,0100 por ciento.

En cuanto a T4, la primera semana alcanzó un porcentaje de remoción con valor de 53,91±0,0100 por ciento, la segunda semana se incrementó a un 56,96±0,0251 por ciento, para la tercera semana este valor aumentó a un 59,8±0,0300 por ciento, y la cuarta semana llegó a un valor de 62,75±0,0300 por ciento, siendo este tratamiento el que tuvo un menor porcentaje de remoción de nitrógeno total. El porcentaje de remoción de para todos los tratamientos fue significativo ($p < 0,05$).

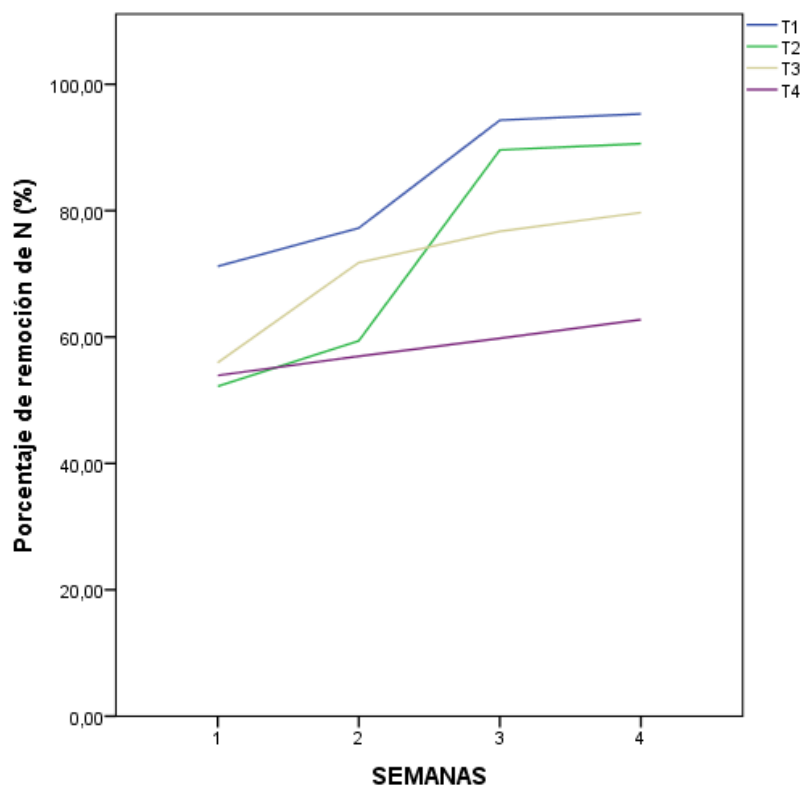


Figura 23. Porcentaje de remoción de Nitrógeno.

3.1.9. Remoción de fósforo total por parte de la microalga inmovilizada *Chlorella vulgaris*

En la primera semana T1 se observó el porcentaje de reducción de fósforo con un valor de $13,15 \pm 0,0208$ por ciento, en la segunda semana este valor se incrementó a un $31,58 \pm 0,0200$ por ciento, en la semana tres aumentó el porcentaje de reducción a un $55,26 \pm 0,0100$ por ciento y para la cuarta semana el porcentaje de reducción llegó a un valor de $65,79 \pm 0,0200$ por ciento.

T2 para la primera semana ya había removido un $20,01 \pm 0,0115$ por ciento de fósforo, la segunda semana amento ligeramente el porcentaje de remoción a un $25,00 \pm 0,0300$ por ciento, la tercera semana se incrementó a un valor de $35,01 \pm 0,0058$ por ciento, mientras que en la cuarta semana el porcentaje de

remoción aumentó considerablemente llegando a un valor de $80,00 \pm 0,0208$ por ciento, siendo este tratamiento el que obtuvo mayor porcentaje de remoción.

T3 la semana uno alcanzó una remoción de $18,18 \pm 0,0200$ por ciento, la segunda llegó a un valor de $27,27 \pm 0,0100$ por ciento y así se mantuvo hasta la tercera semana, mientras que la cuarta semana tuvo un incremento de remoción y llegó a un porcentaje de $36,37 \pm 0,0100$ por ciento, siendo este tratamiento el que tuvo menor porcentaje de remoción de fósforo.

T4 la primera semana obtuvo un porcentaje de remoción de $37,5 \pm 0,0153$ por ciento, la segunda semana se incrementó a un $50,00 \pm 0,000$ por ciento, y así se mantuvo hasta la semana cuatro.

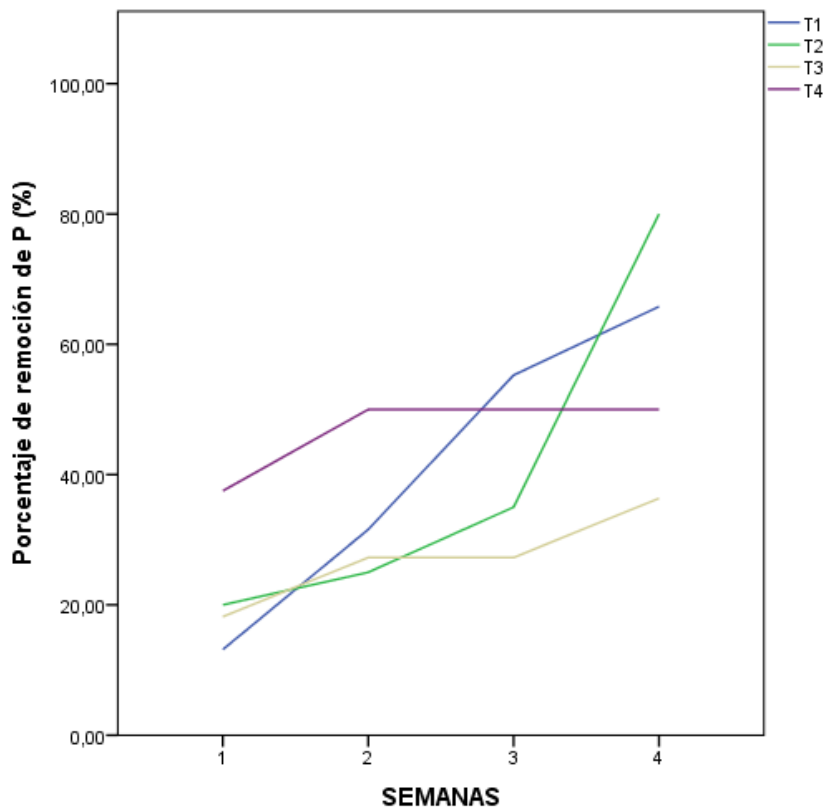


Figura 24. Porcentaje de remoción de Fósforo.

3.2. DISCUSIÓN

La presente investigación, es el primer estudio en el Perú en evaluar la remoción de plomo, nitrógeno total y fósforo total en aguas residuales, vertidas al río Huaura, mediante el uso de la microalga *Chlorella vulgaris*, inmovilizada en alginato de sodio. La microalga *C. vulgaris* es una especie acuática de gran adaptabilidad a ambientes con alta contaminación orgánica (Xiong et al., 2016).

El crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* en el medio de cultivo hidropónico La molina® (0,5 ml/l de solución A y 0,2 ml/l de solución B), resultaron ser eficientes en la obtención de biomasa algal, llegando a una capacidad de carga máxima (K) de $1,4 \times 10^7$ cel/ml en un periodo de 15 días. Estos resultados obtenidos en esta investigación son similares a los reportados por Ávila (2015) en Medio Basal Batch (MBB) con valores de $1,16 \times 10^7$ cel/ml. La microalga *Chlorella vulgaris* cultivada en solución hidropónica mostró una fase *lag* corta, a diferencia de Hun (2010), que mostró una fase *lag* de 9 días para la microalga del género *Chlamydomonas*, cultivadas en una solución nutritiva Hoagland & Arnon II modificada. Esta adaptación, mostrada en la investigación, por *Chlorella vulgaris*, puede deberse a la alta concentración de nutrientes iniciales presentes en la solución nutritiva La molina®, como lo describe Ávila (2015). La tasa de crecimiento exponencial (μ) de la microalga *Chlorella vulgaris* en esta investigación fue de un valor de 0,55; superior a la obtenida por Fierro (2004), quien obtuvo un valor de 0,275 y Valle (2007) 0,045, en sus tasas de crecimiento respectivas. La tasa alta de crecimiento, reportada en esta investigación, se puede deber a que el cultivo estuvo sometido a factores óptimos tales como: una iluminación continua, sin causar inhibición en la especie, disponibilidad de nutrientes y agitación constante; todos estos favorables para su desarrollo.

Actualmente se han desarrollado diversas investigaciones en inmovilización celular con alginato de sodio. Así Trevan y Mark (1988), realizaron inmovilizaciones de la especie *Chlorella vulgaris* en un soporte de alginato de sodio, y demostraron que dicha especie no sufrió variaciones en su tamaño, crecimiento y morfología; similares resultados presentaron Moreira et al. (2006) con la microalga *Phaeodactylum tricornutum*, en donde no se evidenció modificaciones de su estructura. En la presente investigación realizada con *Chlorella vulgaris*, tampoco se ha evidenciado variaciones morfológicas al ser sometidas a la inmovilización con alginato de sodio. Estos resultados confirman que el alginato de sodio es un buen soporte natural para inmovilizar cultivos de microalgas sin alterar sus morfo-fisiológicas.

T2 obtuvo una remoción del metal pesado plomo (Pb) presente en el agua residual proveniente del río Huaura, fue de $66,67 \pm 0,006$ por ciento, a una temperatura constante de $31,5 \text{ }^\circ\text{C}$ y un valor de pH de $7,8 - 8,0$ en la cuarta semana de experimentación. Similares resultados empleando la microalga *Lyngbya* sp., en estado libre, fueron reportados por Olgún, Vidal y Sánchez (2009), quienes obtuvieron un porcentaje de remoción de plomo con un valor de $62,41$ por ciento. Por su parte, Chulle y Villalobos (2016), lograron remociones de plomo de un $97,68$ por ciento, con la microalga *Scenedesmus acutus* en estado libre. Este alto porcentaje de remoción puede ser debido a que esta biomasa algal presentó una etapa de estimulación previa con el tóxico generando una mejor adaptación al plomo para su remoción. La microalga *Chlorella vulgaris*, presentó una remoción continua durante las cuatro semanas de experimentación, esto debido al proceso absorción propia del alga, y por la actividad captadora del alginato de sodio ya que este cuenta con grupos funcionales con elevada densidad electrónica, lo que permite una adsorción de iones metálicos.

Después del carbono, y aparte de hidrógeno y oxígeno, el nitrógeno es cuantitativamente el elemento más importante que contribuye a la materia seca de las células de microalgas, por lo que el estudio de la variación en su concentración es muy importante (Pérez, Sánchez y Jiménez, 2010). En la presente investigación la variación en la concentración de nitrógeno total (NT) en los tratamientos de la microalga *C. vulgaris*, fue de 62,75 por ciento para T4 y de 95,3 por ciento para T1, en un periodo de cuatro semanas que duró el experimento. Lee y Lee (2002) refiere que las microalgas pueden remover el nitrógeno, incluso sobre altas concentraciones en aguas naturales como eutrofizadas, hasta valores de 1400 ppm. En esta investigación la concentración de nitrógeno inicial tuvo un valor promedio de 8,0ppm reduciéndose hasta valores menores a 0,2 ppm, esta actividad refiere que la microalga realiza un consumo rápido del nitrógeno aprovechable como nutriente, donde pasa a formar parte de los aminoácidos para generar estructuras dentro de la célula algal (Pérez et al., 2010)

El valor de remoción más alto de nitrógeno en esta investigación fue de 95,3 por ciento mientras que Wang et al. (2010), usando *Chlorella sp.* para tratar distintos tipos de agua residual doméstica removi6 hasta 82,3 por ciento de NT en nueve días. Resultados muy similares obtuvo Hernández y Labbé (2014) quienes alcanzaron una remoción de amonio (NH_4^+) con un valor de 70 y 99 por ciento usando *C. vulgaris* y un cultivo mixto respectivamente; inmovilizado en lufa y sometido a una solución denominada Agua residual artificial. En la investigación, la diferencia entre las concentraciones de nitr6geno total al principio y al final del experimento podr6a corresponder al nitr6geno asimilado por las microalgas y las adsorbidas por las esferas de alginato de sodio.

El f6sforo es un ingrediente esencial en la conversi6n de energ6a solar a energ6a bioqu6mica en plantas y microalgas, se entiende que juega un papel importante como parte del mecanismo de donador de electrones en la fotos6ntesis (Patel et al., 2012).

En esta investigación el porcentaje de remoción de la microalga *Chlorella vulgaris* fue de 80 por ciento en la cuarta semana, el consumo elevado de este nutriente también se encontró en otra alga verde, *Botryococcus braunii*, cuando se cultivó en aguas residuales tratadas secundariamente (Sawayama, Minowa y Yokoyama, 1992). Se tiene conocimiento que un número de algas puede ser capaz de absorber rápidamente fosfato y este exceso de fosfato se almacena generalmente como gránulos de polifosfato; el fosfato acumulado en un efluente rico en fosfato puede sostener de forma exitosa el crecimiento microalgal cuando el fosfato extracelular es muy bajo o está agotado (Wang, Yu, Lv y Yang, 2013).

La remoción de fósforo total de nuestra investigación fue similar a la alta remoción obtenida por Wang et al. (2013), quienes reportaron un promedio de remoción de 80 por ciento en aguas residuales municipales.

Esta reducción de fósforo en el efluente analizado no fue un factor limitante para el crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, similares resultados fueron reportados por Li, Hu y Yang (2010), quienes encontraron a la microalga *Scenedesmus* sp. un alto crecimiento con concentraciones bajas de fósforo.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

1. La cepa de la microalga *Chlorella vulgaris* obtenida de la Universidad Ricardo Palma aumentó su densidad en el medio de solución hidropónica “La Molina” desde una concentración de $1,5 \times 10^5$ cel/ml a $1,4 \times 10^7$ cel/ml en 15 días, presentando un crecimiento exponencial.
2. La muestra de agua analizada del río Huaura, presenta contaminación de Plomo (Pb), superando los ECA's para aguas plasmados en la Categoría 3.
3. La microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada en alginato presentó una remoción de plomo promedio de 57,1 por ciento, teniendo el mayor porcentaje en el tratamiento 2 con un 66 por ciento y el mínimo en el tratamiento 1 con un 47 por ciento.
4. La microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada en alginato es eficaz depurando el nitrógeno de aguas residuales, pues redujo en todos los tratamientos la concentración de nitrógeno hasta ser menor a 0,5mg/l.
5. La microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada en alginato es eficaz en la reducción de la concentración de fósforo en aguas residuales, el mayor porcentaje de remoción se dio en el tratamiento dos con un 80 por ciento, esta reducción de nutrientes no fue un factor limitante para el crecimiento de *Chlorella vulgaris*.
6. La inmovilización en esferas de alginato facilita la técnica de separación de las microalgas del agua residual doméstica.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

