

UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ

Facultad de Ciencias e Ingeniería

Escuela Profesional de Ecología.



**Evaluación de la remoción de
contaminantes en lixiviado empleando
tres especies de microalgas oleaginosas
amazónicas.**

Autora:

SHEYLA LENIT PEREZ GALLARDO.

**TESIS PRESENTADO PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
LICENCIADO EN ECOLOGÍA.**

IQUITOS-PERÚ

2015

DEDICATORIA

A Dios, por guiar siempre mi camino y permitir que día a día pueda cumplir con las metas que me propongo.

A mis Padres, el Sr. Jorge Perez Zúñiga y la Sra. Gema Gallardo Sotelo por brindarme su apoyo constante a lo largo de mi vida en lo moral, económico, sabios consejos, cariño y comprensión para formarme como profesional.

A mi hermano, Gunter Perez Gallardo porque me motiva a seguir progresando para ser un ejemplo a seguir en su vida y de igual manera va dedicado a mí novio Sunio López Bautista por su apoyo y comprensión en el transcurso de la ejecución de la tesis.

Sheyla Lenit Perez Gallardo

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Científica del Perú, por haberme dado la oportunidad de ingresar a esta prestigiosa institución y así poder crecer como persona y formarme como profesional.

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú por permitir el uso de sus equipos, materiales y reactivos.

A mi asesora la Dra. Marianela Cobos Ruiz y a su esposo el Dr. Juan Carlos Castro Gómez por depositar su confianza en mí, y por su apoyo académico y motivación en todo momento; antes, durante y después de la ejecución de la tesis para así poder concluirlo.

A mis amigos Diana Paredes, Oscar Vásquez, María Casuso por toda la colaboración brindada en todo el transcurso de la tesis.

También va dedicado a todas aquellas personas que de alguna u otra forma me brindaron su valioso tiempo e información necesaria para la realización de la presente tesis.


MUCHAS GRACIAS.

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR:



Ing. Ulises Octavio Izgoín Cabrera

PRESIDENTE



Ing. Carmen Patricia Cedeña Del Águila Mgr.

MIEMBRO



Blgu. Carlos Roberto Dávila Flores Mgr.

MIEMBRO



Dra. Mariacela Cobos Ruiz.

ASESORA



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Iquitos, a las 11:00 horas del día miércoles 22 de abril del año 2015, se reunió el Jurado Examinador, que firma al final del presente documento, para evaluar la Sustentación de la bachiller en Ecología:

SHEYLA LENIT PEREZ GALLARDO

En la modalidad de: **SUSTENTACIÓN DE TESIS**

"Evaluación de la remoción de contaminantes en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas"

Después de las deliberaciones correspondientes, se procedió a evaluar:

| Indicador | Examinador 1 | Examinador 2 | Examinador 3 | Promedio |
|---|--------------|--------------|--------------|----------|
| A) Dominio del Tema | 17 | 17 | 17 | 17 |
| B) Calidad de Redacción de la Tesis | 17 | 17 | 17 | 17 |
| C) Competencia Expositiva (Claridad conceptual, argumentación y coherencia) | 17 | 17 | 17 | 17 |
| D) Calidad de Respuestas | 17 | 17 | 17 | 17 |
| E) Uso de Terminología Especializada | 17 | 17 | 17 | 17 |
| Calificación Final: | 17 | 17 | 17 | 17 |

Aprobado Por: Unanimidad

Calificación Final (en letras): Diecisiete

- Presidente: Ing. Ulises Octavio Irigoin Cabrera
- Miembro: Ing. Carmen Patricia Cerdeña Del Aguila Mgr.
- Miembro: Bigo. Carlos Roberto Dávila Flores Mgr.

| INDICADOR | PUNTAJE |
|-------------------------|--------------------|
| Desaprobado | Menos de 13 puntos |
| Aprobado por Mayoría | De 14 a 15 puntos |
| Aprobado por Unanimidad | De 16 a 17 puntos |
| Aprobado por Excelencia | De 18 a puntos |

La Universidad Vive en Ti

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | Pág. |
|---|------------|
| DEDICATORIA | <i>ii</i> |
| AGRADECIMIENTO | <i>iii</i> |
| JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR | 4 |
| ÍNDICE DE TABLAS | 8 |
| ÍNDICE DE FIGURA | 9 |
| RESUMEN | 10 |
| ABSTRACT | 11 |
| CAPÍTULO I | |
| Introducción | 12 |
| CAPÍTULO II | |
| Objetivos. | 14 |
| CAPÍTULO III | |
| Marco Teórico y Conceptual. | 15 |
| 3.1. Marco Teórico. | 15 |
| 3.1.1. Generalidades de los lixiviados. | 15 |
| 3.1.2. Características de los lixiviados. | 16 |
| 3.1.3 Efectos ambientales de los lixiviados | 18 |
| 3.1.4. El pH en el agua | 20 |
| 3.1.5. El nitrógeno amoniacal en el agua | 20 |
| 3.1.6. El nitrito de nitrógeno en el agua. | 20 |
| 3.1.7. La alcalinidad en el agua | 21 |
| 3.1.8. El dióxido de carbono en el agua. | 22 |
| 3.1.9. La dureza en el agua | 22 |

| | |
|---|----|
| 3.1.10. El cloruro en el agua | 23 |
| 3.1.11. El fosforo en el agua | 24 |
| 3.2.1. Generalidades de las microalgas | 25 |
| 3.2.2. Microalgas oleaginosas | 26 |
| 3.2.3. Crecimiento microalgal | 27 |
| 3.2.4. Curva de crecimiento microalgal | 27 |
| 3.2.4.1. Fase de adaptación | 27 |
| 3.2.4.2. Fase exponencial | 27 |
| 3.2.4.3. Fase de declinación relativa del crecimiento | 28 |
| 3.2.4.4. Fase estacionaria | 28 |
| 3.2.4.5. Fase de muerte | 28 |
| 3.2.5. Remoción de contaminantes | 29 |
| 3.3. Definiciones de términos básicos | 31 |
| 3.4. Antecedentes | 33 |
| CAPÍTULO IV | |
| 4.1. Materiales y Métodos. | 35 |
| 4.1.1. Lugar y desarrollo de la investigación. | 35 |
| 4.2. Recursos utilizados. | 35 |
| 4.2.1. Materiales. | 35 |
| 4.2.2. Equipos. | 36 |
| 4.2.3. Reactivos. | 36 |
| 4.2.4. Programas. | 37 |
| 4.3. Tipo y diseño de Investigación. | 37 |
| 4.4. Población y Muestra. | 38 |
| 4.4.1. Población | 38 |
| 4.4.2. Muestra | 38 |

| | |
|--|----|
| 4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos. | 38 |
| 4.5.1. Técnicas de recolección de datos. | 38 |
| 4.5.2. Instrumentos de recolección de datos. | 38 |
| 4.5.3. Procedimiento experimental. | 38 |
| 4.5.3.1. Cultivo y cosecha microalgal. | 39 |
| 4.5.3.2. Evaluación de los ensayos de remoción de contaminantes en lixiviado | 39 |
| 4.5.3.3. Cosecha de la Biomasa microalgal. | 39 |
| 4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales. | 40 |
| 4.6. Análisis de datos | 40 |
| CAPÍTULO V | |
| RESULTADOS | 41 |
| CAPÍTULO VI | |
| DISCUSIÓN | 52 |
| CAPÍTULO VII | |
| CONCLUSIONES | 53 |
| CAPÍTULO VIII | |
| RECOMENDACIONES | 54 |
| CAPÍTULO IX | |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 55 |
| ANEXO | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Nº | Título | Pág. |
|-----------|---|-------------|
| 01. | Remoción de los compuestos nitrogenados, dióxido de Carbono y Cloruro empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. | 38 |
| 02. | Remoción de cloruro empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. | 39 |
| 03. | Cambios de los valores de dureza y alcalinidad empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. | 41 |
| 04. | Cambios de los valores de Fosforo y pH empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. | 42 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| Nº | Título | Pág. |
|-----|---|------|
| 01. | Perfil de crecimiento de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en lixiviado. | 44 |
| 02. | Producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en lixiviado. | 46 |
| 03. | Materiales para la preparación del medio CHU10 para el cultivo Inicial. | 60 |
| 04. | Preparación del medio CHU10 para el cultivo inicial. | 60 |
| 05. | Medio CHU10 para el cultivo inicial | 60 |
| 06. | Inserción del inóculo para el cultivo inicial | 60 |
| 07. | Introducción del medio CHU10 para el cultivo inicial | 60 |
| 08. | Cultivo iniciales instalados | 60 |
| 09. | Biomasa obtenida de la cosecha microalgal | 61 |
| 10. | Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15 ml | 61 |
| 11. | Cosecha microalgal en la cabina de flujo laminar | 61 |
| 12. | Recojo de lixiviado del relleno sanitario | 61 |
| 13. | Centrifugado del lixiviado | 61 |
| 14. | Filtración del lixiviado | 61 |
| 15. | Preparación de los ensayos problema | 62 |
| 16. | Preparación de los controles | 62 |
| 17. | Evaluación de los indicadores cada 48 horas con el kit Lamotte | 62 |
| 18. | Frascos diluidos para la evaluación | 62 |

| | |
|---|----|
| 19. Conteos diarios | 62 |
| 20. Evaluación del Fosforo | 62 |
| 21. Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15 ml | 63 |
| 22. Biomasa obtenida de la cosecha depositada en placa Petri | 63 |
| 23. Biomasa acondicionada para el proceso de secado. | 63 |
| 24. Raspado de biomasa seca de las placas. | 63 |
| 25. Biomasa raspada lista para el pesado | 63 |
| 26. Peso de la placa Petri con y sin biomasa | 63 |
| 27. Trituración de la biomasa previamente pesada con solución Extractora. | 64 |
| 28. Biomasa mezclada con solución extractora | 64 |
| 29. Fase clorofórmica posterior a centrifugación | 64 |
| 30. Biomasa triturada en tubos de 2ml para centrifugar | 64 |
| 31. Contenido lipídico de las tres especies de microalgas evaluadas Con lixiviado. | 64 |
| 32. Contenido lipídico seco por 24 horas a 50 °C | 64 |

RESUMEN

La remoción de contaminantes en sistemas biológicos es posible mediante la aplicación del cultivo de microalgas, ya que presentan diversas adaptaciones y ciertos mecanismos de tolerancia. Las microalgas son capaces de remover microorganismos patógenos, metales pesados, y compuestos orgánicos tóxicos mediante procesos aún en vías de estudio. El objetivo fue evaluar la remoción de contaminantes químicos en lixiviado empleando las microalgas *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda* y *Ankistrodesmus nannoselene*. Estas microalgas se cultivaron en medio CHU10 por tres semanas. Luego fueron expuestas a dos concentraciones de lixiviado (1/1 y 1/2) por triplicado. Se evaluaron ocho indicadores fisicoquímicos cada 48 horas durante 9 días. Se realizó la extracción de lípidos totales con cloroformo: metanol (2:1). Los resultados indican que *Ankistrodesmus nannoselene* mostró mayor tasa de crecimiento ($0,77 \text{ día}^{-1}$). Fue *Scenedesmus quadricauda* la especie que reportó mayor producción de biomasa en los dos tratamientos y control, el mayor porcentaje de lípidos totales. En la remoción se mantuvieron los compuestos nitrogenados, el dióxido de carbono disminuyó (37-0 ppm) y el Cloruro varió. Se encontraron diferencias significativas para Dureza, Alcalinidad y Fosforo con un pH de 9 ppm para las tres especies. En conclusión, el tiempo de exposición al lixiviado solo indujo a la producción significativa de biomasa microalgal y acumulación lipídica de la especie de *Scenedesmus quadricauda*. Solo se evidenció remoción en cinco indicadores manteniéndose constante en los demás.

