

Universidad Nacional

Federico Villarreal

Vicerrectorado de

INVESTIGACIÓN

Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura

**FITODEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES EN CULTIVO DE CARPAS UTILIZANDO
Desmodesmus quadricauda (TURPIN, 1828)**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Pesquero Acuicultor

AUTOR

Gutiérrez Salazar, Luis Enrique

ASESOR

Ing. Figueroa Vargas-Machuca, Manuel Eduardo

JURADO

Dr. Moreno Garro, Víctor Raúl
Ing. Llontop Velez, Carlos
Ing. Blas Ramos, Walter Eduardo

Lima-Perú

2020

Dedicatoria

Dedico mi tesis a mi madre María Ena Salazar por su apoyo incondicional y consejos, también a mi padre Miguel Gutierrez por su fortaleza constante y bienestar que me ha permitido ser una persona de bien, pero ante todo el amor que me transmitieron de parte de ellos.

A mis hermanos, primos, amigos, tíos, abuelos por el apoyo brindado durante tantos años y a mi novia Nadyne Carballido por sus consejos, paciencia y ánimo constante, hoy puedo con alegría presentar y disfrutar esta tesis.

Luis Enrique Gutiérrez Salazar

Agradecimientos

En primera instancia al Ingeniero Manuel Eduardo Figueroa Vargas Machuca, asesor de mi tesis, por su orientación, consejos, seguimiento, paciencia y apoyo brindado, durante el proceso de desarrollo de la presente investigación.

En conjunto al personal del laboratorio de Cultivos Menores de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura el Bachiller Collin Rivera Reyes, y al técnico Daniel Neciosup Gonzales del laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura por el apoyo, ánimo y asesoría en la realización de mi tesis.

A los docentes de la Facultad por sus consejos y compartir sus intelectos durante mi vida universitaria.

Luis Enrique Gutiérrez Salazar

Índice

RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Descripción y formulación del problema.....	2
1.2. Antecedentes.....	2
1.3. Objetivos.....	6
1.4. Justificación.....	7
1.5. Hipótesis.....	7
II. MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Las microalgas.....	7
2.2. Sistema de cultivo fotobiorreactor.....	9
2.3. Crecimiento microalgal.....	10
2.3.1. Factores de desarrollo microalgal.....	10
2.3.1.1. <i>Luz</i>	11
2.3.1.2. <i>Nutrientes</i>	12
2.3.1.3. <i>Salinidad</i>	13
2.3.1.4. <i>pH</i>	14
2.3.1.5. <i>Oxígeno</i>	14
2.3.1.6. <i>Agitación</i>	15
2.3.1.7. <i>Temperatura</i>	15
2.4. Contaminación del agua.....	15

2.4.1. Agua residual.....	17
2.5. Tratamiento de agua residual con microalgas.....	17
2.5.1. Fitodepuración.....	18
2.6. Técnica para la cosecha de biomasa algal.....	19
2.6.1. Centrifugación.....	19
2.6.2. Inmovilización de células.....	20
2.7. Polímero orgánico.....	22
III. MÉTODO.....	23
3.1. Tipo de investigación.....	23
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	24
3.3. Variables.....	24
3.4. Población y muestra.....	24
3.4.1. Cepa de microalga.....	24
3.4.2. Característica de la microalga.....	26
3.4.3. Medio de cultivo.....	26
3.4.4. Características del agua residual.....	26
3.5. Instrumentos.....	27
3.6. Procedimiento.....	27
3.6.1. Condiciones de cultivo.....	28
3.6.2. Prueba de centrifugabilidad.....	28
3.6.3. Método de preparación de esferas de alginato.....	28
3.6.4. Montaje.....	29
3.6.5. Medición de la biomasa; pH y temperatura de cultivo algal.....	29

3.6.6. Análisis de concentración de nutrientes.....	29
3.7. Análisis de datos.....	30
IV. RESULTADOS.....	38
4.1. Crecimiento de cepa microalgal.....	38
4.2. Análisis de fitodepuración de nutrientes con esferas de alginato sin microalga.....	39
4.3. Análisis de fitodepuración de nutrientes con esferas de alginato con microalga.....	41
4.4. Análisis de fitodepuración porcentual.....	44
4.4.1. Nitritos (NO_2^-).....	44
4.4.2. Nitratos (NO_3^-).....	45
4.4.3. Amonio (NH_4^+).....	46
4.4.4. Fosfatos (PO_4^-).....	47
4.5. Crecimiento poblacional de las microalgas inmovilizadas.....	48
V. DISCUSIÓN.....	49
VI. CONCLUSIONES.....	51
VII. RECOMENDACIONES.....	54
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
IX. ANEXOS.....	61

Lista de Tablas

Tabla 1 <i>Microalgas utilizadas en la disminución de diferentes contaminantes</i>	5
Tabla 2 <i>Estándares nacionales de calidad de agua D.S N°015-2015-MINAM</i>	16
Tabla 3 <i>Descripción de la especie</i>	25
Tabla 4. <i>Medio de cultivo CHU10</i>	26
Tabla 5. <i>Características del agua residual</i>	27
Tabla 6. <i>Equipos utilizados</i>	27
Tabla 7. <i>Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de nitritos</i>	30
Tabla 8. <i>Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de nitratos</i>	32
Tabla 9. <i>Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de fosfatos</i>	34
Tabla 10. <i>Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de amonios</i>	36
Tabla 11. <i>Registro del crecimiento y parámetros in situ de la biomasa “Desmodesmus quadricauda”</i>	38
Tabla 12. <i>Resultado de la fitodepuración del ion nitrito NO_2^- esferas sin microalga (EB)</i>	39
Tabla 13. <i>Resultado de la fitodepuración del ion nitrato NO_3^- esferas sin microalga (EB)</i>	40

Tabla 14. <i>Resultado de la fitodepuración del ion amonio NH_4^+ esferas sin microalga (EB)</i>	40
Tabla 15. <i>Resultado de la fitodepuración del ion fosfato PO_4^- esferas sin microalga (EB)</i>	41
Tabla 16. <i>Resultado de la concentración de pH esferas sin microalga (EB)</i>	41
Tabla 17. <i>Resultado de la fitodepuración del ion nitrito NO_2^- esferas con microalga (EM)</i>	42
Tabla 18. <i>Resultado de la fitodepuración del ion nitrato NO_3^- esferas con microalga (EM)</i>	42
Tabla 19. <i>Resultado de la fitodepuración del ion amonio NH_4^+ esferas con microalga (EM)</i>	43
Tabla 20. <i>Resultado de la fitodepuración del ion fosfato PO_4^- esferas con microalga (EM)</i>	43
Tabla 21. <i>Registro de la concentración de pH esferas con microalga (EM)</i>	43

Lista de Figuras

Figura 1. Fotobiorreactores para el cultivo de microalgas: a. estanques, b. placas planas, c. cilíndrico, d. tubulares horizontales.....	10
Figura 2. Cultivo de microalgas el laboratorio.....	11
Figura 3. Estructura química del alginato. Polímeros de bloque lineales de β - d - manuronato (M) y l- guluronato (G) con una variación en la composición y disposiciones secuenciales. Fuente: Barsanti & Gualtieri, (2006).....	22
Figura 4. El alginato se cayó de un generador de gotas de aire a una solución de CaCl_2 para formar una microcápsula no homogénea en una formación de "huevo". Los geles se forman por entrecruzamiento de polímeros de alginato con iones de calcio entre los bloques GG y MG. Fuente: Barsanti & Gualtieri,(2006).....	23
Figura 5. Especie de microalga <i>Desmodesmus quadricauda</i> . Fuente: Algaebase (2019).....	25
Figura 6. Comparación de los niveles de reducción de NO_2^- en la muestra.....	31
Figura 7. Comparación de los niveles de reducción de NO_3^- en la muestra.....	33
Figura 8. Comparación de los niveles de reducción de PO_4^- en la muestra.....	35
Figura 9. Comparación de los niveles de reducción de NH_4^+ en la muestra.....	37
Figura 10. Comparación de porcentaje de fitodepuración de nitritos entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.....	45
Figura 11. Comparación de fitodepuración de nitratos entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.....	46
Figura 12. Comparación de fitodepuración de amonio entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.....	47

Figura 13. Comparación de fitodepuración de fosfatos entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.....48

Figura14. Crecimiento de población de la microalga inmovilizada.....48

Lista de anexos

Anexo 1. Estanque circular N°3-EPSE-FOPCA-UNFV.....	61
Anexo 2. Fotobiorreactor de la microalga <i>Desmodesmus quadricauda</i>	61
Anexo 3. Prueba de centrifugación de la microalga <i>Desmodesmus quadricauda</i>	62
Anexo 4. 01. Preparado algal (centrifugación) 02. Calentamiento de la solución de Alginato de sodio diluida en agua destilada por 10 minutos (placa calefactora). 03. Enfriamiento de la solución de alginato de calcio.04. Mezcla de alginato de sodio y preparado algal hasta su homogenización. 05. Se pipeteo la mezcla de microalga – alginato y por goteo se dejó caer en el vaso precipitado de cloruro de sodio para la formación de esferas.....	62
Anexo 5. Obtención de esferas de alginato con microalga. 2. Esferas de alginato sin microalga. 3. Tamaño de esferas entre 0,4 mm a 0,6 mm.....	63
Anexo 6. Esquema de preparación de esferas de alginato.....	63
Anexo 7. Montaje de fotobiorreactores 1. Botella de 600 ml conteniendo 100 esferas de alginato con microalga 2. Montaje de los fotobiorreactores acondicionados de luz y agitación constante.....	64
Anexo 8. a. Crecimiento de microalgas en las esferas de alginato día 6. Fase exponencial y b. Esferas de alginato sin microalgas día 6.....	64
Anexo 9. Centrifuga marca Lesco.....	65
Anexo 10. Espectrofotómetro uv-vis 6405,jenway.....	65
Anexo 11. Multiparámetro portátil marca Hanna instruments hi 982.....	65

Resumen

El principal objetivo de este trabajo de investigación ha sido determinar la fitodepuración de nutrientes (Nitrógeno y Fósforo) en las aguas residuales de cultivo de carpas mediante el uso de la microalga *Desmodesmus quadricauda* inmovilizada en esferas de alginato de calcio.

La principal consecuencia de aumento de los niveles de nitrógeno y fósforo sobre los cuerpos de agua receptores es la eutrofización que es la abundancia de nutrientes y disminución de la diversidad biológica del ecosistema, por lo que su reducción es de vital importancia.

Los análisis de la muestra de agua residual tomadas en la temporada otoño en la Estación Piscícola Santa Eulalia (EPSE) indicaron concentraciones altas de fosfato y nitratos, concentraciones medias de nitritos y amonio. Se desarrolló la fitodepuración por medio de una experimentación que consto de 12 botellas (fotobiorreactor acondicionado) de 500 ml de agua residual de cultivo de carpas conteniendo 100 esferas de alginato sin microalga con medidas entre 0,5 mm a 0,8 mm y en comparación a 32 botellas (fotobiorreactor acondicionado) de 500 ml de esferas de alginato con microalga. Finalizada la fitodepuración en el tiempo de 8 días se analizaron los parámetros físico químicos de nitritos, nitratos, amonio y fosfatos, con la finalidad de poder comparar los resultados del tratamiento realizado por las esferas sin microalga donde se obtuvo la fitodepuración por nitritos 40 %, nitratos 12 %, amonio 58% y fosfatos 60 %, mientras el tratamiento de con esferas con microalga reporto los mejores resultados nitritos 93%, nitratos 84%, amonio 69% y fosfatos 75 %.

Palabras Claves: fitodepuración, fotobiorreactor, microalga, eutrofización, alginato, fertilizante.

Abstract

The main objective of this research work was to determine the Phytodepuration of nutrients (Nitrogen and Phosphorus) in the waste waters of carp culture by using the microalgae *Desmodesmus quadricauda* immobilized in calcium alginate spheres.

The main effect of the increase of nitrogen and phosphorus on the receiving bodies of water is the eutrophication that is the enrichment of nutrients and an impoverishment of the biological diversity of the ecosystem, so its reduction is of vital importance.

The analysis of the sample of wastewater taken in the autumn season at the Santa Eulalia Piscícola Station (EPSE) indicated high concentrations of phosphate and nitrates, average concentrations of nitrites and ammonium. Phytodepuration was developed by means of an experimentation that consisted of 12 bottles (conditioned photobioreactor) of 500 ml of residual water from culture of tents containing 100 alginate spheres without microalgae with measurements between 0,5 mm to 0,8 mm and compared to 32 bottles (conditioned photobioreactor) of 500 ml of alginate spheres with microalga. After the Phytodepuration in the 8 days time, the physical chemistry parameters of nitrites, nitrates, ammonium and phosphates were analyzed, in order to compare the results of the treatment carried out by the spheres without microalgae where the Phytodepuration was obtained by 40% Nitrites, Nitrates 12%, Ammonium 58% and Phosphates 60%, while Phytodepuration treatment with microalga spheres reported the best results Nitrites 93%, Nitrates 84%, Ammonium 69% and Phosphates 75%.

Key Words: phytodepuration, photobioreactor, microalgae, eutrophication, alginate, fertilizer.

I. Introducción

La presente tesis es una investigación que se refiere al tema de la fitodepuración de aguas residuales de cultivo de carpas utilizando la inmovilización de la microalga *Desmodesmus quadricauda* (Turpin, 1828). Las microalgas se encuentran en los sistemas naturales de tratamiento de aguas residuales municipales, agropecuarias e industriales, generando a través de la fotosíntesis un suplemento de oxígeno para los microorganismos heterótrofos que degradan los residuos orgánicos. En el agua residual proveniente de la actividad acuícola, se obtienen efluentes ricos en nutrientes que son vertidos en ríos incorporando en la columna de agua carga de materia orgánica que, a través del alimento no consumido y los desechos de los peces, aumentan la cantidad de nitrógeno y fósforo, ocasionando con el tiempo problemas de eutrofización en los sistemas acuáticos.

En concreto, el uso de la técnica de inmovilización de microalgas en la fitodepuración de nutrientes en sistemas acuáticos constituye una alternativa eficaz y eco-amigable para el tratamiento de aguas residuales provenientes de la actividad acuícola, principalmente en la remoción de nitrógeno y fósforo. La ventaja del uso de la inmovilización celular es la recuperación de las células de microalgas y su separación del medio de cultivo (agua residual) ahorrando costos frente a otras técnicas de separación de biomasa, al estar inmovilizadas incrementan en concentración celular, producción de oxígeno y fitodepuración o remoción de nutrientes de fósforo y nitrógeno.

En esta investigación, se cultivó la especie de microalga *Desmodesmus quadricauda* en su medio de cultivo, luego se procedió a la inmovilización con el sustrato de alginato de calcio para la formación de las esferas de microalga y finalmente se colocaron las esferas en los

fotobiorreactores a escala de laboratorio con el agua residual de cultivo de carpas, y se controló el crecimiento y la capacidad de fitodepuración de nitratos, nitritos, amonios y fosfatos.

1.1 Descripción y formulación del problema

En las piscifactorías, se obtienen efluentes ricos en nutrientes que son vertidos en ríos incorporando en la columna de agua carga de materia orgánica que, a través del alimento no consumido y los desechos de los peces, aumentan la cantidad de nitrógeno y fósforo en el ecosistema acuático, disminuyendo el oxígeno disponible, ocasionando eutrofización en la zona.

A la contaminación de materia orgánica, se suma una producida por los agentes químicos como antibióticos, fungicidas, compuestos antiparasitarios para el control de enfermedades, limpieza y desinfección en las piscifactorías, que son eliminadas directamente a los cuerpos de agua naturales, ello puede alterar los ciclos normales de nutrientes, afectando la abundancia del fitoplancton, zooplancton, peces nativos y poblaciones humanas que habitan en los alrededores.