- Evaluar la remoción de plomo con otro tipo de microalgas o probar con consorcios microalgales.
- Evaluar usar microalgas nativas de aguas residuales que contengan altas concentraciones de plomo.
- Usar otro tipo de matrices inmovilizadora para evaluar su cual es más óptima en el proceso de remoción.
- Se recomienda evaluar otros parámetros pH, DBO, nitratos, nitritos, ortofosfatos.
- Experimentar con distintas densidades de población microalgal, para evaluar la remoción de nutrientes y metales pesados, buscando un organismo promisorio que aproveche niveles altos de nutrientes presentes en efluentes, beneficiando el tratamiento de aguas residuales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón, O. (2009). Los elementos traza. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa*. 4(3), 107-124.
- Alfonso, E. y Leal, S. (1999). *Creación y mantenimiento de un cepario de microalgas*. La Habana.
- Álvarez, M. y Gallardo, T. (1989). Dinámica temporal de las microalgas de un tratamiento terciario de aguas residuales urbanas a escala de laboratorio. *Botanica Complutensis*. 14, 65-74.
- Aslan, S. y Kapdan, I.(2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol. Eng.* 28, 64–70.
- Ávila, J. G. J. (2015). *Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales*. (Tesis de grado). Universidad Ricardo Palma, Lima, Perú.
- Autoridad Nacional del Agua (2011). *Protocolo Nacional de la Calidad en Cuerpos Naturales de Agua Superficial*. Lima.
- Bajguz, A. (2000). Blockade of heavy metals accumulation in *Chlorella vulgaris* cells by 24-epibrassinolide. *Plant Physiol Biochem.* 38, 797–801.
- Bajguz, A. (2010). Suppression of *Chlorella vulgaris* Growth by Cadmium, Lead, and Copper Stress and Its Restoration by Endogenous Brassinolide. *Arch Environ Contam Toxicol* 60, 406–416.
- Bajguz, A. (2000). Effect of brassinosteroid on nucleic acids and protein content in cultured cells of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol Biochem.* 38, 209–15.
- Beyerinck, M. (1890). culturvesuche mit Zoochorellen, Lichenegonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung*.
- Brenan, M. (2010). Biofuels from microalgae. *Renewable and sustainable Energy*.
- Castro, R. y Villamizar, C. (2012). Evaluacion De Materiales Co-Inmovilizantes Para El Crecimiento De *Chlorella Vulgaris* UTEX 1803 En Aguas Residuales Industriales. *Revista Centro Azúcar* . 41, 75-85.

- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. y Morales, E. (2004). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO en aguas residuales urbanas del Maracaibo, Venezuela. *J. Plant Physiol.* 307-313.
- Chakraborty, N., Banerjee, A. & Pal, R. (2010). Accumulation of lead by free and immobilized cyanobacteria with special reference to accumulation factor and recovery. *Bioresource Technology.* 102 (5), 4191-4195.
- Chen, W., Sommerfeld, M. & Hu, Q. (2011). Microwave-assisted nilered method for in vivo quantification of neutral lipids in microalgae. *Bioresour Technol.* 102, 135–141.
- Chronakis, S., Galatanu, N., Nylander, T. & Lindman, B. (2000). The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/wáter interface. *ColloidSurfA.* 173, 181–192.
- Chulle, V. y Villalobos, P. (2016). Remoción de metales pesados (mercurio y plomo) de soluciones acuosas sintéticas a diferentes concentraciones utilizando la microalga dulceacuícola *Scenedesmus acutus*. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo. Recuperado de http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPRG_e3868531cdae3b3f95717dc82f8fac5a/Details
- Cortés, A., Sánchez, S. y Bartolome, C. (2017). Mecanismos de resistencia a metales tóxicos (Cd) bajo variaciones abióticas en microalgas. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas.* 21 (1), 40-52.
- De Philippis, R., Paperi, R., Sili, C. & Vincenzini, M. (2003). Assessment of the metal removal capability of two capsulated cyanobacteria *Cyanospira capsulata* and *Nostoc PCC7936*. *J. Appl. Phycol.* 13, 293–299.
- De-Bashan, L. & Bashan, Y.(2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101 (6), 1611-1627.
- Delgadillo, I. (2014). Respuestas biológicas de *Scenedesmus ovalternus* y *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato de calcio, ante diferentes concentraciones de nutrientes en condiciones de laboratorio. Bogota.
- Environmental Law Alliance Worldwide (2010). *Guía para Evaluar EIAs de Proyectos Mineros*. Eugene: USA.

- Fajardo, R., Osuna, J., Villa, P., Minakata, E. y Ibarra, I. (2011). Inmovilización de células y Enzimas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahila*. 3 (6), 42-56.
- Fayed, S., Abdel-Shafy, H. & Khalifa, N. (1983). Accumulation of Cu, Zn, Cd, and Pb by *Scenedesmus obliquus* under nongrowth conditions. *Enviromental Internationa*. 9, 409-414.
- Fierro, S. (2004). *Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes de efluentes de cultivos agrícolas*. (Tesis de Maestría). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México.
- García, J. (2011). *Microalgas: ¿Por Qué Toleran Tanto Cu?* . Mexico.
- Gong, R., Ding, Y., Liu, H., Chen, Q. & Liu, Z. (2005). Lead biosorption and desorption bay intact and preteated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere* 58, 125-130.
- Gonzalez, L., Cañizares, R. & Baena, S.(1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. 259–262.
- Gonzales, G. (2009). *Estabilidad e intercambio de iones calcio en geles de alginato*. Instituto Tecnológico de Durango.
- Harte, J., Holden, C., Scheneider, R. & Shirey, C. (1991). *Toxics A to Z. A guide to everyday pollution hazards*. Univ. of California Press.
- Hameed, A. (2006). Continuous removal and recovery of lead by alginate beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*, 5 (19), 1819-1823.
- Hernández, A. & Labbé, J. (2014). Microalgas, Cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49 (2), 157-173.
- Hernández, B., Rodríguez, M., Lozano, C. y Castilla, P. (2010). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libre e inmovilizados. *Latinoamerica Biotecnol Amb Algal*, 80-94.
- Hoffman, J. (1998). Wastewater Treatment with suspended and nonsuspended algae. *J. Phycol.* 34, 757-763.