Palabras clave: Remoción, lixiviado, oleaginosas, microalgas.

ABSTRACT

The removal of pollutants in biological systems is possible by means of the application of the culture of microalgae, since they present diverse adjustments and certain mechanisms of tolerance. The microalgae are capable of removing pathogenic microorganisms, heavy metals, and organic toxic compounds by means of processes still in routes of study. The aim was to evaluate the removal of chemical pollutants in leachate using microalgae *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda* and *Ankistrodesmus nannoselene*. These microalgae were cultivated in medium CHU10 for three weeks. Then they were exposed to two concentrations of leachate (1/1 and 1/2) for triplicate. Eight physicochemical parameters were evaluated every 48 hours for 9 days. There was realized the extraction of total lipids by chloroform: methanol (2:1). The results indicate *Ankistrodesmus nannoselene* showed higher growth rate (0.77 day⁻¹). It was *Scenedesmus quadricauda* the species which reported increased production of biomass in both treatment and control and the highest percentage of total lipids. In removing nitrogenous compounds, carbon dioxide decreased (37-0 ppm) and remained chloride various. Significant differences were found in hardness, alkalinity, pH, Phosphorus 9 ppm for the three species were found. In conclusion, the time of exhibition to the alone leachate to the significant production of biomass microalgal and lipidic accumulation of the species of *Scenedesmus quadricauda*. Only removal was demonstrated in five parameters being kept constant in the others.

Keywords: Removal, leachate, oleaginous, microalgae

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Teniendo en cuenta la tasa de crecimiento poblacional generada en nuestro país y el incremento del índice de consumo per cápita que está ocasionando la generación masiva de residuos en todos los centros poblados de nuestro país, se ha desatado una serie de problemas de ámbito social y ambiental; causantes de diferentes tipos de contaminaciones por la ineficiencia en el aprovechamiento de los residuos. Esto se debe a que no se está realizado un manejo integral de los residuos sólidos y por esta razón las empresas prestadoras del servicio y los mismos municipios no han elaborado un mecanismo para la solución del problema producido por los lixiviados que contienen altas concentraciones de contaminantes tales como materia orgánica, patógenos, nitrógeno, fósforo, componentes recalcitrantes y sustancias tóxicas como metales pesados que son producidos en los botaderos y/o rellenos sanitarios (1).

Los rellenos sanitarios constituyen una forma de tratamiento más adecuado para la disposición de las basuras, estos traen consigo una gran responsabilidad y es el control y tratamiento de los lixiviados producidos, pues éstos deben ser recolectados y tratados para evitar la contaminación del suelo y de los acuíferos subterráneos (1) . Asimismo, el lixiviado, por la gran variabilidad en su composición y por las diferentes características que presenta entre un relleno sanitario y otro, requiere un estudio individual y por ende tratamientos específicos de acuerdo a sus características (2).

El tratamiento de los lixiviados como parte del desarrollo sostenible es importante por cuanto disminuye la contaminación ambiental, sobre todo en temporada de lluvias donde la basura que genera a diario la población dan lugar a los lixiviados, uno de los contaminantes más peligrosos para el ambiente, en particular para los acuíferos; los lixiviados son una corriente líquida que se genera en los basureros por efecto de la lluvia, y tienen una alta concentración de contaminantes, 100 veces superior a la de las aguas residuales, por lo que tiene un riesgo potencial muy alto para el entorno (2).

Si no se trata los lixiviados en una región tropical como la ciudad de Iquitos pueden filtrarse al subsuelo y contaminar los mantos freáticos llegando a los ríos, de donde se extrae gran parte del agua potable que consumen los habitantes; incluso, un manto acuífero contaminado con lixiviados requiere de tecnología avanzada para quitarle los metales pesados y las sales, con el propósito de volverlo seguro para el uso humano (2).

Por lo anterior, las microalgas son organismos que han despertado un gran interés científico en las últimas décadas, debido a su potencial biotecnológico y comercial, ya que son una fuente importante de una amplia gama de compuestos químicos, pigmentos, aceites, polisacáridos y a la vez, son útiles para el tratamiento de aguas residuales, entre otras aplicaciones (3).

La utilización de microalgas para remoción de nutrientes ha sido estudiada por más de 50 años (4). El cultivo masivo de microalgas en aguas residuales tiene el propósito de reeditar en costo-efectividad, debido a la tecnología simple que envuelve, aunado a que los nutrientes son reciclados, es decir, conservados como un valioso material representado por el alto contenido proteínico en biomasa (5).

El uso como biosistema alternativo ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a que además de incorporar nutrientes, tienen la capacidad de absorber metales y acelerar la inactivación de bacterias (6).

Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como algunas especies del grupo de las cianobacterias, se han reportado para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales (4) de origen industrial (7), urbano (8). También determinaron que el desarrollo de estas microalgas en los cultivos con aguas residuales no presentó inconvenientes ya que es altamente resistente a diferentes componentes químicos y a condiciones variables (4).

Por esta razón se llevó a cabo, el estudio de evaluación de la remoción de contaminantes en lixiviado empleando microalgas oleaginosas amazónicas, como controladores biológicos ya que su función es la absorción de estos componentes permitiendo reducir la cantidad de elementos para mitigar el impacto negativo que ejerce el lixiviado en los cuerpos de agua.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

3.1. General:

- Evaluar la capacidad de remoción de contaminantes químicos en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas.

3.2. Específicos:

- Evaluar la remoción de los compuestos nitrogenados, dióxido de carbono y cloruro. Así como medir los cambios de Dureza, Alcalinidad, pH y Fosforo en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas Amazónicas.
- Determinar la tasa de crecimiento de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas expuestas ha lixiviado.
- Conocer la producción de biomasa y evaluar la acumulación de lípidos totales en tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas expuestas ha lixiviado.

CAPÍTULO III

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

3.1. Marco teórico

3.1.1. Generalidades de los lixiviados.

Es el líquido residual que es generado en la descomposición bioquímica de los residuos o como resultado de la percolación de agua desde fuentes externas (drenaje superficial, lluvia, aguas subterráneas, aguas de manantiales subterráneos), a través de los residuos en procesos de degradación, extrayendo materiales disueltos o en suspensión. Este líquido tiende a salir por gravedad, por la parte inferior del Relleno Sanitario, hasta que una capa impermeable lo impida (19).

Los lixiviados son los líquidos contaminados que drenan de un relleno sanitario. Varían ampliamente en cuanto a su composición, según la antigüedad del relleno y del tipo de residuo que contienen. Sin embargo, la cantidad de lixiviados producidos depende del balance entre la precipitación, la infiltración, la capacidad de campo y permeabilidad (propiedades de la estructura del suelo) y la escurrentía. Asimismo, refieren que los lixiviados contienen altas concentraciones de sustancias orgánicas tóxicas, sólidos disueltos, sales y otros componentes que escurren en forma vertical contaminando los acuíferos. De allí la importancia de ubicar los rellenos en suelos impermeables por encima del nivel freático, evitando que los lixiviados se acumulen dentro del relleno. A fin de proteger las reservas de aguas subterráneas contra la contaminación, es necesario tomar precauciones y medidas complementarias, tales como cubiertas de arcilla o membranas, revestimientos para el relleno, medios para recolectar, extraer y tratar el lixiviado y un sistema de vigilancia de las aguas subterráneas (4).

También afirman que el dióxido de carbono, producto de la descomposición orgánica en combinación con el agua, crea un ambiente ácido en el cual los minerales como el calcio, magnesio, hierro, cadmio, plomo y zinc, presentes en los desechos (o en el suelo), tienden a disolverse y avanzar hacia el nivel freático. El calcio y el magnesio sólo aportan dureza a las aguas subterráneas, pero los metales pesados tóxicos pueden contaminar fuentes de agua para consumo humano.

Finalmente, manifiestan que la dispersión de los lixiviados afectan los ecosistemas de la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas. Otros riesgos son producidos por la alteración de variables ambientales determinantes como las variaciones del pH y la temperatura del medio, entre otras (5).

3.1.2. Características de los lixiviados:

Las características de los lixiviados dependen principalmente de los residuos que provienen. Es por ello que resulta muy compleja una composición específica de los lixiviados. A pesar de esto la composición puede ser medida por parámetros físicos, químicos inorgánicos, químicos orgánicos y toxicidad (5).

Simultáneamente, la constitución química de los lixiviados de un relleno sanitario variará con el tiempo, debido a la biodegradación que se produce en ellos por diferentes factores. Como resultado de esto, los lixiviados se pueden clasificar en jóvenes y maduros. Dentro de los 2 primeros años, los lixiviados jóvenes de un relleno contienen la materia orgánica fácilmente biodegradable. Así, estos tienden a ser ácidos con un pH que va de 6 a 7. Al mismo tiempo el amonio fluctúa entre 1,000 y 2,000 mg/l y los nitritos se encuentran en muy bajas cantidades. Por el contrario los lixiviados maduros, después de transcurridos

varios años, el pH se incrementa a un intervalo de 7 a 8, al igual que una baja en el contenido de nutrientes (5).

3.1.3 Efectos ambientales de los lixiviados:

➤ Contaminación de Aguas Superficiales:

Uno de los efectos ambientales más serios provocados por el inadecuado manejo de los residuos sólidos es la contaminación de las aguas superficiales, sobre todo de aquellas que constituyen fuentes de abastecimiento de agua potable. Por una parte, la materia orgánica disminuye el oxígeno disuelto y aumenta los nutrientes (N y P), conduciendo a los cuerpos de agua a procesos de eutrofización.

Por otra parte, los residuos y los lixiviados están frecuentemente mezclados con residuos industriales peligrosos, ocasionando la pérdida de fuentes de agua para consumo humano o para recreación, asimismo la destrucción de la fauna acuática y del paisaje, con altos costos de remediación ambiental y restauración del hábitat.

En algunos casos, los procesos de degradación de la calidad biológica de los cuerpos de agua en condiciones naturales pueden llegar a ser irreversibles. Asimismo, la presencia de residuos sólidos en los cursos de agua puede ocasionar inundaciones por obstrucción de canales de drenaje y del alcantarillado.

➤ Contaminación de Aguas Subterráneas:

Los acuíferos, confinados o libres, pueden contaminarse inadvertidamente por la inadecuada disposición final de residuos sólidos. En la mayoría de las situaciones se subestima el problema, aun cuando la contaminación por efecto de nitritos y otras sustancias químicas en aguas subterráneas para consumo humano es peligrosa para la salud. Sin embargo, se considera que, a una distancia adecuada del acuífero, el suelo constituye un

medio eficaz para eliminar materiales orgánicos, metales pesados y otros iones inorgánicos en virtud de la filtración, adsorción, actividad biológica y precipitación.

➤ Afectaciones a la Flora y Fauna:

La dispersión de los líquidos lixiviados afectan los ecosistemas de la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas.

Otros riesgos son producidos por la alteración de variables ambientales determinantes para la vida de ciertas, especies como las variaciones del pH, y la variación de la temperatura del medio, entre otras.

