

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel
laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para
el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales
Municipales**

Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología

José Giovanni Jesús Avila Peltroche

Lima, Perú

2015

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres,
a mi hermana, a mi tío Fidel
y a todas las personas que han creído en mí,
que con su apoyo constante, oraciones y afecto
motivaron cada día mis ansias por investigar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la vida, a Jesucristo por darme la Salvación y al Espíritu Santo por concederme el don de la Ciencia

Agradezco a mi madre Lucrecia Peltroche La Rosa, a mi padre José Avila Parco, a mi hermana Mary Claudia Avila Peltroche y a toda mi familia por aguantar mis ausencias mientras trabajaba en la tesis, mis amanecidas mientras escribía la misma y por bendecirme con su apoyo constante cada día de mi vida.

Gracias también a la directora y asesora de mi tesis, Dra. Haydee Montoya Terreros, por saberme guiar académicamente durante toda mi investigación; a la Blga. Patricia Ayón Dejo, jefa del Laboratorio de Biología Marina y Continental de la Universidad Ricardo Palma, por brindarme el ambiente necesario para llevar a cabo esta tesis; y a Yolinda Ramirez de la Planta de Tratamiento “Intihutana” por facilitarme el acceso a sus instalaciones para la toma de muestras.

Especial mención merecen el Dr. Cesar Acleto Osorio y la Dra. Reina Zúñiga de Acleto, por ser, sobre todo, maestros que me han sabido guiar en este fascinante mundo que es la ficología

Agradezco a Stefany Rojas Perea, Karen Neira Cruzado, Jimmy Cabrera, Alejandro Pacheco Silva y por brindarme su amistad incondicional durante mis años de estudio y en mi vida profesional. Sin su ayuda ni consejos no estaría escribiendo estas líneas.

Agradezco a Andrea Laos Ayala, Marysabel Salas Sierralta, Yat Sen Wong, Jose Luis Llanos Carrillo, Nicolás Dávila Burga, Rosa Marina Verano Silvera, Jaraj Padilla Vallejos y Anderson Oropeza Clavo, amigos y colegas, que me apoyaron

incondicionalmente en todo lo necesario y con sus excelentes ideas durante la elaboración de esta tesis.

Valoro, asimismo, el apoyo brindado por la M. Sc. Carla Patricia Aguilar Samanamud, la Ing. Liz Cecil Tenorio García-Blásquez y todos los integrantes del Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú en todo lo relacionado a los análisis fisicoquímicos de la presente investigación. También al Blgo. Armando Chiella por la ayuda brindada en las fases preliminares de mi tesis.

Un especial agradecimiento a los integrantes del Laboratorio Biotecnología y Fisiología Animal y del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad Ricardo Palma por brindarme gentilmente sus ambientes en diversos análisis durante la presente investigación.

“Nos provoca un enorme pavor todo aquello que no comprendemos y respetamos con reverencia todo lo que no podemos explicar”.

Bleach – Tite Kubo

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la capacidad de remoción de nitratos (N-NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}) en Aguas Residuales Municipales (ARM) por microalgas libres e inmovilizadas. Se utilizaron cepas provenientes de los afluentes de la Planta de Recuperación de las Aguas del Río Surco (Lima, Perú) y se evaluó su capacidad de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} durante 10 días, a nivel laboratorio, en ARM con tratamiento primario, tanto de forma libre como inmovilizadas en discos de alginato de sodio al 4%. Las cepas obtenidas se identificaron como *Chlorella* sp y *Chlamydomonas* sp. Ambas tuvieron un buen crecimiento en ARM, especialmente *Chlamydomonas* sp, la cual reportó los mayores valores en los parámetros cinéticos de crecimiento. El cultivo de *Chlorella* sp. libre fue el que registró uno de los valores más altos de porcentaje (71.25%) y tasa de remoción (0.43 mg/l/día) de N-NO_3^- , y los máximos valores de dichos parámetros para PO_4^{3-} (83.69%; 0.09 mg/l/día), así como para el índice de eficacia (EI) de ambos nutrientes, comparado con los de *Chlamydomonas* sp. Los cultivos inmovilizados de ambas especies reportaron valores altos de remoción, entre 56% a 67% para N-NO_3^- y 78% a 81% para PO_4^{3-} , este último fue removido en 24 horas en la mayoría de los cultivos. La inmovilización fue el principal factor que afectó la capacidad de remoción de nutrientes. Ambas cepas mostraron ser eficientes en la remoción de nutrientes en ARM, especialmente de PO_4^{3-} , con valores cercanos a los máximos reportados para ambas especies en estudios previos.

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

ABSTRACT

The aim of this investigation was to determinate the nitrate (N-NO_3^-) and phosphate (PO_4^{3-}) removal capacity of free and immobilized microalgae in Municipal Wastewater (MW). Strains were isolated from Planta de Recuperación de las Aguas del Río Surco (Lima, Perú) influent. Their N-NO_3^- and PO_4^{3-} removal capacity were evaluated during 10 days in MW with primary treatment in batch cultures with free and immobilized cells in 4% sodium alginate discs. Strains were identified as *Chlorella* sp and *Chlamydomonas* sp. Both showed good growth in MW, especially *Chlamydomonas* sp., which reported the highest value of kinetic growth parameters. Free *Chlorella* sp. culture reported one of the highest values of N-NO_3^- removal percentage (71.25%) and rate (0.43 mg/l/día), and the maximum values of PO_4^{3-} removal parameters (83.69%; 0.09 mg/l/día) and efficacy index (EI) for both nutrients compared with *Chlamydomonas* sp. Immobilized cultures reported high values of nutrient removal, between 56% to 67% for N-NO_3^- and 78% to 81% for PO_4^{3-} . In most microalgae cultures, high percentages of PO_4^{3-} (76-80%) were removed in 24 hours. Method of culture (free or immobilized) was the main factor affecting the nutrient removal capacity. Strains were efficient in nutrient removal in MW, especially for PO_4^{3-} , with values close to the maximum ones reported for both species in previous studies.

Key words: Removal, microalgae, immobilization, wastewaters.

INDICE

INDICE.....	8
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	10
1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES	15
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo General	24
3.2. Objetivos Específicos	24
4. JUSTIFICACIÓN	25
5. HIPÓTESIS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1. Área de estudio	28
6.2. Diseño Metodológico	29
6.3. Operacionalización de variables	30
6.4. Procedimiento	31
6.4.1. Obtención y acondicionamiento de las muestra para aislamiento de microalgas.....	31
6.4.2. Preparación del medio de cultivo	31
6.4.3. Aislamiento y cultivos de microalgas	32
6.4.4. Caracterización de las cepas unialgales	34
6.4.5. Inmovilización de las algas.....	35
6.4.6. Preparación de los efluentes y condiciones experimentales	36
6.4.7. Crecimiento en los efluentes de la PTAR	38
6.4.8. Técnicas analíticas.....	39
6.4.9. Determinación de la viabilidad celular	39
6.5. Técnicas para el procesamiento de la información.....	40

7.	RESULTADOS.....	42
7.1.	Caracterización de las cepas	42
7.2.	Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp y <i>Chlamydomonas</i> sp. en los efluentes de la PTAR durante el experimento.	44
7.3.	Remoción de N-NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻ por parte de los cultivos libres e inmovilizados 53	
7.3.1.	Porcentaje y tasa de remoción	57
7.3.2.	Índice de eficacia (IE).	58
7.4.	Viabilidad post-inmovilización.....	63
8.	DISCUSIÓN.....	65
9.	CONCLUSIONES	73
10.	RECOMENDACIONES	75
11.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA.....	76
12.	ANEXOS.....	90

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

<i>Figura 1. Ubicación de la Planta de Recuperación de las Aguas del Río Surco “Ing. Alejandro Vines Araoz” (Fuente: Google Earth, 2015).</i>	29
<i>Figura 2. Colecta de la muestra de aguas residuales luego del pre-tratamiento en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vines Araoz” en el distrito de Surco (Lima, Perú)</i>	32
<i>Figura 3. Técnica de raspado en agar para el aislamiento de microalgas</i>	34
<i>Figura 4. Inmovilización de microalgas. A: mezcla del cultivo microalgal líquido con la solución de alginato de sodio al 4%. B: solución microalgas+alginato previo a la homogenización. C: solución microalgas+alginato en placas Petri previo a la gelificación. D: discos de alginato luego de la gelificación con CaCl₂ al 2%.</i>	36
<i>Tabla 2. Condiciones experimentales para los ensayos de remoción de N-NO₃⁻ y PO₄³⁻</i>	37
<i>Figura 5. Punto de colecta de los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vines Araoz” (Lima, Perú) para el experimento (A) y posterior filtrado con papel filtro (Rundfilter 125 mm) (B)</i>	38
<i>Figura 6. Cuantificación de N-NO₃⁻ y PO₄³⁻ mediante las técnicas colorimétricas de reducción/diazotización y azul de molibdeno, respectivamente. A1: la coloración rosada indica la presencia de N-NO₃⁻. A2: la coloración azulada indica la presencia de PO₄³⁻. B1 y B2: lecturas para cada nutriente en el fotómetro YSI 9500.</i>	41
<i>Figura 7. Cepas aisladas de las aguas residuales de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vines Araoz” (Lima, Perú). A: Chlorella sp. (400x) B: Chlamydomonas sp. teñida con lugol (400x). La flecha indica un individuo de Chlamydomonas sp. en división celular. Escala=25 μm</i>	43
<i>Tabla 3. Características geométricas y parámetros cinéticos de crecimiento durante la fase exponencial de Chlorella sp. y Chlamydomona sp. en Medio Basal Bold (MBB). Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas (p<0.05).</i>	43
<i>Tabla 4. Estimación del crecimiento microalgal ajustado al modelo logístico (regresión lineal). K: máxima densidad celular; b: tasa específica de crecimiento. Las letras y los números diferentes en superíndice señalan diferencias significativas (p<0.05) y altamente significativas (p<0.001), respectivamente.</i>	44
<i>Figura 8. Crecimiento de Chlorella sp. aislada de aguas residuales en Medio Basal Bold (MBB). A: Curva de crecimiento promedio de Chlorella sp. durante los 14 días de cultivo. B. Gráfico semilogarítmico del crecimiento de Chlorella sp. Barras de error = media±D.E.</i>	45

Figura 9. Crecimiento de <i>Chlamydomonas</i> sp. aislada de aguas residuales en Medio Basal Bold. A: Curva de crecimiento promedio de <i>Chlamydomonas</i> sp. durante los 14 días de cultivo. B. Gráfico semilogarítmico del crecimiento de <i>Chlamydomonas</i> sp. Barras de error = media±D.E.	46
Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de los cultivos libres de <i>Chlorella</i> sp. y <i>Chlamydomonas</i> sp. en efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú). r , k y T_2 fueron calculados para la fase exponencial. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).	48
Figura 10. Crecimiento de microalgas libres e inmovilizadas en los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz”. A: sistema de cultivo. B: célula libre de <i>Chlamydomonas</i> sp. (400x). C: disco con <i>Chlamydomonas</i> sp. inmovilizada luego de 10 días de cultivo. D: Individuos de <i>Chlamydomonas</i> sp. en divisiones secuenciales en el corte transversal del disco de alginato luego de 10 días de cultivo (400x). E. Autosporas de <i>Chlorella</i> sp. en el corte transversal del disco de alginato luego de 10 días de cultivo (100x). Escala=50 μ m.	49
Figura 12. Crecimiento de <i>Chlamydomonas</i> sp. libre en efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú). A: Curva promedio de <i>Chlamydomonas</i> sp. durante los 10 días del experimento. B: Gráfico semilogarítmico que evidencia las fases de crecimiento del cultivo. Barras de error = media±D.E.	51
Figura 13. Cantidad total de clorofila a en los cultivos libres e inmovilizados de <i>Chlorella</i> sp. (A) y <i>Chlamydomonas</i> sp. (B) al inicio (día 0) y final (día 10) del experimento. Los asteriscos (*) señalan diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de error = media±D.E.	52
Figura 14. Remoción de $N-NO_3^-$ (A) y PO_4^{3-} (B) en los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú) en un período de 10 días. Barras de error = media±D.E.	55
Tabla 6. Concentración de $N-NO_3^-$ y PO_4^{3-} en los diferentes tratamientos en un periodo de 10 días. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).	56
Tabla 7. Porcentajes y tasas de remoción de $N-NO_3^-$ y PO_4^{3-} durante los 10 días de experimentación en los cultivos microalgales comparados con los tratamientos control y blanco según los test post hoc de Tukey y Dunnet. Los valores mostrados corresponden al valor de la significancia.	59
Tabla 8. Porcentajes y tasas de remoción de $N-NO_3^-$ y PO_4^{3-} de los cultivos microalgales en un período de 10 días. Los valores con signo negativo indican aumento en la concentración de nutrientes y no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).	60

<i>Tabla 9. Análisis de ANOVA de dos vías para los parámetros de remoción de $N-NO_3^-$ y PO_4^{3-} (día 0-10) en los diferentes cultivos microalgales. Los asteriscos señalan factores significativos (*) y altamente significativos (**).</i>	61
<i>Tabla 10. Índice de Eficacia (IE) de $N-NO_3^-$ (IE_N) y PO_4^{3-} (IE_P) de los cultivos microalgales estudiados. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).</i>	62
<i>Tabla 11. Análisis de ANOVA de dos vías para el IE de $N-NO_3^-$ y PO_4^{3-} de los cultivos microalgales. Los asteriscos señalan factores altamente significativos (**).</i>	62
<i>Tabla 12. Viabilidad post-inmovilización de <i>Chlorella sp</i> y <i>Chlamydomonas sp</i>. evaluada mediante la densidad celular ($\times 10^6$ cel/ml). DE: Desviación estándar. El asterisco (*) señala diferencias significativas con la concentración final control (día 5) (<i>Chlorella sp.</i>: $4.38 \pm 0.70 \times 10^6$ cel/ml, $p = 0.005$; <i>Chlamydomonas sp.</i>: $1.09 \pm 0.25 \times 10^6$ cel/ml, $p = 0.001$).</i>	63
<i>Figura 15. Crecimiento post-inmovilización de <i>Chlorella sp</i>. (A; 100x) y <i>Chlamydomonas sp</i>. (B; 100x) luego de 5 días de cultivo en Medio Basal Bold. Escala= 50 μm</i>	64

1. INTRODUCCIÓN

El veloz incremento de la población mundial y la mejora de los niveles de vida en ciertas regiones del planeta han incrementado el consumo per cápita del agua. Esto ha llevado a que 6 000 millones de personas se enfrenten a una grave crisis hídrica en todo el mundo. Si a esto le sumamos la contaminación diaria de 2 millones de toneladas de desechos de todo tipo en fuentes de agua dulce, el panorama hídrico se agrava aún más.