Actualmente en nuestro país no se realiza tratamiento de los efluentes provenientes de la actividad acuícola por esa razón encontrar alternativas eficientes y que ayuden a reducir el contenido de nitritos, nitratos, amonios y fosfatos en los efluentes, es por eso que planteo realizar una investigación científica.

Formulación del problema

¿De qué manera el sistema de fitodepuración utilizando *Desmodesmus quadricauda* reduce el nivel de nutrientes en las aguas residuales proveniente del cultivo controlado de carpas?

1.2 Antecedentes

Caldwell (1946) reporta los primeros estudios, sobre la probabilidad de aplicar el uso de las microalgas como microorganismos purificadores de aguas residuales, debido al

aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos contenidos en esta agua, ayudando al crecimiento de las microalgas, funcionando como medio de cultivo.

Oswald *et al.* (1957) introdujeron un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, al realizar el sistema de tratamiento de las aguas residuales, utilizando los denominados “sistemas algas bacterias” para el tratamiento de residuos líquidos y producción de HRPA (high rate algal ponds), consiguiendo la producción de biomasa vegetal con un elevado contenido de proteínas, lo que finalmente se considera como un valor agregado de las aguas residuales mediante el cultivo de microalgas.

Hashimoto & Furukawa (1989) reportó la capacidad de eliminación de nutrientes por la microalga *Oscillatoria sp.* Los resultados evidenciaron que en un tratamiento discontinuo eliminan totalmente los nutrientes NO_3^- y PO_4^- en 7 días. Adicionalmente reportaron que usando un reactor tipo tanque continuo con retención de biomasa por filtración en 7,5 días es posible eliminar el 82 % de fósforo.

Shelef, Moraine & Oron (1978) sostienen que la alternativa de solución para los problemas de contaminación ambiental y reciclaje de residuos en el agua residuales provenientes de las actividades industriales son las microalgas ejerciendo un rol importante en la transformación de la materia orgánica e inorgánica de las aguas residuales en biomasa y agua tratada que puede reutilizarse en actividades para el riego.

Cañizares *et al.* (1994) reportaron que la microalga *Spirulina máxima* inmovilizada con carragenato potásico es capaz de eliminar nitrógeno y fósforo en los efluentes de provenientes de la actividad porcina pre tratados aeróbicamente, obteniendo remociones entre el 70 y 80% en 100 días.

García *et al.* (2000) utilizaron la técnica del encapsulamiento del alga *P. nigrescens* en alginato de calcio, el cual favoreció la absorción de Cr (III), permitiendo obtener valores de eficiencia de remoción más elevados que los correspondientes a cantidades significativamente mayores de alga sin encapsular.

Riquelme y Avendaño (2003) afirman que las aguas residuales son ricas en todo tipo de compuestos que permiten sostener el metabolismo de ciertos microorganismos fotosintéticos; esta es la base de la depuración, donde la digestión aerobia de la materia orgánica mediada por bacterias se mantiene gracias al oxígeno producido por las microalgas, las cuales incorporan los compuestos residuales de la oxidación generando un proceso depurativo eficaz.

Salazar (2005) investigó el aprovechamiento de *S. quadricauda* en procesos de depuración, planteando una solución al problema medio ambiental y mejora la calidad del efluente a la vez que permite obtener productos aplicables en diferentes usos como acuicultura, agricultura o fertilizantes. De esta manera, este proceso permite poner un valor agregado al cultivo de microalgas en aguas residuales.

Sánchez, Garza, Almaguer, Sáenz & Liñán (2008) desarrollaron un sistema de fotobiorreactor donde experimentaron la absorción con la biomasa de *Chroella sp.* Inmovilizada la cual presenta durabilidad, facilidad de operación, gran capacidad de adsorción y alto % de recuperación de níquel entre 60 a 97 % y de 83 a 96 % para zinc en la columna de agua.

Rawat, Ranjith-Kumar, Mutanda & Bux (2011) sostuvieron que la eficacia de las microalgas cultivadas en aguas residuales para el desarrollo y la producción de lípidos puede ser igual o incluso mejor que el obtenido con el medio de cultivo común. Estos resultados avalan lo que se ha demostrado en diferentes estudios en los últimos años sobre el uso de tecnologías de microalgas en aguas residuales.

Tabla 1

Microalgas utilizadas en la disminución de diferentes contaminantes

Microalgas	Tipos de aguas residuales
<i>Chlorella sp.</i>	Residuos de la actividad ganadera
<i>Ankistrodesmus y Scenedesmus</i>	Aguas residuales industriales del papel y cartón
<i>Spirulina platensis</i>	Agua residual domestica
<i>Prototheca zopfii</i>	Productos derivados del Petróleo
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Pigmentos y Colorante azoicos
<i>Chlorella sokoniana</i>	Efluentes residuales en heterotrofia sin luz
<i>Botryococcus braunii</i>	Agua residual post tratamiento secundario
<i>Scenedesmus</i>	Niveles elevados de amonio en efluente de digestión anaerobia

Fuente: Rawat, Ranjith-Kumar, Mutanda & Bux (2011)

Méndez, Albarracín, Cravero y Salomón (2010) desarrollaron la investigación de biorremediación evaluando la tasa de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* cultivada en efluentes domiciliarios de la ciudad argentina de Trelew. Los resultados obtenidos de remoción fueron de amoniaco 40%, fósforo total 94% y nitratos 40% durante 12 días.

Castaños (2010), demostró la cantidad de iones Ca^{++} mediante el método de espectroscopía de absorción atómica (EAA) en la formación de las cápsulas de alginato, concluyendo que aun mayor tiempo de exposición se completa el proceso de gelificación ideal.

Bermeo (2011) demostró que las especies estudiadas para el tratamiento de agua residual fueron: *Chlorella vulgaris*, *Botryococcus braunii*, *Neochloris oleoabundans*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sorokiniana*, obtuvo una eficiencia de eliminación de concentración de fosfatos en un 95 % en casi todos los cultivos durante 9 días prueba.

Sostuvo González-Moya (2015) una serie de experimentos en fotobiorreactores con la microalga *Coelastrum pseudomicroporum*, donde expuso la cafeína en diferentes concentraciones en esferas de alginato sin microalga y con microalga en su interior, evaluando la absorción de la cafeína por la microalga inmovilizada en esferas. Obteniendo finalmente, la hipótesis fue rechazada, observando únicamente eliminación significativa de cafeína en el medio sin esferas de alginato.

1.3 Objetivos

✓ Objetivo general:

- Efectuar la fitodepuración a través de la *Desmodesmus quadricauda* en aguas residuales de cultivo controlado de carpas.

✓ Objetivos específicos:

- Determinar la metodología apropiada para el cultivo de *Desmodesmus quadricauda* que se ajuste a la finalidad del presente trabajo.
- Determinar las eficiencias o porcentajes de fitodepuración, principalmente de nutrientes de Aguas Residuales de cultivo de carpas mediante el cultivo de *Desmodesmus quadricauda*.
- Demostrar una alternativa diferente de purificación de agua residual proveniente de acuicultura.

1.4 Justificación

La fitodepuración es la técnica empleada en el tratamiento de aguas residuales procedentes de industrias, ganadería, centros urbanos, entre otras actividades, en distintos países como EE.UU, España, Japón, Argentina y México, por esta razón se considera que es apropiado usar el mismo principio en aguas provenientes de la acuicultura.

Debido a que en Perú no se cuenta con un sistema de tratamiento de aguas de piscifactorías, se considera utilizar la fitodepuración de estos efluentes por intermedio de la microalga *Desmodesmus quadricauda*. Este recurso destaca por su fácil manejo, reproducción, crecimiento, disminución significativa de nutrientes en la columna de agua, la producción de oxígeno para mejorar la calidad del efluente y reutilizar el agua en cualquier actividad agrícola o acuícola, por lo que sería conveniente iniciar las investigaciones que permitirán determinar si el agua resultante de una piscifactoría puede reutilizarse en la misma acuicultura.

1.5 Hipótesis Central

La fitodepuración utilizando *Desmodesmus quadricauda* reducirá el exceso de nutrientes contenidos en agua residual de acuicultura.

II. Marco Teórico

2.1 Las microalgas

Son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares o multicelulares, localizados en diferentes hábitats, tales como aguas marinas, dulces, salobres y residuales. Se presentan bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; son responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta. Se estima que existen más de 100,000 especies. (Garibay, Vázquez Sánchez, Serrano y Martínez. 2009).

Según Brennan & Owende (2010) menciona que varias especies de microalgas son eficientes de desarrollarse utilizando la materia orgánica como fuente de obtención de energía o de carbono para realizar sus funciones fotosintéticas. Conforme a esto, la producción de microalgas se divide en:

- Fotoautótrofa: los organismos algales consiguen su fuente de energía de la radiación solar y el carbono de compuestos inorgánicos (sales).
- Fotoheterótrofa: los organismos algales consiguen su fuente de energía de la radiación solar y utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono.
- Mixotrófica: comúnmente los organismos algales son capaces de desarrollarse en procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica. El carbono lo consiguen de compuestos orgánicos y de CO₂. Como las microalgas de la especie *Spirulina platensis* o la *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Heterótrofa: los compuestos orgánicos proporcionan la energía como la fuente de carbono.

Existen en efecto algas que pueden desarrollarse en ausencia de luz, un ejemplo es la microalga *Chlorella protothecoides*.

La producción fotoautótrofa de algas (para uso distinto al energético) es actualmente la única técnica y económicamente viable a gran escala.

Gouveia, Marques, Lopes da Silva & Reis (2009). Las microalgas además de su rendimiento como bioremediadores de aguas residuales producen biomasa con un valor añadido generando co-productos o subproductos (por ejemplo, proteínas, polisacáridos, pigmentos, los biopolímeros, alimentos para animales, fertilizantes, etc.), también de ser una fuente de energía en la generación de biocombustibles útiles.

2.2 Sistema de cultivo Fotobiorreactor

Richmond (2004) define que un Fotobiorreactor (PBR) es un sistema de cultivo para microbios, algas o células de plantas. Para el caso de cultivo de las microalgas lo definiremos como un sistema cerrado. Para este tipo de sistemas la luz no incide directamente sobre la superficie del cultivo, pero tiene que pasar a través de las paredes transparentes del reactor para llegar a las células cultivadas. Estos sistemas no permiten o limitan el fuerte intercambio de gases y contaminantes (polvo, microorganismos, hongos, etc.) ofrecen protección contra la lluvia, lo que los hace ideales para la mayoría de especies de microalgas que no se pueden mantener expuestos por demasiado tiempo al aire libre porque sufren el riesgo de ser dominados por otras especies.

Según Posten (2009) el rendimiento obtenido en sistemas de cultivo cerrados es superior, debido que requieren mucho menos espacio en comparación a los sistemas abiertos y por otro lado reduce los costes de cosecha de la biomasa generada. El superior rendimiento es debido a desventajas importantes de los sistemas abiertos de cultivo, que son, entre otras, una baja eficiencia de mezclado y bajas eficacias fotosintética y de consumo de CO₂. Aun así, los costes totales son superiores cuando se emplean fotobiorreactores, comparados con sistemas de cultivo abierto: presentan mayores costes de inversión, operación y mantenimiento.

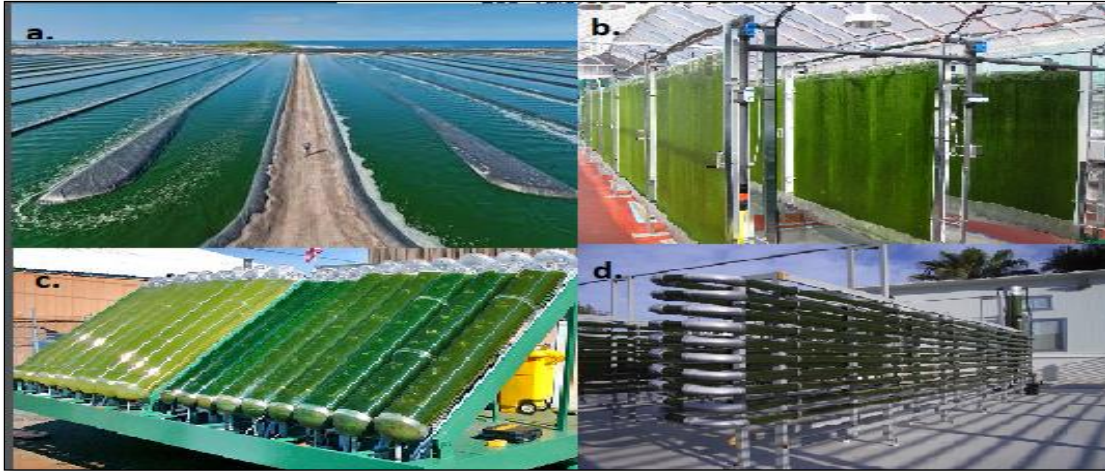


Figura 1. Fotobiorreactores para el cultivo de microalgas:
a. estanques, b. placas planas, c. cilíndrico, d. tubulares horizontales. Fuente: Elaboración propia

2.3 Crecimiento microalga

Brennan & Owende (2010) Sustentan las diferentes especies de microalga expresan sus propias características respecto a condiciones óptimas de desarrollo, así como su eficacia de crecimiento en distintas formas de sistema de cultivo. Los factores influyentes son la composición de las microalgas como su productividad están determinadas, por la alcalinidad, el pH, la temperatura, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y tipo de luz, la densidad celular del cultivo y la contaminación o depredación por otros organismos.

La mayoría de las microalgas doblan su biomasa en 24 horas. No obstante, en fase exponencial algunas algas pueden doblar su biomasa en tiempos tan cortos como 3,5 horas.

2.3.1 Factores de Desarrollo microalgal

La influencia de estos factores en el desarrollo de las microalgas, se centra en los cultivos cerrados por ser en éstos donde su control y monitoreo constante de luz, pH, temperatura, nutrientes, oxígeno y agitación son importante para el crecimiento poblacional de las microalgas.



Figura 2. Cultivo de microalgas en laboratorio
(Extraído de Ynga, 2011)

2.3.1.1. Luz

El principal factor limitante es la disponibilidad de luz como nutriente que suministra la energía para la producción de biomasa microalgas en los cultivos fotoautótrofos. 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, García, Sánchez y Fernández, 1996).

Según Pulz & Scheinbenbogan (1998) determinaron que la luz es generalmente el factor relevante en la producción de microalgas al aire libre. Al contrario, las concentraciones óptimas de biomasa son diferentes para distintos niveles de irradiación solar, y ésta cambia a lo largo del día, la biomasa debe adaptarse a ello. Asimismo, el sistema fotosintético se adapta mejor a la hora de capturar la energía lumínica cambiante (mediante el contenido en clorofila a), se han llevado investigaciones que proponen que el principal problema se sitúa en la biosíntesis de biomasa estructural a partir de carbono fijado fotosintéticamente.

2.3.1.2. Nutrientes

Se hace referencia ya citado, las algas pueden ser autótrofas, heterótrofas, o mixotrófica, nos centraremos sobre todo en las microalgas autótrofas. Los principales nutrientes minerales que éstas toman del medio y necesitan para su desarrollo son:

Carbono: Las microalgas pueden utilizar como fuente de carbono el CO_2 presente en la atmósfera, así como los iones bicarbonato (HCO_3^-) con la ayuda de una enzima llamada anhidrasa carbónica. La gran mayoría, son capaces de tolerar hasta unas 150.000 ppmv de CO_2 en aire, aunque hay especies como *Chlorella*, que han demostrado que toleran hasta 400.000 ppmv.

Cuando se suministra a las algas de carbonato, se hace generalmente en forma de Na_2CO_3 y NaHCO_3 . Los compuestos orgánicos suministran a las microalgas heterótrofas tanto la energía como la fuente de carbono. Así mismo, las microalgas mixotróficas son capaces de crecer bajo procesos tanto autótrofos como heterótrofos, de manera que la fuente de energía es tanto la luz como la materia orgánica, consiguiendo el carbono de compuestos orgánicos y del CO_2 .