Las afectaciones a la flora y fauna no sólo se dan de manera directa sobre los individuos, sino también sobre áreas críticas de alimentación o reproducción, ocasionando alteraciones fisiológicas en los organismos. La presencia de sustancias contaminantes o tóxicas puede alterar funciones vitales para el mantenimiento de poblaciones genéticamente viables o para la sobrevivencia de la especie.

➤ Implicancias sociales:

El acelerado crecimiento de las ciudades, sin planificación, plantea una difícil situación para enfrentar el tema de servicios básicos como el de la gestión de los residuos. Los más afectados en este proceso son los estratos más pobres de las ciudades, que carecen de servicios básicos y el desconocimiento de mecanismos para proteger su salud pone a la población más pobre en una grave situación de vulnerabilidad.

Esta vulnerabilidad se relaciona con la calidad del ambiente en el que viven, considerando variables como su situación de vivienda, acceso a servicios, educación e información, lo que los pone en desventaja frente a la exposición a agentes patógenos, ante los cuales tienen menos posibilidades de protegerse.

Las toneladas de residuos vertidos al ambiente diariamente alimentan a roedores e insectos que transmiten peligrosas enfermedades, además de la contaminación que producen en el suelo, el agua y los alimentos a través de los lixiviados producidos por la descomposición de los residuos.

La reducción de riesgos provenientes de la mala gestión de residuos sólidos involucra ampliar la noción de “salud pública”, incorporando otros aspectos como lo avanzado en nuestro país respecto a los sistemas de agua y saneamiento, lo que se ha traducido en políticas públicas e inversión (6).

3.1.4. El pH en el agua.

El pH es un índice logarítmico del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa. Este índice es logarítmico por que se expresa mediante un exponente (en base 10) que es fácil de manejar. El índice de la escala de pH es muy importante en procesos químicos, biológicos, industriales y en general en la vida cotidiana. La diferencia entre la lluvia normal y la lluvia ácida sólo se expresa y se debe a través del pH. El pH no sólo sirve como índice del grado de contaminación del agua de lluvia y como diagnóstico para una enfermedad corporal, al medir el pH de la orina o de la sangre, sino además nos puede indicar el grado de contaminación de un terreno (9).

3.1.5. El nitrógeno amoniacal en el agua.

El nitrógeno es un nutriente esencial para los organismos vivos, su presencia en gran exceso puede transformarlo en una sustancia tóxica (7). La presencia de nitrógeno en exceso en el ambiente ha provocado serias distorsiones del ciclo natural de nutrientes entre los organismos vivos y los compartimientos suelo, agua y aire. El nitrógeno amoniacal es soluble en agua, lo que significa que puede contaminar aguas subterráneas por mecanismos de lixiviación/infiltración.

3.1.6. El nitrito de nitrógeno en el agua.

El nitrógeno es incorporado a las aguas por las descargas residuales domésticas e industriales, por arrastre de los suelos fertilizados con abonos nitrogenados, lo cual provoca la eutrofización de lagos y embalses (5). Por otro lado, las descargas de nitrógeno amoniacal en las aguas receptoras puede resultar tóxica para las especies acuáticas presentes en ellas, por esta razón se afirma que para poder evaluar la toxicidad de una sustancia, es necesario distinguir entre aquellas que ponen en peligro a humanos y animales, es decir afectando su salud y los que alteran primordialmente la estructura y organización de un ecosistema acuático. El nitrógeno persiste en el ambiente, acumulándose en el agua y en los organismos.

La bioacumulación puede ser controlada hasta cierto límite mediante la absorción por la biota, esto es, repartición entre el agua y los organismos que utilizan dicho elemento (Nitrógeno), como nutriente para su proliferación como es el caso del proceso de fijación del nitrógeno donde una enorme cantidad de este proveniente tanto del aire como del agua, se convierte en compuestos de nitrógeno donde una amplia variedad de bacterias aeróbicas y anaeróbicas incluyendo algunas especies de algas como las de color verde azulado o *Cianophytas* son capaces de fijarlo tomándolo del agua, con el objetivo de obtener las proteínas necesarias para su crecimiento.

3.1.7. La alcalinidad en el agua.

La capacidad del agua para neutralizar ácidos o aceptar protones. Esta representa la suma de las bases que pueden ser tituladas en una muestra de agua. Dado que la alcalinidad de aguas superficiales está determinada generalmente por el contenido de carbonatos, bicarbonatos e hidróxidos, ésta se toma como un indicador de dichas especies iónicas.

La alcalinidad, no sólo representa el principal sistema amortiguador del agua dulce, sino que también desempeña un rol principal en la productividad de cuerpos de agua naturales,

sirviendo como una fuente de reserva para la fotosíntesis. Históricamente, la alcalinidad ha sido utilizada como un indicador de la productividad de lagos, donde niveles de alcalinidad altos indicarían una productividad alta y viceversa. Dicha correlación se debe en parte a que la disponibilidad del carbono es mayor en lagos alcalinos y también al hecho de que las rocas sedimentarias que contienen carbonatos, a menudo contienen también concentraciones relativamente altas de nitrógeno y fósforo (7).

3.1.8. El dióxido de carbono en el agua.

El dióxido de carbono es el segundo gas importante presente en el agua. Se origina por la descomposición de la materia, por la respiración de los animales y las plantas y también por las lluvias, ya que arrastran el CO₂ presente en la atmósfera lo que aumenta la concentración de gas en los cuerpos de agua naturales. Por lo tanto, el dióxido de carbono es un gas que por su alta capacidad de reacción en el agua, produce grandes modificaciones en la composición química.

El dióxido de carbono en el agua juega dos papeles fundamentales. El primero está relacionado con la acción buffer en el agua, lo que permite que no se presenten cambios bruscos de pH en el agua, y el segundo quizás más importante, es el que constituye la materia prima para la fotosíntesis y en especial el carbono (C) elemento básico para la constitución de la materia orgánica. (9)

3.1.9. La dureza en el agua.

Se denomina dureza a la concentración de iones de calcio y magnesio expresadas en mg/Lt, unidad equivalente a partes por millón (ppm). En la práctica las aguas duras son las que generan sarro en los recipientes.

- El agua se presenta una acción indeseable similar, el dióxido de carbono se desprende a altas temperaturas, y produce un depósito de sales de calcio o magnesio en el interior del calentador. Esto puede obstruir los tubos y también reducir la conductividad térmica.
- El agua dura no produce espuma con el jabón por lo que dificulta la limpieza, formando un residuo duro y grisáceo en las superficies, telas, piel y cabello cuando se realiza el lavado. Otra forma de evidenciar los problemas con el agua dura es la formación de SARRO en todas las superficies en contacto con el líquido (6).

3.1.10. El cloruro en el agua.

El cloruro (Cl), es uno de los aniones inorgánicos principales en el agua natural y residual. El contenido de cloruros de las aguas naturales son variables y depende principalmente de la naturaleza de los terrenos atravesados, en cualquier caso, esta cantidad siempre es menor que la que se encuentra en las aguas residuales, ya que el cloruro de sodio o sal de mesa (ClNa) es común en la dieta y pasa inalterado a través del aparato digestivo.

El aumento de cloruros en una muestra de agua puede tener orígenes diversos. Si se trata de una zona costera puede deberse a infiltraciones de agua del mar, en el caso de una zona árida este aumento se debe al lavado de los suelos producido por fuertes lluvias y en otros casos puede deberse a la contaminación del agua por aguas residuales, etc. Un contenido elevado de cloruros puede dañar las conducciones y estructuras metálicas y perjudicar el crecimiento vegetal, no así en las aguas de consumo humano donde no representan más inconvenientes que el gusto desagradable del agua, además de no plantear problemas de potabilidad (7).

3.1.11. El fósforo en el agua.

El fósforo se encuentra en aguas naturales y residuales casi exclusivamente como fosfatos, los cuales se clasifican en ortofosfatos, fosfatos condensados (piro-, meta-, y otros polifosfatos) y fosfatos orgánicos. El análisis de fósforo envuelve dos pasos generales; (a) conversión de la forma de fósforo de interés a ortofosfato disuelto, y (b) determinación colorimétrica del ortofosfato disuelto (8).

3.2.1. Generalidades de las microalgas.

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos fotosintéticos unicelulares que comprenden organismos eucariotas y a cianofíceas procariotas (cianobacterias). Se consideran un grupo de organismos versátiles en términos de tamaño, forma y función ecológica y se localizan en hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes (21). De la misma manera que las plantas, ellas convierten la energía solar en energía química mediante la fotosíntesis (22).

Las clases más importantes de algas son: las algas verdes (*Chlorophyta*), las algas rojas (*Rhodophyta*) y las diatomeas (*Bacillariophyta*). Las algas pueden ser autótrofas o heterótrofas, las primeras requieren únicamente compuestos inorgánicos como el CO₂, sales y la luz como fuente de energía para el crecimiento, mientras las segundas son heterótrofas por lo que requieren una fuente externa de compuestos orgánicos, así como de nutrientes como fuente de energía. Algunas algas fotosintéticas son mixotróficas, es decir, tienen la capacidad tanto de realizar la fotosíntesis como de utilizar nutrientes exógenos orgánicos.

Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es un componente clave de supervivencia, por el que convierte la radiación solar y el CO₂ absorbido por los cloroplastos en Adenosin Trifosfato (ATP) y O₂, utilizable a nivel celular para la respiración y para producir energía en sus actividades de crecimiento (23).

La división Chlorophyta son las más utilizadas en aplicaciones comerciales. Sin embargo, existen grupos de microalgas como las diatomeas o grupos de microalgas ricas en silicio y cianobacterias procariontas que también ofrecen grandes oportunidades en biotecnología e ingeniería metabólica (24). Las microalgas de la división Chlorophyta o también llamadas algas verdes, son consideradas como uno de los grupos más especializados que comprenden una variedad de organismos con alto potencial de estudio. Dentro de este grupo se encuentran microalgas con diversas morfologías y aunque muchas provenientes de agua dulce, un gran número de estas también crecen en hábitat marinos y terrestres (25).

Muchas de estas algas son adaptadas a condiciones extremas de temperatura, salinidad y humedad. Esta habilidad para adaptarse a condiciones combinadas y de estrés severos se refleja en el patrón de diversos y a veces inusuales perfiles lipídicos presentes en sus membranas (26).

3.2.2. Microalgas oleaginosas.

Las microalgas contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía (32). Estos microorganismos representan una opción viable como materia prima para producir biodiesel, debido a la mayor productividad de biomasa y mayor velocidad de replicación con respecto a plantas cultivables (33), algunas especies pueden acumular entre 20-80% (peso seco) de triglicéridos (34), no requieren terrenos cultivables para el crecimiento celular y no compiten por alimento humano (35).

Para la producción exitosa de biodiesel empleando microalgas como sistemas biológicos para la acumulación de biomasa y lípidos, el primer punto crítico es buscar e identificar cepas híper productoras de lípidos (36). A pesar de que el intervalo de lípidos contenidos en microalgas oscila entre 1-75% (peso seco), algunas especies pueden alcanzar hasta el 90% (peso seco) bajo condiciones específicas de cultivo (33).