En Latinoamérica, menos del 20% del agua residual recibe un tratamiento adecuado, mientras que en Perú, el 70.9% de las mismas (530 millones de m³/año) no son tratadas. La remoción de nutrientes como PO₄³⁻ y N-NO₃⁻ (tratamiento terciario) es deficiente en nuestro país, y más aún en la capital, donde ninguna planta lleva a cabo este tipo de tratamiento de forma directa. El impacto de las aguas carentes de tratamiento terciario reside en la gran concentración de nutrientes que contienen, provocando el fenómeno llamado eutrofización en los cuerpos de agua receptores. Asimismo, la presencia de metales pesados y compuestos orgánicos de difícil degradación en estos efluentes causan problemas a largo plazo. La salud y la disponibilidad de agua potable pueden verse muy afectadas en zonas aledañas a dichos cuerpos de agua, no solo debido a la descomposición de los organismos muertos, sino también a la producción de olores fétidos como consecuencia de la liberación de hidrógeno sulfurado y el aumento de focos infecciosos.

En la actualidad, el tratamiento convencional de aguas residuales enfrenta el reto de disminuir dicho exceso de nutrientes a niveles normales. Los métodos químicos y físicos, que son los más utilizados a nivel mundial, son costosos, no tan efectivos y, al ser no naturales, tienen un impacto considerable en el ecosistema. El Tratamiento Terciario Biológico (TBT) usando microalgas tiene la ventaja de ser un método natural,

eficiente y productivo, ya que la biomasa obtenida en el proceso puede ser utilizada en la producción de fertilizantes, biocombustibles, suplemento alimenticio en acuicultura, entre otros. A esto se suma la oxigenación natural de los cuerpos de agua por parte de estos microorganismos, reestableciendo el equilibrio ecológico en ellos.

Sin embargo, el mayor problema que enfrenta el tratamiento de aguas residuales mediante este método es la remoción de la biomasa microalgal en suspensión del agua tratada. Los procesos convencionales son costosos, con alta demanda energética y requieren de una serie de etapas para recuperar por completo dicha biomasa. Ante esto, surge la posibilidad de utilizar matrices de diferente naturaleza que puedan inmovilizar microalgas y evitar el proceso engorroso de removerlas de la forma convencional.

La inmovilización con matriz de alginato ha probado ser eficiente en la remoción de nutrientes. Las ventajas de este compuesto residen en la ausencia de reacciones extremas en su preparación, bajo costo, baja toxicidad, mayores tasas de remoción y fácil recuperación de las células inmovilizadas. Asimismo, las formas de las matrices juegan un rol importante al momento de permitir el pase y captura de luz por las células microalgales, lo que repercute directamente en la biomasa y compuestos derivados del metabolismo celular producidos. Nuevas variantes en las formas de las matrices han permitido alcanzar mayores tasas de remoción y mayor biomasa microalgal, entre las que se encuentran las matrices en forma de paneles y, la más reciente, en forma de discos. En tal sentido, el futuro del tratamiento de aguas residuales con microalgas conlleva la utilización de estas matrices, los cuales pueden ser reusables, económicas y fácilmente manejables.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} en aguas residuales municipales mediante microalgas libres e inmovilizadas en discos de alginato.

2. ANTECEDENTES

Las microalgas son un conjunto de microorganismos autótrofos que poseen una alta tasa de conversión de energía solar a biomasa, así como un uso eficiente de nutrientes inorgánicos, lo que les permite aumentar sus poblaciones rápidamente a la par que oxigenan el medio en donde se desarrollan y capturan el CO₂ atmosférico (de la Noüe, 1992; Benemann *et al.*, 1987; Li *et al.*, 2008). En general, las diferentes especies de microalgas clorofitas presentan rangos variables de remoción de nitrógeno (N) y fósforo (P) que van desde un 8% hasta un 100% (Cai *et al.*, 2013), y algunas de ellas pueden ser heterotróficas o mixotróficas, por lo cual son capaces de consumir materia orgánica que pudiera estar presente (Wang *et al.*, 2010a). Por otro lado, microalgas del grupo de las cianobacterias o cianofitas han mostrado gran efectividad en la disminución de las concentraciones de N y P en un 96% y 87%, respectivamente (Olguin *et al.*, 2003). Gracias a esta capacidad de remoción de nutrientes, el uso de microalgas para el TBT de aguas residuales se ha convertido en una opción eficiente y productiva de tratamiento, sin que este genere impactos negativos en el ecosistema como sí lo ocasionan Tratamientos Terciarios Físico-químicos (de la Noüe, 1992).

El N presente en aguas residuales proviene principalmente de las conversiones metabólicas de los compuestos derivados de las deposiciones (urea y proteínas), mientras que el 50% o más del P procede de detergentes sintéticos. Las principales formas químicas en las que se presentan ambos elementos son amonio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻), nitrato (NO₃⁻) y ortofosfato (PO₄³⁻), referido este último, de aquí en adelante, como fosfato (Horan, 1990). De estas formas químicas, el NO₃⁻ y PO₄³⁻ son los compuestos más difíciles de remover en aguas residuales (de-Bashan y Bashan, 2010; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). La asimilación de NO₃⁻ por algas eucariotas involucra cuatro pasos principales: 1) translocación de NO₃⁻ a través de la membrana celular; 2) reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ por la acción de la enzima nitrato reductasa y la transferencia

de dos electrones por parte de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH); 3) reducción del NO_2^- a NH_4^+ por la acción de la enzima nitrito reductasa y la transferencia total de 6 electrones por la ferredoxina (Fd); y 4) la incorporación del NH_4^+ en el aminoácido L-glutamina gracias a la acción de la glutamina sintetasa y de una molécula de adenosin trifosfato (ATP). En el caso de PO_4^{3-} , su asimilación comprende dos pasos importantes: 1) transporte activo de PO_4^{3-} a través de la membrana celular con el consecuente consumo de energía derivado de la fotosíntesis; y 2) incorporación en compuestos orgánicos a través del proceso de fosforilación, lo que involucra la generación de una molécula de ATP a partir de adenosin difosfato (ADP). En el caso de exceso de P, las microalgas pueden acumularlo en cuerpos de polifosfatos y utilizarlo cuando este se convierta en el nutriente limitante (Cai *et al.*, 2013; Grobbelaar, 2013)

El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales data de finales de los años 50 cuando un grupo de investigadores de la Universidad de California acuñó el concepto de Laguna Algal de Alta Tasa (HARP, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de desechos orgánicos. Sin embargo, no fue hasta los años 70 que dicha idea se extendió por diferentes países de Asia y en Estados Unidos de América (de la Noüe, 1992; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006). En 1974, Chung *et al* fueron los primeros en poder cultivar *Spirulina platensis* en aguas residuales de granjas de cerdos y, posteriormente, Mitchell y Richmond (1988) lograron optimizar el medio Zarrouk para dicho género con aguas residuales de ganado. Durante las siguientes décadas, diferentes especies de microalgas clorofitas, como *Chlorella pyrenoidosa*, *Desmodesmus quadricaudatus* o *Chlamydomonas* spp., comenzaron a ser utilizadas para remover nutrientes de efluentes de todo tipo e incluso degradar contaminantes como petróleo (Rawat *et al.*, 2011).

Debido a la gran cantidad de biomasa producida gracias a las características antes mencionadas, y a los productos derivados del metabolismo microalgal, estos organismos han logrado posicionarse en el mercado y se han convertido en una gran fuente de recursos económicos para las industrias relacionadas a ella, especialmente en los

sectores de alimentos y biocombustibles (Pulz, 2001). Por ejemplo, géneros como *Chlorella* y *Spirulina* se encuentran entre las primeras microalgas cultivadas y comercializadas desde los años 50 y 60 del siglo pasado como “suplementos dietéticos” en Japón, Taiwan y México (Myers *et al.*, 1951; Tamiya, 1957; Durand-Chastel, 1980; Soong, 1980; Shimamatsu, 2004). De igual manera, especies de *Chlorella* se utilizan actualmente para la extracción de pigmentos carotenoides, como astaxantina, cantaxantina y zeaxantina, de amplio uso en industria acuícola y nutracéutica por el poder antioxidante que presentan (Arad *et al.*, 1993; Lemoine *et al.*, 2010; Koo *et al.*, 2012). En la actualidad, el número de usos de ambos abarca una gran variedad de industrias, generando una gran demanda económica, con un mercado global de US\$2.1 billones solo en el 2010 (Borowitzka, 2013).

A pesar de las ventajas señaladas anteriormente, uno de los obstáculos más importantes en la remoción de la biomasa microalgal del medio de cultivo o de los efluentes residuales tratados reside en sus técnicas de cosecha (filtración, flotación, floculación, sedimentación, etc.), las cuales no son simples, baratas ni adecuadas a cultivos *outdoor* a gran escala. Este inconveniente es la razón principal por la cual no se pueden desplegar cultivos microalgales para el TBT de grandes volúmenes de aguas residuales (Hoffman, 1998; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Los métodos de separación tradicionales gastan aproximadamente el 30% de la energía de la etapa de cultivo (Ozkan *et al.*, 2012), lo que repercute directamente en la eficiencia del proceso y en los costes de producción. Ante esto, las técnicas de inmovilización constituyen una solución sencilla y de bajo costo para tal fin.

El concepto de inmovilización celular se refiere a la restricción del movimiento independiente de una célula viva en la fase acuosa de un sistema por medios naturales o artificiales (Tampion y Tampion, 1987). Su registro se remonta a finales de los años 60, fecha en la cual se comenzó a adoptar mejores técnicas y a expandirse en la literatura científica (Papageorgiou, 1987). Si bien existen varias técnicas de inmovilización, el entrapamiento es la más utilizada a nivel laboratorio y en algunos procesos a nivel

industrial. Existen diferentes compuestos utilizados para inmovilizar células. Entre las matrices más importantes se encuentran los alginatos, carragenanos y el quitosano. De los tres, la más ampliamente usada es el alginato, el cual es un polisacárido aniónico componente de la pared celular de algas pardas (Phaeophyta) formado por unidades de ácido β (1-4) D-manurónico y ácido α (1-4) L-gulurónico.

Una de las principales ventajas que presenta la inmovilización por entrapamiento reside en el aumento de la eficiencia de remoción de N y P al compararlas con sus contrapartes no inmovilizadas. Asimismo, la eliminación de metales pesados de efluentes industriales por parte de microalgas inmovilizadas es posible gracias a la unión de estos elementos a la superficie de la pared celular u otros mecanismos de detoxificación (Moreno-Garrido *et al.*, 2005; Moreno-Garrido, 2008). Al contrario de lo que se piensa, las tasas de crecimiento de células inmovilizadas y libres presentan valores similares de crecimiento. Lo que es más, diferentes estudios han encontrado valores de crecimiento y contenido de clorofila *a* en *Chlorella* y *Anabaena* muy superiores a sus contrapartes no inmovilizadas (Robinson *et al.*, 1985; Rai y Mallick, 1992; Abdel Hammeed, 2002; Gonzalez y Bashan, 2000).

Los sistemas de inmovilización se ven afectados por diferentes características de la matriz utilizada. La estabilidad es un factor clave al momento de utilizar determinada matriz, además de la retención de la biomasa, la resistencia al crecimiento microalgal y a la invasión de microorganismos no deseados, y fototransparencia (Mallick, 2002; Moreira *et al.*, 2006; Covarrubias *et al.*, 2012; Cruz *et al.*, 2013). De entre las tres mencionadas, la última se ve afectada directamente por la forma de la matriz en cuestión. En la mayor cantidad de estudios realizados, la matriz en forma de “perlas” o “gotas” es la que se utiliza, hasta el punto de diseñarse maquinaria especial para su producción de forma masiva y estandarizada (de Bashan y Bashan, 2010). No obstante, el uso de técnicas alternativas, como “pantallas” o “discos” de alginato, ha demostrado incrementar la tasa de remoción de nutrientes al aumentar la cantidad de luz que recibe cada célula en comparación a su contraparte en forma de “perlas”. En tal sentido, la

reducción del grosor y el aumento de la superficie de contacto de las matrices evitaría que se produzca un “efecto sombra”, derivado de la gran concentración microalgal, lo que incrementaría el metabolismo celular en su conjunto (Kaya y Picard, 1995; Kaya *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 2008; Zamani *et al.*, 2012).

A nivel mundial, Chevalier y de la Noüe, en dos estudios realizados en 1985, fueron los primeros en evaluar la remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} en aguas residuales urbanas por las microalgas clorofitas *Desmodesmus quadricaudatus* y *Acutodesmus obliquus* inmovilizadas en carragenina kappa. Sus resultados mostraron una capacidad de remoción de casi el 100%, y que esta no mostraba diferencia si se comparaba con la de sus contrapartes cultivadas de forma libre. Si bien en los siguientes años se realizaron estudios en relación a la remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} en medios sintéticos por parte microalgas inmovilizadas en alginato (Jeanfils y Thomas, 1986; Robinson *et al.*, 1988; Robinson *et al.*, 1989); no fue hasta 1992 que Travieso *et al.* usaron esta misma matriz con *Chlorella vulgaris* para tratar aguas residuales. Los autores obtuvieron un porcentaje de remoción de entre el 69% y 82% de N y P en condiciones de luz natural y fluidizado.

Mallick y Rai, en 1994, compararon el efecto de diferentes tipos de soportes, incluyendo alginato, en la remoción de nutrientes y metales en aguas residuales por parte de *Anabaena doliolum* y *C. vulgaris*. En sus conclusiones refirieron que el quitosano fue el mejor soporte debido a que presentó una alta eficiencia en la remoción y gran estabilidad en aguas cargadas de PO_4^{3-} . En ese mismo año, Tam *et al.* estudiaron el efecto de la concentración inicial de *C. vulgaris* inmovilizada en alginato de calcio sobre la remoción de NH_4^+ y PO_4^{3-} de aguas residuales municipales. Ellos encontraron que concentraciones altas de esta microalga (4.6 a 8.9×10^6 cel/esfera) eliminaban mayor cantidad de estos compuestos (100% y 71%, respectivamente) que aquellas con una concentración inicial baja (5.2×10^5 a 2×10^6 cel/esfera).