- Hutchisona, A., Schwab, M. & Banks, M. (2001). Phytoremediation of aged petroleum sludge. Effect of irrigation techniques. *Journal of Environmental Quality*.
- Incharoensakdi, A., & Kitjahn, P. (1998). Removal of lead from aqueous solution by filamentous cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *J Sci Res Chula Univ*. 23, 38-44.
- Infante, C., Angulo, E., Zarate, A., Flores, J., Barrios, F. y Cindy, Z. (2012). Propagación De La Microalga *Chlorella* sp. En Cultivo Por Lote: Cinética Del Crecimiento Celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 159-164.
- Infante, C., León, I., Florez, J., Zárate, A., Barrios, F. & Zapata, C. (2013). Removal of ammonium and phosphate ions from wastewater samples by immobilized *Chlorella* sp. *Int. J. Environ. Stud*. 1-7.
- Inthorn, D., Nalin, S., Suthep, S. & Aran, I. (2001). Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae. *ScienceAsia* 28, 253-261
- Kitada, K., Machmudah, S., Sasaki, M., Goto, M., Nakashima, Y. & Kumamoto, S. (2009). Supercritical CO₂ extraction of pigment components with pharmaceutical importance from *Chlorella vulgaris*. *J Chem Technol Biotechnol*. 84: 657–61.
- Kitjahn, P. & Incharoensakdi, A. (1992). Factors affecting the accumulation of lead by *Aphanothece halophytica*. *J Sci Chula* 17, 141-7.
- Kong, Q., Li, L., Martinez, B., Chen, P. y Ruan, R. (2010). Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. *Appl. Biochem*.
- Kothari, R., Prasad, R., Kumar, V. & Singh, D. (2013). Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. *Bioresource Technol*. 499-503.
- Lau, P., Tam, N. y Wong, Y. (1998). Effect on carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol*, 115- 121.
- Lee, K. & Lee, C. (2001). Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae.
- Lee, K. & Lee, C. (2002). Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. *J. Microbiol. Biotechnol*. 12, 979-985.
- Les, A. & Walker, R. (1984). Toxicity and binding of copper, zinc and cadmium by the blue-green alga, *Chroococcus parisi*. *Water Air Soil Pollut*. 23, 129-39.

- Liu, Z., Wang, G. & Zhou, B. (2008). Effect of iron on growth and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol.* 99 (11), 4717-4722.
- Li, X., Hu, Y. & Yang, J. (2010). Lipid accumulation and nutrient removal properties of newly isolated freshwater microalga, *Scenedesmus* sp. LX1, growing in secondary effluent. *New biotechnol.* 27, 59-63.
- Lovley, D. (2003). Cleaning up with genomics: applying molecular biology to bioremediation. *Nature Reviews. Microbiology.* 1 (1): 35-44.
- Lupo, B., Gonzáles, C. y Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev. Venez. Cienc. Technol. Aliment.* 3 (1), 130-151.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals*, 15 (9), 377-390.
- Markou, G. & Gergakakis, D. (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Appl. Energy*, 88 (10), 3389-3401.
- Martínez, F., Ascaso, C. & Orús, M. (1991). Morphometric and stereological analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Ann Bot.* 67, 239-245.
- Mata, T., Martins, A. & Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: review. *Renew Sustain Energy Rev.* 14, 217-232.
- Medina, M., Gutzeit, G. y Neis, U. (2014). biomasa bacterio-algal: una alternativa para el mejoramiento de sistemas naturales de tratamiento de agua. Hamburgo.
- Molina, E. (1996). A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition in dense microalgal cultures taking into account incident and averaged irradiances. *Journal of Biotechnology*, 45 (1), 59-69.
- Moreno, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *In Bioresource Technology.* 99 (10), 3949-3964.
- Moreira, S., Moreira, M., Guilhermino, L. & Ribeiro, R. (2006). Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and Microbial Technology.* 38(1-2), 135-141.

- Morris, H., Almarales, A., Carrillo, O. & Bermudez, C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour Technol.* 99, 7723–7729.
- Nourollah, M., Ehsan, M. & Omidvar, F. (2014). Biosorption of Cd and Pb ions from aqueous solutions by biomass of the green microalga, *Scenedesmus quadricauda*. Springer Science+Business Media Dordrecht.
- Olguín, J., Vidal, M. y Sánchez, G. (2009). Remoción de plomo con microalgas rizosféricas (*Lyngbya* sp.) DE *Salvinia minima*. Instituto de Ecología A.C., Unidad de Biotecnología Ambiental.
- Pellon, A., Benitez, F., Frades, J., Garcia, L., Cerpa, A., y Alguacil, F. (2003). Empleo de microalga *Scenemus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Revista de Metalurgia.* 39 (1), 9-16.
- Pérez, C., Sánchez, P. & Jiménez, M. (2010). Utilization of immobilized benthic algal species for N and P removal. *J. Appl. Phycol.* 22, 277-282.
- Piña, R. (2014). Determinación de la Capacidad de Remoción de Cadmio in vitro de la microalga *Chlamydomonas reinhardtii* con potencial para la biorremediación de sitios naturales impactados . San Luis Potosí.
- Pizarro, R. (2012). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* cultivada en aguas residuales generadas en la producción de *Seriola lalandi*. Antofagasta: Universidad de Antofagasta.
- Real Academia Española (2014). *Diccionario de la lengua española* (23 ed.). Madrid, España: Espasa.
- Richmond, A. (1986). Microalgaculture. In *CRC, Critical Reviews in Biotechnology.* 4, 369-438.
- Rodolfi, L., & Zittelli, G. (2009). Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering.*
- Ruiz, A. (2011). *Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente.* (Tesis de Maestría). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.

- Ruiz, A., Mendoza, L. & Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technol.* 101, 58–64.
- Sánchez, E., Garza, M., Almaguer, V., Sáenz, I. & Liñán, A. (2008). Estudio cinético e isotermas de adsorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa del alga *Chlorella* sp. inmovilizada. *Ciencia UNAL*: 11(2), 168-176.
- Santos, A., Gonzales, Y., y Martín, C. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. *Anales de mecánica y electricidad*, 91 (1), 20-28.
- Sawayama, S., Minowa, T. & Yokoyama, S. (1992). Growth of the hydrocarbon-rich microalga *Botryococcus braunii* in secondarily treated sewage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 135-138.
- Shanab, S., Ashraf, E. & Emad, S. (2012). Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling & Behavior*. 7(3), 1–8.
- Shehata, F., & Whitton, B. (1982). Zinc tolerance in strains of blue-green alga *Anacystis nidulans*. *Br Phycol J.* 17, 5-12.
- Shi, J., Podola, B. & Melkonian, M. (2014). Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. *Bioresour. Technol.* 154, 260-266.
- Solomon, E., Berg, L. & Martin, D. (1999). *Biology*. 5th ed.. Fort Worth: Saunders College Publishing.
- Stephens, P. & Ross, L. (2010). Future prospects of microalgal biofuels production systems. *En Trends in plant.* 10, 554-564.
- Trevan, M. & Mak, A. (1988). Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* 6, 68-73.
- Valle, G. A. (2007). *Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas*. (Tesis de Maestría), Centro de Investigación Científica de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, México.
- Van den Hoek, C., Mann, D. & Jahns, H. (1995). *Algae: an introduction to phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.

- Vinatea, L. (1999). Aquicultura e desenvolvimento sustentavel, Subsidios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aquicultura brasileira. Editora UFSC Brasil.
- Wang, C., Yu, X., Lv, H. & Yang, J.(2013). Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. *J. Environ. Biol.* 34, 421-425.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y. & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol.* 162(4), 1174-1186.
- Xiong, J., Kurade, M., Kim, J., Roh, H. & Jeon, B. (2017). Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *J Hazard Mater.* 323, 212-219.
- Yamamoto, M., Fujishita, M., Hirata, A. & Kawano, S. (2004). Regeneration and maturation of daughter cell Wall sin the autospore-forming Green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta,Trebouxiophyceae). *JPlantRes.* 117, 257–64.
- Yang, C., Ding, Z. & Zhang, K. (2008). Growth of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from cassava ethanol fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 2919-2925.
- Zamani, N., Noshadi, M., Amin, S., Niazi, A. & Ghasemi, Y.(2012). Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. *J. Appl. Phycol.* 649-656.
- Zar, J.(1996). *Biostatistical analysis*. New Yersey, Prentice-Hall, Inc.,3rded, 662p.
- Zhang, E., Wang, B., Ning, S., Sun, H., Yang, B., Jin, M. & Hou, L.(2012). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Afr. J. Biotechnol.* 11 (24), 6529-6534.