Nitrógeno: es uno de los macronutrientes principales para el desarrollo de las microalgas. El contenido en nitrógeno de la biomasa algal puede ser desde un 1% hasta más del 10%, en función de la disponibilidad y el tipo de fuente de nitrógeno. Las microalgas pueden obtener nitrógeno del medio generalmente en forma de urea, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno.

Xin & Hong-yin (2010) demostró que la microalga *Scenedesmus sp.*, se desarrolla más rápido con amonio, urea y de nitrato, en comparación, a la remoción de fósforo y nitrógeno fue más eficaz en el cultivo donde el nitrógeno estaba presente en forma de nitrato y urea que en el cultivo realizado con amonio, dado que el nitrógeno en forma de amonio, cuyo equilibrio de disociación

depende de la temperatura y el pH del medio, impide también el crecimiento de las microalgas debido a que es normalmente tóxico para los organismos fotosintéticos.

El Fósforo es obtenido del medio en forma de ortofosfatos ($P-PO_4^{-3}$), los factores como un pH gradualmente alto o bajo, o la ausencia de iones como potasio, sodio o magnesio, frenan la toma de fosfatos por parte de las microalgas.

La proporción necesaria de fósforo es mucho menor que la de nitrógeno para una misma cantidad de biomasa generada. Varios autores coinciden que la obtención de nutrientes por parte de las microalgas se ve afectada por la relación N: P en el medio de cultivo, de tal modo que se producirá un mayor crecimiento y toma de nutrientes cuanto más próxima esté a la composición de las microalgas. Por ejemplo, para la microalga *Chlorella* la relación óptima es de 8:1. (Aslan & Kapdan.2008). Después de todo las microalgas son capaces de adaptarse al medio de cultivo pueden tomar uno de los nutrientes en cantidad mayor que la presente en su composición celular.

Las microalgas necesitan, para su crecimiento, además de otros macro y micronutrientes (Richmond, 2004). Elementos que son necesarios para el cultivo de microalgas, como macronutrientes (S, K, Na, Fe, Mg, Ca) y micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Mo, Zn, V y Se), tal como se aprecia en la composición elemental de las células microalgas. Varios de dichos elementos traza son cruciales en reacciones enzimáticas y en la biosíntesis de compuestos necesarios para el metabolismo. Al igual que el fósforo (P), estos iones traza muestran cierta afinidad por otros compuestos del medio y precipitan. Para evitar este problema, se adiciona al medio agentes quelantes de metales, como el EDTA.

2.3.1.3. Salinidad

Las salinidades del medio de cultivo contribuyen al crecimiento de las microalgas, así como en el rendimiento de lípidos para biodiesel u otras sustancias de valor agregado. Araujo y Matos

(2011) en un ensayo con diez cepas de microalgas diferentes concluyó que cada una reaccionó de un modo distinto ante un cambio gradual en la salinidad del medio de 25 g/L a 35 g/L, calculando los resultados de rendimiento y productividad de biomasa y de aceite por volumen cultivado. Sin embargo, especies de microalgas como *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis tetraathele* no mostraron cambios frente a la salinidad. La mayor productividad se alcanzó con *Chlorella vulgaris*, que alcanzó una relación biomasa inicial: final de 1:10.

2.3.1.4. 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 requeridos. Cada especie de microalgas tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de qué especies químicas esté más habituada a asimilar. El pH generalmente en los cultivos de microalgas se encuentra en los rangos de 7 y 9, con un óptimo entre 8,2–8,7.

2.3.1.5. Oxígeno

El nivel de oxígeno disuelto es un parámetro que debe ser controlado y monitoreado en el cultivo de microalgas, ya que elevadas concentraciones de oxígeno disuelto pueden inhibir la fijación de carbono por parte del enzima RuBisCo (Ribulosa 1,5 bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa). Esta inhibición se ve favorecida por un déficit de CO₂, por la alta radiación y temperatura.

Muchas especies de microalgas no son capaces de desarrollarse en un medio sobresaturado de oxígeno más de 2 o 3 horas. El nivel de saturación varía siendo para algunas especies el 120% de saturación en el aire mientras que para otras el 200%, en cultivos de alta densidad los niveles de producción fotosintética de oxígeno son hasta 40 mg/L.

2.3.1.6 Agitación

La agitación facilita la eficiencia en el transporte, evita 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. Con una adecuada agitación se controla a las algas a ciclos rápidos de mezclado, en los que en cuestión de milisegundos pasan de una zona oscura a una zona iluminada, no todas las especies toleran una agitación fuerte que suponga un buen mezclado en el reactor, ya que son sensibles al estrés hidrodinámico.

2.3.1.7. Temperatura

En el crecimiento de las microalgas, la temperatura es un factor a 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 que se alcanza la temperatura óptima.

A pesar de que una gran variedad de microalgas son capaces de desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, como la especie *Chlorella* que se desarrolla entre 5 y 42°C, todas ellas presentan un rango fuera del cual se ven inhibidas e incluso mueren.

2.4. Contaminación del agua

Acumulación indeseable de sustancias, organismos y cualquier forma de energía en un sistema hídrico. En cuanto a las aguas del país, es la acumulación de diversos elementos y sustancias aportados por vertimiento de aguas residuales crudas o insuficientemente tratadas que superan la capacidad de asimilación y/o autodepuración del cuerpo receptor generando concentraciones en el cuerpo de agua que exceden el estándar de calidad normado en la zona sometida a regulación. Autoridad Nacional del Agua (ANA).

Tabla 2

Estándares Nacionales de Calidad de Agua D.S N°015-2015-MINAM

Categoría 4						
PARÁMETRO	UNIDAD	E1: LAGUNAS Y LAGOS	E2: COSTA Y SIERRA	SELVA	ESTUARI OS	MARINOS
FISICO - QUÍMICOS						
Aceites y grasas (MEH)	mg/L	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Cianuro	mg/L	0,0052	0,0052	0,0052	0,001	0,001
Color (b)	Color verdadero escala Pt/Co	20 (a)	20 (a)	20 (a)
Clorofila A	mg/L	0,008
Conductividad	(uS/cm)	1000	1000	1000
Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO ₂)	mg/L	5	10	10	15	10
Fenoles	mg/L	2,56	2,56	2,56	5,8	5,8
Fósforo total	mg/L	0,035	0,05	0,05	0,124	0,062
Nitratos (NO ₃)	mg/L	13	13	13	200	200
Amoniaco	mg/L	1,9	1,9	1,9	0,4	0,56
Nitrógeno Total	mg/L	0,315
Oxígeno disuelto (Valor mínimo)	mg/L	≥5	≥5	≥5	≥4	≥4
Potencial de Hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,5 a 9,0	6,8-8,5	6,8-8,5
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	≤25	≤100	≤400	≤100	30

Ministerio del Ambiente (MINAM, 2015)

2.4.1 Agua residual

Son aquellas aguas cuyas características originales han sido alteradas por actividades humanas y que por su deplorable calidad requieren un tratamiento previo, antes de ser reusadas, vertidas a un cuerpo natural de agua o descargadas al sistema de alcantarillado. Organismo de Evaluación y fiscalización Ambiental (OEFA).

2.5. Tratamiento de agua residual con microalgas

Rawat, Ranjith-Kumar, Mutanda, & Bux (2011), Los Procesos de tratamiento biológico son considerados los más ecológicos y los de menor costo para tratar aguas residuales. Estos procesos utilizan microorganismos para descomponer las sustancias químicas, orgánicas, grasas, nutrientes presentes en los residuos municipales. Dentro de estos microorganismos se encuentran las microalgas, las mismas que han sido valoradas a través de los años como una alternativa eficaz de tratamiento especialmente para nitrógeno y fósforo. La ventaja de usar microalgas para depuración de aguas residuales es que mientras estos microorganismos se encargan de eliminar el exceso de nutrientes y de liberar O₂ en el ejercicio de la fotosíntesis, que garantiza la biodegradación de los compuestos orgánicos, habrá abundante producción de biomasa debido a los componentes esenciales que contienen las aguas residuales para el rápido crecimiento de las microalgas.

Pittman & Dean (2011) mencionan que las microalgas tales como *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Phormidium* han sido usadas para el tratamiento de aguas residuales provenientes de plantas de tratamientos convencionales, aguas residuales industriales y residuos animales debido a su particular tolerancia de las condiciones de los efluentes residuales y su alta eficiencia.

Según Richmond (2004) desde el punto de vista técnico, el cultivo de microalgas presenta algunas desventajas, principalmente en el tratamiento de grandes volúmenes de agua residual, debido al frecuente colapso del cultivo y a los cambios estacionales. Así también, una de las mayores limitantes en el sistema, es el cosechado o separación de biomasa desde el efluente tratado. Se debe tomar en consideración que un proceso exitoso consiste en la separación eficiente de la biomasa de algas para la disposición final y reutilización del agua residual tratada.

2.5.1 Fitodepuración

La fitodepuración facilita la eliminación paralelamente de las sustancias contaminantes de las aguas residuales, que para los organismos vegetales pueden ser nutrientes, y del CO₂ de la atmósfera, utilizando para ello el metabolismo de organismos vegetales y la energía del sol. Como resultado del metabolismo se produce un aumento de la biomasa, dependiendo de la especie organismo vegetal que se utilice como biofiltro, y de las condiciones existentes de radiación solar, temperatura y concentraciones de nutrientes en el agua residual.

Como ventaja frente a otras técnicas de depuración de aguas residuales, la fitodepuración permite aprovechar la capacidad de los organismos vegetales de metabolizar sustancias contaminantes con la ayuda de la energía solar.

Los cultivos de microalgas, componen un sistema biológico eficiente y eco amigable en la utilización de nutrientes presentes en las aguas residuales domesticas e industriales, forma parte de una aplicación denominada ficorremediación que se define como la utilización de algas en la depuración o biotransformación de compuestos contaminantes. Entre éstos se incluyen nutrientes y xenobióticos de un agua residual o CO₂ de un aire contaminado. También es interesante la detección de compuestos tóxicos con biosensores basados en microalgas (Olguín, 2003).

La eutrofización o enriquecimiento en nutrientes de agua marina y superficial causada por la actividad humana, en algunas regiones del mundo este problema es de urgencia debido que no se dispone de la infraestructura necesaria para el tratamiento de las aguas residuales. En otros, se realiza el tratamiento a las aguas residuales urbanas, pero otras de mayor carga orgánica, como es el caso de aguas residuales procedentes de granjas de cría de animales, las cuales son vertidas sin ningún tratamiento previo (De Godos, Gonzáles, Becares, García-Encina y Muñoz. 2009).

2.6. Técnica para la cosecha de biomasa algal

Existe una gran cantidad de métodos de cosecha que puede ser empleado para la recuperación de biomasa de microalgas como la centrifugación, floculación, la sedimentación por gravedad y filtración, o cualquier combinación de estos (Molina & Belarbi, 2003). Se debe tomar en consideración que la recuperación de la biomasa puede ser un importante problema debido al pequeño tamaño (30 mm de diámetro) de las células de las algas y por tanto, se encuentran diluidas en el agua. Por lo que se requiere manejar grandes volúmenes para recuperar un porcentaje deseable de biomasa, lo cual contribuye al costo final de producción. Así también, otro factor importante que influye es la energía utilizada, que sigue siendo una de las principales limitantes, porque representa entre un 20% al 30% del costo final de producción (Gouveia, 2011).

2.6.1. Centrifugación

La centrifugación es un método por el cual se separan sólidos de líquidos de diferente densidad mediante una fuerza giratoria de determinada intensidad, la cual se genera directamente a la mezcla una fuerza mayor a la de la gravedad, provocando la sedimentación de los sólidos o de las partículas de mayor densidad, para luego separar el sobrenadante por drenaje. Molina *et al.*, (2003) realizaron pruebas de laboratorio utilizando una centrifuga y demostraron que de 10

a 20 g de biomasa se pudieron recuperar en un tiempo de 2 a 5 minutos. Sin embargo, Molina *et al.*, (2003). concuerda que este es un método caro por la alta demanda de energía, aproximadamente de 3.000 kW/ton (Oswald, 1995).

El uso de la centrifugación no es un concepto nuevo ya que el método es muy utilizado en la industria alimentaria, laboratorios clínicos, tratamiento de aguas residuales y para la recolección de algas (Golueke & Oswald 1965). Durante los últimos años se observado demanda en los procesos de separación de alta eficiencia para sólido-líquido aplicados a la bioingeniería y biotecnología (Molina *et al.*, 2003).

En el campo de las microalgas, es una de las etapas más costosas y difíciles es la separación, ya que el volumen de las partículas o el gradiente de densidad entre ellas y el líquido son pequeños. En estos casos, la centrifugación comparada con otras técnicas es eficiente, al presentar un alto potencial de aclarar y muy buenos rendimientos (Egmont & Steiwand, 2010).

2.6.2. Inmovilización de células

El inmovilizado celular es una alternativa eficaz para solucionar el problema de los gastos económicos y energéticos de recuperación de las células de microorganismos, y su separación del medio de cultivo. La inmovilización celular es una forma eficiente de retener la biomasa generada en el tratamiento de agua residual.

El inmovilizado de células se precisa como la confinación o ubicación física de células intactas a una región espacial definida en el biorreactor con la preservación de la deseada actividad catalítica (Karel, Libicki & Robertson, 1985). Los objetivos de la inmovilización celular son los siguientes (Adaptado de Karel *et al.*, 1985; Dervakos & Webb, 1991)

- Aumentar la concentración celular y la productividad volumétrica
- Aumentar la estabilidad biológica

- Incrementar la estabilidad del producto
- Elevar la concentración del producto en el medio de cultivo
- Reducir la concentración de sustrato en el medio de cultivo
- Ventajas por la proximidad entre las células
- Separación de células del medio, fácil recuperación del producto

Entre los componentes generalmente empleados en la inmovilización de microalgas están los compuestos orgánicos como: alginato, agar, agarosa, carragenina, glutaraldehído de albúmina sérica, y los materiales sintéticos como: poliuretano, espumas de polivinilo, archilamida, cerámica y perlas de cristal (Becker, 2003), el autor también señala que los componentes convenientes para el inmovilizado de células de microalgas deben de tener las siguientes propiedades: elevada capacidad de cargar biomasa, alta transparencia, ausencia de tóxicos para las células algales, proceso de inmovilización simple, eficaz difusión de nutrientes y productos, resistencia a la abrasión, máxima relación área de superficie–volumen, estabilidad mecánica, esterilizable, favorable para una separación fácil de la matriz del medio de cultivo.

Becker (2003) indica los principales campos de investigación en donde se utiliza la inmovilización de células de microalgas:

- Acumulación o remoción de productos de desecho en sistemas acuosos
- Biosíntesis o biotransformación de diferentes productos naturales en reactores, suelos y ambientes acuosos.
- Producción de oxígeno en sistemas alga-bacteria
- Producción de hidrógeno

2.7. Polímero Orgánico

Los alginatos constituyen una familia de polisacáridos de copolímeros binarios no ramificados de los ácidos D-manurónico y L-galurónico en diferentes proporciones y secuencias (Ertesbåg & Valla, 1998; Lee, 2008). Comercialmente se extrae de algas pardas, principalmente de especies de los géneros Laminaria y Sargassum. La mayor ventaja de los geles basados en alginatos es que las células inmovilizadas no sufren cambios en sus condiciones físico-químicas durante el proceso de inmovilización. Estos polímeros naturales son solubles en agua y en combinación con cationes como Na^+ y Ca^{2+} , forman geles termo-estables (Barsanti & Gualtieri, 2006).