Kaya y Picard, en 1995, propusieron un sistema de pre-tratamiento en cámara de “hambre” al 100% de humedad para maximizar la eficiencia de remoción de nutrientes

en agua residual sintética por parte de *Desmodesmus bicellularis* inmovilizado en “pantallas” de alginato. Dicha cepa pudo remover en su totalidad PO_4^{3-} y NH_4^+ en 90 y 60 minutos, respectivamente, luego de tres ciclos de pre-tratamiento. Estos resultados fueron corroborados ese mismo año por Kaya *et al.*, quienes establecieron una temperatura ideal de 18°C para una total remoción de PO_4^{3-} y NH_4^+ en la microalga antes mencionada.

Travieso *et al.*, en 1996, compararon la efectividad de remoción de nutrientes por parte de *C. vulgaris*, *Parachlorella kessleri* y *Desmodesmus quadricaudatus* en alginato frente a sus contrapartes en carragenina kappa, poliestireno y poliuretano. Al probar aguas residuales crudas, tan solo las microalgas en alginato pudieron lograr altos porcentajes de remoción de NH_4^+ (63.8%-81.7%) y PO_4^{3-} (59.7%-71.9%) luego de 8 semanas de tratamiento en biorreactores de columnas verticales y con fotoperiodo natural de 13:11 horas. Las demás matrices se desintegraron o perdieron su forma durante el experimento (carragenina kappa), o no permitieron el crecimiento de las microalgas (poliestireno), con excepción del poliuretano que consiguió valores similares de remoción en aguas residuales pre-tratadas de ganado.

Lau *et al.*, en 1997, estudiaron la cinética de remoción de nutrientes por parte de *C. vulgaris* cultivadas de forma libre e inmovilizada en alginato o carragenano kappa. Sus resultados confirmaron el hecho de que las microalgas en alginato tuvieron el mayor porcentaje de remoción (más del 95%) en tan solo tres días de cultivo. No obstante, ningún estudio previo había determinado la concentración de esferas de alginato necesarias para una óptima captación de dichos nutrientes. Es así que Tam y Wong, en 2000, determinaron una concentración ideal de 12 esferas/ml para la microalga en cuestión con el fin de conseguir 100% de remoción de NH_4^+ y PO_4^{3-} en 24 horas. Los autores indicaron que la asimilación de nutrientes por parte de las microalgas y la adsorción de los compuestos en la matriz de alginato son los principales procesos involucrados en dicha remoción.

Durante la primera década del siglo XXI, las investigaciones en este tópico comenzaron a aumentar y empezaron a incluir nuevos aspectos en la inmovilización con alginato con el fin de hacer esta tecnología aplicable a gran escala y/o aumentar la eficiencia de la remoción en diferentes tipos de efluentes. En 2002, de-Bashan *et al.* inmovilizaron por primera vez *C. vulgaris* con la bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* para determinar si esta interacción mejoraba la captación de nutrientes en aguas residuales sintéticas. Esta co-inmovilización mejoró en un 15% la remoción de NH_4^+ y en un 63% la de PO_4^{3-} para el primer ciclo (48 horas) de tratamiento en un sistema semi-continuo. La capacidad biorremediadora de dicho consorcio fue mejorada por Hernandez *et al.* (2006) al incluir períodos de supresión de nutrientes seguido de inmersiones en el agua residual a tratar.

En 2007, Abdel Hameed fue el primero en evaluar el efecto de la densidad celular de microalgas en esferas de alginato, la concentración de estas en el medio a tratar y las dimensiones de dichas esferas, sobre la capacidad de remoción de nutrientes en aguas residuales. Valores intermedios de densidad celular (1.5×10^6), concentración de esferas (1:3) y dimensiones de las mismas (4 mm de diámetro) lograron los porcentajes de remoción más altos, luego de 48 horas, de NH_4^+ (99-100%), PO_4^{3-} (95%) y N-NO_3^- (96%). De igual manera, Zhang *et al.*, en 2008, establecieron un grosor de entre 2 a 3 mm en la matriz de alginato si esta se quería utilizar en forma de “pantalla” para optimizar la remoción de nutrientes por parte de *Scenedesmus* sp.

Singh *et al.*, en 2011, compararon la capacidad biorremediadora de una cepa estándar de *Chlorella minutissima* y de *Oscillatoria* sp. aislada de aguas residuales, ambas inmovilizadas en esferas de alginato. Si bien la cepa estándar pudo remover el mayor porcentaje de NH_4^+ presente en aguas residuales crudas (94% en 48 horas), aquella procedente de aguas residuales eliminó el 100% de PO_4^{3-} y el 62.5% de N-NO_3^- en el mismo intervalo de tiempo. Asimismo, Zhang *et al.*, en 2012, evaluaron la remoción de NH_4^+ y PO_4^{3-} por parte de *Chlorella* sp., aislada de aguas residuales municipales, inmovilizada en “pantallas” de alginato. La supresión previa de nutrientes y su cultivo

en biorreactores de placas paralelas en total oscuridad lograron una eficiencia en la remoción de NH_4^+ de un 98.91% luego de 4 horas de tratamiento, y de 100% de PO_4^{3-} en el mismo tiempo.

Covarrubias *et al.* (2012) y Cruz *et al.* (2013) realizaron dos estudios que proveyeron información vital sobre el uso de matrices de alginato en el TBT de aguas residuales. En la primera investigación, se halló que dicha matriz impedía la penetración de bacterias propias de estos efluentes, lo que aseguraba un óptimo crecimiento y remoción de nutrientes por parte del consorcio *Chlorella sp. – A. brasilense*. No obstante, la segunda investigación identificó 9 cepas de bacterias degradadoras de alginato que afectaban negativamente la estabilidad de dicha matriz. A pesar de esto, el consorcio antes mencionado pudo remover completamente el NH_4^+ y PO_4^{3-} de las aguas residuales antes de que dichas bacterias alteraran significativamente la estructura. Por otro lado, en 2012, Zamani *et al.* fueron los primeros en inmovilizar microalgas en matrices de alginato en forma de “disco”. De las 10 cepas utilizadas, solo 3 (*Halochlorella rubescens*, *Chlamydomonas sp.* y *Chroococcus dispersus*) lograron los mayores valores de eficiencia de remoción de PO_4^{3-} (69-72%). Los autores señalaron que la superficie de contacto y el diámetro de los discos afectaron el metabolismo microalgal y, por ende, la remoción de este compuesto.

Finalmente, en el 2014, Shi *et al.* diseñaron un prototipo de fotobiorreactor en placas con *H. rubescenes* inmovilizada en láminas de nitrocelulosa que pudieron acoplar, de forma piloto, al sistema de tratamiento normal de aguas residuales municipales. La remoción de N-NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} , luego de 32 días, fue de entre un 70% al 99%, lo que dio una concentración final de N y P en el efluente de ≤ 1 mg/l y 1.3 mg/l, respectivamente. Estos valores cumplieron con los límites permitidos por la legislación europea, con lo que este estudio se convirtió en el primero en aplicar con éxito esta tecnología, a nivel piloto, en un sistema integrado de tratamiento de aguas residuales.

En Sudamérica, las investigaciones sobre este tema son muy escasas considerando los bajos porcentajes de aguas tratadas. En Ecuador, Moreno *et al.* (2010) evaluaron la reducción de N y P en aguas residuales sintéticas y semi-sintéticas por parte de una cepa axénica de *Nostoc* sp. y un consorcio de cianobacterias. Los cultivos inmovilizados en perlas de alginato de ambas cepas mostraron tener una mayor eficiencia en la remoción de estos compuestos en comparación a sus contrapartes libres. El consorcio inmovilizado logró el mayor porcentaje de remoción de P (93.4%) en comparación a la cepa axénica (76.3%). Por otro lado, en Colombia, Infante *et al.* (2013) inmovilizaron *Chlorella* sp. en poliuretano con el fin de remover NH_4^+ y PO_4^{3-} de aguas residuales provenientes de lagunas de oxidación. Luego de 32 horas, la cepa inmovilizada removió el 68% y 65% de nutrientes, respectivamente, con un pH óptimo de 6.5 y 7.5 en cada caso.

Actualmente, no existe ningún estudio en Perú referido la utilización de biomasa microalgal inmovilizada para biorremediar aguas residuales. Las perlas de alginato solo se han utilizado, por sí solas, para la adsorción de Cu (II) con una eficiencia del 87.7% (Tapia *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Determinar la capacidad de remoción de nitratos y fosfatos en aguas residuales municipales por microalgas libres e inmovilizadas.

3.2. Objetivos Específicos

Aislar e identificar cepas de microalgas nativas de las aguas residuales municipales de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) “Ing. Alejandro Vincés Araoz” del distrito de Surco (Lima, Perú).

Caracterizar la morfología y crecimiento de las cepas aisladas en el Medio Basal Bold (MBB) (medio estándar).

Inmovilizar las cepas de microalgas en discos de alginato de calcio con una solución de 4% de CaCl_2 .

Caracterizar el crecimiento de las cepas cultivadas de forma libre e inmovilizada en los efluentes de la PTAR.

Determinar el porcentaje de remoción, tasa de remoción e índice de eficacia (IE) de nitratos y fosfatos por microalgas libres e inmovilizadas en los efluentes de la PTAR

Evaluar la viabilidad post-inmovilización de las cepas.

4. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, las aguas residuales son un serio problema para la salud humana y el ecosistema. El alto contenido en nutrientes como N y P ponen en peligro los cuerpos de aguas receptores al romper el equilibrio ecológico y llevarlas a un estado de eutrofización. Sin embargo, esta amenaza puede ser convertida en una oportunidad en lo que se refiere al cultivo de microalgas. Como se ha mencionado en el apartado anterior, estos microorganismos tienen la capacidad de remover dicho exceso de nutrientes a la par que oxigenan las aguas, capturan el CO₂ atmosférico y aumentan su biomasa.

Actualmente, Perú carece de Tratamientos Biológicos Terciarios (TBTs) efectivos y baratos. Un elevado porcentaje de las aguas residuales no son ni siquiera sometidas a algún tipo de tratamiento. Producto de estas falencias, muchos ecosistemas acuáticos, ya sean marinos o continentales, están seriamente contaminados o están en peligro de estarlo en un futuro próximo. Esto ha llevado a considerar al desarrollo de tecnologías para el reuso de agua residual doméstica como una línea de investigación de vital importancia en los próximos 8 años (Ministerio del Ambiente, 2013). En este sentido, la utilización de microalgas para tratar efluentes residuales es una alternativa ecológica, sostenible y productiva. Lo que es más, la biomasa obtenida puede ser utilizada en diferentes industrias y convertirse en una nueva fuente de desarrollo económico y social.

No obstante, el cultivo a gran escala de microalgas es costoso debido a la dificultad de removerlas del medio de cultivo o medio a tratar. Si estos métodos no se hacen más eficientes, rápidos y/o baratos, la producción de estos microorganismos no será rentable en los próximos años. En este sentido, desarrollar técnicas de inmovilización representa una solución ideal para el problema antes descrito, más aún si consideramos que no se ha explorado dicha posibilidad a nivel nacional. Mejorando las técnicas de cosecha no solo se mejora el proceso de TBT de aguas residuales, tal y como lo han demostrado

diferentes estudios utilizando microalgas inmovilizadas (Moreno *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2011; Hernández-Reyes *et al.*, 2012; Roa *et al.*, 2012), sino que la producción microalgal se hace más rentable y eficiente.

5. HIPÓTESIS

La remoción de fosfatos y nitratos en aguas residuales municipales será más efectiva en microalgas inmovilizadas por entrapamiento (discos de alginato) que en aquellas cultivadas de forma libre.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Área de estudio

Las aguas residuales que fueron utilizadas en el presente estudio, tanto para el aislamiento de microalgas como para el TBT de las mismas, fueron obtenidas de la Planta de Recuperación de las Aguas del Río Surco “Ing. Alejandro Vincés Araoz”, o también llamada “Intihuatana”, ubicada en el cruce de las avenidas Caminos del Inca e Intihuatana, distrito de Surco, Lima, Perú (12°6'43.52" S y 76°59'38.17"O, 72 msnm; figura 1). Esta planta recibe las aguas contaminadas del Río Surco para someterlas a un pre-tratamiento a base de cámara de rejillas y un desarenador, para luego aplicar un tratamiento primario fisicoquímico que consiste en flocular con sulfato de aluminio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) los sólidos en suspensión y hacerlos pasar por una serie de filtros. Finalmente, las aguas son desinfectadas con cloro y se almacenan en una cisterna de 350 m³ (Burstein, 2004; Moscoso, 2011; Prieto, 2011)

El motivo de la elección de dicha planta para el presente trabajo es la carencia de algún tipo de tratamiento biológico en los diferentes pasos del tratamiento de las aguas. A diferencia de otras PTAR, como la de San Borja, la de Intihuatana tan solo usa métodos fisicoquímicos.

6.2. Diseño Metodológico

Se utilizó un diseño metodológico experimental; prospectivo, ya que la toma de datos se llevó a cabo luego de planificar el estudio; y longitudinal, porque se realizó más de una medición durante todo el experimento en los diferentes tratamientos.

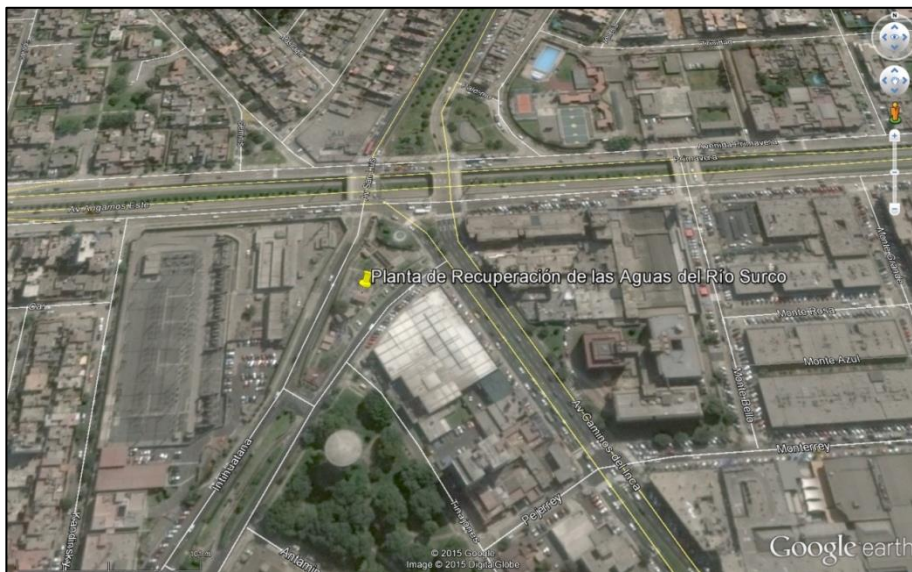


Figura 1. Ubicación de la Planta de Recuperación de las Aguas del Río Surco “Ing. Alejandro Vines Araoz” (Fuente: Google Earth, 2015).