TERMINOLOGÍA

Algas: Grupo de plantas talofitas, unicelulares o pluricelulares, que viven preferentemente en el agua, tanto dulce como marina, y que en general están provistas de clorofila, acompañada en ocasiones de otros pigmentos de colores variados que enmascaran a esta; el talo de las algas pluricelulares tiene forma de filamento, de cinta o de lámina y puede ser ramificado (Real Academia Española, 2014).

Biorremediación: Se define como biorremediación a cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural. La biorremediación puede ser empleada para atacar contaminantes específicos del suelo, por ejemplo, en la degradación bacteriana de compuestos organoclorados o de hidrocarburos (lovley, 2003).

Contaminación: Acción de introducir sustancias perjudiciales (o cantidades excesivas de sustancias usualmente no peligrosas) al ambiente, causando impactos ambientales negativos (Environmental Law Alliance Worldwide [ELAW], 2010).

Drenaje ácido de mina (DAM): es el flujo saliente de agua ácida de las minas metalíferas. Después de ser expuestas al aire y al agua, la oxidación de los metales sulfurosos (usualmente piritita, que es un sulfuro de hierro) dentro de las rocas que lo rodean y el desmonte, generan acidez (ELAW, 2010).

Efluente: La descarga de un contaminante líquido desde una instalación o proceso industrial (también llamado desecho o residuo líquido) (ELAW, 2010).

Elemento traza: Los elementos traza u oligoelementos son aquellos elementos que, aunque presentes en cantidades muy pequeñas, en los tejidos corporales, son nutrientes esenciales por desempeñar una serie de funciones indispensables para mantener la vida (Alarcón, 2009).

Fitorremediación: La fitorremediación es la descontaminación de los suelos, la depuración de las aguas residuales o la limpieza del aire interior, usando plantas vasculares, algas (fitorremediación) u hongos (micorremediación), y por extensión ecosistemas que contienen estas plantas. Así pues, se trata de eliminar o controlar las diversas contaminaciones. La degradación de compuestos dañinos se acelera mediante la actividad de algunos microorganismos (Hutchisona, Schwab y Banks, 2001).

Inmovilización celular: El término inmovilización de células y enzimas se refiere a células y enzimas físicamente confinadas o localizadas en una cierta región definida en el espacio reteniendo sus propiedades y actividades catalíticas. Asimismo, dependiendo del tipo de inmovilización tanto las células como las enzimas pueden ser inmovilizadas de forma permanente o temporal para ser utilizadas repetida y continuamente en diversos procesos químicos (Fajardo et al., 2011).

Metales pesados: son aquellos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua. Tienen aplicación directa en numerosos procesos de producción de bienes y servicios. Los más importantes son: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Zinc (Zn) (Harte, Holden, Scheneider y Shirey, 1991).

Metales tóxicos: son aquellos cuya concentración en el ambiente puede causar daños en la salud de las personas. Los términos metales pesados y metales tóxicos se usan como sinónimos pero sólo algunos de ellos pertenecen a ambos grupos (Harte et al., 1991).

APÉNDICES

APÉNDICE 1

FÓRMULA PARA EL CÁLCULO DE PARÁMETROS DE REMOCIÓN DE N-NO₃ Y PO₄³⁻ (Aslan y Kapdan, 2006).

Porcentaje de remoción:

$$\%R = \left(\frac{C_o - C}{C_o} \right) \times 100$$

Donde:

%R: porcentaje de remoción del nutriente.

C_o: la concentración inicial del nutriente en el agua residual.

C: la concentración del nutriente luego del tratamiento.

APÉNDICE 2

FÓRMULA PARA EL CONTEO MICROALGAL

$\Sigma n \times 50 \times 10^3$ (celx ml^{-1})

Donde :

n : número de microalgas contadas en 5 cuadrantes de la cámara de Neubauer .

APÉNDICE 3

PRUEBA DE TUKEY PARA LA CONCENTRACIÓN DE PLOMO

Tratamiento1Pb

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana4	3	,3500			
semana3	3	,3767	,3767		
semana2	3		,4067		
semana1	3			,5200	
semana0	3				,6600
Sig.		,310	,219	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento2Pb

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana4	3	,1100			
semana3	3		,2500		
semana2	3			,2833	
semana1	3			,3067	,3067
semana0	3				,3300
Sig.		1,000	1,000	,127	,127

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento3Pb

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana4	3	,0567			
semana3	3		,1200		
semana2	3			,1467	
semana1	3			,1600	,1600
semana0	3				,1733
Sig.		1,000	1,000	,288	,288

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento4Pb

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
semana4	3	,0433	
semana3	3	,0600	,0600
semana1	3	,0667	,0667
semana2	3		,0700
semana0	3		,0833
Sig.		,058	,058

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APÉNDICE 4

ANOVA DE UN FACTOR PARA LA CONCETRACIÓN DE PLOMO

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
tratamiento 1	Inter- grupos	,196	4	,049	193,776	,000
	Intra- grupos	,003	10	,000		
	Total	,199	14			
tratamiento 2	Inter- grupos	,090	4	,023	199,471	,000
	Intra- grupos	,001	10	,000		
	Total	,092	14			
tratamiento 3	Inter- grupos	,026	4	,006	106,556	,000
	Intra- grupos	,001	10	,000		
	Total	,026	14			
tratamiento 4	Inter- grupos	,003	4	,001	8,042	,004
	Intra- grupos	,001	10	,000		
	Total	,003	14			

APÉNDICE 5

PRUEBA DE TUKEY PARA LA CONCENTRACIÓN DE NITRÓGENO

Tratamiento1N

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana4	3	,3833			
semana3	3	,4633			
semana2	3		1,8400		
semana1	3			2,3333	
semana0	3				8,0933
Sig.		,637	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento2N

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
semana4	3	,3767				
semana3	3		,4233			
semana2	3			1,6433		
semana1	3				1,9300	
semana0	3					4,0400
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento3N

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
semana4	3	,4067				
semana3	3		,4667			
semana2	3			,5667		
semana1	3				,8900	
semana0	3					2,0167
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento3N

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
semana4	3	,4067				
semana3	3		,4667			
semana2	3			,5667		
semana1	3				,8900	
semana0	3					2,0167
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APÉNDICE 6

ANOVA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN NITRÓGENO

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
tratamiento1 N	Inter-grupos	120,905	4	30,226	6236,525	,000
	Intra-grupos	,048	10	,005		
	Total	120,954	14			
tratamiento2 N	Inter-grupos	26,734	4	6,683	55695,611	,000
	Intra-grupos	,001	10	,000		
	Total	26,735	14			
tratamiento3 N	Inter-grupos	5,354	4	1,338	7170,304	,000
	Intra-grupos	,002	10	,000		
	Total	5,356	14			
tratamiento4 N	Inter-grupos	,861	4	,215	556,750	,000
	Intra-grupos	,004	10	,000		
	Total	,865	14			

APÉNDICE 7

PRUEBA DE TUKEY PAARA LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO

Tratamiento1P

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
semana4	3	,1267				
semana3	3		,1667			
semana2	3			,2567		
semana1	3				,3267	
semana0	3					,3767
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Tratamiento2P

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
semana4	3	,0467		
semana3	3		,1400	
semana2	3		,1467	
semana1	3		,1567	
semana0	3			,2033
Sig.		1,000	,257	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento3P