Para elegir una cepa se debe considerar una estrategia de selección en base a diversos criterios que sean prácticos a los siguientes problemas: a) velocidad de crecimiento, cuantificado normalmente por biomasa total acumulada por unidad de tiempo y unidad de volumen; b) cantidad y calidad lipídica; c) respuesta a alteraciones del ambiente, se consideran variaciones de temperatura, entrada de nutrientes y fuente lumínica, así como competencia con otras especies de microalgas o bacterianas; d) velocidad de absorción y afinidad por nutrientes, particularmente CO₂, nitrógeno y fósforo; e) cultivo de biomasa sencillo para su posterior procesamiento (3).

3.2.3. Crecimiento microalgal.

El crecimiento microalgal es un proceso autocatalítico de incremento en la cantidad de materia autoduplicante y donde la reacción catalizada (crecimiento) resulta en la producción de más y más catalizadores (materia viviente). Bajo condiciones de “crecimiento balanceado”, la duplicación de la biomasa está acompañada con la duplicación de todas las otras propiedades medibles de la población, por ejemplo, niveles de proteína, ARN, ADN, clorofila y agua intracelular, es decir mantienen una composición química constante; y es suficiente medir algún componente bioquímico para determinar la tasa de crecimiento algal.

3.2.4. Curva de Crecimiento Microalgal

En condiciones ideales de cultivo, las microalgas presentan cinco fases de crecimiento, las cuales se suscitan progresivamente en el cultivo.

3.2.4.1. Fase de adaptación

En donde no ocurre incremento en el número de células pudiendo incluso llegar a disminuir en número con respecto al inóculo inicial Exponencial. Ya una vez adaptadas al medio de cultivo las microalgas comienzan a multiplicarse puesto que la división da lugar a nuevas células que son capaces de dividirse el aumento en número de microalgas se acelera continuamente en forma exponencial.

3.2.4.2. Fase Exponencial

Al adaptarse las células al medio, la velocidad de multiplicación se caracteriza por tener una forma geométrica. Esta fase es la más importante, porque indica que el cultivo debe cosecharse, transferirse o diluirse debido al incremento máximo en la densidad celular. La fase exponencial puede presentarse del segundo al tercer día después de inoculado el medio y prolongarse hasta cuatro días. Si se controla la tasa de dilución del cultivo, esta etapa puede prolongarse por varias semanas.

3.2.4.3. Fase de Declinación Relativa del Crecimiento

En esta fase, que puede durar de uno a dos días, empieza a manifestarse la muerte de las células debido a condiciones desfavorables en el cultivo generadas en la fase anterior (agotamiento de nutrientes, aumento de metabolitos de desecho, cambios de pH) y consecuentemente empieza a disminuir la densidad celular.

3.2.4.4. Fase Estacionaria

En este periodo, el número de microalgas permanece constante. En ocasiones el fenómeno apenas se detecta y puede presentarse en su lugar la fase de muerte.

3.2.4.5. Fase de Muerte

Al incrementarse el número de células muertas y las condiciones desfavorables, tales como el aumento del número de bacterias, hongos, metabolitos de desecho y espuma, producto de la destrucción celular, generan el colapso final del cultivo.

La duración de cada fase de cultivo puede acortarse, alargarse o apenas reconocerse dependiendo de diversos factores como: temperatura, fuente de luz, composición nutricional del medio de cultivo, tamaño del inóculo y estado fisiológico del alga. En la práctica, la fase de adaptación no es tan marcada en los cultivos microalgales, sino más bien parece ocurrir una fase de multiplicación de las células algales.

Esto se debe a que los medios frescos casi siempre se inoculan con cultivos algales en fase cercanamente estacionaria, por lo que hay crecimiento de células jóvenes “viables” y por consiguiente una multiplicación de células desde el inicio de los cultivos microalgales. Con la finalidad de observar adecuadamente la fase log, se tendría que determinar la “edad” más apropiada del inóculo y/o también realizar cultivos sincrónicos, donde todas células mantienen el mismo patrón de desarrollo del ciclo celular.

3.2.5. Remoción de contaminantes

Las microalgas son capaces de remover microorganismos patógenos, metales pesados, y compuestos orgánicos tóxicos mediante procesos aún en vías de estudio (10).

Dado que una gran variedad de estos microorganismos crecen en medios completamente inorgánicos, confiriéndoles capacidades para remover nutrientes y al mismo tiempo producir material celular potencialmente útil, se iniciaron estudios sobre su aplicación en el tratamiento de aguas residuales desde la década de los 40, al respecto se citan los trabajos de Oswald y Lembi (19), quienes introdujeron un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, demostrando que los cultivos a gran escala podrían ser simultáneamente

utilizados para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa para la obtención de proteína vegetal.

En la actualidad han aparecido otras alternativas como los bioprocesos, que involucran distintas interacciones entre los microorganismos y los metales realizando transformaciones que permiten la extracción o estabilización de los metales. Todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son componentes fundamentales de los ciclos biogeoquímicos.

Las interacciones metal-microbiota son estudiada en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales y radionúclidos. Los procesos biológicos presentan ciertas ventajas frente a otras alternativas tradicionales; ya que son mucho más selectivos, económicos, menos contaminantes y de mayor eficacia para grandes volúmenes y pequeñas concentraciones (13).

Entre las estrategias de las microalgas se encuentran evitar el paso de los iones a través de la pared celular por medio de secreción de sustancias que producen uniones específicas con los iones metálicos del medio. El resultado de esta estrategia es formar complejos quelados que pueden quedar en el exterior de la pared celular o en compartimientos específicos en el interior de la célula.

Un mecanismo común de detoxificación intracelular en microalgas es la formación de péptidos o proteínas, malato, citrato, polifosfato son algunos de los compuestos reportados como agentes quelantes intracelulares (20).

Debido a que las microalgas presentan adaptaciones y mecanismos de tolerancia, pudiendo ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, ofrecen una alternativa o ayuda a las técnicas convencionales para la eliminación y/o recuperación de metales (21).

Las microalgas, las cuales componen un grupo muy diversificado de microorganismos fotosintéticos, que varían en tamaño y forma, existen en casi todos los hábitats tanto marinos como dulceacuícolas. *Chlorella vulgaris* es una *Chlorophyta* de forma esférica, unicelular, eucariota y presenta clorofila a y b.

Se puede encontrar en medios marinos y de agua dulce, debido a que su pared celular se encuentra compuesta por una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido úrico. Esta microalga es capaz de incorporar grandes cantidades de metales ($\text{Cr}^{+2,+3,+6}$, $\text{Fe}^{+2,+3}$, $\text{Cu}^{+1,+2}$, Zn^{+2} , $\text{Pb}^{+2,+4}$ y $\text{Hg}^{+1,+2}$) por medio de absorción y acumulación (22).

Cenedesmus obliquus al igual que *Chlorella vulgaris*, son microalgas de agua dulce que forman colonias de hasta 16 células. Las células son eucariotas generalmente cilíndricas y tienen en cada extremo una espina dorsal hasta de 200 μm de longitud (22).

Las microalgas son consideradas con gran potencial de uso en la remoción de nutrientes (metales traza) por su alta capacidad de acumulación de metales, además de que presentan sensibilidad ante diversos materiales de prueba, sus requerimientos nutricionales son conocidos, poseen una alta tasa de crecimiento que permite conocer en pocos días la densidad y el efecto causado por el agente tóxico y su manipulación es relativamente sencilla en laboratorio (23).

3.3. Definición de términos básicos.

Remoción: Es cuando quitamos, borramos, eliminamos, obviamos o apartamos algo, lo que estamos haciendo es removiéndolo. Una remoción, por tanto, consiste en llevar una cosa de un lugar hacia otro o en modificar la situación, el estado o la condición.

Lixiviados: Es el líquido producido cuando el agua percola a través de cualquier material permeable. Puede contener tanto materia en suspensión como disuelta, generalmente se da en ambos casos.

Microalgas: Las microalgas son organismos unicelulares microscópicos (2-200 μm), polifiléticos, su metabolismo puede ser autótrofo o heterótrofo y suelen ser eucariontes, aunque las cianobacterias procariontes son frecuentemente incluidas como microalgas Oleaginosas.

Microalgas oleaginosas: son aquellas microalgas que contienen ácidos grasos como componentes de su membrana, productos de almacenamiento, metabolitos y fuente de energía.

Biomasa: Materia total de los seres que viven en un lugar determinado, expresada en peso por unidad de área o de volumen.

Lípidos: Son biomoléculas orgánicas formadas básicamente por carbono e hidrógeno y generalmente, en menor proporción, también oxígeno. Además ocasionalmente pueden contener también fósforo, nitrógeno y azufre.

pH: Es un indicador de la acidez de una sustancia. Está determinado por el número de iones libres de hidrógeno (H^+) en una sustancia La acidez es una de las propiedades más importantes del agua. El agua disuelve casi todos los iones.

Bases nitrogenadas: nitrito de nitrógeno: son iones que existen de manera natural y que forman parte del ciclo del nitrógeno. Las concentraciones pueden alcanzar varios cientos de miligramos por litro.

Nitrógeno amoniacal: Es el resultado de la primera transformación del nitrógeno orgánico. Esta forma del nitrógeno es soluble en agua y queda retenido por el poder absorbente del suelo. Es una forma transitoria, que se transforma en nitrógeno nítrico.

Alcalinidad: La alcalinidad del agua se puede definir como una medida de su capacidad para neutralizar ácidos. En las aguas naturales, esta propiedad se debe principalmente a la presencia de ciertas sales de ácidos débiles, aunque también puede contribuir la presencia de bases débiles y fuertes.

Dióxido de carbono: Es el más importante de los gases menores, involucrado en un complejo ciclo global. Se libera desde el interior de la Tierra a través de fenómenos tectónicos, vulcanismo y a través de la respiración, procesos de suelos y combustión de compuestos con carbono y la evaporación oceánica. Disuelto en los océanos y consumido en procesos fotosintéticos.

Cloruro: son compuestos que llevan un átomo de cloro en estado de oxidación formal. Por lo tanto corresponden al estado de oxidación más bajo de este elemento ya que tiene completado la capa de valencia con ocho electrones. El cloruro más conocido es la sal marina que está presente en el agua marina con una concentración del aproximadamente 3-3,5%. Por lo tanto los océanos representan una fuente prácticamente inagotable de cloruro.

Dureza: Se denomina dureza del agua a la concentración de compuestos minerales que hay en una determinada cantidad de agua, en particular sales de magnesio y calcio. El agua denominada comúnmente como “dura” tiene una elevada concentración de dichas sales y el agua “blanda” las contiene en muy poca cantidad.

Fosforo: Se estima que el fósforo constituye solamente el 1 % de la corteza terrestre. En los mares hay fósforo en estado de fosfatos en solución, fosfatos fijados por los elementos que los ríos aportan y fosfatos orgánicos en el plancton.

3.4. Antecedentes.

La importancia de la aplicación de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, tiene sus antecedentes en la época de Caldwell (1940), quien reporta los primeros estudios, sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos purificadores de aguas residuales", debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos" contenidos en esta agua, para favorecer el crecimiento de las microalgas, funcionando este como medio de cultivo.

Posteriormente Oswald (14), introduce un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, al llevar a cabo el tratamiento de las aguas residuales, obteniendo una producción de biomasa vegetal con un alto contenido proteico, lo que finalmente se considera como una valorización de las aguas residuales mediante el cultivo de microalgas. Es en la década de los años sesenta, en Richmond, California cuando se plantea el sistema de cultivo más grande de los Estados Unidos, llegándose a alcanzar una producción muy alta de biomasa de microalgas, siendo de 12-18 g m²d⁻¹. Es a partir de este cultivo a gran escala que desencadenó el desarrollo por parte de diversos países en el cultivo masivo de microalgas en sistemas cerrados y abiertos, con diferentes finalidades. La incorporación de lixiviados de rellenos sanitarios en instalaciones de plantas de aguas residuales con procesos biológicos, como una medida de tratamiento y/o disposición, es una alternativa atractiva tanto desde el punto de vista técnico como económico (10).