6.3. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de las variables tomadas en cuenta en el presente trabajo

Tipo de variable	Variable	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Categorías
Independiente	Cepa	Cepas microalgales aisladas de los afluentes de la PTAR y utilizadas para la remoción de N-NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻ en sus efluentes.	Cualitativa	Nominal	0 = Control (Agua residual sola) 1 = <i>Chlorella</i> sp. 2 = <i>Chlamydomonas</i> sp.
Independiente	Forma de cultivo	Cepas cultivadas de forma libre o inmovilizada (discos de alginato) en los efluentes de la PTAR para la remoción de N-NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻	Cualitativa	Nominal	0= Alginato (disco de alginatos sin microalgas) 1= Cultivo libre 2= Cultivo inmovilizado
Dependiente	Porcentaje de remoción	La cantidad de N-NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻ , en mg/l, removido en las aguas residuales durante el experimento en cada tratamiento en relación a la concentración inicial del mismo, expresado en porcentaje (%)	Cuantitativa	Razón	Abierta
	Tasa de remoción	La cantidad de N-NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻ , en mg/ml, removidos por día en cada tratamiento	Cuantitativa	Razón	Abierta
	Índice de eficacia	El ratio entre la cantidad máxima total de N-NO ₃ ⁻ y PO ₄ ³⁻ , en mg/ml, y la cantidad máxima total de clorofila <i>a</i> , en mg/ml, registrados en cada tratamiento durante todo el experimento.	Cuantitativa	Razón	Abierta

6.4. Procedimiento

6.4.1. Obtención y acondicionamiento de las muestra para aislamiento de microalgas

Se tomaron, por triplicado, 100 ml de aguas residuales domésticas sometidas a pre-tratamiento de la Planta de Recuperación de las Aguas del Río Surco “Ing. Alejandro Vínces Araoz” (Figura 2). Frascos de vidrio transparentes fueron utilizados para trasladar las muestras al Laboratorio de Biología Marina y Continental de la Universidad Ricardo Palma, en donde se dejaron reposar en un estante metálico con 3 fluorescentes (Philips) de 30 watts cada uno, a una distancia de 30 cm y a temperatura ambiente. Dicha iluminación continua se mantuvo durante 1 semana con la finalidad de que las microalgas se adapten a su nuevo ambiente.

La temperatura y pH de las muestras fueron medidas inmediatamente. 50 ml de las aguas residuales fueron colocados a 4°C para el posterior análisis de los parámetros fisicoquímicos.

6.4.2. Preparación del medio de cultivo

Los componentes del Medio Bold Basal (MBB) se presentan en el Anexo 1. En un frasco de dilución de 1 litro se añadieron los siguientes componentes a 936 ml de agua destilada estéril: 1) 10 ml de cada macronutriente; 2) 1 ml de solución alcalina de EDTA; 3) 1 ml de solución acidificada de hierro; 4) 1 ml de solución de boro; y 5) 1 ml de solución de metales traza.



Figura 2. Colecta de la muestra de aguas residuales luego del pre-tratamiento en la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vines Araoz” en el distrito de Surco (Lima, Perú)

Dicho medio fue suplementado con 1 ml de la muestra de aguas residuales, la cual, previamente fue filtrada dos veces con papel filtro (Rundfilter 125 mm) y autoclavada por 15 minutos a 121 °C y 15 libras de presión.

El MBB suplementado sólido se obtuvo agregando 1.5 gramos de agar por litro de medio de cultivo y esterilizado en autoclave, para luego servirlo en placas Petri de 15 x 100 mm de forma aséptica. Finalmente, una vez solidificado el agar, las placas se distribuyeron en bolsas de polietileno herméticamente cerradas guardándose en refrigeración hasta su utilización.

6.4.3. Aislamiento y cultivos de microalgas

Luego del período de adaptación, se realizaron inóculos 1ml de la muestra en tubos de ensayo (15 x 100 mm) conteniendo 9 ml del MBB suplementado líquido. En total, se

inocularon 12 tubos en condiciones de asepsia (4 réplicas por cada muestra) y con material estéril, los cuales se incubaron por una semana en un estante con iluminación continua a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron observaciones microscópicas con el fin de determinar aquellos tubos donde haya habido mejor crecimiento. (Guillard, 1975; Paniagua-Michel *et al.*, 1987). Las microalgas presentes se identificaron con la clave taxonómica de Whitford y Schumacher (1973)

Una vez elegidos los tubos para esta etapa, se utilizó la técnica de raspado en agar. Dicha técnica tiene la ventaja de poder obtener cultivos unialgales de manera sencilla y en un solo paso si se cumplen todas las medidas de asepsia.

Cada tubo se sembró en MBB suplementado sólido por triplicado. Se realizaron observaciones diarias para monitorear la aparición de colonias. Una vez obtenida las colonias, estas se sembraron en tubo y se eligieron aquellas cepas de crecimiento rápido (no mayor a una semana). Este procedimiento se repitió las veces necesarias hasta obtener un cultivo unialgal (Figura 3).

Cabe señalar que para el presente experimento no se utilizaron cepas axénicas con el fin de evitar cualquier tipo de interferencia entre las relaciones simbióticas de la especie de microalga elegida y organismos heterótrofos.



Figura 3. Técnica de raspado en agar para el aislamiento de microalgas

6.4.4. Caracterización de las cepas unialgales

Se anotó la morfología y dimensiones celulares de cada cepa, así como el color y morfología de las colonias. La concentración celular se determinó diariamente con ayuda de un hemocitómetro (Neubauer improved, Marienfeld, Alemania) de 0.1 mm de profundidad. Este método permite un adecuado conteo de las microalgas, distribuidas al azar, de entre 2 a 30 μm de tamaño y de entre 10^4 a 10^7 células/ml.

El cálculo de parámetros cinéticos en un cultivo microalgal permite caracterizarlo, monitorearlo y manejarlo de manera exacta y sencilla. Durante la fase exponencial del cultivo, las células se duplican de forma constante en intervalos iguales de tiempo. Tomando esto como premisa, se calcularon tres parámetros cinéticos básicos: Tasa intrínseca de crecimiento (r), número de divisiones por día (k) y tiempo de duplicación (T_2). Dichos parámetros se calcularon según lo propuesto por Wood *et al.* (2005) con un intervalo de 14 días. Asimismo, se determinó el biovolumen final según lo detallado por

Hillebrand *et al.* (1999) con las medidas de 50 células. En el anexo 2 se detallan las fórmulas utilizadas para los cálculos respectivos.

Asimismo, se ajustó el crecimiento microalgal al modelo logístico $N_t = K_B/(1+e^{-a-b_B t})$, donde $a = \ln K_B/(N_0-1)$, b_B es la tasa específica de crecimiento, t es el tiempo (días), N_0 es la concentración celular inicial, N_t corresponde a la concentración celular en el tiempo t , y K_B es la concentración celular máxima alcanzada en el cultivo. Luego de linealizar la fórmula, se realizó una regresión lineal entre el tiempo (t) y $\ln((K_B/N_t)-1)$ para obtener el valor de la pendiente, la cual correspondió a la tasa específica de crecimiento (b_B) (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004).

Los datos de crecimiento celular y parámetros cinéticos de crecimiento sirvieron para determinar el momento adecuado para iniciar la fase experimental.

6.4.5. Inmovilización de las algas

Una vez alcanzada la fase exponencial en los cultivos *batch*, 15 ml del cultivo fueron mezclados con 60 ml de una solución de alginato de sodio (Solegraells) al 4% previamente esterilizado en autoclave (dilución 1:5). En este punto, se procedió a realizar esta misma dilución con aguas destilada para el conteo de microalgas en el hemocitómetro con el fin de determinar la concentración celular en esta nueva solución. A continuación, 2.1 mL de la mezcla se añadieron a placas Petri de 15 x 100 mm estériles y se agregó una solución al 2% de CaCl_2 para su gelificación durante 2 horas y media. Los discos resultantes tuvieron un diámetro promedio de 2.60 ± 0.07 cm y un grosor 3.22 ± 0.44 mm.

Finalmente, las estructuras se lavaron dos veces en agua destilada para eliminar cualquier exceso de CaCl_2 y se utilizaron inmediatamente en el experimento (Figura 4) El blanco se preparó reemplazando la cantidad de microalgas en suspensión por agua destilada estéril.

6.4.6. Preparación de los efluentes y condiciones experimentales

Los efluentes provenientes de la PTAR, sometidos previamente a filtros de arena y grava, fueron nuevamente filtrados 2 veces para asegurar la completa remoción de partículas en suspensión (Figura 5), esterilizados en autoclave en matraces Erlenmeyer de 300 ml y guardados a 4°C hasta su uso. Las condiciones experimentales se detallan en la tabla 2.



Figura 4. Inmovilización de microalgas. A: mezcla del cultivo microalgal líquido con la solución de alginato de sodio al 4%. B: solución microalgas+alginato previo a la homogenización. C: solución microalgas+alginato en placas Petri previo a la gelificación. D: discos de alginato luego de la gelificación con CaCl_2 al 2%.

Tabla 2. Condiciones experimentales para los ensayos de remoción de N-NO₃⁻ y PO₄³⁻

Característica del experimento	Descripción
Diseño experimental	Bifactorial
Duración del ensayo	10 días
Temperatura	21.8 ± 0.5 °C
Suministro de luz	2 lámparas fluorescentes de 18W cada una
Fotoperiodo	24 horas
Aireación	Sí
Unidad de prueba	Matraces de 300 ml
Volumen inicial	300 ml
pH inicial	8.75 ± 0.40
Factores	Cepa (Control, Chlorella y Chlamydomona) Forma de cultivo (Alginato, libre e inmovilizada)
Tratamientos	6 (Control, Alginato, Chlorella libre, Chlorella inmovilizada, Chlamydomona libre, Chlamydomona inmovilizada)
Número de discos de alginato utilizados en los tratamientos inmovilizados	4 por matraz
Repeticiones	5



Figura 5. Punto de colecta de los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú) para el experimento (A) y posterior filtrado con papel filtro (Rundfilter 125 mm) (B)

6.4.7. Crecimiento en los efluentes de la PTAR

La determinación de la biomasa celular se realizó por conteo celular durante todo el experimento, en el caso de los cultivos libres, y al inicio y término del mismo, en el caso de los cultivos inmovilizados, previa disolución de los discos en citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) al 0.05M. Además, se determinó el biovolumen final de los cultivos libres y se anotó si existió algún cambio morfológico en ambos tipos de cultivos.

El contenido inicial y final de clorofila *a* fue medido para evaluar el crecimiento de microalgas libres e inmovilizadas debido a que esta se ve afectada directamente por la tasa de crecimiento y la remoción de nutrientes inorgánicos (Kaya *et al.*, 1995; Tam *et al.*, 2000). El proceso de extracción se llevó a cabo según lo indicado por Henriques *et al.* (2007) y Porra (1990), y se leyó en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys

20 a 665 y 650 nm. Para el tratamiento con microalgas inmovilizadas, estas fueron disueltas previamente como se indicó en el párrafo anterior. El contenido de clorofila *a*, en mg/l, se calculó según lo indicado por Lee y Shen (2004) (ver Anexo 3).

6.4.8. Técnicas analíticas

Se tomaron 10 ml de muestra, por cada repetición, para obtener la concentración de N-NO_3^- y PO_4^{3-} de cada tratamiento durante los 10 días de duración del experimento. En el caso de los cultivos de células microalgales libres, las muestras se filtraron en filtros de jeringa Millipore Millex-HN de 0.44 μm para separar la biomasa microalgal. La determinación de dichos valores se realizó en el Banco de Germoplasma del Instituto del Mar del Perú (IMARPE) mediante las técnicas colorimétricas de reducción/diazotización (para N-NO_3^-) y azul de molibdeno (para PO_4^{3-}) (APHA, 1999) en un fotómetro YSI 9500 y fueron expresados en mg/l (Figura 6).

Con estos datos, se calculó el porcentaje de remoción, tasa de remoción según Aslan y Kapdan (2006) (mg/l/día) e IE según Jiménez-Pérez *et al.* (2004) (mg nutriente/mg chl *a*) para dichos nutrientes. En el anexo 3 se detallan las fórmulas utilizadas para calcular dichos parámetros.

Asimismo, se registraron los valores de pH y temperatura diariamente.

6.4.9. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó mediante la comparación del crecimiento de las microalgas luego de la inmovilización con cultivos controles. Para esto, se inoculó 0.1 ml de microalgas recuperadas o del cultivo estándar en 9.9 ml de MBB suplementado (dilución 1:100) y se determinó la concentración celular luego de 5 días de crecimiento.

Asimismo, se observó si hubo alguna alteración morfológica durante este período de crecimiento.

6.5. Técnicas para el procesamiento de la información

Todos los datos obtenidos se tabularon en el programa Microsoft Excel para obtener tablas, gráficos de barras y de dispersión que permitieran evidenciar la dinámica de los diferentes parámetros evaluados durante todo el experimento.

Los datos vaciados en el programa se exportaron al paquete estadístico SPSS v. 21 para el cálculo de la media y desviación estándar (DE). La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. En el caso de que no existiera homocedasticidad, los datos se transformaron con raíz cuadrada. Para las comparaciones por pares se utilizó la prueba T para muestras independientes mientras que para determinar si las concentraciones de nutrientes se mantuvieron constantes en el tiempo se usó la prueba T para muestras relacionadas. Con el fin de determinar si la concentración y la remoción de nutrientes en los cultivos microalgales fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos Control y Alginato se aplicó la prueba de ANOVA de 1 vía con el *post-hoc* de Dunnet y Tukey. Asimismo, se llevó a cabo la prueba de ANOVA de dos vías con el fin de determinar si hubo influencia e interacción entre los factores “cepa” y “forma de cultivo” sobre los parámetros de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} . El test *post-hoc* de Tukey se utilizó para determinar las diferencias significativas entre los factores o, en el caso de interacción, los tratamientos. Todo se evaluó con un 95% de confianza.