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
semana4	3	,0733	
semana2	3	,0767	,0767
semana3	3	,0767	,0767
semana1	3	,0867	,0867
semana0	3		,1100
Sig.		,717	,061

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

Tratamiento4P

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
semana3	3	,0400	
semana4	3	,0400	
semana2	3	,0433	
semana1	3	,0500	
semana0	3		,0833
Sig.		,487	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APÉNDICE 8

ANOVA DE UN FACTOR DE LA CONCENTRACIÓN DE FÓSFORO

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
tratamiento1 P	Inter-grupos	,132	4	,033	451,227	,000
	Intra-grupos	,001	10	,000		
	Total	,133	14			
tratamiento2 P	Inter-grupos	,039	4	,010	112,808	,000
	Intra-grupos	,001	10	,000		
	Total	,040	14			
tratamiento3 P	Inter-grupos	,003	4	,001	4,060	,033
	Intra-grupos	,002	10	,000		
	Total	,004	14			
tratamiento4 P	Inter-grupos	,004	4	,001	18,937	,000
	Intra-grupos	,001	10	,000		
	Total	,005	14			

APÉNDICE 9

PRUEBA DE TUKEY PARA PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE PLOMO

PRPb1

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	21,2233			
semana2	3		37,8933		
semana3	3			42,4200	
semana4	3				46,6700
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRPb2

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	9,0900			
semana2	3		15,1500		
semana3	3			24,1733	
semana4	3				66,6733
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRPb3

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	5,8900			
semana2	3		11,7600		
semana3	3			29,3667	
semana4	3				64,7033
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRPb4

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
semana2	3	12,5000		
semana1	3	12,5067		
semana3	3		25,0033	
semana4	3			49,7033
Sig.		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APÉNDICE 10

PRUEBA DE TUKEY PARA PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE NITRÓGENO

PRN1

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	71,1900			
semana2	3		77,2500		
semana3	3			94,3100	
semana4	3				95,3100
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRN2

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	52,2033			
semana2	3		59,4000		
semana3	3			89,6033	
semana4	3				90,6000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRN3

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	55,9467			
semana2	3		71,7800		
semana3	3			76,7300	
semana4	3				79,7000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRN4

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	53,9200			
semana2	3		56,9600		
semana3	3			59,8000	
semana4	3				62,7500
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APÉNDICE 11

PRUEBA DE TUKEY PARA PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE FÓSFORO

PRP1

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	13,1500			
semana2	3		31,5800		
semana3	3			55,2600	
semana4	3				65,7900
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRP2

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
semana1	3	20,0067			
semana2	3		25,0000		
semana3	3			35,0033	
semana4	3				80,0033
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRP3

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
semana1	3	18,1800		
semana3	3		27,2667	
semana2	3		27,2700	
semana4	3			36,3600
Sig.		1,000	,987	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

PRP4

HSD de Tukey

semana	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
semana1	3	37,5067	
semana2	3		50,0000
semana3	3		50,0000
semana4	3		50,0000
Sig.		1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,000.

APÉNDICE 12
CONTEO CELULAR

dias	$\Sigma n * 50 * 1000$ (cel/ml)	promedio	dias	$\Sigma n * 50 * 1000$ (cel/ml)	promedio
1	160000	150000	9	6330000	6320000
	140000			6310000	
	150000			6330000	
	150000			6310000	
2	230000	250000	10	7891000	7892000
	250000			7983000	
	260000			7984000	
	260000			7980000	
3	603000	605000	11	8540000	8560000
	607000			8550000	
	605000			8580000	
	605000			8570000	
4	940000	950000	12	9810000	9800000
	960000			9790000	
	960000			9820000	
	940000			9780000	
5	2250000	2300000	13	10300000	10200000
	2350000			10100000	
	2300000			10000000	
	2300000			10400000	
6	3540000	3560000	14	11100000	11200000
	3570000			11300000	
	3570000			11200000	
	3560000			11200000	
7	4190000	4200000	15	12200000	12300000
	4210000			12400000	
	4220000			12500000	
	4180000			12100000	
8	5620000	5620000	16	14503000	14501000
	5630000			13599000	
	5610000			14500000	
	5620000			14502000	

APÉNDICE 13

TABLA DEL ESTÁNDAR DE CALIDAD AMBIENTAL PARA AGUAS.

Tabla N° 1: Estándar de calidad de Amoniac Total en función de pH y temperatura para la protección de la vida acuática en agua dulce (mg/L de NH₃)

Temperatura (°C)	pH							
	6	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	10,0
0	231	73,0	23,1	7,32	2,33	0,749	0,250	0,042
5	153	48,3	15,3	4,84	1,54	0,502	0,172	0,034
10	102	32,4	10,3	3,26	1,04	0,343	0,121	0,029
15	69,7	22,0	6,98	2,22	0,715	0,239	0,089	0,026
20	48,0	15,2	4,82	1,54	0,499	0,171	0,067	0,024
25	33,5	10,6	3,37	1,08	0,354	0,125	0,053	0,022
30	23,7	7,50	2,39	0,767	0,256	0,094	0,043	0,021

Nota:

(*)El estándar de calidad de Amoniac total en función de pH y temperatura para la protección de la vida acuática en agua dulce, presentan una tabla de valores para rangos de pH de 6 a 10 y Temperatura de 0 a 30°C. Para comparar la temperatura y pH de las muestras de agua superficial, se deben tomar la temperatura y pH próximo superior al valor obtenido en campo, ya que la condición más extrema se da a mayor temperatura y pH. En tal sentido, no es necesario establecer rangos.

(**)En caso las técnicas analíticas determinen la concentración en unidades de Amoniac-N (NH₃-N), multiplicar el resultado por el factor 1,22 para expresarlo en las unidades de Amoniac (NH₃).

Categoría 3: Riego de vegetales y bebida de animales

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido	Bebida de animales
FÍSICOS-QUÍMICOS				
Aceites y Grasas	mg/L	5		10
Bicarbonatos	mg/L	518		**
Cianuro Wad	mg/L	0,1		0,1
Clouros	mg/L	500		**
Color (b)	Color verdadero Escala Pt/Co	100 (a)		100 (a)
Conductividad	(µS/cm)	2 500		5 000
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₅)	mg/L	15		15
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	mg/L	40		40
Detergentes (SAAM)	mg/L	0,2		0,5
Fenoles	mg/L	0,002		0,01
Fluoruros	mg/L	1		**
Nitratos (NO ₃ -N) + Nitritos (NO ₂ -N)	mg/L	100		100
Nitritos (NO ₂ -N)	mg/L	10		10
Oxígeno Disuelto (valor mínimo)	mg/L	≥ 4		≥ 5
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 – 8,5		6,5 – 8,4
Sulfatos	mg/L	1 000		1 000
Temperatura	°C	Δ3		Δ3
INORGÁNICOS				
Aluminio	mg/L	5		5

Parámetros	Unidad de medida	D1: Riego de vegetales		D2: Bebida de animales
		Agua para riego no restringido (c)	Agua para riego restringido	Bebida de animales
Arsénico	mg/L	0,1		0,2
Bario	mg/L	0,7		**
Berilio	mg/L	0,1		0,1
Boro	mg/L	1		5
Cadmio	mg/L	0,01		0,05
Cobre	mg/L	0,2		0,5
Cobalto	mg/L	0,05		1
Cromo Total	mg/L	0,1		1
Hierro	mg/L	5		**
Litio	mg/L	2,5		2,5
Magnesio	mg/L	**		250
Manganeso	mg/L	0,2		0,2
Mercurio	mg/L	0,001		0,01
Niquel	mg/L	0,2		1
Plomo	mg/L	0,05		0,05
Selenio	mg/L	0,02		0,05
Zinc	mg/L	2		24