Existen varios antecedentes de tratamientos aerobios y anaerobios de lixiviados que van desde experiencias a escala laboratorio hasta experiencias a escala real. El tipo de tratamiento aerobio más extendido es lodos activos o lagunas aireadas (15).

En cuanto a la aplicación de tratamientos biológicos, la viabilidad de los mismos está condicionada por una serie de elementos y compuestos tóxicos para los microorganismos y que puede inhibir las reacciones, por lo que se hace necesario un estudio detallado de las características de los lixiviados (16).

Estudios realizados por María (21) en el que se evaluó la capacidad de una planta de tratamiento de 500 L/s de aguas residuales por medio de lagunas de estabilización como método de tratamiento y disposición de lixiviados de rellenos sanitarios, en la cual la incorporación de lixiviados altamente recalcitrantes no afectaron la eficacia del tratamiento biológico, lo que significa que las lagunas de estabilización pueden ser también utilizadas como una alternativa para la disposición de lixiviados estabilizados. Los resultados de este estudio indican que la planta de tratamiento de aguas residuales puede tratar lixiviados de rellenos sanitarios con un gasto del 10% en volumen con respecto al gasto de agua residual, sin alterar la eficacia del sistema de lagunas de estabilización, ni la población algal.

El objetivo fundamental de la aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales es la utilización y transformación de los nutrientes a biomasa, con la consecuente producción de oxígeno, para mejorar la calidad del afluente así como la disponibilidad de este para la continua oxidación bacteriana de la materia orgánica en sistemas integrales, mediante el ciclo de oxigenación fotosintética de aguas residuales (43).

El género de *Chlorella*, *sp* ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales. Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (42).

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Lugar y desarrollo de la investigación.

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicada en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,5, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, Departamento de Loreto La extracción de lípidos totales se realizó en la Unidad Especializada del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia Peruana (CIRNA - UNAP).ubicado en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,0 distrito de San Juan Bautista, pasaje Los Paujiles s/n. AA.HH Nuevo San Lorenzo del Distrito de San Juan Bautista.

4.2. Recursos utilizados.

4.2.1. Materiales.

- ✓ Placas Petri (15x 100 mm, Duran).
- ✓ Frascos Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- ✓ Mandil y guantes de laboratorio.
- ✓ Láminas portaobjetos y cubreobjetos
- ✓ Gradillas
- ✓ Mascarilla
- ✓ Gorro
- ✓ Papel de Aluminio
- ✓ Pipetas de 20 hasta 1000 μ l
- ✓ Probetas
- ✓ Tips de 100,200 y 100 μ l
- ✓ Alcohol (70% y 96%)

✓ Microtubos (1.5 ml)

✓ Tubos de 15ml.

4.2.2. Equipos.

✓ Computadora

✓ Balanza analítica Sartorius

✓ Centrifuga

✓ Autoclave

✓ Cámara fotográfica

✓ Microscopio de fluorescencia Zeiss.

✓ Microscopio óptico Zeiss.

✓ Cámara de Neubauer.

✓ Estufa.

✓ Cabina de flujo laminar Telstar.

✓ Bombas de aireación.

✓ Kit Lamotte 3633-04

4.2.3. Reactivos.

✓ Alcohol isopropílico

✓ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

✓ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

✓ NaHCO_3

✓ K_2HPO_4

✓ NaNO_3

✓ Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)

✓ Citrato férrico ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{Xh}_2\text{O}$)

✓ NaEDTA

- ✓ H_3BO_3
- ✓ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$
- ✓ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$
- ✓ $CoCl_2 \cdot 6H_2O$
- ✓ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
- ✓ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$
- ✓ Metasilicato de sodio (Na_2SiO_3)
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl)
- ✓ Cloroformo
- ✓ Etanol
- ✓ NaCl

4.2.4. Programas.

- ✓ ANOVA
- ✓ ZEN (programa de visualización y procesamiento de imágenes conectado al microscopio de epifluorescencia)
- ✓ Excel de Microsoft Office

4.3. Diseño de la investigación.

El diseño de la investigación fue de tipo experimental, el cual consistió en cultivar tres especies de microalgas en 1000mL de medio CHU (40) con todos los nutrientes que lo constituyen en matraces Erlenmeyer de 1000mL. Al cabo de 04 semanas se realizó la cosecha de la biomasa microalgal para dar inicio a la evaluación. Para ello, se añadió 3mL de biomasa microalgal en matraces de 500 mL conteniendo lixiviado al 100% y al 50% , así como dos grupos controles uno con agua y otro con medio CHU por 9 días.

Estos tratamientos se realizaron por triplicado. Posteriormente cumplido el tiempo respectivo se cosecharon las microalgas por centrifugación para realizar la extracción de lípidos totales.

4.4. Población y muestra.

4.4.1. Población.

Estuvo constituida por las especies de microalgas de agua dulce de la amazonia peruana.

4.4.2. Muestra.

La muestra fue representada por tres especies de microalgas oleaginosas (*Ankistrodesmus nanmoselene*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sp.*) que fueron proporcionadas por el Banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

4.5. Técnicas, Instrumentos y procedimientos de recolección de datos.

4.5.1. Técnica de recolección de datos.

Los equipos, materiales y técnicas que se utilizaron en el laboratorio fueron de acuerdo a Arredondo y Vásquez (18). Además se procedió a recopilar los datos procediendo de la siguiente manera:

Observación: La evaluación del crecimiento microalgal se realizó por conteo directo utilizando la cámara Neubauer, registrándose los datos en fichas del programa Excel. Además, se registró la información de los resultados del análisis de remoción de contaminantes de lixiviado con cada uno de las especies microalgales.

4.5.2. Instrumentos de recolección de datos.

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron son los siguientes:

a). Fichas o guías de observación. Se utilizó para registrar la información obtenida de la tasa de crecimiento microalgal.

b). Los equipos que se utilizaron para obtener directamente el registro de datos fueron el Microscopio de epifluorescencia, el microscopio compuesto y la cámara de Neubauer, entre otros.

4.5.3. Procedimiento Experimental.

4.5.3.1. Cultivo y cosecha microalgal.

Se cultivaron tres especies de microalgas oleaginosas en medio CHU10 (42). Las cepas fueron cultivadas en matraces de 1000 mL con 1000 mL de medio hasta su saturación. Cada matraz fue aireado constantemente, a 26°C y un fotoperiodo de (12:12) luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E. m}^2. \text{S}^{-1}$.

Una vez alcanzado la saturación del cultivo se prosiguió a la cosecha respectiva, que consistió en distribuir 15 mL del cultivo en 12 tubos de 15 mL para centrifugar a 4000 rpm a temperatura ambiente por 10 min. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos y se centrifugó bajo las condiciones indicadas.

Estos pasos se repitieron hasta obtener todo el precipitado microalgal. Luego, el precipitado fue lavado con suero fisiológico. Este se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y el precipitado microalgal se transfirió a matraces de 250 mL para el ensayo de acumulación lipídica

El lixiviado se recolecto del Relleno Sanitario Manual de la ciudad de Nauta, se recolecto 3L de lixiviado, luego se prosiguió a distribuir 15 mL del lixiviado en tubos de 15 mL para centrifugar a 4000 rpm a temperatura ambiente por 10 min, luego se filtró el lixiviado para separar las partículas en suspensión y así poder usarlo para las evaluaciones.

4.5.3.2. Evaluación de los ensayos de remoción de contaminantes en lixiviado.

Se usaron 3 mL de biomasa microalgal y se distribuyó en matraces de 500 mL para los ensayos respectivos, que contó un control: 500 mL de medio CHU más 3mL de biomasa y dos grupos problemas: uno al 100% de lixiviado más 3mL de biomasa y otro al 50% de lixiviado más 50 mL de agua y 3mL de biomasa. Estos ensayos se realizaron por triplicado, sometidas a una intensidad lumínica de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. En esta fase se evaluaron la tasa de crecimiento microalgal y porcentaje de biomasa por 9 días.

Se evaluó el crecimiento celular con conteos diarios de los grupos problemas y el control, los cambios de los parámetros químicos se evaluaron cada 48 horas con un kit de agua modelo lamotte.

4.5.3.3. Cosecha de la biomasa microalgal.

Seguido de los 9 días de evaluación se cosecharon las microalgas como se indicó previamente, la biomasa obtenida fue secada a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas en condiciones de oscuridad.

4.5.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.

La extracción de lípidos totales se realizó según Yu *et al.* (43), que consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL. La solución se homogenizó en vortex por 30 segundos y centrifugó a $10000g$ a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se transfirió a vasos de precipitado de peso conocido.

Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entra fases acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol) después de su homogenización en el vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos al mismo vaso de precipitado.

Los solventes orgánicos se evaporaron del vaso de precipitado en un recipiente a 50°C por 4 horas. Luego los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado fueron secados a 50°C por 4 horas. Finalmente, el vaso de precipitado se atemperó a 25°C y determinar su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinaron la cantidad de lípidos totales obtenidos. Con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{P_L}{P_M} \times 100$$

Donde PL es el peso seco de los lípidos totales y PM es el peso seco de las microalgas.

4.6. Análisis de datos.

Se determinó el promedio, desviación estándar, para conocer si existen diferencias estadísticas significativas en la producción de lípido total a través del programa ANOVA con prueba de HSO de Tukey. Mientras que para la elaboración de figuras de producción de biomasa y la tasa de crecimiento microalgal se empleó el programa Excel de Microsoft Office.

CAPÍTULO V

RESULTADOS:

5.1. Remoción de los compuestos nitrogenados, dióxido de carbono y cloruro.

Tabla 01. Remoción de los compuestos nitrogenados y dióxido de carbono del lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas

| Tratamientos | Tiempo (h) | Especies de microalgas | | | | | | | | |
|----------------|------------|------------------------|------|-----------------|-----------------------|------|-----------------|-----------------------|------|-----------------|
| | | <i>Chlorella sp</i> | | | <i>S. quadricauda</i> | | | <i>A. nannoselene</i> | | |
| | | N.A | N.N | CO ₂ | N.A | N.N | CO ₂ | N.A | N.N | CO ₂ |
| 1 | 0 | 0,2 | 0,05 | 37 | 0,2 | 0,05 | 4 | 0,2 | 0,05 | 4 |
| | 120 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 0 |
| 2 | 0 | 0,2 | 0,05 | 37 | 0,2 | 0,05 | 4 | 0,2 | 0,05 | 4 |
| | 120 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 0 |
| Control | 0 | 0,2 | 0,05 | 2 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 1 |
| | 120 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 0 | 0,2 | 0,05 | 0 |

Leyenda: N. A= Nitrógeno amoniacal (ppm), N. N=Nitrito de nitrógeno (ppm), CO₂=Dióxido de carbono (ppm).