Figura 6. Cuantificación de N-NO_3^- y PO_4^{3-} mediante las técnicas colorimétricas de reducción/diazotización y azul de molibdeno, respectivamente. A1: la coloración rosada indica la presencia de N-NO_3^- . A2: la coloración azulada indica la presencia de PO_4^{3-} . B1 y B2: lecturas para cada nutriente en el fotómetro YSI 9500.

7. RESULTADOS

7.1. Caracterización de las cepas

Las cepas unialgales no axénicas obtenidas de las aguas residuales (pH=8.2±0.27; temperatura=19.64±0.17°C) se identificaron como *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. (Figura 7), las cuales presentaron colonias puntiformes verde oscuras (<0.5 mm) y circulares verde claras con bordes ligeramente irregulares (≈1 mm), respectivamente. La tabla 3 detalla la forma, dimensiones y volumen celular de ambas cepas. Con respecto al crecimiento en el MBB, *Chlorella* sp. no presentó fase de adaptación (=fase *lag*) y tuvo una fase exponencial de 2 días de duración (Figura 8). *Chlamydomonas* sp. presentó una fase exponencial de 1 día precedida por una fase de adaptación de igual duración (Fig. 9). En ninguno de los casos se evidenció una fase de muerte. Si bien *Chlorella* sp. mostró el crecimiento más lento (Tabla 3 y 4), la densidad celular máxima alcanzada al final del cultivo fue significativamente mayor. No obstante, el biovolumen final tuvo un mayor valor en *Chlamydomonas* sp. (5875.12±764.77 mm³/l) que en *Chlorella* sp. (3307.70±657.36 mm³/l) (p<0.001).

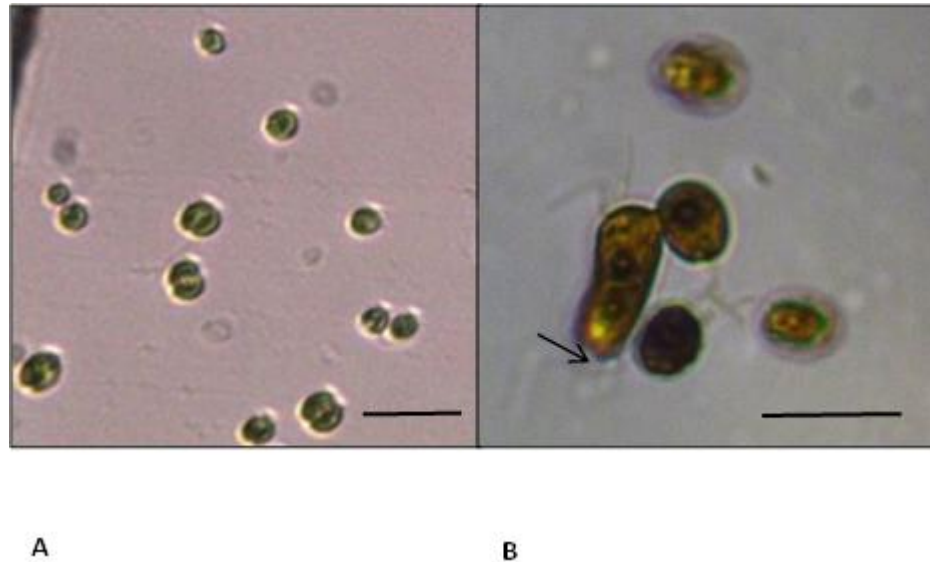


Figura 7. Cepas aisladas de las aguas residuales de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú). A: *Chlorella* sp. (400x) B: *Chlamydomonas* sp. teñida con lugol (400x). La flecha indica un individuo de *Chlamydomonas* sp. en división celular. Escala=25 μm

Tabla 3. Características geométricas y parámetros cinéticos de crecimiento durante la fase exponencial de *Chlorella* sp. y *Chlamydomona* sp. en Medio Basal Bold (MBB). Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).

		<i>Chlorella</i> sp	<i>Chlamydomona</i> sp.
Características geométricas	Forma	Esférica subesférica	a Esferoide alargado
	Diámetro (μm)	8.00 \pm 1.11	14.63 \pm 2.28
	Altura (μm)	NA	17.07 \pm 2.14
	Volumen celular (μm^3)	283.52 \pm 114.91	1958.37 \pm 667.88
Parámetros cinéticos de crecimiento	r (días ⁻¹)	1.37 \pm 0.10 ^a	2.47 \pm 0.17 ^b
	k (div/días)	1.98 \pm 0.15 ^a	3.56 \pm 0.24 ^b
	T_2 (días)	0.51 \pm 0.04 ^a	0.28 \pm 0.02 ^b

Tabla 4. Estimación del crecimiento microalgal ajustado al modelo logístico (regresión lineal). *K*: máxima densidad celular; *b*: tasa específica de crecimiento. Las letras y los números diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$) y altamente significativas ($p < 0.001$), respectivamente.

	<i>K</i> ($\times 10^6$ cel/ml)	<i>b</i> (día ⁻¹)	R ²	<i>p</i>
<i>Chlorella</i> sp.	11.67 \pm 2.32 ¹	0.36 \pm 0.08 ^a	0.74	0.003
<i>Chlamydomonas</i> sp.	3.00 \pm 0.39 ²	0.694 \pm 0.06 ^b	0.94	<0.001

7.2. Crecimiento de *Chlorella* sp y *Chlamydomonas* sp. en los efluentes de la PTAR durante el experimento.

En los cultivos libres, *Chlamydomonas* sp. presentó un crecimiento más rápido a pesar de haber alcanzado una densidad celular máxima inferior a la de *Chlorella* sp. y un biovolumen final estadísticamente similar a esta (Tabla 5). En ambos casos, los parámetros de crecimiento y el biovolumen final fueron inferiores a sus contrapartes cultivadas en MBB ($p < 0.05$). Asimismo, en ambas cepas se incrementó la duración de la fase exponencial, con un total de 5 días para *Chlorella* sp. y 2 días para *Chlamydomonas* sp. La duración de la fase de adaptación no se vio afectada en esta última (Figura 11 y 12). La morfología de *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. durante el crecimiento no difirió en relación a sus contrapartes en MBB (Figura 10). El tamaño promedio celular fue similar en ambos casos en relación a los cultivos en MBB (*Chlorella* sp.=7.90 \pm 0.90 μ m (diámetro), $p=0.903$; *Chlamydomonas* sp.=14.49 \pm 2.05 μ m (diámetro), $p=0.923$, y 16.92 \pm 1.93 μ m (altura), $p=0.932$).

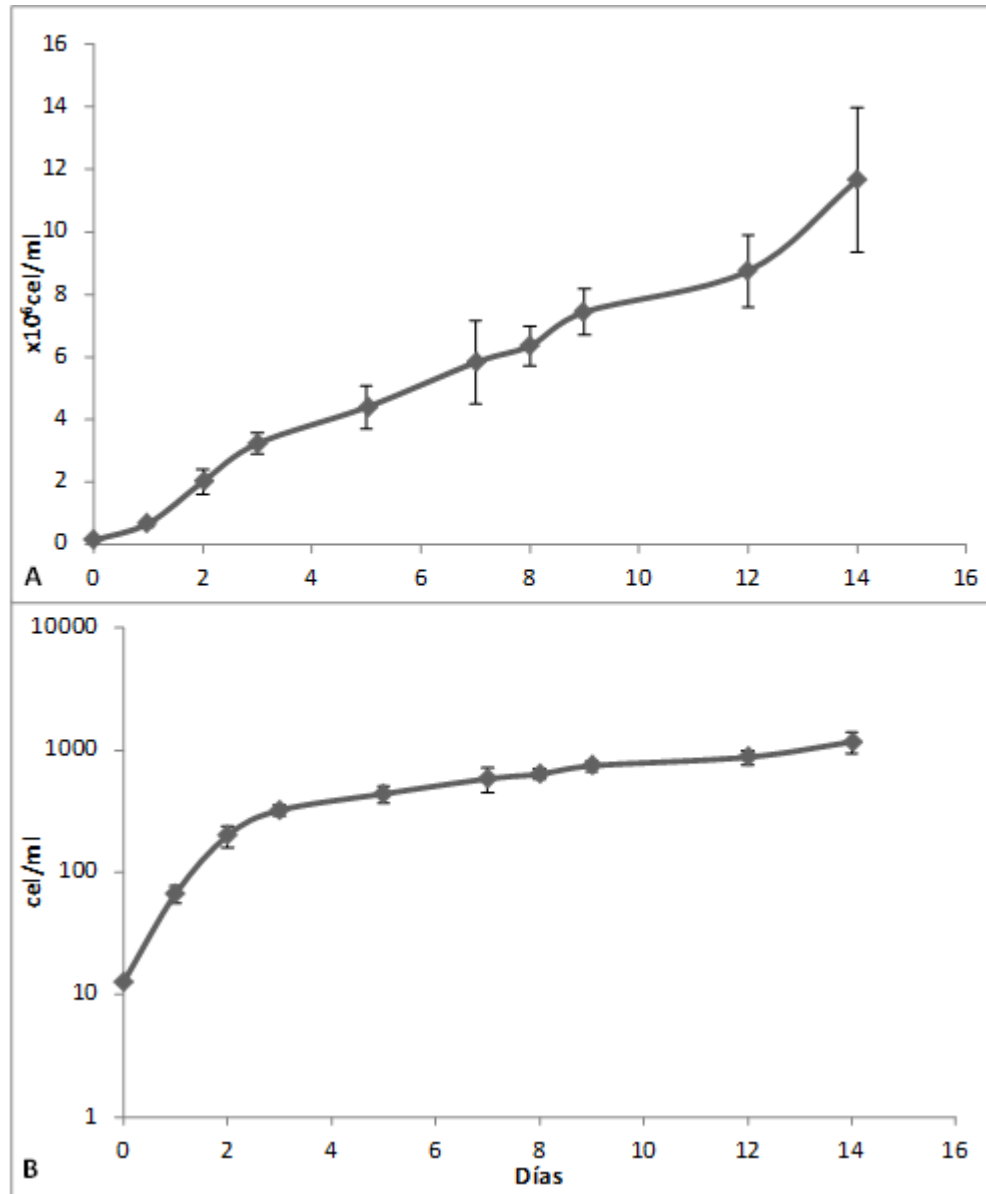


Figura 8. Crecimiento de *Chlorella* sp. aislada de aguas residuales en Medio Basal Bold (MBB). A: Curva de crecimiento promedio de *Chlorella* sp. durante los 14 días de cultivo. B. Gráfico semilogarítmico del crecimiento de *Chlorella* sp. Barras de error = $\text{media} \pm \text{D.E.}$

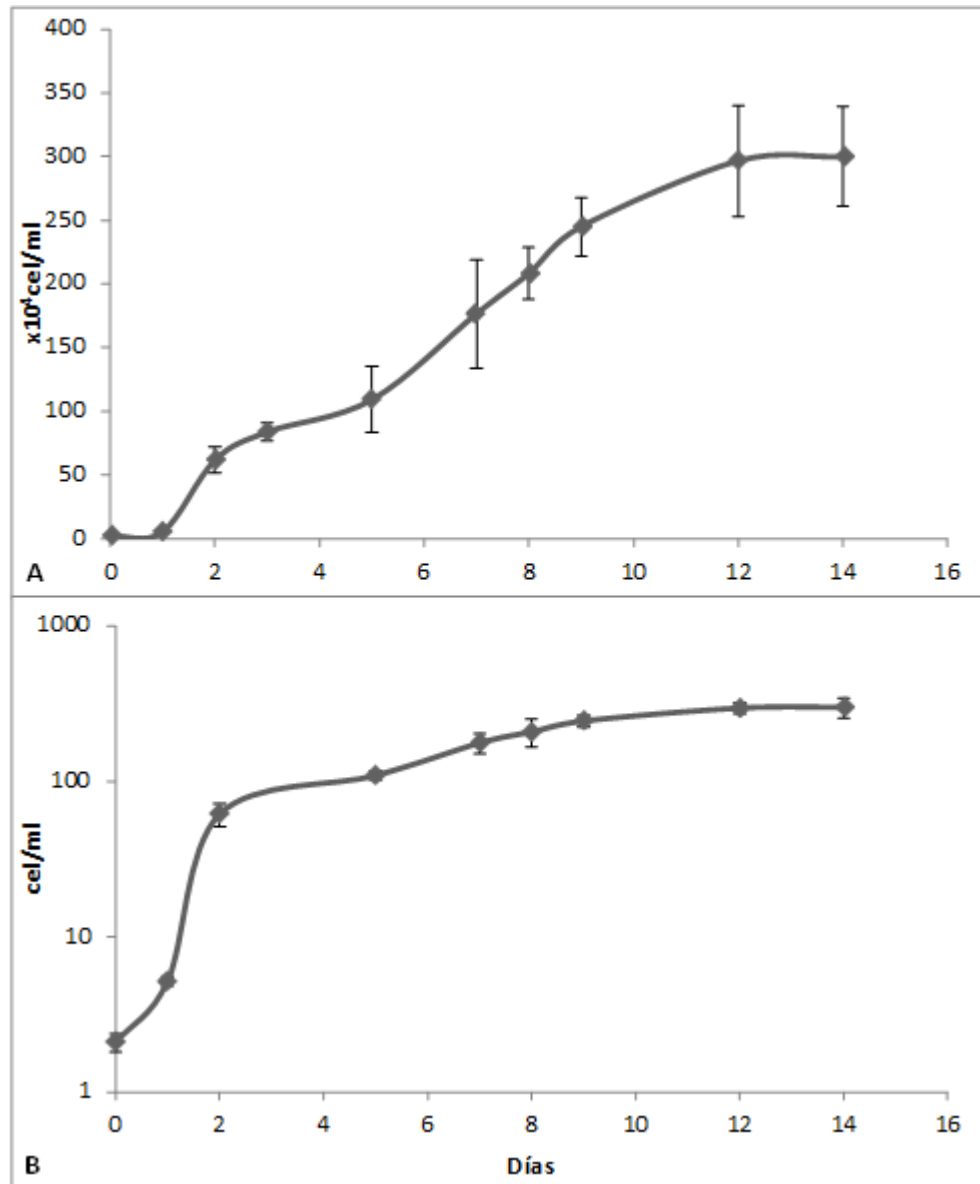


Figura 9. Crecimiento de *Chlamydomonas* sp. aislada de aguas residuales en Medio Basal Bold. A: Curva de crecimiento promedio de *Chlamydomonas* sp. durante los 14 días de cultivo. B. Gráfico semilogarítmico del crecimiento de *Chlamydomonas* sp. Barras de error = media±D.E.