El gel se puede disolver con citrato de sodio o con fosfato, sustancias que desestabilizan su estructura. Por otra parte, los alginatos son relativamente baratos, no son tóxicos, son suficientemente transparentes, son bastante estables y son fáciles de usar. En las cápsulas de alginato, las células están protegidas contra el estrés mecánico, pero los nutrientes y los metabolitos pueden difundirse a través de la matriz semipermeable que constituye el alginato (Ertesbåg & Valla, 1998).

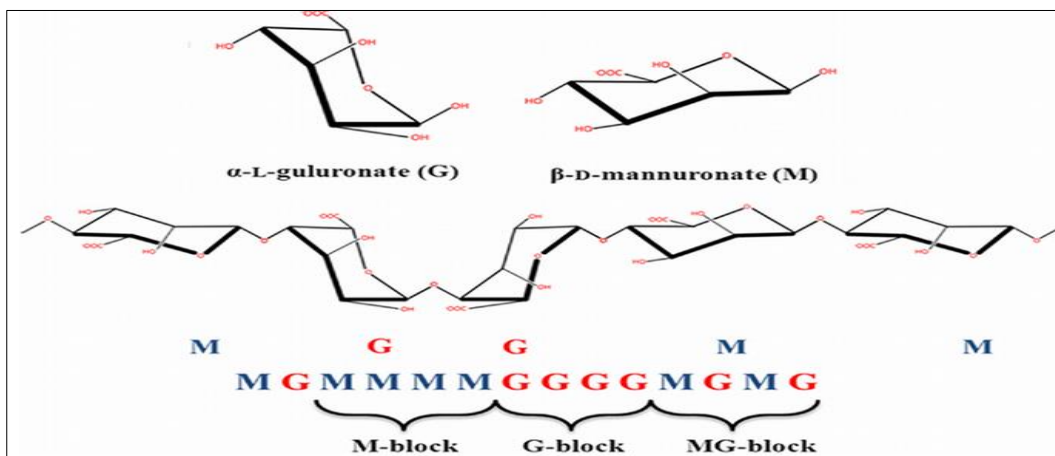


Figura 3. Estructura química del alginato. Polímeros de bloque lineales de β - d - manuronato (M) y l- guluronato (G) con una variación en la composición y disposiciones secuenciales.

Fuente: Barsanti & Gualtieri, (2006).

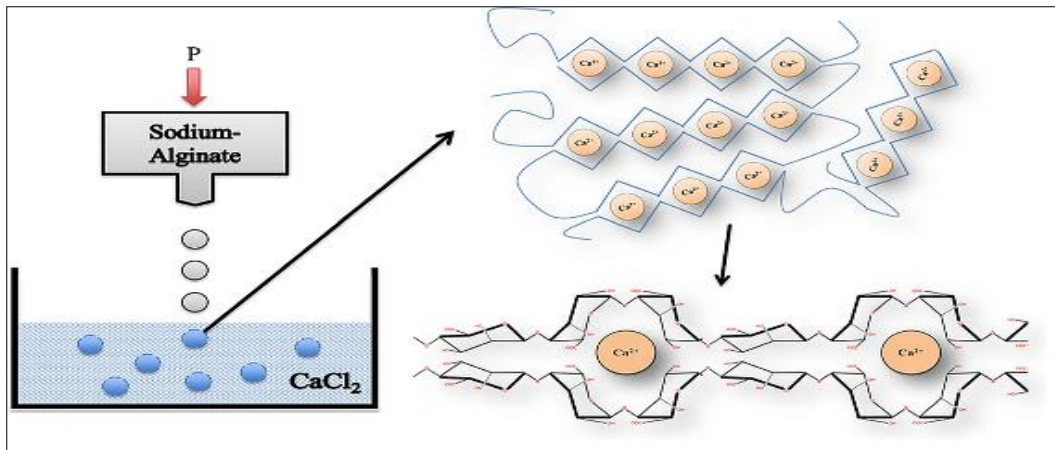


Figura 4. El alginato se cayó de un generador de gotas de aire a una solución de CaCl_2 para formar una microcápsula no homogénea en una formación de "huevo". Los gels se forman por entrecruzamiento de polímeros de alginato con iones de calcio entre los bloques GG y MG. Fuente: Barsanti & Gualtieri, (2006)

III. Método

3.1. Tipo de investigación

Se desarrollará investigación experimental, aplicada y explicativa para en la cual se abordará el análisis de los distintos parámetros físico-químicos relacionados con la fitodepuración de nutrientes en agua residual proveniente del cultivo de carpas.

La cepa de microalga *Desmodesmus quadricauda* se obtendrá de la donación del Instituto del Mar Peruano del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos encargado por la Ing. Liz Tenorio García.

Se seguirá el Protocolo de Cultivo establecido para microalgas chlorophyta de agua dulce del Laboratorio de Cultivo Menores en el distrito de Miraflores en la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

Se analizará el agua residual del cultivo de carpas colectada del estanque número 3 de la EPSE, en el Laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

3.2. Ámbito temporal y espacial

La zona de recolección del agua residual del cultivo de carpas fue en la Estación Piscícola Santa Eulalia se ubica en la Av. San Martín 310, en el Km 37.5 de la Carretera Central. Distrito de Santa Eulalia, Provincia de Huarochirí, Departamento de Lima. La temperatura máxima es de 32.5 ° C (marzo) y mínima de 17.3 ° C (marzo) se especifica el mes en el cual se realizó la recolección de muestra. **Ver Anexo 1**

3.3. Variables

La investigación se llevó a cabo en dos etapas, la primera en el laboratorio de Cultivos Menores de la facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villareal donde se cultivó la microalga para luego su inmovilización en las esferas, segunda parte se llevó a cabo en el laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos de la misma facultad donde se realizó los análisis en agua residual filtrada con de esferas de alginato del calcio con la microalga *Desmodesmus quadricauda* y esferas de alginato sin microalga.

Se definen las variables según los objetivos planteados, son las siguientes:

- **Variable independiente:**

Medio agua residual

- **Dependiente:**

Fitodepuración de nutrientes (NO₂, NO₃, PO₄ y NH₄)

3.4. Población y muestra

3.4.1. Cepa de Microalga

En la realización de esta investigación se utilizó la cepa de microalga *Desmodesmus quadricauda* fue proporcionado por el Laboratorio de Germoplasma del Instituto Del Mar Peruano.

Tabla 3.
Descripción de la especie

CLASIFICACION	<i>Desmodesmus quadricauda</i> (Turpin 1828)
División	Chlorophyta
<i>Clase</i>	Chlorophyceae
<i>Orden</i>	Chlorococcales
<i>Familia</i>	Scenedesmaceae
<i>Genero</i>	Desmodesmus
<i>Especie</i>	Quadricauda

Fuente: Algaebase 2019



Figura 5. Especie de microalga Desmodesmus quadricauda.

Fuente: Algaebase (2019)

3.4.2 Características de la microalga

El género *Scenedesmus* es muy común en todo tipo de aguas dulces. Ejercen un rol importante en la producción primaria y contribuyen a la depuración de las aguas eutróficas. Las células de

Scenedesmus están unidas en grupos de 4, 8 o raramente 16, denominados cenobios. Se distinguen al menos dos subgéneros, *Desmodesmus* y *Scenedesmus*, en función de que las células posean o no espinas. (Becker, 1984; Camacho, Martínez, Sanchez y Pérez 1989).

Desmodesmus quadricauda: individuo colonial, constituido por 4, 8 ó 12 células. Las células centrales son alargadas y sin apéndices, las terminales, se abomban en el centro y presentan dos espinas que se proyectan hacia el exterior.

3.4.3. Medio de Cultivo

Para la obtención de la biomasa de *Desmodesmus quadricauda*, se preparó el medio de cultivo CHU descrito en la FAO (1989) no se encuentra en referencias

Tabla 4.

Medio de Cultivo CHU 10

<i>Medio chu 10 (modificado por Gerloff) Umebayashi (1975)</i>	
Ca(NO ₃) ₂	0.04%
K ₂ HPO ₄	0.01%
Na ₂ CO ₃	0.02%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.025%
Na ₂ SiO ₃	0.025%
Citrato de Fierro Amoniacal	0.005%

Fuente: FAO (1989)

3.4.4. Características del agua residual

Las características del agua residual de cultivo de carpas del estanque Circular N°3-de la EPSE-FOPCA-UNFV se muestran en la Tabla 3. El agua residual colectada la cual fue filtrada con el uso del papel filtro y en un embudo de filtración para la determinación de su composición.

Al agua residual no se le añadió ningún efluente de nutrientes.

La muestra de agua residual para el desarrollo de la investigación fue tomada de la salida del estanque Circular N° 3 donde se encuentran las carpas.

Tabla 5.

Características del agua residual

PARAMETROS	AGUA RESIDUAL FILTRADA (mg/L)
P-PO ₄ (mg/L)	0,228
N-NO ₂ (mg/L)	0,100
N-NH ₄ (mg/L)	0,372
N-NO ₃ (mg/L)	0,146
pH	8,00

Fuete: Elaboración propia

3.5. Instrumentos

Los equipos utilizados para la realización del experimento, pertenecen a los laboratorios de cultivos menores y contaminación ambiental.

Tabla 6.

Equipos utilizados

Equipo	Función
Centrífuga Lesco	Centrifuga los tubos con muestras de cultivos para separar la biomasa, a diferentes velocidades de giro y variando el tiempo
Espectofotómetro UV-VIS 6405, Jenway	Medir la absorbancia de: Nitritos, nitratos, amonio y fosfatos
Multiparámetro Portátil Hanna Instruments HI 982	Mide parámetros través de la misma sonda (IP68): pH, mV, ORP, oxígeno disuelto (% de saturación y mg/L), conductividad, resistividad, sólidos totales disueltos, salinidad, gravedad específica del agua de mar, presión atmosférica, temperatura.

Fuente: Elaboración propia

Ver Anexo 9, 10 y 11.

3.6. Procedimiento

Se describe a continuación:

3.6.1. Condición de cultivo

El cultivo se mantuvo a nivel de laboratorio, en tres fotobiorreactores dos de 2 L y uno de 5 L esterilizados a una temperatura entre 26 a 28 °C, con aireación y presencia de luz durante 15 días, fotoperiodo de 12:12h, para favorecer el crecimiento celular, la iluminación fue suministrada con lámparas fluorescentes al fotobiorreactor, antes de su inmovilización en esferas de alginato. **Ver Anexo 2.**

3.6.2. Prueba de centrifugabilidad

Posteriormente el cultivo de la microalga *Desmodesmus quadricauda* alcanzó la fase exponencial de su crecimiento se procedió a preparar el cultivo algal para separar la biomasa del medio de cultivo por el método de centrifugación, protocolo utilizado en el laboratorio de cultivos menores.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Tomamos 500 ml de muestra del reactor en un vaso precipitado esterilizado.
2. Se prepararon 10 tubos de ensayo llenos con 10 ml de la muestra microalgal del vaso precipitado.
3. Se procedió a la etapa de centrifugación en una centrifuga analógica con la velocidad de 3000 r.p.m. y temporizador de 3 minutos. Se realizó este procedimiento hasta obtener 200 ml de muestra algal. **Ver Anexo 3.**

3.6.3. Método de preparación de esferas de alginato

Para preparar 200 ml de solución de alginato sódico se usó el método Moreno-Garrido, Campana, Lubián, & Blasco (2005). En un vaso precipitado de 500 ml se vertieron 200 ml de agua destilada y se diluyeron 2.5 g de alginato sódico agitando manualmente de forma vigorosa.

En un vaso precipitado de 600 ml se vertieron 350 ml de agua destilada y se disolvió 3,5 g de cloruro de calcio.

Para la inmovilización microalgal, se centrifugaron 200 ml del cultivo de *Desmodesmus quadricauda* en etapa de crecimiento exponencial durante 15 minutos, con una densidad de $1,518.8 \times 10^3 \text{ cel./ml}$, la biomasa algal obtenida de 50 ml fue mezclada de manera manual con la solución de 100 ml alginato de calcio hasta la homogenización, obteniendo el preparado algal de 150 ml. **Ver Anexo 4, 5 y 6.**

3.6.4. Montaje

El montaje en el laboratorio consistió en la elaboración de fotobiorreactores, botellas de 600 ml de polietileno de alta densidad, conteniendo un volumen de 500 ml de agua residual, sobre los cuales se determinaron el efecto de los tratamientos a partir variables calculadas. Se realizaron 2 tipos de montajes, las cuales fueron 100 de esferas de alginato del calcio con la microalga *Desmodesmus quadricauda* y 100 esferas de alginato sin microalga, donde se realizó un análisis descriptivo, comparando los datos de los tratamientos, al término de 8 días.

Ver anexo 7

3.6.5. Medición de la Biomasa, pH y temperatura del cultivo algal

El desarrollo de crecimiento de las microalgas fue monitoreado diariamente midiendo la densidad celular mediante una cámara Improved – Neubauer, se controló el pH mediante el pH-metro y la temperatura se controló con el termómetro, se efectuó el análisis de parámetros hasta que el cultivo algal alcanzó la fase estacionaria de crecimiento.

3.6.6. Análisis de concentración de nutrientes

Los análisis para determinar la concentración de NO_2^- , el amonio NH_4^+ , el nitrato NO_3^- , fosfato PO_4^- , se realizaron agua residual filtrada con de esferas de alginato del calcio con la

microalga *Desmodesmus quadricauda* y esferas de alginato sin microalga por el ensayo de espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro UV-VIS 6405, JENWAY a diferentes longitudes de onda dependiendo del parámetro.

Se procedió a elaborar las rectas de calibrado con los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de concentración de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos en ppm.

3.7. Análisis de datos

3.7.1. Prueba de reducción de Nitritos- NO₂

I. Descripción de Hipótesis:

H₀: La reducción de la concentración de nitritos en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalgas es similar ($\mu_A = \mu_B$)

H₁: La reducción de la concentración de nitritos en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalgas es diferente ($\mu_A \neq \mu_B$)

II. Prueba de Hipótesis:

H₀: $\mu_A = \mu_B$

H₁: $\mu_A \neq \mu_B$

III. Nivel de Significancia

$\alpha = 0.05$

IV. Prueba Estadística

$F = SCT/SCE$

Factor de Corrección (FC): 0,0626

Suma de Cuadrados Totales (SCT): 0,0099

Suma de Cuadrados de los tratamientos (SCT): 0,0020

Suma de Cuadrados del Error (SCE): 0,0079

Tabla 7.

Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de nitritos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F _c	F _{tab}
Tratamientos	1	0,0020	0,0020	3,5366	4,6
Error	14	0,0079	0,0006	-	-
Total	15	0,0099		-	-

V. Regla de Decisión:

Si $F_c > F_t$ se RECHAZA H_0

VI. Conclusión:

Existe suficiente evidencia estadística ($\alpha = 0.05$) para afirmar que los niveles de reducción de NO_2 con ambos tipos de esferas es diferente

VII. Resultados:

Reducción de nitritos en el agua

Descripción Tratamientos

- Esferas sin microalga: 0.074^a - Concentración de NO_2 (mg/L)
- Esferas con microalgas: 0.051^a - Concentración de NO_2 (mg/L)

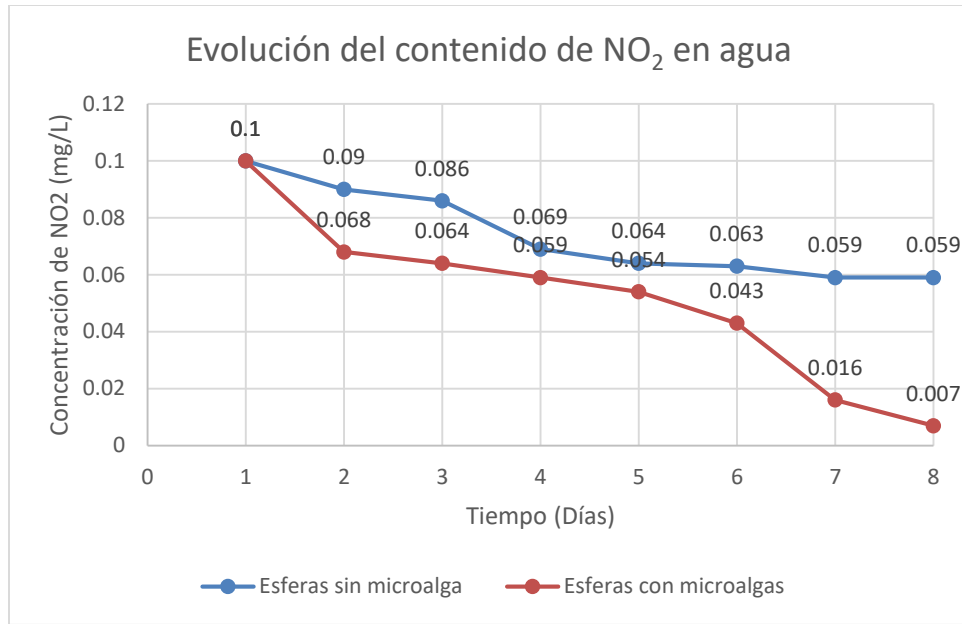


Figura 6. Comparación de los niveles de reducción de NO₂ en la muestra.