ORGÁNICO

Bifenilos Policlorados

Bifenilos Policlorados (PCB)	µg/L	0,04	0,045
------------------------------	------	------	-------

PLAGUICIDAS

Paratión	µg/L	35	35
----------	------	----	----

Organoclorados

Aldrin	µg/L	0,004	0,7
Clordano	µg/L	0,006	7
Dicloro Difetil Tricloroetano (DDT)	µg/L	0,001	30
Dieldrin	µg/L	0,5	0,5
Endosulfán	µg/L	0,01	0,01
Endrin	µg/L	0,004	0,2
Heptacloro y Heptacloro Epóxido	µg/L	0,01	0,03
Lindano	µg/L	4	4

Carbamato

Aldicarb	µg/L	1	11
----------	------	---	----

MICROBIOLÓGICOS Y PARASITOLÓGICO

Coliformes Termotolerantes	NMP/100 ml	1 000	2 000	1 000
<i>Escherichia coli</i>	NMP/100 ml	1 000	**	**
Huevos de Helmintos	Huevo/L	1	1	**

(a): Para aguas claras. Sin cambio anormal (para aguas que presentan coloración natural).

(b): Después de filtración simple.

(c): Para el riego de parques públicos, campos deportivos, áreas verdes y plantas ornamentales, sólo aplican los parámetros microbiológicos y parasitológicos del tipo de riego no restringido.

Δ 3: significa variación de 3 grados Celsius respecto al promedio mensual multianual del área evaluada.

Nota 4:

- El símbolo ** dentro de la tabla significa que el parámetro no aplica para esta Subcategoría.

- Los valores de los parámetros se encuentran en concentraciones totales, salvo que se indique lo contrario.

APÉNDICE 15

COMPOSICIÓN DE LA SOLUCIÓN HIDROPÓNICA

SOLUCIÓN A	
COMPONENTE	%
Nitrato de potasio	51
Nitrato de amonio	32
Fosfato tripe	17
TOTAL	100
SOLUCIÓN B	
Sulfato de magnesio	88,75
Quelato de hierro	6,86
Sulfato de manganeso	2,02
Ácido bórico	1,21
Sulfato de zinc	0,68
Sulfato de cobre	0,4
Molibdato de amonio	0,08
TOTAL	100

APÉNDICE 16 REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA INVESTIGACIÓN

Fotografía 1. Desinfección de la cámara de siembra



Fotografía 2. Preparación de la solución hidropónica



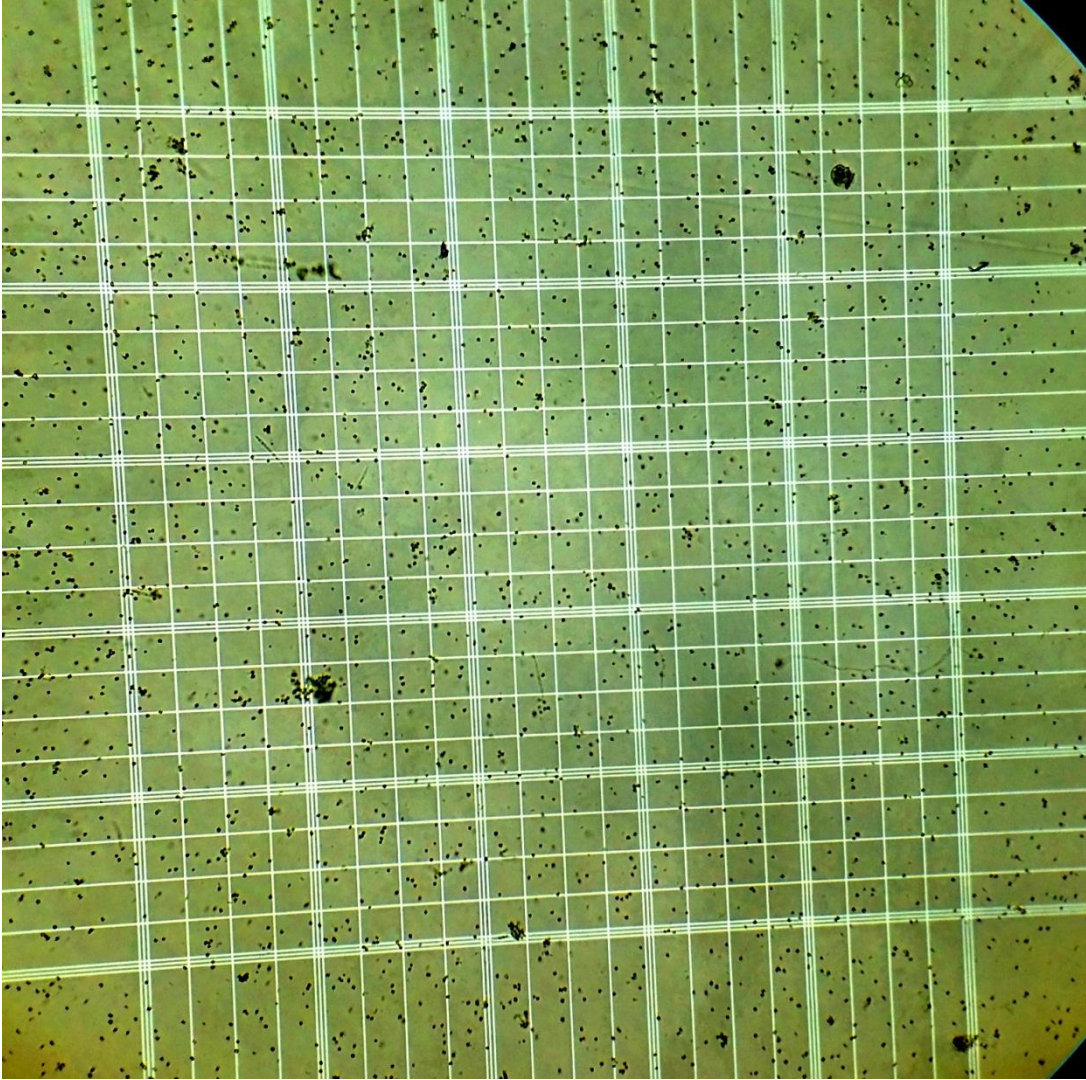
Fotografía 3. Siembra de la cepa



Fotografía 4. Conteo de las microalgas.