Para el caso de los cultivos inmovilizados, hubo un crecimiento muy notorio en ambas cepas. La densidad celular se incrementó en 6 veces para *Chlorella* sp. (2.50 ± 0.51 a $17.67 \pm 2.81 \times 10^6$ cel/disco), y en 27 veces para *Chlamydomonas* sp. (0.23 ± 0.12 a $6.50 \pm 2.04 \times 10^6$ cel/disco). El número total de células (NTC) del cultivo de *Chlorella* sp. inmovilizado fue menor que su contraparte cultivada de forma libre (inmovilizado = $70.63 \pm 11.25 \times 10^6$ cel.; libre = $213.4 \pm 55.59 \times 10^6$ cel.; $p=0.004$). El NTC para *Chlamydomonas* sp. también siguió la misma tendencia aunque las diferencias no fueron estadísticamente diferentes (inmovilizado = $26.00 \pm 8.14 \times 10^6$ cel.; libre = $31.21 \pm 9.78 \times 10^6$ cel.; $p=0.410$). Al finalizar el cultivo, *Chlorella* sp. presentó autosporas de 16 a 32 individuos y *Chlamydomonas* sp., hasta 16 células resultantes de divisiones secuenciales dentro de la pared parental (Figura 10). Como en el caso de los cultivos libres, el tamaño promedio celular fue similar a los cultivos en MBB (*Chlorella* sp. = $7.96 \pm 0.90 \mu\text{m}$ (diámetro), $p=0.946$; *Chlamydomonas* sp. = $14.42 \pm 2.32 \mu\text{m}$ (diámetro), $p=0.886$, y $16.82 \pm 2.32 \mu\text{m}$ (altura), $p=0.880$)

La cantidad total de clorofila *a* en los cultivos de ambas cepas se incrementó significativamente luego de los 10 días del experimento. La cantidad final de clorofila *a* fue mayor en los cultivos inmovilizados de *Chlorella* sp. (libre = $8.34 \pm 2.34 \mu\text{g}$; inmovilizada = $43.65 \pm 15.67 \mu\text{g}$), mientras que en *Chlamydomonas*, dicho valor fue similar en los cultivos libres ($45.82 \pm 7.59 \mu\text{g}$) e inmovilizados ($53.25 \pm 12.93 \mu\text{g}$) (Figura 13).

Tabla 5. Parámetros cinéticos de crecimiento de los cultivos libres de *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. en efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú). r , k y T_2 fueron calculados para la fase exponencial. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Parámetros	<i>Chlorella</i> sp.	<i>Chlamydomonas</i> sp.
r (días ⁻¹)	0.51±0.08 ^a	2.11±0.47 ^b
k (div/días)	0.74±0.12 ^a	3.04±0.68 ^b
T_2 (días)	1.39±0.23 ^a	0.35±0.10 ^b
Densidad celular máxima (x10⁶ cel/ml)	0.98±0.37 ^a	0.27±0.02 ^b
Biovolumen final (mm³/l)	275.01± 71.64 ^a	257.85± 77.34 ^a

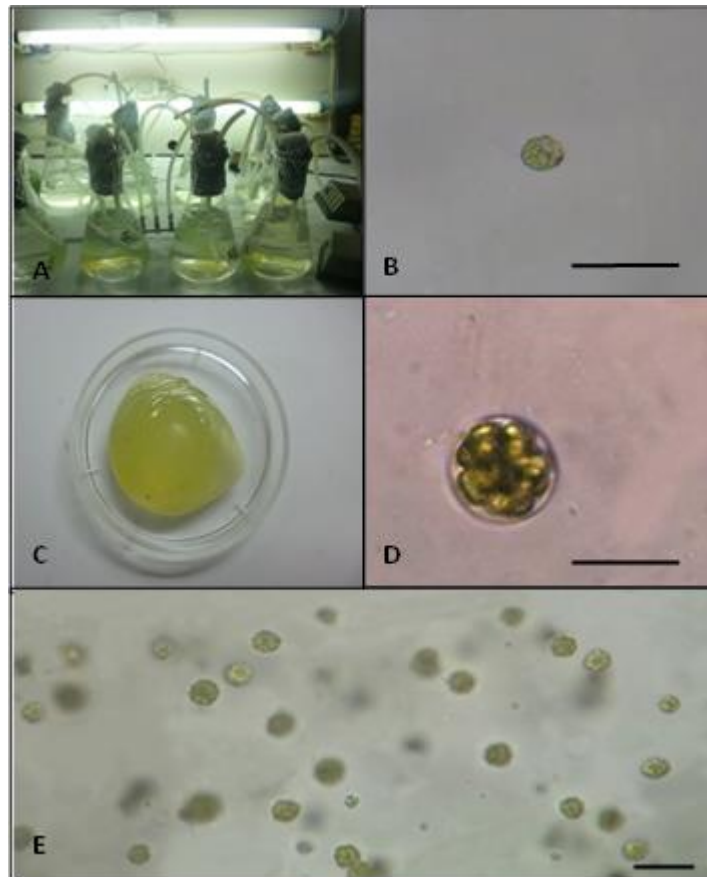


Figura 10. Crecimiento de microalgas libres e inmovilizadas en los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz”. A: sistema de cultivo. B: célula libre de *Chlamydomonas* sp. (400x). C: disco con *Chlamydomonas* sp. inmovilizada luego de 10 días de cultivo. D: Individuos de *Chlamydomonas* sp. en divisiones secuenciales en el corte transversal del disco de alginato luego de 10 días de cultivo (400x). E. Autosporas de *Chlorella* sp. en el corte transversal del disco de alginato luego de 10 días de cultivo (100x). Escala=50 μ m.

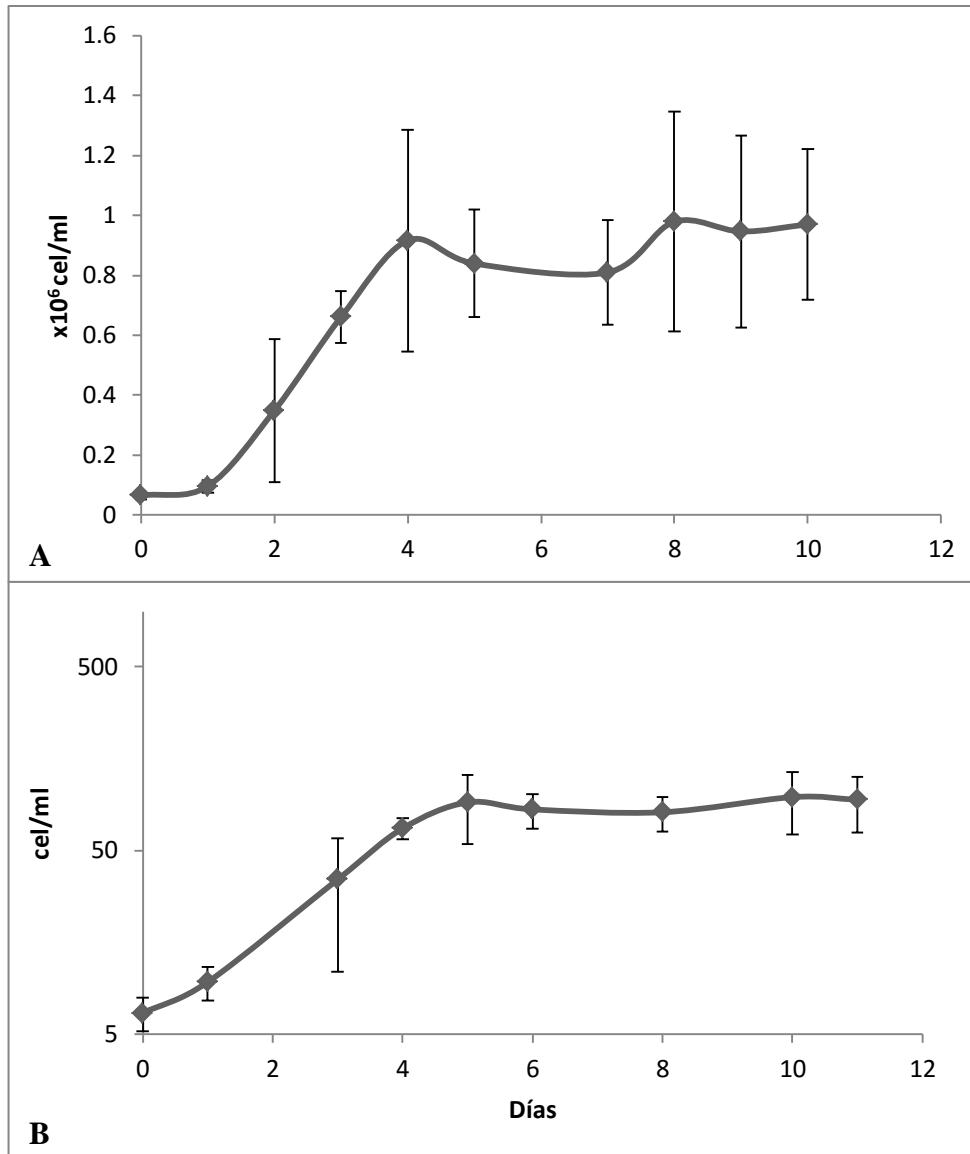


Figura 11. Crecimiento de *Chlorella* sp. libre en efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú). A: Curva promedio de *Chlorella* sp. durante los 10 días del experimento. B: Gráfico semilogarítmico que evidencia las fases de crecimiento del cultivo. Barras de error = media±D.E

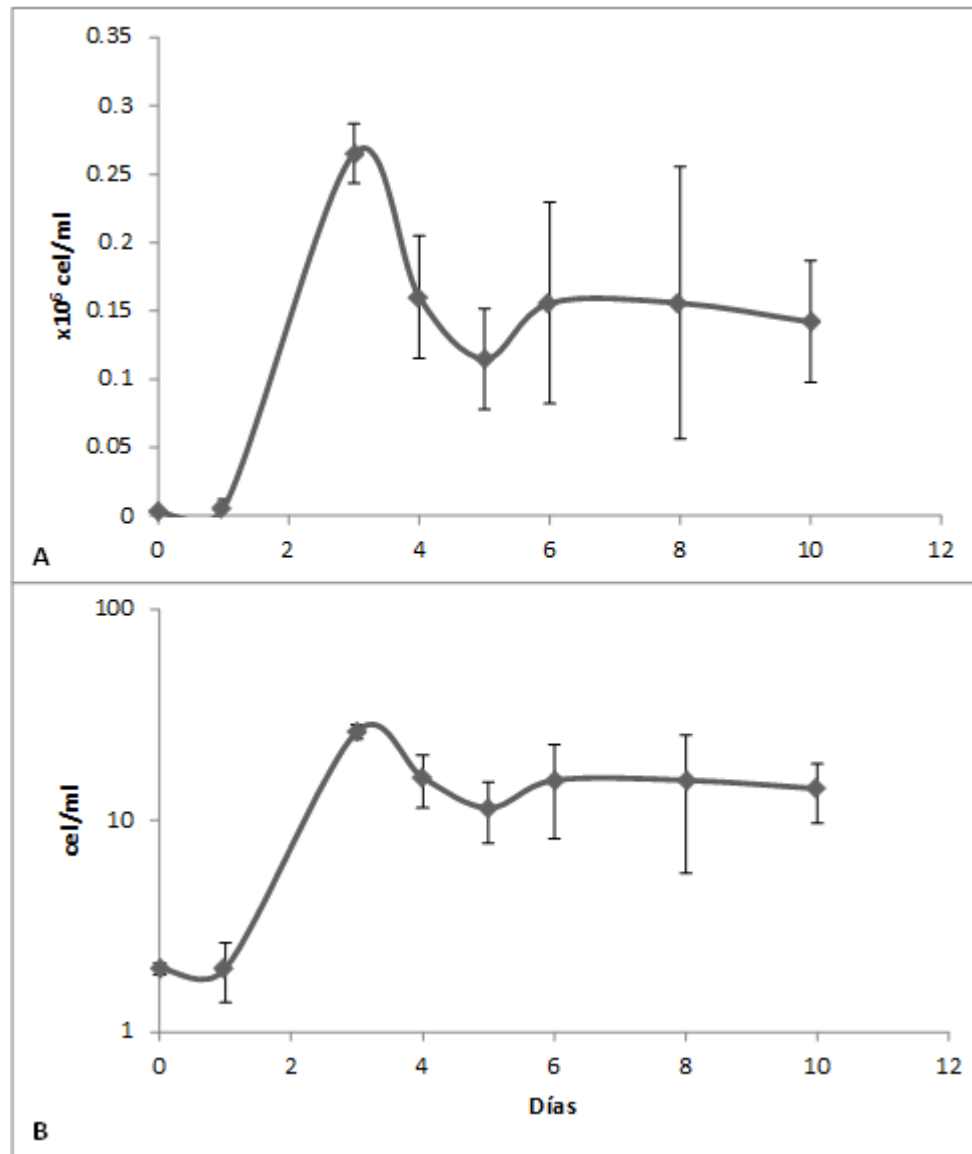


Figura 12. Crecimiento de *Chlamydomonas* sp. libre en efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú). A: Curva promedio de *Chlamydomonas* sp. durante los 10 días del experimento. B: Gráfico semilogarítmico que evidencia las fases de crecimiento del cultivo. Barras de error = $\text{media} \pm \text{D.E}$