3.7.2. Prueba de Reducción de Nitratos- NO₃

I. Descripción de Hipótesis:

H₀: La reducción de la concentración de nitratos en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalga es similar ($\mu_A = \mu_B$)

H₁: La reducción de la concentración de nitratos en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalga es diferente ($\mu_A \neq \mu_B$)

II. Prueba de Hipótesis:

H₀: $\mu_A = \mu_B$

H₁: $\mu_A \neq \mu_B$

III. Nivel de Significancia

$\alpha = 0.05$

IV. Prueba Estadística

$F = SCt/SCE$

Factor de Corrección (FC): 0,1687

Suma de Cuadrados Totales (SCT): 0,0287

Suma de Cuadrados de los tratamientos (SCt): 0,0179

Suma de Cuadrados del Error (SCE): 0,0108

Tabla 8.

Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de nitratos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F _c	F _{tab}
Tratamientos	1	0,0179	0,0179	23,1032	4,6
Error	14	0,0108	0,0008		
Total	15	0,0287			

V. Regla de Decisión:

Si $F_c > F_t$ se RECHAZA H_0

VI. Conclusión:

Existe suficiente evidencia estadística ($\alpha = 0.05$) para afirmar que los niveles de reducción de NO_3 con ambos tipos de esferas es diferente.

VII. Resultados:

Reducción de nitratos en el agua

Descripción Tratamientos

- Esferas sin microalga: 0.136^a - Concentración de NO_3 (mg/L)
- Esferas con microalgas: 0.069^a - Concentración de NO_3 (mg/L)

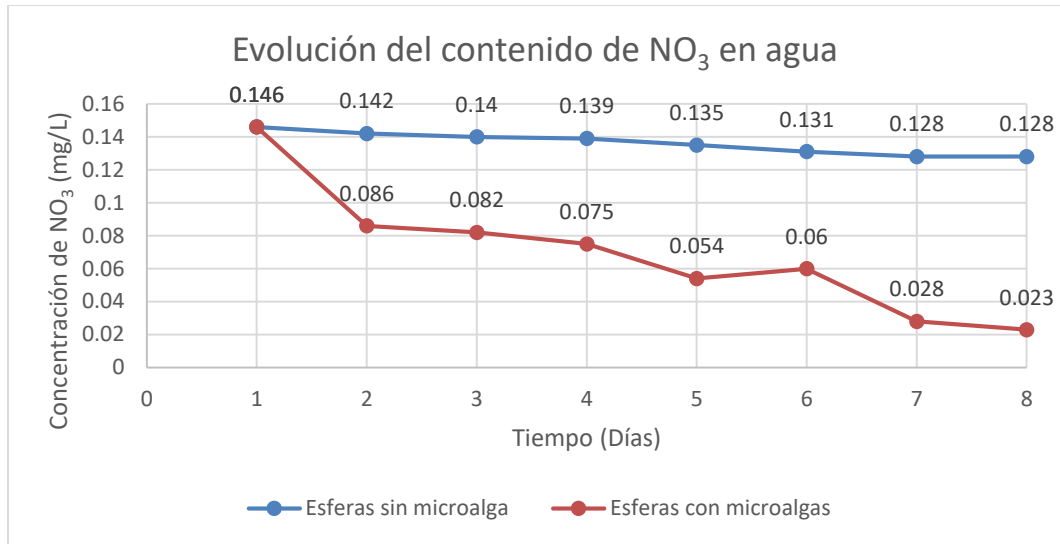


Figura 7. Comparación de los niveles de reducción de NO₃ en la muestra.

3.7.3. Prueba de Reducción de Fosfatos- PO₄

I. Descripción de Hipótesis:

H0: La reducción de la concentración de fosfatos en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalgas es similar ($\mu_A = \mu_B$)

H1: La reducción de la concentración de fosfatos en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalgas es diferente ($\mu_A \neq \mu_B$)

II. Prueba de Hipótesis:

H0: $\mu_A = \mu_B$

H1: $\mu_A \neq \mu_B$

III. Nivel de Significancia

$\alpha = 0.05$

IV. Prueba Estadística

$F = SCT/SCE$

Factor de Corrección (FC): 0,3338

Suma de Cuadrados Totales (SCT): 0,0376

Suma de Cuadrados de los tratamientos (SCt): 0,0023

Suma de Cuadrados del Error (SCE): 0,0353

Tabla 9.

Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de fosfatos

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F _c	F _{tab}
Tratamientos	1	0,0023	0,0023	0,9046	4,6
Error	14	0,0353	0,0025		
Total	15	0,0376	0,0025		

V. Regla de Decisión:

Si $F_c < F_t$ se acepta H_0

VI. Conclusión:

Existe suficiente evidencia estadística ($\alpha = 0.05$) para afirmar que los niveles de reducción de PO_4 con ambos tipos de esferas es similar.

VII. Resultados:

Reducción de fosfatos en el agua

Descripción Tratamientos

- Esferas sin microalga: 0.156^a - Concentración de PO_4 (mg/L)
- Esferas con microalgas: 0.133^a - Concentración de PO_4 (mg/L)

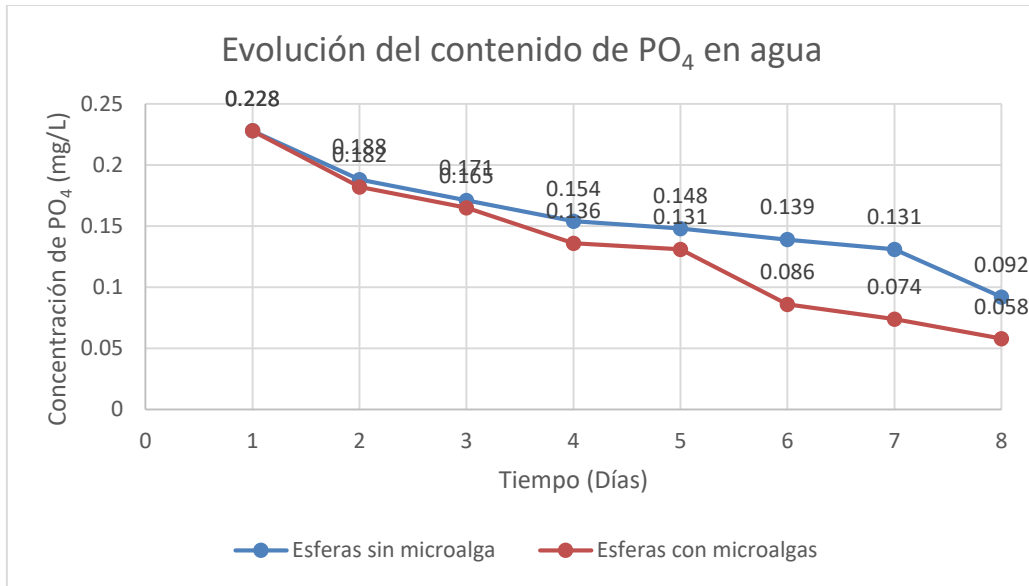


Figura 8. Comparación de los niveles de reducción de PO4 en la muestra.

3.7.4. Prueba de Reducción de Amonio- NH_4^+

I. Descripción de Hipótesis:

H0: La reducción de la concentración de amonio en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalgas es similar ($\mu_A = \mu_B$)

H1: La reducción de la concentración de amonio en el agua con ambos tratamientos de esferas con microalga y sin microalgas es diferente ($\mu_A \neq \mu_B$)

II. Prueba de Hipótesis:

H0: $\mu_A = \mu_B$

H1: $\mu_A \neq \mu_B$

III. Nivel de Significancia

$\alpha = 0.05$

IV. Prueba Estadística

$F = S_{Ct}/S_{CE}$

Factor de Corrección (FC): 0,7718

Suma de Cuadrados Totales (SCT): 0,0806

Suma de Cuadrados de los tratamientos (SCt): 0,0014

Suma de Cuadrados del Error (SCE): 0,0792

Tabla 10.

Análisis de la varianza para la prueba de comparación de reducción de amonio

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F _c	F _{tab}
Tratamientos	1	0,0014	0,0014	0,2419	4,6
Error	14	0,0792	0,0057		
Total	15	0,0806	0,0054		

V. Regla de Decisión:

Si $F_c < F_{tab}$ se acepta H0

VI. Conclusión:

Existe suficiente evidencia estadística ($\alpha = 0.05$) para afirmar que los niveles de reducción de NH₄ con ambos tipos de esferas es similar.

VII. Resultados:

Reducción de fosfatos en el agua

Descripción Tratamientos

- Esferas sin microalga: 0.229^a - Concentración de NH₄ (mg/L)
- Esferas con microalgas: 0.210^a - Concentración de NH₄ (mg/L)

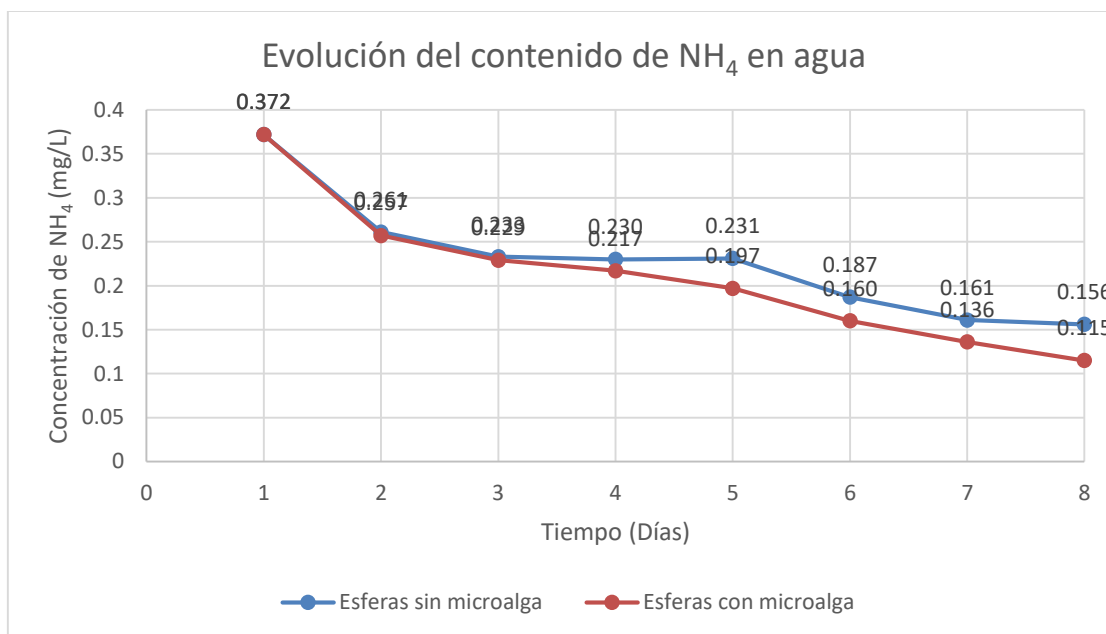


Figura 9. Comparación de los niveles de reducción de NH_4^+ en la muestra

IV. Resultados

Se muestra los resultados obtenidos en las dos etapas en la cual se llevó a cabo esta investigación, la primera etapa en el laboratorio de Cultivos Menores donde se controló, registro y monitoreo diariamente el crecimiento del cultivo de microalgas y las condiciones ambientales (temperatura y pH) y la segunda etapa realizada en el laboratorio de Contaminación Ambiental y Recursos Marinos donde se analizó el rendimiento de la Fitodepuración de las esferas de alginato con microalgas y sin microalgas.

4.1. Crecimiento de cepa microalgal

Se logró obtener las condiciones adecuadas para el crecimiento de la microalga *Desmodesmus quadricauda* a nivel de laboratorio en el medio de cultivo CHU, en tres fotobiorreactores dos de 2 L y uno de 5 L esterilizados a una temperatura entre 26 a 28 °C, con

aireación y presencia de luz durante 15 días, en fotoperiodos de 12 hs luz artificial (luz fluorescente) y 12 hs oscuridad.

El monitoreo diario del cultivo de microalga se reportó los siguientes datos en la presente tabla:

Tabla 11.
Registro del crecimiento y parámetros in situ de la biomasa "Desmodesmus quadricauda".

Día	Crecimiento Algal (Cel/ml)	Temperatura Del Fotobiorreactor (C °)	pH
1	43333,33	27	6
2	45555,56	25	6
3	61111,11	26	6
4	318888,89	27	6
5	530000,00	26	6
6	553333,33	26	6
7	557777,78	27	6
8	676666,67	27	6
9	688888,89	26	6
10	841111,11	26	6
11	1496666,67	28	6
12	1507777,78	26	6
13	1512222,22	27	6
14	1518888,89	26	6
15	1518888,88	27	6

Fuente: Elaboración propia

4.2. Análisis de fitodepuración de nutrientes con esferas de alginato sin microalga

El ensayo se realizó en las siguientes condiciones: 12 botellas de polietileno, con un volumen de 500 ml de agua residual, conteniendo 100 esferas de alginato sin microalga de tamaño entre 0,5 mm a 0,8 mm, en fotoperiodos de 12 hs luz artificial (luz fluorescente) y 12 hs oscuridad, dentro del laboratorio y con aireación continua. Para cada análisis de la concentración de nitrito

NO₂⁻, amonio NH₄⁺, nitrato NO₃⁻ y fosfatos PO₄⁻, se tomó muestra de 200 ml de agua del fotobiorreactor cada 24 horas durante 7 días y refrigeradas en el cooler acondicionado con gel pack.

a) El análisis de la concentración del ion nitrito NO₂⁻, tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 12.

Resultado de la fitodepuración del ion nitrito NO₂⁻ esferas sin microalga (EB)

Día	Concentración de NO ₂ ⁻ (mg/L)- EB
1	0,100
2	0,090
3	0,086
4	0,069
5	0,064
6	0,063
7	0,059
8	0,059

Fuente: Elaboración propia

b) El análisis de la concentración del ion nitrato NO₃⁻ tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 13

Resultado de la fitodepuración del ion nitrato NO₃⁻ esferas sin microalga (EB)

Día	Concentración de NO ₃ ⁻ (mg/L)- EB
1	0,146
2	0,142
3	0,140
4	0,139
5	0,135
6	0,131
7	0,128
8	0,128

Fuente: Elaboración propia

c) El análisis de la concentración del ion amonio NH_4^+ , tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 14

Resultado de la fitodepuración del ion amonio NH_4^+ esferas sin microalga (EB)

Día	Concentración de NH_4^+ (mg/L)- EB
1	0,372
2	0,261
3	0,233
4	0,230
5	0,231
6	0,187
7	0,161
8	0,156

Fuente: Elaboración propia

d) El análisis de la concentración del ion fosfatos PO_4^- tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 15.