1=lixiviado concentrado (1/1), 2=lixiviado diluido al 50%(1/2)

En general, en las tres especies de microalgas evaluadas durante los 9 días, los valores de nitrógeno amoniacal y nitrito de nitrógeno no reportaron variación alguna, manteniéndose en (0,2ppm y 0,05 ppm respectivamente) Esto ocurre ya que, las microalgas ya tenían los suficientes compuestos nitrogenados almacenados en sus células, ya que el medio de cultivo en el que se les cultiva en el laboratorio posee compuestos nitrogenados. Respecto a los valores de CO₂ la microalga *Chlorella sp* fue la especie que reportó un mayor valor el primer día que se inició la evaluación (37 ppm) disminuyendo totalmente al final de la evaluación. Las dos especies restantes mostraron los mismos valores evidenciando en ambos casos la total disminución de este indicador durante el ensayo, lo que indica que en la evaluación hubo consumo de dióxido de carbono para emplearlo en el proceso de la fotosíntesis y así

obtener sus principales macromoleculares las cuales son esenciales para su desarrollo, además de usarlo para producir oxígeno.

Tabla.02. Remoción del cloruro en el lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas.

| Tratamientos | Tiempo (h) | Especies de microalgas | | |
|----------------|------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| | | <i>Chlorella sp.</i> | <i>A.nannoselene</i> | <i>S.quadrikauda</i> |
| | | Cloruro | Cloruro | Cloruro |
| 1 | 0 | 24 | 24 | 24 |
| | 120 | 2 | 2 | 2 |
| 2 | 0 | 24 | 24 | 24 |
| | 120 | 2 | 2 | 2 |
| Control | 0 | 4 | 4 | 4 |
| | 120 | 2 | 2 | 2 |

Leyenda: Cloruro (ppm). 1=lixiviado concentrado (1/1), 2=lixiviado diluido (1/2).

En general las tres especies de microalgas evaluadas durante los 9 días en los dos tratamientos y el control, reportaron disminución en los valores del indicador cloruro, desde el tiempo inicial hasta el tiempo final. Siendo para el T1 y T2 (24ppm a 2ppm respectivamente) y el control (4ppm a 2ppm). Esto se debe a que si tuviéramos un contenido elevado de Cloruro perjudicaría el crecimiento de las microalgas, pero como se obtuvo valores menores de este indicador, lo cual permitió el crecimiento de las tres especies de microalgas. El bajo valor obtenido en el indicador cloruro también influye con el valor del pH obtenido en las evaluaciones. Tal como se puede evidenciar en la tabla 02.

5.1.2. Cambios de Dureza, Alcalinidad, pH y Fosforo en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas Amazónicas.

En general las tres especies de microalgas evaluadas con lixiviado mostraron cambios similares en los valores de Dureza y Alcalinidad, siendo *A. nannoselene* la especie que mostró el valor más bajo en alcalinidad en su tratamiento 2 desde la hora 0 hasta las 120 horas. En la Dureza la especie de *Chlorella sp* mostró el valor más bajo en su control desde la hora 0 horas hasta las 120 tal como se puede apreciar en la tabla 03. Esto nos lleva determinar que para cada especie de microalga presentan sus características propias respecto a condiciones óptimas de crecimiento. Sus productividades están determinadas, principalmente, por la alcalinidad del medio, el pH, la temperatura, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y tipo de luz.

Tabla 03. Cambios de dureza y alcalinidad en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas

| Tratamientos | Tiempo (h) | Especies de microalgas | | | | | |
|----------------|------------|------------------------|-------------|----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | | <i>Chlorella sp.</i> | | <i>A.nannoselene</i> | | <i>S.quadricauda</i> | |
| | | Dureza | Alcalinidad | Dureza | Alcalinidad | Dureza | Alcalinidad |
| 1 | 0 | 160 | 180 | 160 | 180 | 160 | 180 |
| | 120 | 28 | 96 | 28 | 96 | 48 | 96 |
| 2 | 0 | 160 | 180 | 160 | 180 | 160 | 180 |
| | 120 | 28 | 96 | 28 | 76 | 48 | 96 |
| Control | 0 | 16 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| | 120 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |

Leyenda: Dureza (ppm), Alcalinidad (ppm).1=lixiviado concentrado (1/1), 2=lixiviado diluido (1/2).

En general las tres especies de microalgas evaluadas en lixiviado mostraron cambio solo en el indicador de Fosforo (100 a 10 respectivamente) y se mantuvo el pH (9 ppm y 8 ppm respectivamente) en los dos tratamientos y el control desde las 0 horas hasta las 120 horas. Esto nos lleva a determinar que el Fosforo es uno de los macronutrientes esenciales en el crecimiento de las microalgas, con un pH optimo en el medio que se encuentre entre 8 y 9 así como se puede apreciar en la tabla 04.

Tabla 04. Cambios de Fosforo y pH en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas.

| Tratamientos | Tiempo (h) | Especies de microalgas | | | | | |
|----------------|------------|------------------------|----|----------------------|----|----------------------|----|
| | | <i>Chlorella sp.</i> | | <i>A.nannoselene</i> | | <i>S.quadricauda</i> | |
| | | Fosforo | pH | Fosforo | pH | Fosforo | pH |
| 1 | 0 | 100 | 9 | 100 | 9 | 100 | 9 |
| | 120 | 10 | 9 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| 2 | 0 | 100 | 9 | 100 | 9 | 100 | 9 |
| | 120 | 10 | 9 | 10 | 9 | 10 | 9 |
| Control | 0 | 100 | 8 | 100 | 8 | 100 | 8 |
| | 120 | 10 | 8 | 10 | 8 | 10 | 8 |

Leyenda: Fosforo (ppm), pH (ppm)1=lixiviado concentrado (1/1), 2=lixiviado diluido (1/2).

5.2. Tasa de crecimiento (μ) de tres especies de microalgas oleaginosas cultivadas en lixiviado.

Con respecto a los valores de la tasa de crecimiento de las tres especies de microalgas evaluadas, las tres especies mostraron un incremento gradual en los dos tratamientos y el control desde el día inicial hasta el último día de evaluación. La especie que mostro la mayor tasa de crecimiento fue *Ankistrodesmus nannoselene* en los dos tratamientos y el control con (0,15 d⁻¹, 0,14 d⁻¹, 0,77 d⁻¹ respectivamente), en cambio *Chlorella.sp* y *Scenedesmus quadricauda* obtuvieron valores menores. Por lo que determinamos que para cada una de las especie de microalgas evaluadas influye de manera diferente el cultivo de microalgas en lixiviado, en este caso siendo favorable para la especie de *Ankistrodesmus nannoselene*.

Tabla 05. Valores promedio de la tasa de crecimiento (μ) de tres especies de microalgas oleaginosas cultivadas en lixiviado.

| Especies | Tasa de crecimiento (dia ⁻¹) | | |
|----------------------|--|------|---------|
| | T1 | T2 | Control |
| <i>Chlorella.sp</i> | 0,03 | 0,04 | 0,09 |
| <i>A.nannoselene</i> | 0,15 | 0,14 | 0,77 |
| <i>S.quadricauda</i> | 0,04 | 0,03 | 0,61 |

Leyenda: 1=lixiviado concentrado (1/1), 2=lixiviado diluido (1/2).

Perfil de crecimiento de las microalgas oleaginosas evaluadas.

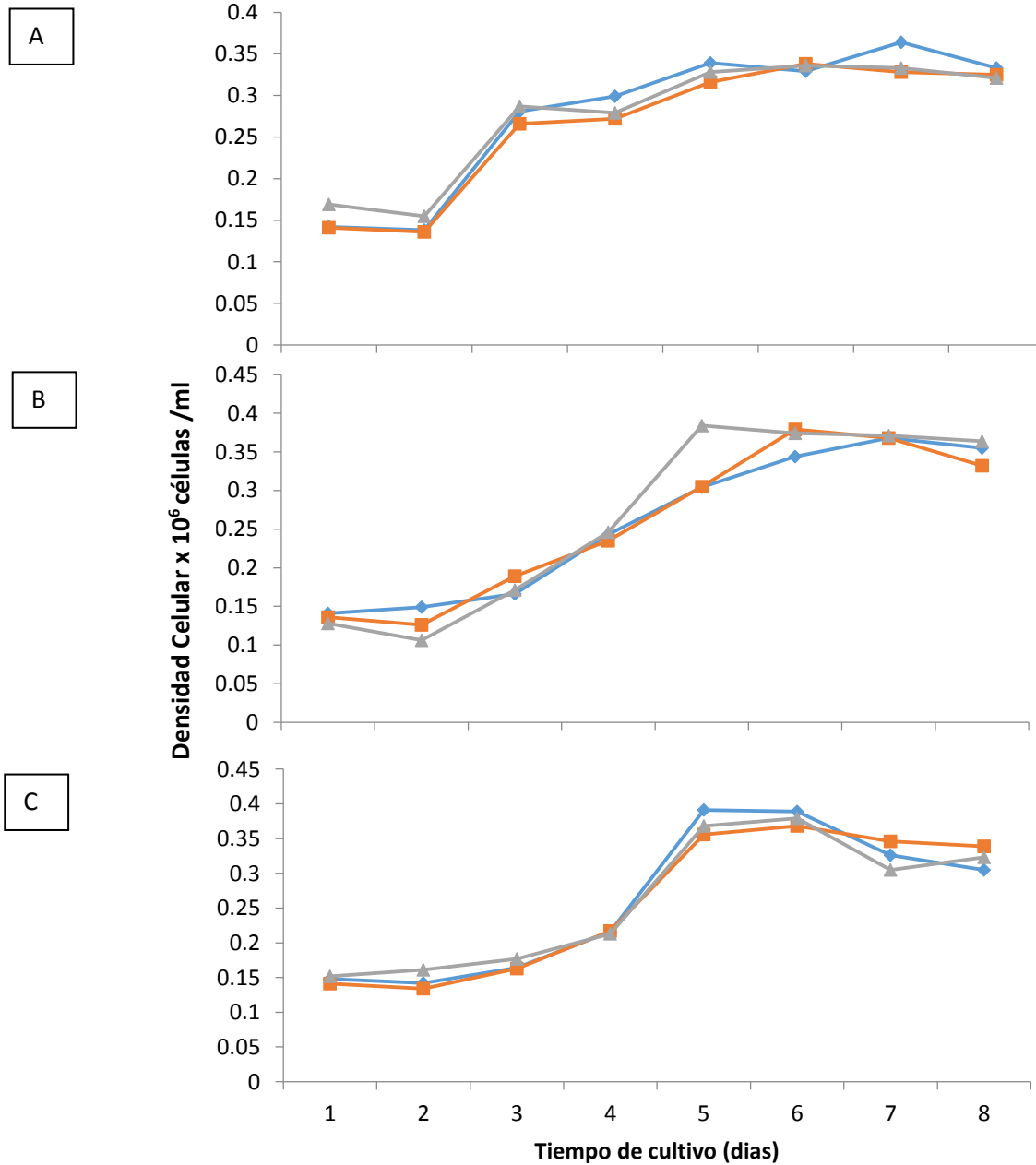


Figura 01. Perfil de crecimiento de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en lixiviado. A (*Chlorella.sp.*) B (*Ankistrodesmu nannoselene*) y C (*Scenedesmus quadricauda*). Los colores diferencian los dos tratamientos y el control: C — T1 — T2 —

El perfil de crecimiento de las tres especies de microalgas evaluadas en lixiviado por lo general muestran un comportamiento similar en *Chlorella.sp*, *A.nannoselen*, *S.quadricauda* en donde es evidente que tienen un incremento gradualmente diferenciándose entre los tratamientos y el control. Asimismo, en el día 2 se observa una disminución en la densidad celular de *Chlorella sp*, con ($0,281 \times 10^6$ célula/ml, $0,266 \times 10^6$ célula/ml, $0,287 \times 10^6$ célula/ml, respectivamente), para *A.nannoselene* con ($0,166 \times 10^6$ célula /ml, $0,189 \times 10^6$ célula/ml, $0,171 \times 10^6$ célula/ml, respectivamente) y *S.quadricauda* con ($0,164 \times 10^6$ célula /ml, $0,163 \times 10^6$ célula/ml, $0,177 \times 10^6$ célula/ml respectivamente) entre ambos tratamientos y el control, debido al estado de estrés a que fueron sometidos previos a la evaluación las tres especies de microalgas , este periodo es llamado la fase de adaptación o acondicionamiento. A partir de la cual, comenzaron a tener un crecimiento progresivo alcanzando la fase exponencial el día 6 para *Chlorella sp* ($0,364$, $0,328$, $0,33$) *A. nannoselene* ($0,368 \times 10^6$ célula/ml, $0,368 \times 10^6$ célula/ml, $0,371 \times 10^6$ célula/ml) y *S. quadricauda* ($0,326 \times 10^6$ célula/ml, $0,346 \times 10^6$ célula/ml, $0,305 \times 10^6$ célula/ml) el mismo que fue su máxima densidad celular para cada especie ya especificada anteriormente. El día 3 de la evaluación se pudo observar un cambio en la coloración en el cultivo, ya que el color del lixiviado empezó a cambiar de marrón a amarillo.