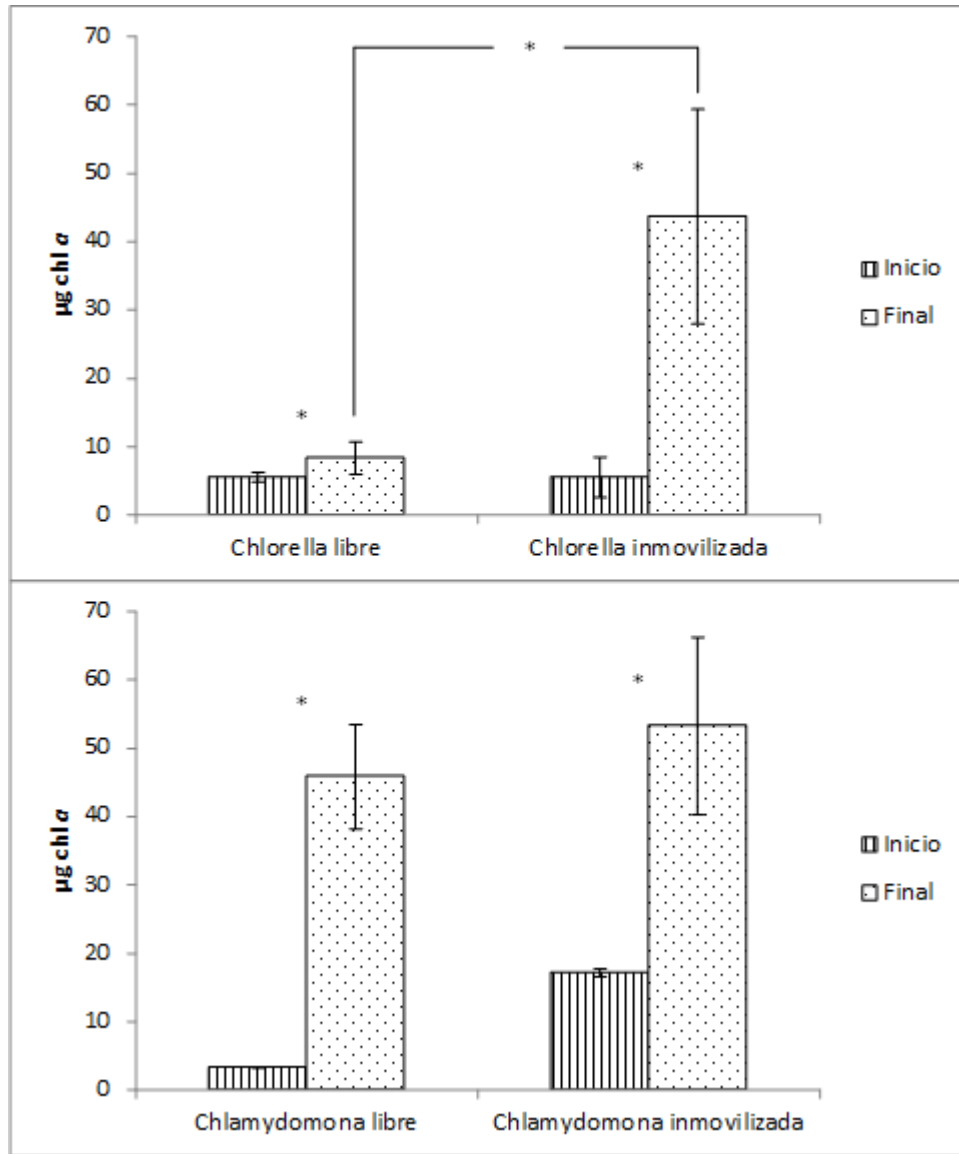


Figura 13. Cantidad total de clorofila *a* en los cultivos libres e inmovilizados de *Chlorella* sp. (A) y *Chlamydomonas* sp. (B) al inicio (día 0) y final (día 10) del experimento. Los asteriscos (*) señalan diferencias significativas ($p < 0.05$). Barras de error = media ± D.E

7.3. Remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} por parte de los cultivos libres e inmovilizados

La concentración inicial de N-NO_3^- y PO_4^{3-} en todos los tratamientos fue de 5.06 ± 0.03 y 1.00 ± 0.04 mg/l, respectivamente. El pH fluctuó desde 8.75 ± 0.40 (día 0) y 8.19 ± 0.17 (día 10). Las concentraciones se mantuvieron constantes durante todo el experimento en los tratamientos Control y Alginato ($p > 0.05$).

La cantidad de N-NO_3^- en el resto de tratamientos alcanzó un valor mínimo de 1.26 ± 0.11 mg/l en el cultivo de *Chlamydomonas* sp. libre para el día 10. *Chlorella* sp. libre registró una caída abrupta de N-NO_3^- desde el día 2, la cual se mantuvo constante desde el día 3 al 7 ($p > 0.05$), para luego presentar una caída en el día 8 ($p = 0.007$) y estabilizarse en el día 10 ($p > 0.05$). *Chlorella* sp. inmovilizada presentó una disminución súbita en el primer día para luego mantener constante la concentración de N-NO_3^- desde el día 3 hasta el final del experimento ($p > 0.05$). *Chlamydomonas* sp. libre e inmovilizada mantuvieron constante dichos valores desde el día 1, previa caída súbita de estos, hasta el día 9, con una disminución significativa para el día 10 ($p = 0.009$ en ambos casos)(Figura 14A). Los valores finales estuvieron por debajo del valor máximo permitido según la legislación peruana.

Con respecto a PO_4^{3-} , su concentración alcanzó un valor mínimo de 0.09 ± 0.04 mg/l en el cultivo de *Chlorella* sp. libre al finalizar el experimento. En este tratamiento, la cantidad de dicho nutriente tuvo una caída importante del día 2 al 3 para luego estabilizarse desde el día 4 al 7 ($p > 0.05$) y caer en los días 8 ($p = 0.034$) y 10 ($p = 0.011$). *Chlorella* sp. inmovilizada mostró un patrón diferente ya que la concentración de PO_4^{3-} cayó súbitamente durante el primer día y se mantuvo constante desde el día 3 hasta terminado el experimento ($p > 0.05$). *Chlamydomonas* sp. libre e inmovilizada mostraron un patrón similar debido a que la cantidad de dicho nutriente se mantuvo constante desde el día 1 al 8 ($p > 0.05$), previa caída de su concentración de manera similar al tratamiento anterior. No obstante, en el cultivo libre se observó una disminución en el día 10 ($p < 0.001$)

mientras que el inmovilizado presentó un aumento significativo en el mismo día ($p < 0.023$) (Figura 14B).

La comparación entre tratamientos muestra que a partir del día 1 los cultivos microalgales, con excepción de *Chlorella* sp. libre, comienzan a diferir significativamente del Control y Alginato. Durante los días 3 y 6, las concentraciones de N-NO_3^- y PO_4^{3-} son similares en todos los cultivos. Finalmente, en el día 10, *Chlamydomonas* sp. inmovilizada presentó una mayor cantidad de N-NO_3^- con respecto a los demás cultivos, mientras que para PO_4^{3-} tan solo las formas de cultivo presentaron valores similares (Tabla 6).

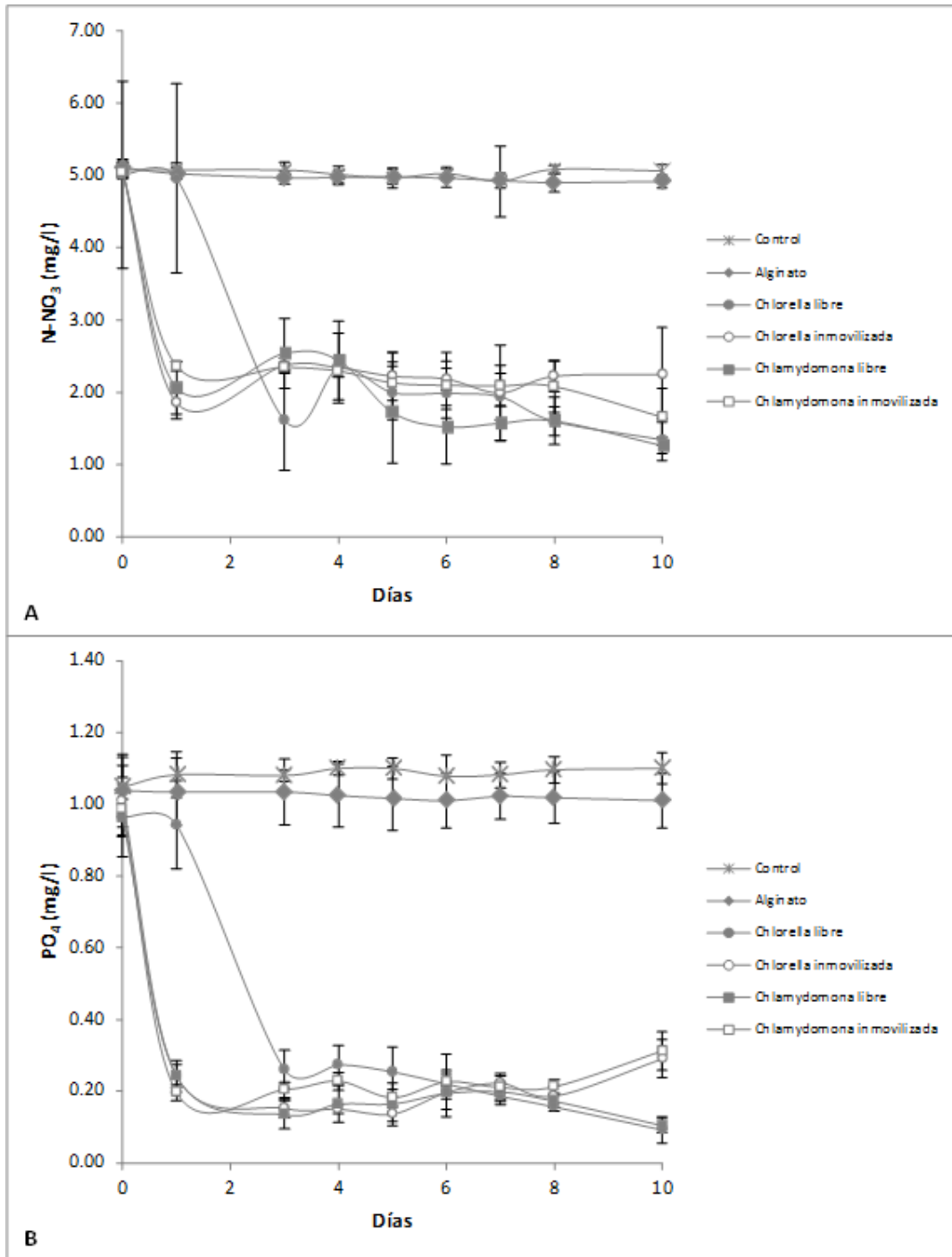


Figura 14. Remoción de N-NO_3^- (A) y PO_4^{3-} (B) en los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vincés Araoz” (Lima, Perú) en un período de 10 días. Barras de error = media±D.E.

Tabla 6. Concentración de N-NO₃⁻ y PO₄³⁻ en los diferentes tratamientos en un periodo de 10 días. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas (p<0.05).

Días	0		1		3		6		1	
	N-NO ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)	N-NO ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)	N-NO ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)	N-NO ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)	N-NO ₃ (mg/l)	PO ₄ (mg/l)
Control	5.07±0.12 ^a	1.05±0.08 ^a	5.07±0.10 ^a	1.08±0.06 ^a	5.07±0.11 ^a	1.08±0.02 ^a	5.02±0.09 ^a	1.08±0.06 ^a	5.06±0.08 ^a	1.10±0.04 ^a
Alginato	5.11±0.11 ^a	1.04±0.10 ^a	5.02±0.07 ^a	1.03±0.09 ^a	4.97±0.09 ^a	1.03±0.09 ^a	4.96±0.13 ^a	1.01±0.08 ^a	4.91±0.09 ^a	1.01±0.08 ^a
<i>Chlorella</i> sp. libre	5.01±1.29 ^a	0.96±0.11 ^a	4.96±1.31 ^a	0.94±0.12 ^a	1.61±0.69 ^b	0.26±0.05 ^b	1.99±0.34 ^b	0.22±0.03 ^b	1.34±0.29 ^b	0.09±0.04 ^b
<i>Chlorella</i> sp. inmovilizada	5.07±0.11 ^a	1.01±0.10 ^a	1.86±0.22 ^b	0.24±0.03 ^b	2.37±0.11 ^b	0.15±0.02 ^b	2.18±0.37 ^b	0.20±0.02 ^b	2.25±0.65 ^c	0.29±0.05 ^c
<i>Chlamydomonas</i> sp. Libre	5.07±0.10 ^a	0.96±0.05 ^a	2.06±0.36 ^b	0.24±0.04 ^b	2.54±0.48 ^b	0.13±0.04 ^b	1.52±0.51 ^b	0.19±0.06 ^b	1.26±0.11 ^b	0.10±0.02 ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. Inmovilizada	5.04±0.06 ^a	0.99±0.07 ^a	2.36±0.07 ^b	0.20±0.02 ^b	2.35±0.06 ^b	0.20±0.02 ^b	2.10±0.33 ^b	0.23±0.08 ^b	1.66±0.39 ^b	0.31±0.05 ^c

7.3.1. Porcentaje y tasa de remoción

Los porcentajes y tasa de remoción reportados en los tratamientos Control y Alginato fueron similares, tanto para nitratos (% remoción: $p=0.11$; tasa de remoción=0.88) como para PO_4^{3-} (% remoción: $p=0.18$; tasa de remoción: $p=1.00$). Dichos valores presentaron diferencias significativas y altamente significativas al ser comparados con los correspondientes en los cultivos microalgales (Tabla 7).

Chlamydomonas sp. libre alcanzó el máximo porcentaje de remoción de N-NO_3^- durante todo el experimento (día 0-10) con un $75.08 \pm 2.32\%$, mientras que *Chlorella* sp. inmovilizada reportó la tasa de remoción más alta para el mismo nutriente (0.90 ± 0.04 mg/l/día). Todos los tratamientos, con excepción de *Chlorella* sp. libre, pudieron remover durante el primer día más del 50% de N-NO_3^- en el cultivo, especialmente *Chlorella* inmovilizada, la cual alcanzó el máximo valor durante este período ($63.41 \pm 4.15\%$). Durante los siguientes días, *Chlorella* sp. inmovilizada presentó un aumento máximo del 18% (día 1-6) en la concentración de N-NO_3^- mientras que los cultivos de *Chlamydomonas* sp. presentaron porcentajes de remoción altamente variables. *Chlorella* sp. libre comenzó a remover N-NO_3^- de forma significativa a partir del día 1 y, al término del experimento, había alcanzado un porcentaje de remoción de $71.25 \pm 10.50\%$. Los porcentajes de remoción final (día 0-10) fueron similares solamente entre las formas de cultivo mientras que la tasa de remoción presentada por *Chlamydomonas* sp. libre fue la única estadísticamente diferente con respecto a los demás cultivos (Tabla 8).