Resultado de la fitodepuración del ion fosfato PO_4^- esferas sin microalga (EB)

Día	Concentración de PO_4^- (mg/L)- EB
1	0,228
2	0,188
3	0,171
4	0,154
5	0,148
6	0,139
7	0,131
8	0,092

Fuente: Elaboración propia

e) El análisis de pH tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 16.

Resultado de la concentración de pH esferas sin microalga (EB)

Día	Concentración de pH (Unidad de pH)- EB
1	8,3
2	8,3
3	8,2
4	8,5
5	8,2
6	8,6
7	8,5
8	8,4

Fuente: Elaboración propia

4.3. Análisis de fitodepuración de nutrientes con esferas de alginato con microalga

El ensayo se realizó en las siguientes condiciones: 32 botellas de polietileno, con un volumen de 500 mL de agua residual conteniendo 100 esferas de alginato con microalga, en fotoperiodos de 12 hs luz artificial (luz fluorescente) y 12 hs oscuridad, dentro del laboratorio y con aireación continua. Para cada análisis de la concentración de nitrito NO_2^- , amonio NH_4^+ , nitrato NO_3^- y fosfatos PO_3^- , se tomó muestra de 200 ml de agua del fotobiorreactor cada 24 horas durante 7 días y refrigeradas en el cooler acondicionado con gel pack.

- a) El análisis de la concentración del ion nitrito NO_2^- , tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 17.

Resultado de la fitodepuración del ion nitrito NO_2^- esferas con microalga (EM)

Día	Concentración de NO_2^- (mg/L)- EM
1	0,100
2	0,068
3	0,064
4	0,059
5	0,054
6	0,043

7	0.016
8	0.007

Fuente: Elaboración propia

b) El análisis de la concentración del ion nitrato NO_3^- tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 18.

Resultado de la fitodepuración del ion nitrato NO_3^- esferas con microalga (EM)

Día	Concentración de NO_3 (mg/L)- EM
1	0,146
2	0,086
3	0,082
4	0,075
5	0,054
6	0,060
7	0,028
8	0,023

Fuente: Elaboración propia

c) El análisis de la concentración del ion amonio NH_4^+ , tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla

Tabla 19.

Resultado de la fitodepuración del ion amonio NH_4^+ esferas con microalga (EM)

Día	Concentración de NH_4^+ (mg/L)- EM
1	0,372
2	0,257
3	0,229
4	0,217
5	0,197
6	0,160
7	0,136
8	0,115

Fuente: Elaboración propia

d) El análisis de la concentración del ion fosfatos PO_4^- tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 20.

Resultado de la fitodepuración del ion fosfato PO_4^- esferas con microalga (EM)

Día	Concentración de PO_4^- (mg/L)- EM
1	0,228
2	0,182
3	0,165
4	0,136
5	0,131
6	0,086
7	0,074
8	0,058

Fuente: Elaboración propia

e) El análisis de pH tomada durante 7 días del fotobiorreactor se reportó los siguientes datos en la presente tabla.

Tabla 21.

Registro de la concentración de pH esferas con microalga (EM)

Día	Concentración de pH (Unidad de pH)- EM
1	8,3
2	8,3
3	8,4
4	8,5
5	8,6
6	8,6
7	8,5
8	8,4

Fuente: Elaboración propia

4.4. Análisis de fitodepuración porcentual

Se analizan los resultados obtenidos de los parámetros fisicoquímicos del agua residual del cultivo de carpa, con lo que se determina el porcentaje de fitodepuración de las esferas de microalga y esferas sin microalga.

Porcentaje de fitodepuración (Aslan & Kapdan, 2006)

$$\%R = \frac{C0 - C}{C0} \times 100$$

Dónde: **%R**: Porcentaje de fitodepuración del nutriente **C0**: Concentración inicial del nutriente en el agua residual **C**: Concentración del nutriente luego del tratamiento.

4.4.1. Nitritos (NO₂⁻)

En el Anexo 8. se puede observar que la muestra de esferas con microalga tuvieron mejores resultados que las esferas sin microalga, esto se debe por la capacidad de crecimiento celular de la microalga lo que genera consumo de nutrientes presentes en el agua residual, tiene una incidencia en este parámetro, por la reducción de los niveles de nitritos en las muestras analizadas lo que se obtuvo porcentaje de fitodepuración en las esferas con microalgas del 93% en comparación de las esferas sin microalga que fue un 40 % en el día 8.

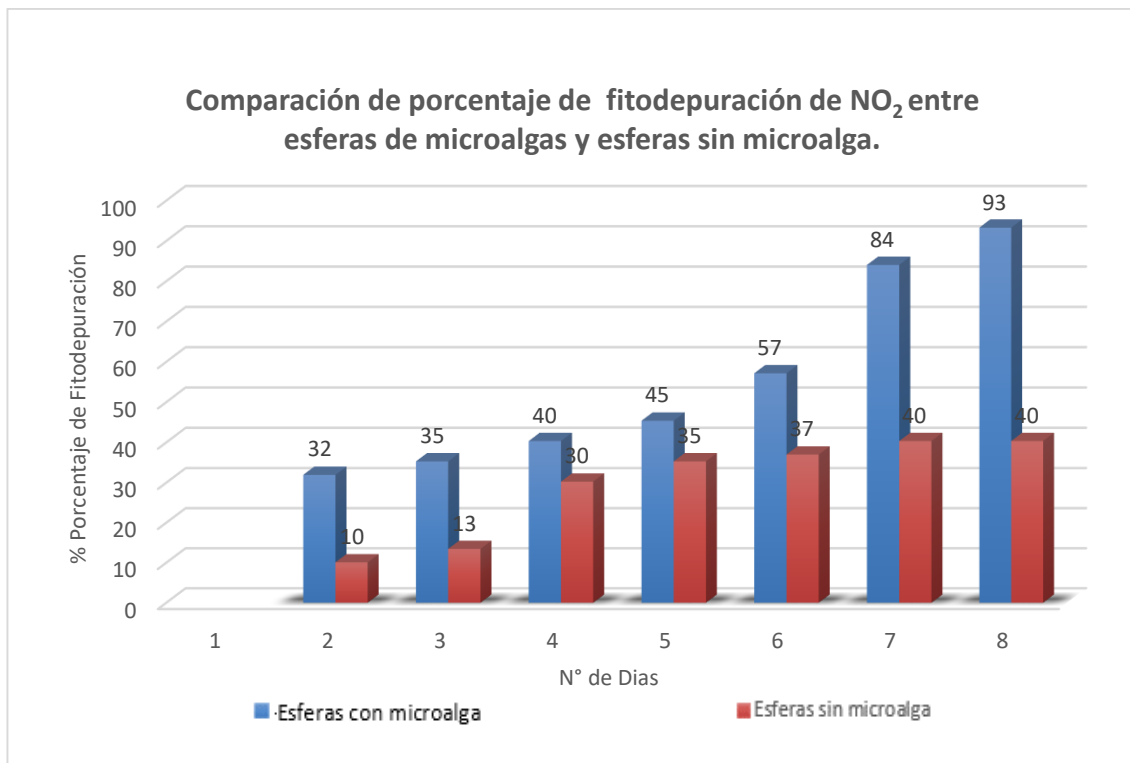


Figura 10.

4.4.2. Nitratos (NO_3^-)

En el Anexo 8 se puede observar que la muestra de esferas con microalga tuvieron mejores resultados que las esferas sin microalga, esto se debe por la capacidad de crecimiento celular de la microalga lo que genera consumo de nutrientes presentes en el agua residual, tiene una incidencia en este parámetro, por la reducción de los niveles de nitratos en las muestras analizadas lo que se obtuvo porcentaje de fitodepuración en las esferas con microalgas del 84 % en comparación de las esferas sin microalga que fue un 12 % en el día 8.

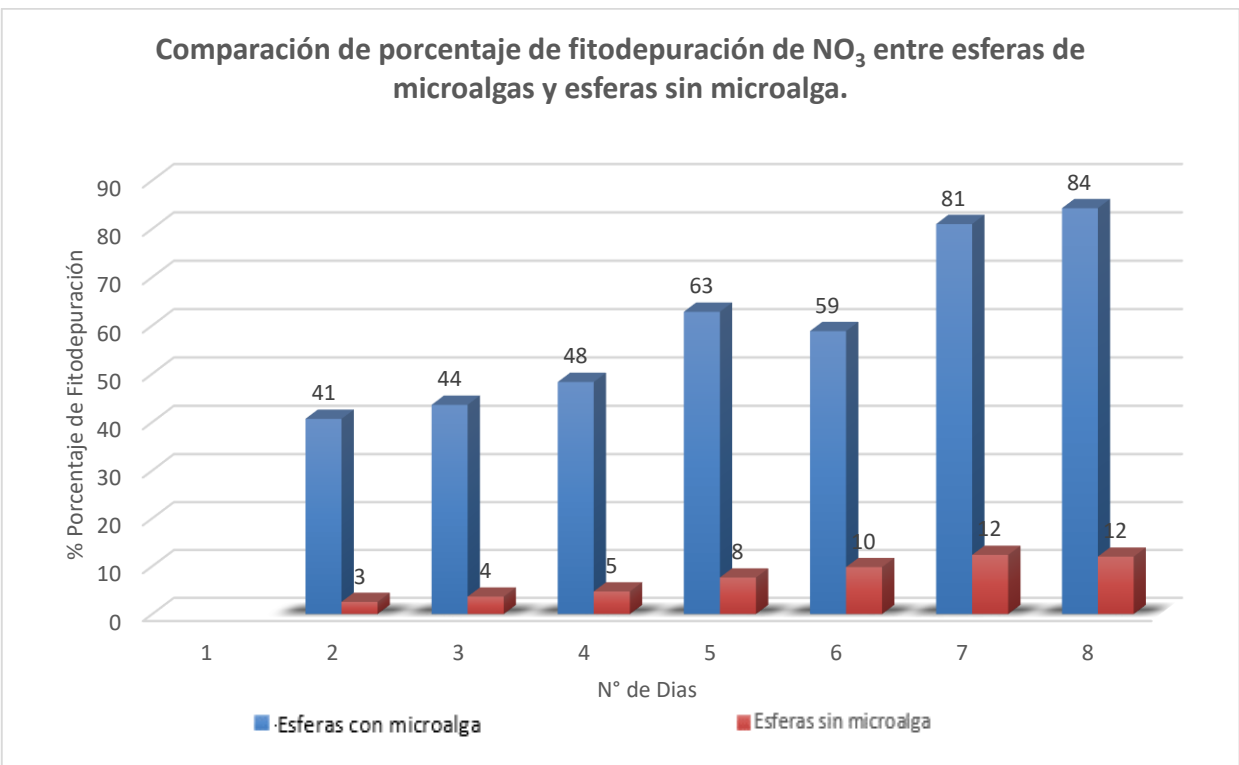


Figura 11. Comparación de fitodepuración de nitratos entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.

4.4.3. Amonio (NH_4^+)

En el Anexo 8 se puede observar que la muestra de esferas con microalga tuvieron mejores resultados que las esferas sin microalga, esto se debe por la capacidad de crecimiento celular de

la microalga lo que genera consumo de nutrientes presentes en el agua residual, tiene una incidencia en este parámetro, por la reducción de los niveles de nitritos en las muestras analizadas lo que se obtuvo porcentaje de fitodepuración en las esferas con microalgas del 69 % en comparación de las esferas sin microalga que fue un 58 % en el día 8.

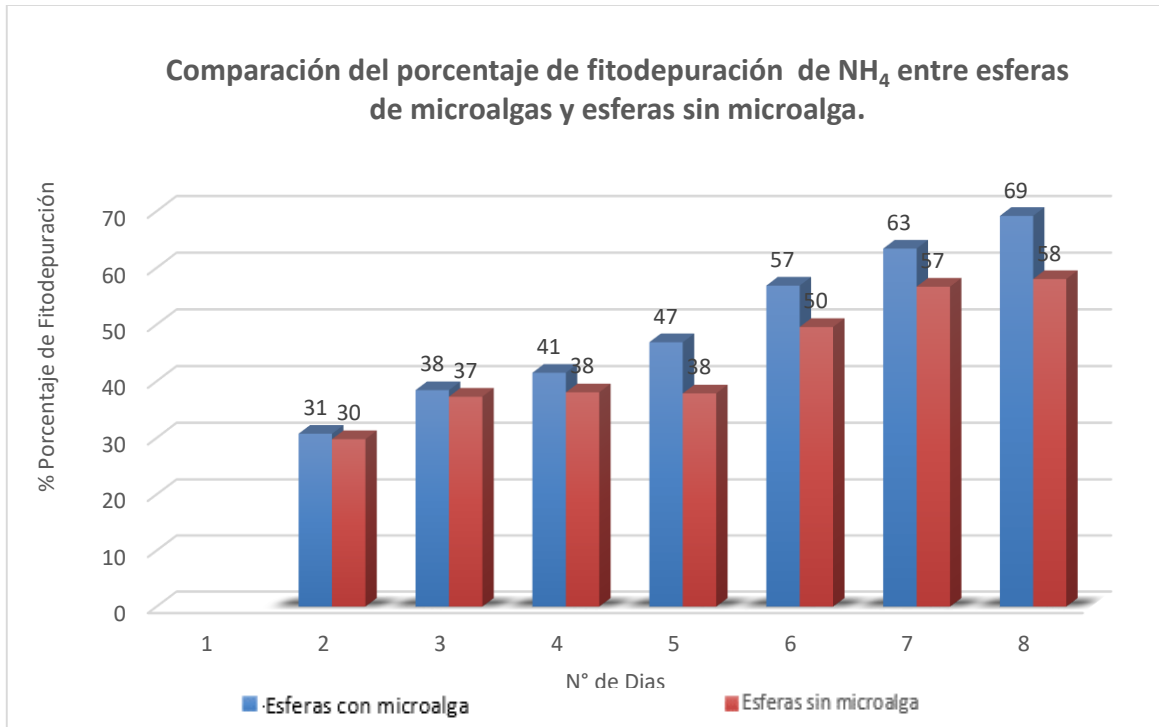


Figura 12. Comparación de fitodepuración de amonio entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.

4.4.4. Fosfatos (PO_4^-)

En la Anexo 8 se puede observar que la muestra de esferas con microalga tuvieron mejores resultados que las esferas sin microalga, esto se debe por la capacidad de crecimiento celular de la microalga lo que genera consumo de nutrientes presentes en el agua residual, tiene una incidencia en este parámetro, por la reducción de los niveles de nitritos en las muestras analizadas lo que se obtuvo porcentaje de fitodepuración en las esferas con microalgas del 75 % en comparación de las esferas sin microalga que fue un 60 % en el día 8.