5.3. Producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas evaluadas.

En general, en las tres especies de microalgas evaluadas en lixiviado se observa que la especie que mostró mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus quadricauda* con (0,19 mg/L, 0,12 mg/L y 0,14 mg/L respectivamente) y las especies de *Chlorella sp* y *A. nannoselene* obtuvieron valores menores. Asimismo, el contenido de lípidos totales también mostró un incremento en función a la producción de biomasa, ya que la especie que reportó la mayor acumulación de lípidos totales fue *Scenedesmus quadricauda* con (27,55%, 17,09%, 20,86% respectivamente) seguido de *Chlorella sp*. que presentó porcentajes lipídicos de (15,3%, 11,7%, 16,1% respectivamente). Por lo que, la inducción de lípidos totales en lixiviado no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las tres especies evaluadas. Tal como se puede apreciar en la figura 02.

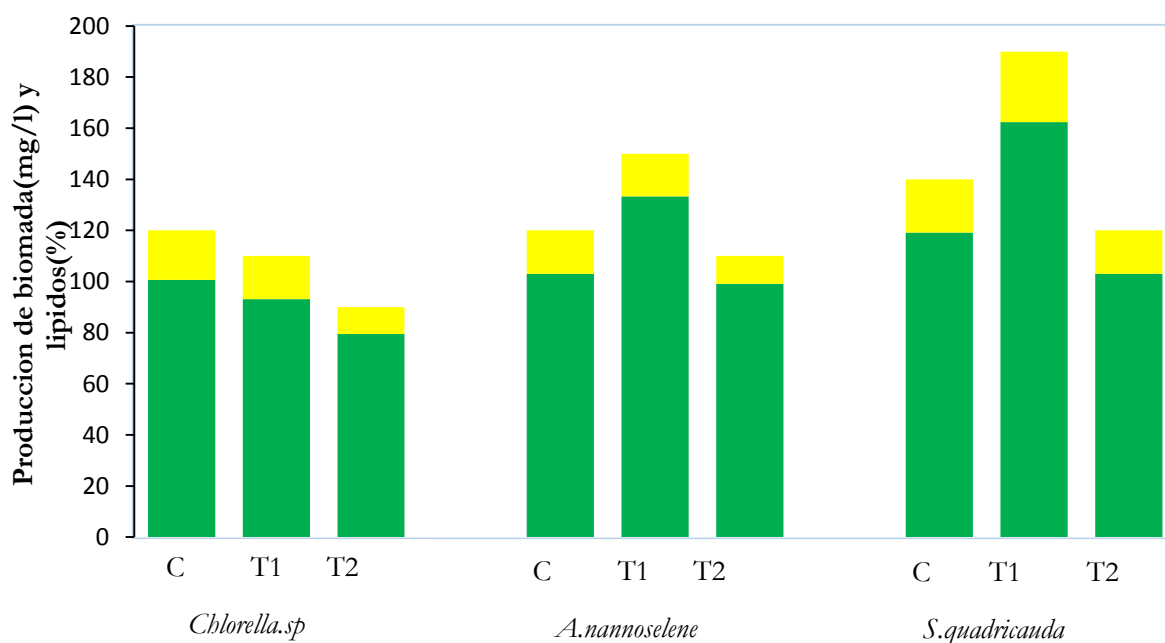


Figura 02. Producción de biomasa y acumulación de lípidos totales en tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas cultivadas en lixiviado. 1=lixiviado concentrado (1/1), 2=lixiviado diluido (1/2), C=Control medio CHU. Barras amarillas (contenido de lípidos totales %) y barras verdes (producción de biomasa microalgal)

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Las microalgas son productores primarios y como tales cumplen una función esencial en los ecosistemas. Su importancia en el consumo humano se basa en su contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Las microalgas han sido utilizadas ampliamente en procesos de biorremediación con el fin de remover metales pesados y materia orgánica. Los componentes de su pared celular contribuyen a su capacidad para retener variados contaminantes ambientales presentes en cuerpos de agua. Es deseable obtener suficiente biomasa algal para poder aplicarla al desarrollo de materiales bioasorbentes (41).

Los resultados de esta investigación indican que *Chlorella sp* mostró remoción de dióxido de carbono, dureza, alcalinidad y fosforo, tal como se evidencia en estudios realizados sobre la efectividad de esta especie en la remoción de nitrógeno, fosforo, demanda química de oxígeno y metales en aguas residuales realizados por Garza *et al* (42). Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (42). Los valores de los compuestos nitrogenados se mantuvieron, ya que las microalgas al ser cultivadas inicialmente en un medio donde ya contenía compuestos nitrogenados, de donde obtuvieron lo suficiente para almacenarlo en sus células ya no pudiendo consumir los compuestos nitrogenados presentes en el lixiviado, estos resultados concuerdan con los de Lartigue y Sherman (48) quienes indican que las algas pueden captar el nitrógeno del agua y transportarlo a sus células. La cinética de esta absorción posee una fase acelerada y luego llega a un máximo donde la velocidad de absorción disminuye hasta detenerse, en ese momento se dice que la célula tiene sus reservas de nitrógeno completas. Así por más nitrógeno que se agregue, la célula no lo absorberá.

El Dióxido de carbono fue consumido totalmente en las tres especies, ya que las microalgas utilizan el CO₂ en el proceso de fotosíntesis en el cual produce las macromoléculas esenciales para su desarrollo y crecimiento, además de producir el O₂ al ambiente. Los valores de pH en las tres especies de microalgas evaluadas se mantuvieron en 9. Estos resultados son similares a lo reportado en estudios anteriores realizados por Borowitzka (43) donde indica que la especie de *Scenedesmus obliquus* tiene una consistencia a pH comprendido entre 4 y 9,5 ppm valores en los que se encuentran los lixiviados.

Respecto al perfil de crecimiento de las tres microalgas evaluadas se observó un comportamiento similar entre ellas, evidenciándose un incremento gradual en cada una de las microalgas, diferenciándose entre los tratamientos y el control.

Esto se sustenta en lo afirmado por Arredondo y Vásquez (18) quienes indican que cada especie de microalga responde de diferente manera ante la disponibilidad de nutrientes y dependiendo de su procedencia. Asimismo, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Urcia y Díaz (45) quienes mencionan que *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Ankistrodesmus sp.* Fueron las microalgas que mostraron un mejor crecimiento bajo condiciones de cultivo. Sin embargo, el perfil de crecimiento también dependía del tiempo de cultivo y la adición de nutrientes al medio. Las mismas autoras indican que el perfil de crecimiento de las microalgas puede ser alterado sustancialmente por la manipulación de las condiciones de cultivo tales como intensidad de luz, fotoperiodo o temperatura. Por su parte Phatarpekar *et al.*, (46) estudiando el desempeño en el crecimiento de las microalgas *Chaetoceros calcitrans* e *Isochrysis galbana*, afirmaron que esto difiere para cada una de las especie en monocultivos, ya en cultivo mixto de las dos especies *C. calcitrans* es dominante sobre *I. galbana*.

La producción de biomasa en las tres especies microalgales evaluadas, *Scenedesmus quadricauda* fue la especie que mostró la mayor producción de biomasa. Estos resultados concuerdan con Castilla (44) quien alcanzó una mayor producción de biomasa microalgal con agua residual. Además, la especie de *Scenedesmus quadricauda* fue la que mayor producción de lípidos obtuvo, estos resultados son similares a los obtenidos por Cobos *et al.*, (47) quienes reportaron (43.6%) de producción lipídica con *Scenedesmus quadricauda* al ser la especie más interesante por tener alto contenido lipídico al ser aisladas por primera vez del río Itaya para fines sustentables en la producción de biodiesel.

Los resultados obtenidos en esta investigación nos indican que las microalgas son organismos que pueden ser utilizados para remover diversos patógenos, iones metálicos y otros compuestos tóxicos, ya que presentan diversas adaptaciones y ciertos mecanismos de tolerancia al estrés. Por lo que se recomienda continuar con estudios de exposición de microalgas al lixiviado considerando mayores y menores tiempos en la evaluación

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

- En la remoción de los compuestos nitrogenados se evidencia que hubo consumo de dióxido de carbono y de cloruros. Asimismo, se encontró cambios significativos en Dureza, Alcalinidad y Fosforo para las tres especies de microalgas oleaginosas evaluadas.
- La especie microalgal que mostró la mayor tasa de crecimiento fue *Ankistrodesmus nanmoselene* con 0,77 y la especie con mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus quadricauda*.
- La especie microalgal que reportó la mayor producción de lípidos totales fue *Scenedesmus quadricauda*.

CAPÍTULO VIII

RECOMENDACIONES

Los valores en las remociones de los indicadores evaluados fueron obtenidos a solo 9 días pero queda la posibilidad que puedan disminuir aún más por un mayor tiempo de exposición lo que se observó en este trabajo de investigación.

Los valores del contenido lipídico fueron obtenidos en un periodo de 9 días pero queda la posibilidad de que puedan incrementar aún más su contenido lipídico por un mayor o menor tiempo de exposición en lixiviado lo que se observó en este trabajo de investigación.

Realizar un estudio de remoción de parámetros físicos y biológicos con microalgas para contribuir con este estudio de tesis.

Los cultivos deberán ser unialgales para garantizar los buenos resultados de la remoción de contaminantes en el lixiviado y evitar la competencia por los nutrientes entre microorganismos.

Promover este tipo de investigaciones a escala industrial para determinar la efectividad que pueden llegar a tener.