Fotografía 5. Microalgas *Chlorella vulgaris* en la cámara de Neubauer



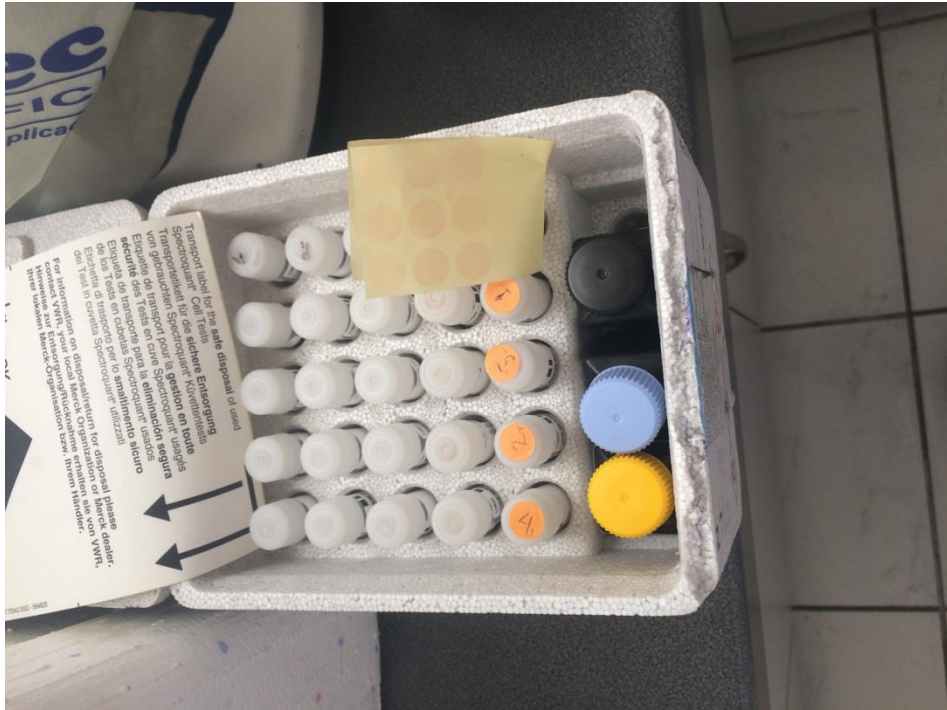
Fotografía 6. Soportes de PVC



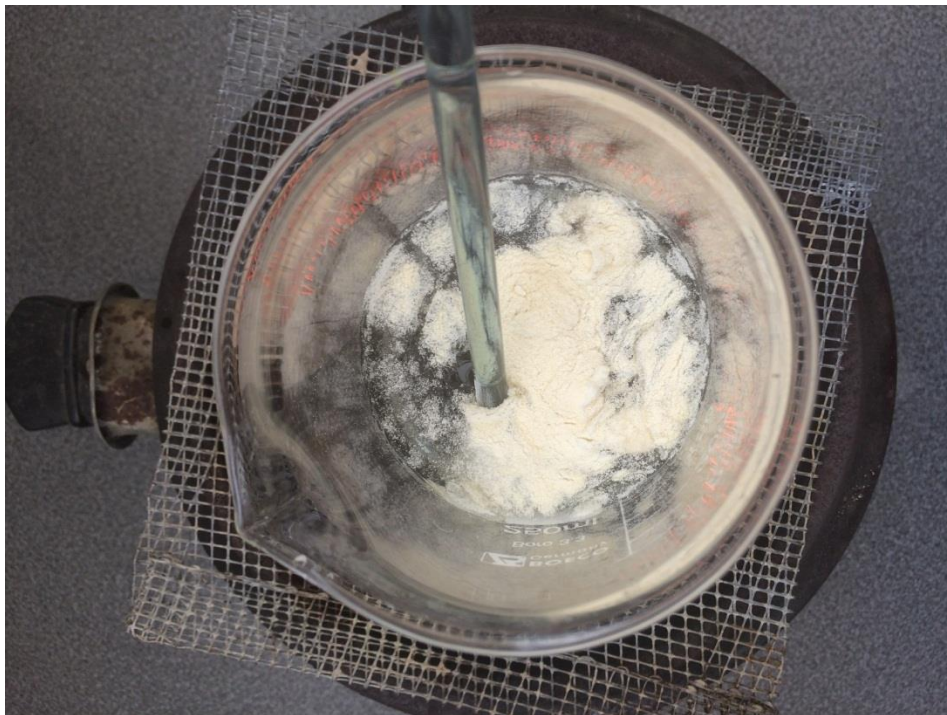
Fotografía 7. Lectura de los parámetros de nitrógeno total, fósforo total y plomo con el equipo Photoflex WTW



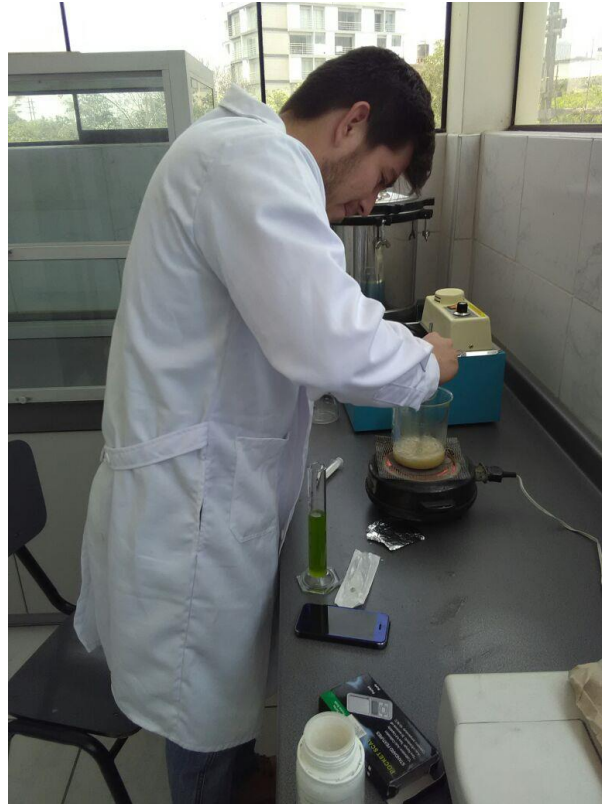
Fotografía 8 Reactivos usados en la de determinación del nitrógeno total, fósforo total y plomo.



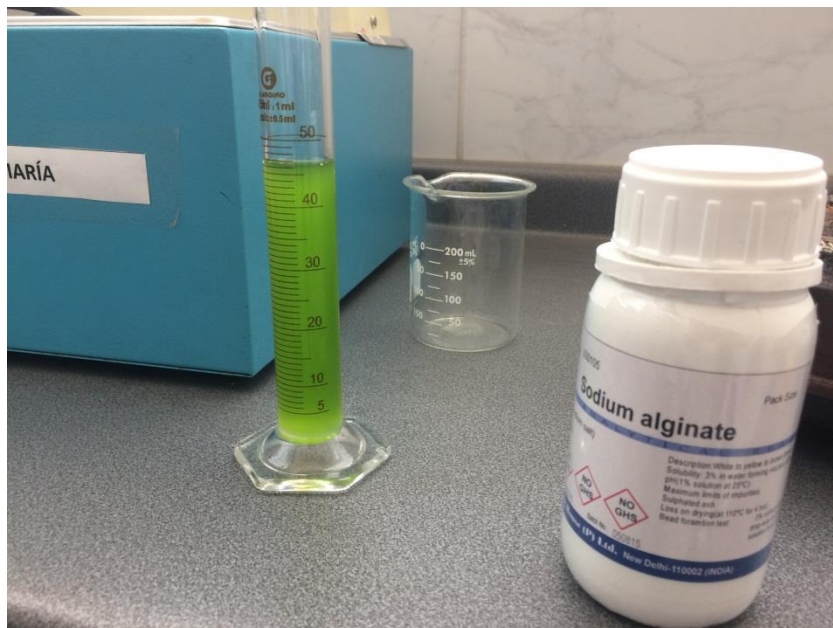
Fotografía 9. Preparación del Alginato de sodio al 4%.



Fotografía 10. Preparación del Alginato de sodio al 4%.



Fotografía 11. Alginato de sodio y microalgas *C. vulgaris*



Fotografía 12. Esferas de alginato con las microalgas inmovilizadas.



Fotografía 13. Cepa de *Chlorella vulgaris* por replicar.