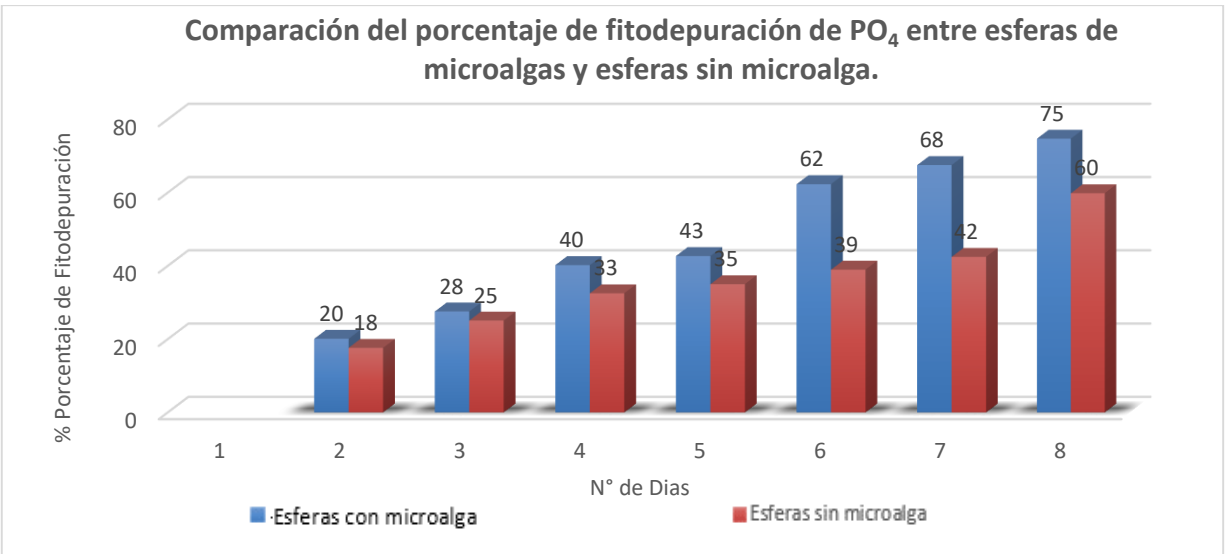
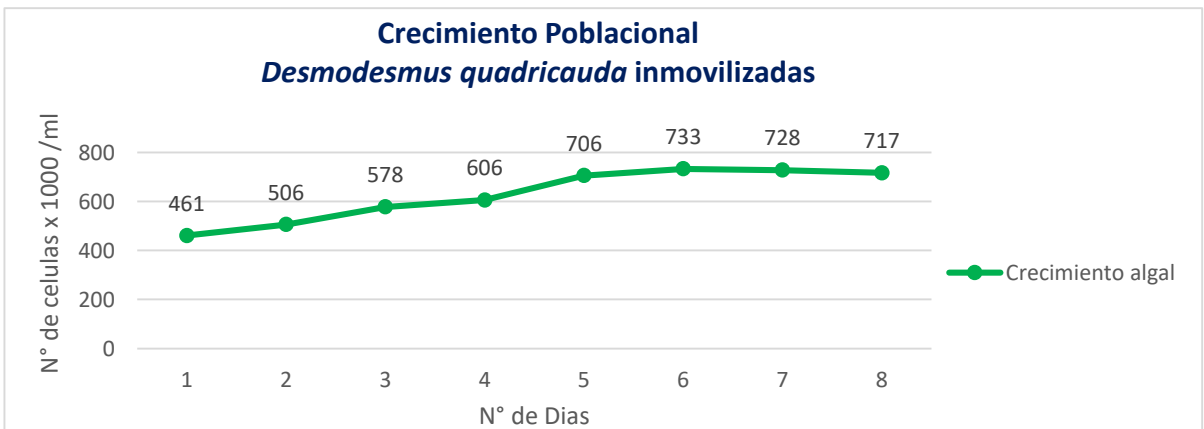


Figura 13. Comparación de fitodepuración de fosfatos entre esferas de microalgas y esferas sin microalga.

4.5. Crecimiento poblacional de las microalgas inmovilizadas

El Crecimiento poblacional de la microalga (*Desmodesmus quadricauda*) inmovilizadas en esferas de alginato de calcio, por la mayor cantidad de nutrientes en el medio se entiende un mayor crecimiento y eficiencia de fitodepuración de nutrientes. Como resultado se evidencio la fase estacionaria en el día 6 al 7 a diferencia del cultivo libre que esta fase estacionaria inicia



entre los días 12-14. Al crecer la microalga la estructura de la esfera no soporta la cantidad de células y esta se deforma a partir del día 9. **Ver Anexo 8.**

Figura 14. Crecimiento de población de la microalga inmovilizada.

V. Discusión

El deterioro gradual de la esfera es un proceso ya reportado por varios autores el cual juega un papel importante en la protección del contenido de la esfera Lebsky ., Gonzales-Bashan & Bashan (2001) señalan que el deterioro se debe al crecimiento de los microorganismo dentro de la esfera; reportan también deformaciones u abultamientos que llegan a fracturarse liberando células al medio, lo cual comparto puesto que el deterioro de las esferas se evidencio en la experimentación en el día 9.

El pH del medio analizado se vio afectado en el tratamiento de esferas con microalga significativamente lo cual concuerda con lo descrito por De-Bashan, Moreno, Hernández, & Bashan, (2002), quienes reportaron un incremento en el pH debido a la actividad fotosintética de la microalga, como resultado de la fotosíntesis ocurre una eliminación del CO₂ libre del medio. Lo que tiene como consecuencia la formación de iones de carbonato reaccionan con el agua para formar iones hidroxilos (OH) lo que conlleva un aumento de pH.

En la experimentación el sistema de fitodepuración es la solución eficaz para remover nitratos y nitritos del agua residual, en comparación a lo reportado por sistema microalga *Chlorella sorokiniana* - bacteria *Azospirillum brasilense* inmovilizadas en esferas de alginato, el tratamiento para remover nitratos no fue eficaz (Hernández, 2011)

En lo que respecta al objetivo principal de efectuar la fitodepuración, con la microalga *Desmodesmus quadricauda* en esferas de alginato fue más eficiente en reducir los niveles nitritos con un porcentaje del 93 % y nitratos fue del 84%, en comparación con la investigación

realizada por Ayodha, (2013), reportó porcentajes menores de remoción de nutrientes en aguas residuales con dos diferentes especies de microalgas, con *Chlorella vulgaris* pudo remover un 78.08% de nitratos y 62.73% para fosfatos, y también con *Scenedesmus sp.*, consiguieron remover un 70.32% para nitratos y 81.34% para fosfatos.

Demostró Castaños (2010) la exposición de la gota de alginato de sodio con la solución de cloruro de calcio fue de 10 minutos de modo que capture la mayor cantidad de iones Ca^{++} contribuyendo a la formación de la cápsula de alginato, concluyendo a mayor tiempo de exposición se llega al proceso de gelificación, se concuerda con lo descrito la concentración de cloruro calcio influye en la estabilidad de la esfera de alginato.

VI. Conclusiones

- Se evidenció disminución de la concentración de la microalga en el fotobiorreactor a partir del día 9, acompañada por el deterioro de las esferas de alginato y proceso de sedimentación.
- Se demostró que a condiciones de temperatura entre 26 a 28 °C, con aireación y presencia de luz durante 15 días en los meses de febrero y marzo en el año 2019, la microalga *Desmodesmus quadricauda* se adaptó al medio de cultivo CHU, obteniendo la cantidad de microalga necesaria para el preparado algal. Se encontró que existe relación directa entre la velocidad de crecimiento con respecto a la fitodepuración de los parámetros analizados debido a la reducción de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos esto se evidencia en el día 6.
- Se determinó que la mayor fitodepuración para nitritos se logró con las microalgas inmovilizadas en alginato obteniendo un porcentaje del 93 % de fitodepuración en comparación a las esferas sin microalgas que se obtuvo un 40%.
- Se obtuvo un porcentaje mayor de fitodepuración para fosfatos en las esferas con microalgas fueron de un 75 % de reducción en comparación de las esferas sin microalga que fue un 60 % en el día 8.
- Se determinó que la mayor fitodepuración de nitratos se logró con las microalgas inmovilizadas en alginato obteniendo un porcentaje del 84 % de fitodepuración en comparación a las esferas sin microalgas que se obtuvo un 12% en el día 8.

- Los rendimientos de fitodepuración obtenidos para aguas residuales provenientes del cultivo de carpas, indican la posibilidad de aplicación del método como tratamiento de estos efluentes. Los porcentajes promedios determinados para la fitodepuración fueron superiores al 79 %.
- La reducción en los contenidos de nitrógeno y fósforo a los valores inferiores 0,007 y 0,058 mg/L, respectivamente durante la fitodepuración en los fotobiorreactores, suponen una mejora de la calidad del agua, minimizando el riesgo de eutrofización de efluentes vertidos.
- El valor del pH del agua residual proveniente del cultivo de carpas, a lo largo del experimento de 8 días el pH aumentó gradualmente hasta el pH 8.6 esto se debe al aumento de la fotosíntesis y a la acumulación de iones hidroxilo (OH⁻).
- La introducción de esferas de alginato sin microalga sí contribuyó significativamente en la fitodepuración de amonio en 52 % y Fosfatos 60 %.
- La temperatura no es una variable importante por lo tanto no debe ser una variable descartable en el proceso de fitodepuración de nitratos, nitritos, amonio y fosfatos sobre las microalgas inmovilizadas.
- Los resultados obtenidos en el análisis de los parámetros físico químicos (pH, nitritos, nitratos, amonios y fosfatos) después de la fitodepuración, se evidencian que las muestras de esferas de microalga y con las esferas sin microalga tuvieron un efecto con relación a los valores obtenidos; donde las muestras de microalga inmovilizadas en esferas de alginato presentaron mejores resultados de fitodepuración.
- La reducción de los niveles de concentración de nitritos según el tratamiento de esferas con microalgas es acelerado y eficiente, en un promedio 0.051 de reducción de

concentración de NO_2 (mg/L), en comparación con el tratamiento de esferas sin microalga el cual fue deficiente reportando un promedio 0.074 de reducción de concentración de NO_2 (mg/L).

- La reducción de los niveles de concentración de nitratos según el tratamiento de esferas con microalgas es acelerado y eficiente, en un promedio 0.069 de reducción de concentración de NO_3 (mg/L), en comparación con el tratamiento de esferas sin microalga el cual fue deficiente reportando un promedio 0.136 de reducción de concentración de NO_3 (mg/L).
- La reducción de los niveles de concentración de fosfatos según el tratamiento de esferas con microalgas es deficiente, en un promedio 0.133 de reducción de concentración de PO_2 (mg/L), similarmente el tratamiento de esferas sin microalga fue deficiente reportando un promedio 0.156 de reducción de concentración de PO_2 (mg/L).
- La reducción de los niveles de concentración de amonio según el tratamiento de esferas con microalgas es deficiente, en un promedio 0.210 de reducción de concentración de NH_4 (mg/L), similarmente el tratamiento de esferas sin microalga fue deficiente reportando un promedio 0.229 de reducción de concentración de NH_4 (mg/L).

VII. Recomendaciones

- Para la inmovilización de las microalgas en alginato de calcio es necesario tener en cuenta la proporción es de 2:1 para el preparado algal, su mantenimiento y su fragilidad o dureza.
- Se recomienda estudiar el efecto que tienen otros diferentes medios de inmovilización, las investigaciones mencionadas aquí se encuentran comúnmente en relación a la remoción de nutrientes de las aguas residuales, en el crecimiento y procesos metabólicos de las microalgas, genera alternativas de uso de la biomasa algal por ejemplo, en la formulación de piensos para peces de cultivo buscando aprovechar sus propiedades
- Para el fotobiorreactor de microalgas inmovilizadas, es adecuado utilizar especie con capacidades de adaptación en el medio a evaluar y crecimiento población acelerado.

VIII. Referencias

- Araujo, G.S., Matos, L., 2011. Bioprospecting for oil producing microalgal strains: Evaluation of oil and biomass production for ten microalgal strains. *Bioresource Technology* 102, 5248-5250.
- Aslan S., & Kapdan IK. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol. Eng*(28), 64-70.
- Aslan, S., Kapdan, I.K., 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering* 28, 64-70
- Ayodha D, K. (2013). Bioremediation of wastewater by using microalgae: an experimental study. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*(3), 339 - 346.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2006). *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. USA: CRC Press.
- Bashan Y. & Bashan L. (2005) Alginate beads as synthetic inoculants carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied Environmental Microbiology*.51:1089-1098.
- Becker E. (1984) Biotechnology and exploitation of the green alga *Scenedesmus obliquus* in India. *Biomass*. 4,1-19.
- Becker P. (2003). *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. New York, p.267, 293.
- Bermeo, L. E. (2011) Estudio del cosechado de cultivos de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.
- Brennan, L. & Owende P (2010) Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and coproducts. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 14(-), 217-232.

- Caldwell D. H. (1946). Sewage oxidation ponds-performance, operation and design. *Sewage Wsk J.*, 18, 433-458
- Camacho F., Ación F., Sánchez J. y García F. (1999). Prediction of Dissolved Oxygen and Carbon Dioxide Concentration Profiles in Tubular Photobioreactors for Microalgal Culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 62.1
- Camacho F., Martínez M., Sanchez S., Pérez A. (1989) Influence of pH on the kinetic and yield parameters of *Scenedesmus obliquus* heterotrophic growth. *Process Biochem.* 133-136.
- Cañizares R.O, Rivas, L. , Montes, C. , Domínguez A., Travieso, L. y Benítez F. (1994) Aerated swinewastewater treatment with k – carrageenan -immobilized *Spirulina maxima*. CINVESTAV-IPNCNIC. Short Communication. *Bioresource Technology*, 89-91p.
- Castaños, O. F. (2010). *Determinación de iones Ca⁺⁺ mediante el método de espectroscopía de absorción atómica (EAA) en cápsulas de alginato*. Tesis de pregrado. Facultad de ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, 61 pp
- D.S N°015-2015-MINAM-*Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación*. Autoridad Nacional del Agua.
- De-Bashan, L., Moreno, M., Hernandez, J. & Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*, 36, 2941–2948.
- De Godos I., Gonzáles C., Becares E., García-Encina P. y Muñoz R., (2009). *Una evaluación comparativa de las microalgas para la degradación de las aguas residuales de la lechería bajo oxigenación fotosintética*, Valladolid, España.

- Dervakos AG, Webb C (1991) On the merits of viable-cell immobilization. *Biotechnol. Adv.* 9: 559-612.
- Egmont Spelter L. & Steiwand Anna (2010) Nirschl Hermann. Processing of dispersions containing fine particles or biological products in tubular bowl centrifuges. *Chemical Engineering Science.* 65: 4173–4181.
- Ertesbåg H & Valla S. (1998). Biosynthesis and applications of alginates. *Polymer Degradation and Stability* 59: 85-91.
- FAO. (1989). Proyecto GCP/RLA/075/ITA. Apoyo a las Actividades Regionales de Acuicultura para América Latina y el Caribe. Brasília, Brasil
- García, S., Gonzales, J. C., Frascaroli M., Blanes, P., Novello, M.A., Molinaria P. y Sala, L.F. (2000), *Remediación de aguas de desecho empleando alga encapsulada*. Argentina-Universidad Nacional de Rosario.
- Garibay HA, Vázquez-Duhalt R, Sánchez SMP, Serrano CL y Martínez JA (2009). Biodiesel a partir de Microalgas. *Biotecnología.* 13, 38-61.
- Golueke, C. G., Oswald, W. J. (1965). Harvesting and processing sewage-grown algae. *J. Water Pollut. Contr. Fed.* 37: 471-98.
- González-Moya, M. (2015) *Inmovilización de Coelastrum sp. en esferas de alginato y su uso como biosorbentes de cafeína*. Tesis de grado. Universidad de Cádiz, España.
- Gouveia L, Marques AE, Lopes da Silva T, Reis A (2009) *Neochloris oleabundans* UTEX # 1185: una fuente de lípidos renovable adecuada para la producción de biocombustible. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36: 821–826
- L.Gouveia,(2011) Microalgae as a Feedstock for Biofuels, *Springerbrief in Microbiology*.

- Hashimoto S & Furukawa K. J. (1989) Fermentation and Bioengineering ,67:62-69. *Journal of Bioscience and Bioengineering*
- Hernández S. (2011) *Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato como protección contra condiciones adversas en un tratamiento de agua residual*. Tesis de grado de maestro en ciencias, La Paz Baja California Sur, México
- Karel, S., Libicki, S., Robertson, C. (1985) The immobilization of whole cells engineering principles. *Chemical Engineering Science*. 40, 1321–1354
- Lebsky V., Gonzales-Bashan L. & Bashan Y. (2001) Ultrastructure of interaction in alginat beads between the microalgae *Chlorella vulgaris* with his natural asociative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and the plant growthpromoting bacteria *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*.47:1-8
- Lee, R. (2008). *Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge. 547 p
- MD Guiry en Guiry, MD & Guiry, GM (2019). AlgaeBase. Publicación electrónica mundial, Universidad Nacional de Irlanda, Galway. <http://www.algaebase.org>; Buscado el 08 de marzo de 2019.
- Méndez L. Albarracín I., Cravero M. y Salomón R. (2010). *Crecimiento de Scenedesmus quadricauda en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina*.
- Ministerio del Ambiente del Perú (2015) *Modifican los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación Decreto Supremo N° 015-2015-MINAM*. Lima: Ministerio del Ambiente del Perú.
- Molina Grima, E., Belarbi, E.H (2003) Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnology Advances* 20. 491-515.