CAPÍTULO IX

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parra, A Vigías Ambientales, Tratamiento de lixiviado con la microalga *Chlorella sp.* 2010.
2. Ortan, Proyecto de tratamiento y control de residuos aplicados en el relleno sanitario de Bordo poniente de México: Instituto de ingeniería de la UNAM.2009.
3. Conam, Manejo de residuos sólidos. Situación en América latina y el caribe.2007.
4. Lavole A. y De la noue J. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus Obliquus*: A new approach for Wastewater biological tertiary treatment. Water Resources. 1985; 1437-1442.
5. Nuñez J. Voltonia D.Nieve M., Piña P, Medina A. y Guerrero M: 2001.
6. Tam N.F,Wong y.S:Repeated use of two *Chlorella species*, *C. Vulgaris* and for cyclic nickel bioadsorption. Environmental pollution. 2001; 85-92.
7. Charles M. Remoción de los compuestos nitrogenados en un Sistema piloto de estabilización. Tesis de grado. Facultad de ingeniería. Universidad de Zulia; 1983.
8. Protocolo de calidad de agua: Fosforo total en agua. Versión 02.Sub dirección de hidroogia.2004; 13p.
9. Fundamentos de limnologia neotropical versión 03; 2009.
10. Gonzales L. E. Cañizares R. O y Baena S: Efficiency of ammonia and phosphorus removal a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresouce.1997; 359-262.
11. Jonte L. et al Glynn H, Heinke G. Ingeniería ambiental. (2 ed.). México: Prentice Hall; 1999.

12. Orta V, Monje R, Gonzales M, Valdivia S. Estudio de tratabilidad de lixiviados en la planta de tratamiento de aguas residuales municipales .Santa fe .1999.
13. Giralde, E. Tratamiento de lixiviado de relleno sanitarios. Universidad de los Andes. 2002.
14. Oswald w, Lembi C, Waaland J. The role of microalgae in liquid waste tretment and reclamation (Eds 2).Cambribge.1988; 225-281.
15. Abalde J, A. Cid, P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. (Monografías N^o 26).Facultad de ciencia, Laboratorio de microbiología. Universidad de Coruña.1995; 210.
16. Mulligan C, Yong R, Gibbs B. An evaluation of technologies for the heavy metal remedition of dredged sediments.2001; 145-163.
17. Oswald, W. J. Light conversion efficiency in photosynthetic oxygenation. IER, series 44. Sanitary Engr. Res. Lab. Univ. Calif. Berkeley. 1957. 127pp.
18. Arredondo B. O. & R. Vásquez. Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. Ciencia y Desarrollo, CONACyT. 1991; 27 (98): 99-111.
19. Giraldo, E. Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios. Universidad de los Andes.2002.
20. Samuel, P. Manejo y disposición de residuos sólidos urbanos. Panamericana formas e impresos. 1998. pp. 249-250.
21. María O. Estudio de la tratabilidad de lixiviados de la etapa iv del relleno sanitario de bordo poniente, en las lagunas facultativas con recirculación ubicadas en la zona federal del lago de Texaco. 2004.
22. Ministerio del medio ambiente. Guía Ambiental Para Rellenos Sanitarios. 2002.
23. Oswald w, Lembi C, Waaland J. The role of microalgae in liquid waste tretment and reclamation (Eds 2).Cambribge.1988; 225-281.

24. Kaplan D .Water pollution and bioremediation by microalgae.2005; 439-447.
25. Cañizares V. Biosorción de metal pesado mediante el uso de biomasa microbiana: Revista latinoamericana de microbiología. 2000; 131-143.
26. Graham L, Wilcox, L. Algae. London: Prentice Hall International.2000. 420.
27. Cañizares V, Casas C. El papel de las microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales. Instituto Politécnico Nacional. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. México. 1991.
28. Garibay-Hernández A, Vázquez-Duhalt R, Sánchez-Saavedra M. y Martínez-Jiménez A. Biodiesel a partir de Microalgas. Soc Mex Biotecnol Bioingeniería. 2009; 13:38-61.
29. Albarracín I. La reducción de biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. XV Simp Electrónico Int. 2007; 1- 16.
30. Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. Renew Sust Energ Rev. 2010; 14(2):557-77.
31. Resenberg J, Oyler G, Wilkinsin L, Betenbaugh M. A Green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution. Curr Opin Biotechnol. 2008; 19(5):430 - 6.
32. Richmond A, Biological principle of mass cultivation. Richmond a Hondbook of microalgal mass, culture: biotechnology and applied phycology. 2004; 566.
33. Thompson G. Lipids and membrane function in Green algae. Biochim Biophys Acta. 1996; 1302(1):17 - 45.
34. Badui S. Química en los alimentos. (3ª ed.). México D.F: Person; 1993.
35. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. (8ª ed.). Madrid: Prentice Hall; 1999.

36. Metz J, Roessler P, Facciotti D, Levering C, Dittrich F, Lassner M. Production of polyunsaturated fatty acids by polyketide synthases in both prokaryotes and eukaryotes. *Science*. 2001; 293(5528):291- 293.
37. Demirbas A, Demirbas M. *Algae Energy: Algae as a New Source of Biodiesel*. Springer Lond Dordr Heidelb New York. 2010; e-ISBN 978-1-84996-050-2.
38. Chisti Y. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv*. 2007; 25:294- 306.
39. Chisti Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends Biotechnol*. 2011; 26(3):126-131.
40. Amaro H, Guedes A, Malcata F. Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Appl Energy*. 2011; 88(10):3402-10.
41. Infante CH. Propagación de la microalga *Chlorella sp*. En cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. Universidad de Cartagena. 2012.
42. Garza, M.T., Almaguer, V., Rivera, J. & Loredó, J. (2010). Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chorella sp*. Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*: 13(2), 174-177.
43. Borowitzka, M. A. *Microalgae Biotechnology*, University Press, Cambridge, 1988.
44. Castilla P. Remoción de ortofasto y amonio de agua residual municipal por tres cultivos inmovilizados de microalgas. Mexico.2010.
45. Urcia, M y Díaz, L. Aislamiento e identificación de Microalgas oleaginosas amazónicas en las cuencas de los ríos Amazonas, Itaya y Nanay, Loreto-2013.
46. Phaterpekar P, Sreepada R, Pednekar C, Achutha C. A comparative study on growth performance and composition of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitran*. 181; 2000.
47. Cobos, M., Castro, J.C., Cerdeira, A. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Peru-2002.

ANEXO

GALERÍA DE FOTOS

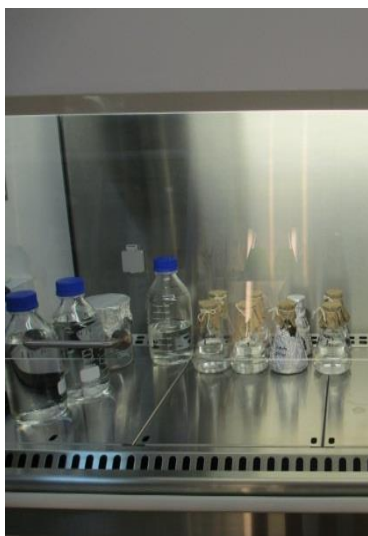


Figura 03. Materiales para la preparación del medios CHU10 para el cultivo inicial.



Figura 04. Preparación del medios CHU10 para el cultivo inicial.



Figura 05. Medios CHU10 para el cultivo inicial.



Figura 06. Inserción del inoculo para el cultivo inicial.



Figura 07. Introducción del medio CHU10 para el cultivo inicial.



Figura 08. Cultivos iniciales instalados.

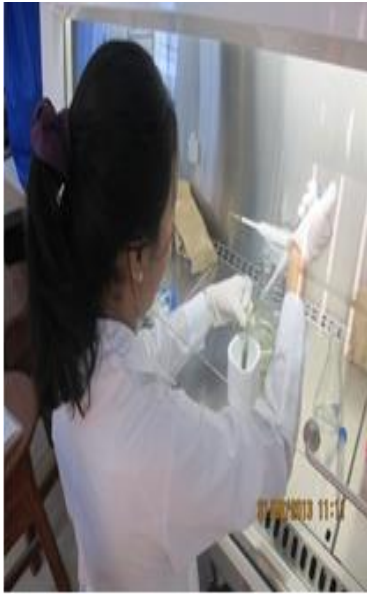


Figura 09. Biomasa obtenida de la cosecha microalgal.



Figura 10. Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15 ml.

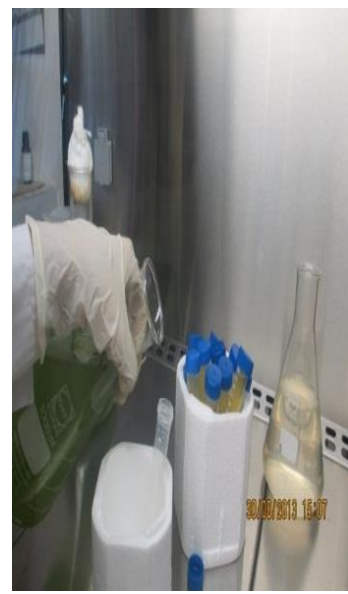


Figura 11. Cosecha microalgal en la cabina de flujo laminar.



Figura 12. Recojo de lixiviado del relleno sanitario.



Figura 13. Centrifugado del lixiviado.



Figura 14. Filtración del lixiviado.



Figura 15. Preparación de los ensayos problema.



Figura 16. Preparación de los controles.



Figura 17. Evaluación de los indicadores cada 48 horas con el kit lamotte.



Figura 18. Frascos diluidos para la evaluación.



Figura 19. Conteos diarios.

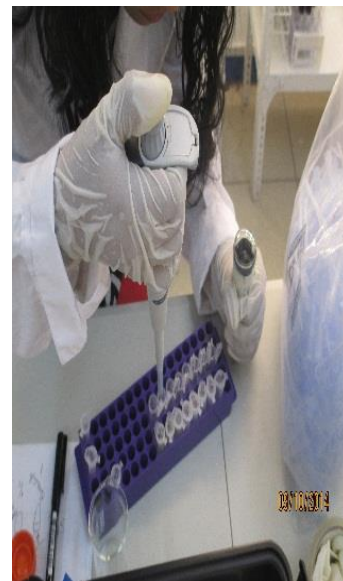


Figura 20. Evaluación del fosforo.



Figura 21. Centrifugación del cultivo microalgal en tubos de 15 ml.



Figura 22. Biomasa obtenida de la cosecha depositada en placas Petri.



Figura 23. Biomasa acondicionada para el proceso de secado.



Figura 24. Raspado de biomasa seca de las placas.

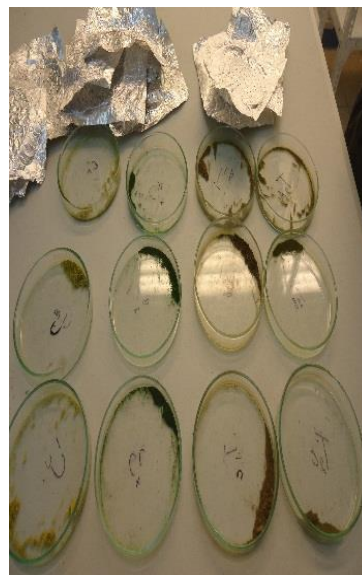


Figura 25. Biomasa raspada lista para el pesado.



Figura 26. Peso de la placa Petri con y sin biomasa.



Figura 27. Trituración de la biomasa previamente pesada con solución extractora.



Figura 28. Biomasa mezclada con solución extractora.



Figura 29. Fase clorofórmica posterior a centrifugación.



Figura 30. Biomasa triturada en tubos de 2ml para centrifugar.



Figura 31. Contenido lipídico de las tres especies de microalgas evaluadas con lixiviado.



Figura 32. Contenido lipídico secado por 23 horas a 50 °C.