- Molina Grima E, García Camacho F, Sánchez Pérez JA, Fernández Sevilla JM (1996) A study on simultaneous photolimitation and photoinhibition taking into account incident and averaged irradiances. *J. Biotechnol.* 45: 59–69.
- Moreno-Garrido, I., Campana, O., Lubián, L. M., & Blasco, J. (2005). Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Marine Pollution Bulletin*, 51(8–12), 823-829.
- Olguín, E.J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnol Adv.* 22(1-2):81-91.
- Oswald, W., Gotaas, H.B., Golueke, C.G., Kellen, W., Gloyna E.F. y Hermann, E. (1957). Algae in waste treatment. *Sewages and Industrial Wastes*. 29:437-455.
- Oswald W. (1995) Ponds in the twenty-first century. *Water Sci. Technol.* 31,1-8.
- Pittman, J. K., Dean, A. P., 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102, 17-25.
- Posten, C., (2009). Design principles of photo-bioreactors for cultivation of microalgae. *Engineering in Life Sciences*. 9, 165-177.
- Pulz, O., (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57, 287-293.
- Pulz, O. & Scheinbenbogan, K., (1998) Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 59,123-152.
- Rawat I, Ranjith-Kumar, R., Mutanda, T. & Bux, F. (2011) Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy* 88: 3411-3424

- Richmond, A. (Ed.), 2004. *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK.
- Richmond A. 1986. Microalgaculture. CRC, *Critical Reviews in Biotechnology*, 4, pp. 369-438
- Riquelme, C. y Avendaño R. (2003) Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural.*, 76: 725-736.
- Salazar, M. (2005) Aplicación e importancia de la microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, 59:64-70.
- Sánchez E.L., Garza T., 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. México – UANL.*
- Shelef, G.; R. Moraine and G. Oron (1978): Photosynthetic biomass production from sewage. *Arch. Hydrobiol. Ergebn. Limnol.*, 11: 3-14.
- Turpin, P. (1828) Aperçu organographique sur le nombre deux, considéré comme multiplicateur de quatre, huit, douze, seize, trentedeux et soixante-quatre dans la structure des végétaux d'un ordre inférieur-Mém. *Mus. Nat. Hist. Nat.* (Paris) 16: 295-344
- Xin, L & Hong-yin, H. (2010) Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology* 101, 5494-5500
- Xiong, W., Li, X., Xiang, J., Wu, Q. (2008) High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production. *Appl Microbiol Biotechnol* 78(1):29-36
- Ynga Huamán, G. (2011). "Cultivo masivo de microalgas en biorreactores verticales," 61. Tesis de grado, Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa.

IX. Anexos

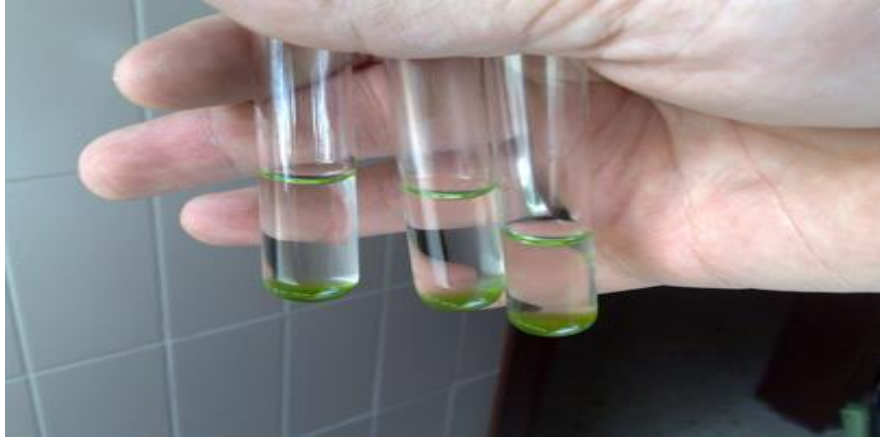
Anexo 1. Estanque Circular N°3-EPSE-FOPCA-UNFV



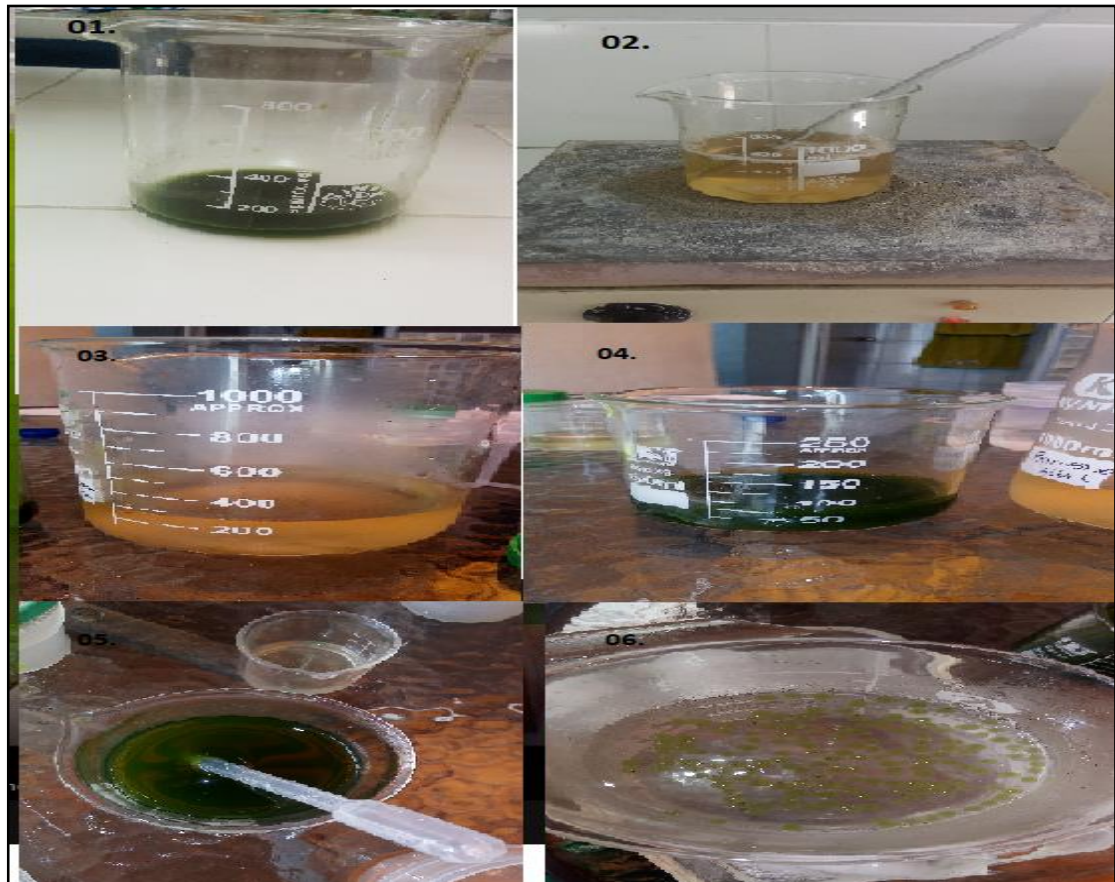
Anexo 2. Fotobiorreactor de la microalga *Desmodesmus quadricauda*



Anexo 3. Prueba de centrifugación de la microalga *Desmodesmus quadricauda*

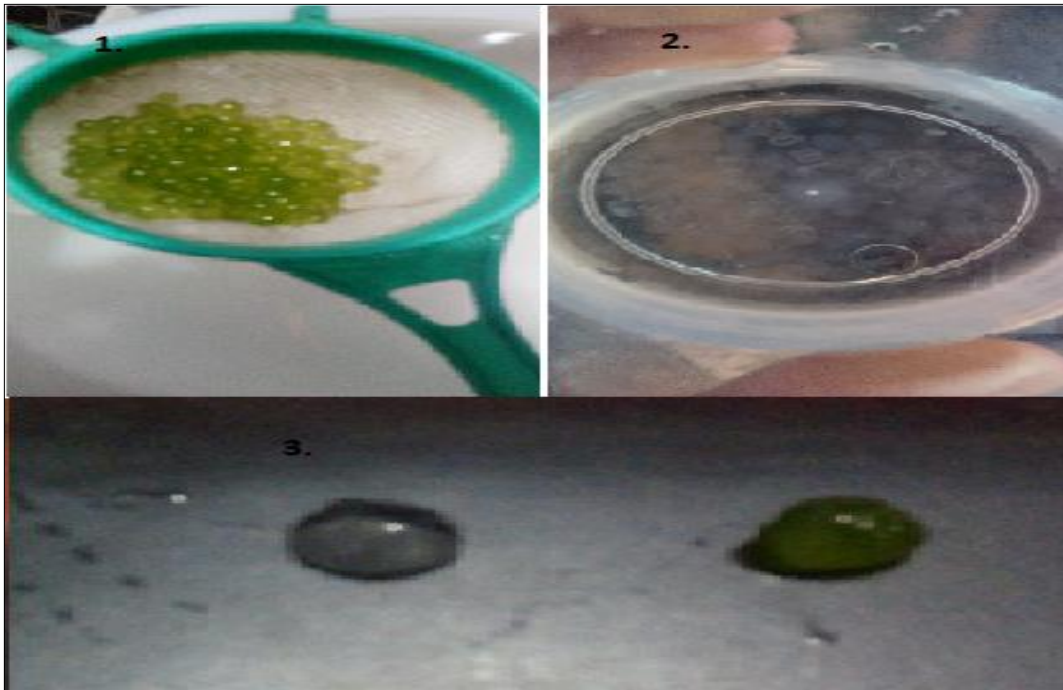


Anexo 4. 01. Preparado algal (centrifugación) 02. Calentamiento de la solución de alginato de sodio diluida en agua destilada por 10 minutos (Placa Calefactora). 03. Enfriamiento de la solución de alginato de calcio. 04. Mezcla de alginato de sodio y preparado algal hasta su homogenización. 05. Se Pipeteo la mezcla de microalga –alginato y por goteo se dejó caer en el vaso precipitado de cloruro de sodio para la formación de esferas.

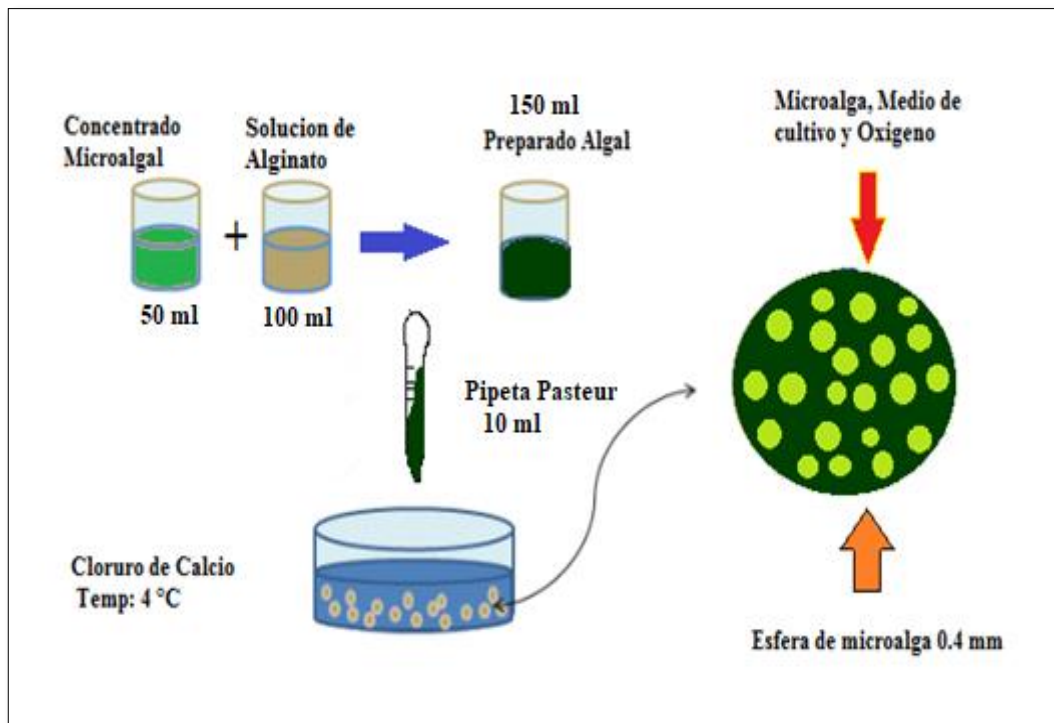


Anexo 5. Obtención de Esferas de alginato

1. Esferas de alginato con microalga.
2. Esferas de alginato sin microalga.
3. Tamaño de esferas entre 0.4 mm a 0.6 mm



Anexo 6. Esquema de preparación de esferas de alginato

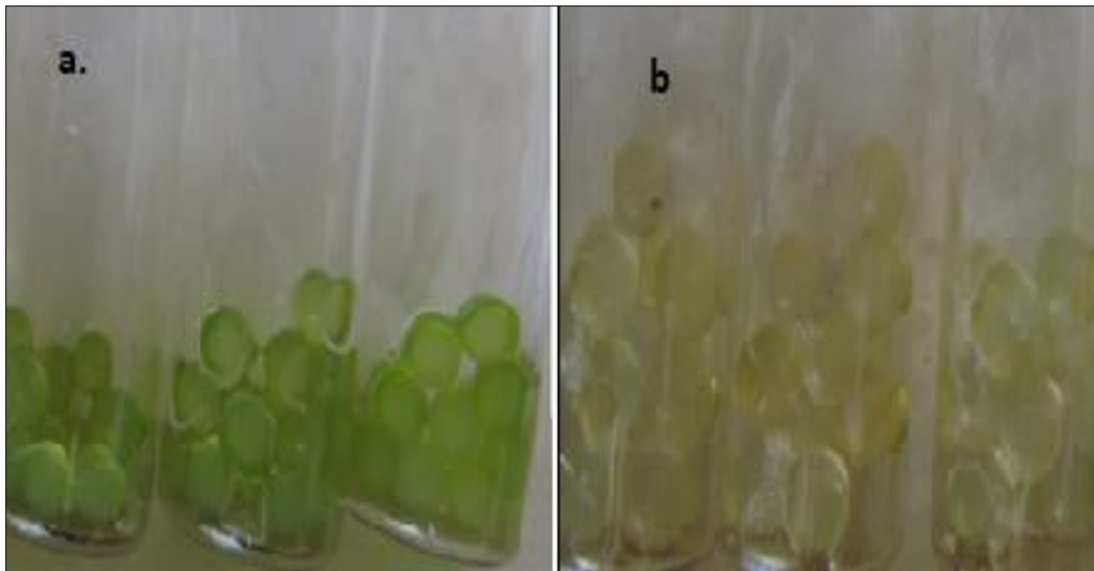


Anexo 7. Montaje de fotobiorreactores

1. Botella de 600 ml conteniendo 100 esferas de alginato con microalga
2. Montaje de los fotobiorreactores acondicionados de luz y agitación constante.



- Anexo 8. a. Crecimiento de microalgas en las esferas de alginato día 6. Fase Exponencial y b. Esferas de alginato sin microalgas día 6.



Anexo 9. Centrifuga Lesco



Anexo 10. Espectofotometro
uv-vis 6405, jenway



Anexo 11. Multiparámetro portátil hanna
instruments hi 982