Chlorella sp. libre tuvo el valor más alto de porcentaje de remoción de PO_4^{3-} al finalizar el experimento (Día 0-10) con un $83.69 \pm 1.85\%$, mientras que los cultivos libres alcanzaron la máxima tasa de remoción con un 0.09 ± 0.01 mg/l/día. Todos los tratamientos, con excepción de *Chlorella* sp. libre, pudieron remover entre 74.87% y $80.10 \pm 2.19\%$ de PO_4^{3-} durante el primer día, sin que se encontrara diferencia estadística entre ellos. Durante los siguientes días, los cultivos inmovilizados presentaron un aumento mínimo de $18.71 \pm 47.95\%$ (*Chlamydomonas* sp. día 1-6) y máximo de

49.21±30.64% (*Chlorella* sp., día 6-10). De manera similar a lo presentado en el párrafo anterior, los porcentajes de remoción en estos períodos fueron altamente variables. *Chlorella* sp. libre presentó un porcentaje de remoción significativo desde el día 1 y alcanzó el valor más alto hasta el día 6 (76.63±2.81%) en comparación a los demás tratamientos en el período día 1-6. El porcentaje de remoción final fue estadísticamente similar en todos los cultivos, con excepción de *Chlamydomonas* sp. inmovilizada, mientras que la tasa de remoción fue significativamente mayor en los cultivos libres que en los inmovilizados (Tabla 8).

Los resultados del ANOVA de dos vías muestran que la forma de cultivo es un factor significativo en la remoción de ambos nutrientes. Para el caso de N-NO₃⁻, también se evidenció una influencia significativa en la cepa utilizada y se presentó interacción entre factores en lo que respecta a la tasa de remoción. Por otro lado, el tipo de cepa fue un factor significativo en el porcentaje de remoción de PO₄³⁻ (día 0-10), pero no se evidenció interacción alguna en los factores analizados (Tabla 9).

7.3.2. Índice de eficacia (IE).

El IE para ambos nutrientes fue estadísticamente superior en *Chlorella* sp. libre. Los demás cultivos tuvieron valores similares que oscilaron entre 29.71 y 39.9 mg N-NO₃/mg chl *a* y 5.77 a 7.85 mg PO₄/mg chl *a* (Tabla 10). Los resultados del análisis de ANOVA de dos vías mostraron que existe una influencia altamente significativa por parte del tipo de cepa, forma de cultivo y de la interacción entre ambos factores (Tabla 11).

Tabla 7. Porcentajes y tasas de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} durante los 10 días de experimentación en los cultivos microalgales comparados con los tratamientos control y blanco según los test *post hoc* de Tukey y Dunnet. Los valores mostrados corresponden al valor de la significancia.

Tratamiento	Nutriente	Control		Blanco	
		% remoción	Tasa de remoción (mg/l/día)	% remoción	Tasa de remoción (mg/l/día)
<i>Chlorella</i> libre sp.	N- NO_3	<0.001	0.002	<0.001	0.002
	PO_4	0.009	<0.001	0.009	<0.001
<i>Chlorella</i> inmovilizada sp.	N- NO_3	<0.001	0.001	<0.001	<0.001
	PO_4	0.009	<0.001	0.009	<0.001
<i>Chlamydomonas</i> sp. libre	N- NO_3	<0.001	0.001	<0.001	0.001
	PO_4	0.009	<0.001	0.009	<0.001
<i>Chlamydomonas</i> sp. inmovilizada	N- NO_3	<0.001	0.007	<0.001	0.001
	PO_4	0.009	<0.001	0.009	<0.001

Tabla 8. Porcentajes y tasas de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} de los cultivos microalgales en un período de 10 días. Los valores con signo negativo indican aumento en la concentración de nutrientes y no se tomaron en cuenta para el análisis estadístico. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tratamientos	% remoción								Tasa de remoción (mg/l/día)	
	0-1		1-6		6-10		0-10		N-NO ₃	PO ₄
	N-NO ₃	PO ₄	N-NO ₃	PO ₄	N-NO ₃	PO ₄	N-NO ₃	PO ₄		
<i>Chlorella</i> sp. libre	1.14±0.81 ^a	2.36±4.10 ^a	58.41±9.94 ^a	76.63±2.81 ^a	29.55±22.97 ^a	59.19±12.09 ^a	71.25±10.50 ^a	83.69±1.85 ^a	0.43±0.15 ^a	0.09±0.01 ^a
<i>Chlorella</i> sp. inmovilizada	63.41±4.15 ^b	75.69±4.63 ^b	-18.38±22.18	18.53±5.92 ^b	-1.79±20.58	-49.21±30.64	55.75±12.74 ^b	81.55±2.37 ^a	0.90±0.04 ^b	0.07±0.01 ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. libre	59.49±6.41 ^c	74.87±4.38 ^b	24.15±28.49 ^a	20.99±17.04 ^b	7.97±35.38 ^a	37.82±33.07 ^a	75.08±2.32 ^a	82.11±1.81 ^a	0.38±0.02 ^a	0.09±0.01 ^a
<i>Chlamydomonas</i> sp. inmovilizada	53.11±1.56 ^c	80.10±2.19 ^b	11.18±14.15 ^b	-18.71±47.95	19.57±22.63 ^a	-56.35±76.22	67.05±7.92 ^b	78.38±2.79 ^b	0.34±0.04 ^a	0.07±0.01 ^b

Tabla 9. Análisis de ANOVA de dos vías para los parámetros de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} (día 0-10) en los diferentes cultivos microalgales. Los asteriscos señalan factores significativos (*) y altamente significativos (**).

Nutriente	Factor	Parámetro	F	P
N-NO₃	Cepa	% remoción	3.68	0.07
		Tasa de remoción	55.01	<0.001**
	Forma de cultivo	% remoción	8.24	0.01*
		Tasa de remoción (mg/l/día)	24.96	<0.001**
	Interacción	% remoción	0.97	0.34
		Tasa de remoción (mg/l/día)	40.58	<0.001**
PO₄	Cepa	% remoción	5.60	0.03*
		Tasa de remoción (mg/l/día)	0.67	0.43
	Forma de cultivo	% remoción	8.57	0.01*
		Tasa de remoción (mg/l/día)	22.59	<0.001**
	Interacción	% remoción	0.63	0.44
		Tasa de remoción (mg/l/día)	0.18	0.68

Tabla 10. Índice de Eficacia (IE) de N-NO₃⁻ (IE_N) y PO₄³⁻ (IE_P) de los cultivos microalgales estudiados. Las letras diferentes en superíndice señalan diferencias significativas (p<0.05).

Tratamiento	IE _N (mg N-NO ₃ /mg chl a)	IE _P (mg PO ₄ /mg chl a)
<i>Chlorella</i> sp. libre	186.67±48.37 ^a	38.39±10.19 ^a
<i>Chlorella</i> sp. inmovilizada	39.97±18.51 ^b	7.85±3.43 ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. libre	33.98±5.50 ^b	6.33±1.39 ^b
<i>Chlamydomonas</i> sp. inmovilizada	29.71±6.86 ^b	5.77±1.13 ^b

Tabla 11. Análisis de ANOVA de dos vías para el IE de N-NO₃⁻ y PO₄³⁻ de los cultivos microalgales. Los asteriscos señalan factores altamente significativos (**).

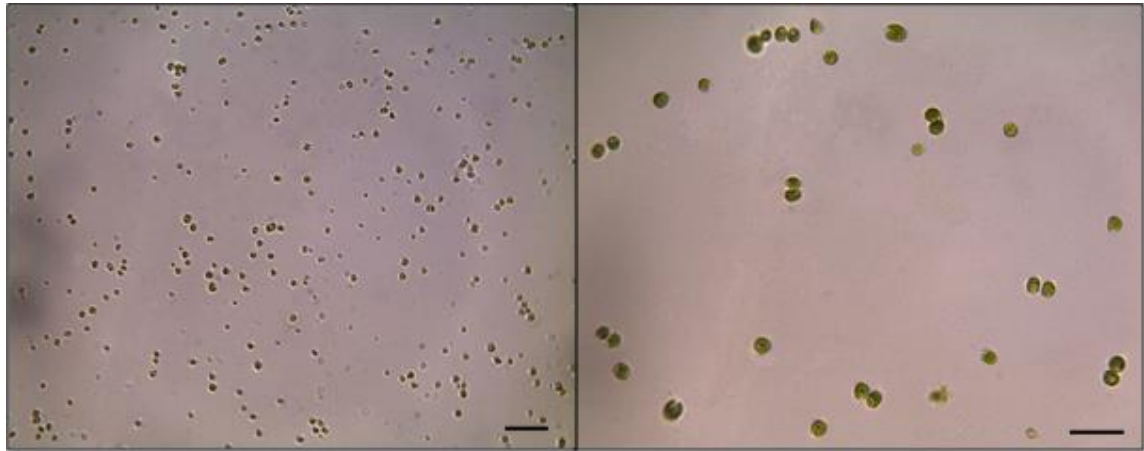
Nutriente	Factor	F	P
N-NO ₃	Cepa	59.53	<0.001**
	Forma de cultivo	31.94	<0.001**
	Interacción	41.34	<0.001**
PO ₄	Cepa	68.10	<0.001**
	Forma de cultivo	35.41	<0.001**
	Interacción	47.33	<0.001**

7.4. Viabilidad post-inmovilización

Luego de 5 días de crecimiento en MBB, las cepas que habían sido inmovilizadas presentaron un excelente crecimiento y superaron la densidad celular de sus contrapartes que no habían sido inmovilizadas en el mismo período (Tabla 12). La morfología celular no se vio alterada en comparación a los cultivos mantenidos en MBB (Figura 15).

Tabla 12. Viabilidad post-inmovilización de *Chlorella* sp y *Chlamydomonas* sp. evaluada mediante la densidad celular ($\times 10^6$ cel/ml). DE: Desviación estándar. El asterisco (*) señala diferencias significativas con la concentración final control (día 5) (*Chlorella* sp.: $4.38 \pm 0.70 \times 10^6$ cel/ml, $p=0.005$; *Chlamydomonas* sp.: $1.09 \pm 0.25 \times 10^6$ cel/ml, $p=0.001$).

Réplicas	<i>Chlorella</i> sp. ($\times 10^6$ cel/ml)	<i>Chlamydomonas</i> sp. ($\times 10^6$ cel/ml)
1	16.10	12
2	17.80	12.50
3	11.60	19.75
4	12.10	18.50
5	8.450	18
Promedio\pmDE	13.21\pm3.73*	16.15\pm3.62*



A

B

Figura 15. Crecimiento post-inmovilización de *Chlorella* sp. (A; 100x) y *Chlamydomonas* sp. (B; 100x) luego de 5 días de cultivo en Medio Basal Bold. Escala= 50 μ m

8. DISCUSIÓN

El presente trabajo es el primer estudio en Perú en evaluar la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} por parte de microalgas libres e inmovilizadas en aguas residuales municipales. *Chlorella* y *Chlamydomonas* son dos de los géneros de microalgas clorofitas planctónicas más resistentes a la polución orgánica y, por ende, encontradas comúnmente en aguas residuales (Bellinger y Sigee, 2010). La morfología de las cepas aisladas en este estudio es similar a la reportada en la literatura científica; no obstante, sus tamaños estuvieron por encima del promedio reportado en estudios previos, muy cerca del límite superior (Dent *et al.*, 2001; Klochkova *et al.*, 2008; Safi *et al.*, 2014), mientras que el volumen celular fue de 10 (*Chlorella* sp.) a 20 (*Chlamydomonas* sp.) veces mayor a los valores típicos (Bellinger, 1974; Reynolds y Bellinger, 1992). Dichas diferencias podrían deberse al ambiente de donde son aisladas, lo cual se ha demostrado que afecta la fisiología de cepas de una misma especie (Hwang y Horneland, 1965; Xu y Hu, 2013). No obstante, debe realizarse una determinación taxonómica mucho más rigurosa a nivel de especie, desde un enfoque clásico y molecular, para poder atribuir dichas diferencias a variaciones intra o interespecíficas.

El crecimiento de *Chlamydomonas* sp. en MBB fue más rápido que el reportado para *Chlorella* sp. Figueroa y de Lara-Isassi (1998) encontraron esta misma tendencia al cultivar *Chlamydomonas debaryana* y *Chlorella vulgaris* en MBB, lo cual, explicaron, puede atribuirse a la variación interespecífica de requerimientos nutricionales. La disminución de los valores en los parámetros de crecimiento, densidad celular máxima y biovolumen final de los cultivos libres en los efluentes del PTAR se debe a que el ratio inorgánico de N/P, que tuvo un valor igual a 5, estuvo por debajo del ideal. Generalmente, dicho valor se debe encontrar en el rango de 6.8 a 10 para un crecimiento óptimo de microalgas dulceacuícolas (Darley, 1982; Reynolds, 1984; Martin *et al.*, 1985). No obstante, este hecho no tuvo un impacto considerable en la curva de

crecimiento de ambas cepas en los cultivos libres. La ausencia de una fase *lag* para *Chlorella* sp. muestra una buena adaptación al medio residual, lo que es similar a lo reportado por Tam y Wong (1989), Yang *et al.* (2008), Wang *et al.* (2010b) y Wang *et al.* (2013) en diversos tipos de efluentes residuales. Para el caso de *Chlamydomonas* sp. la duración de la fase *lag* fue la misma, aunque más notoria, en comparación al cultivo en MBB. Esta fase de adaptación no se evidenció en los cultivos realizados por Kong *et al.* (2010) y Kothari *et al.* (2013) en *C. reinhardtii* y *C. polypyrenoideum*, respectivamente, lo que se puede atribuir a la alta concentración de nutrientes iniciales en los efluentes residuales utilizados en dichos estudios. No obstante, una vez adaptada la cepa al efluente de la PTAR esta creció más rápido que *Chlorella* sp. cultivada de forma libre, similar a lo descrito anteriormente para los cultivos en MBB. La disminución de la constante media saturación de los nutrientes inorgánicos, con el fin de flexibilizar la cuota celular de dichos compuestos, es el principal mecanismo por el cual las microalgas pueden adaptarse a medios con ratios no óptimos de N/P (Grobbelaar, 2013).

Si bien no se pudo determinar el crecimiento diario de las microalgas en los discos de alginato, los valores iniciales y finales de densidad celular y clorofila *a* evidencian que esta matriz no limitó el crecimiento de ambas cepas. El reducido tamaño de los poros (17 nm) (Lupo *et al.*, 2012) presentes en la matriz permite el atrapamiento de las células dentro de esta, pero no impide el paso de moléculas pequeñas y altamente solubles, tales como N-NO_3^- y PO_4^{3-} , lo que sostiene el metabolismo y crecimiento de dichos organismos (Lau *et al.*, 1998; Cohen, 2001). Asimismo, Moreira *et al.* (2006) encontraron que el alginato no interfirió con el crecimiento de *Phaeodactylum tricornutum* ya que la densidad celular se incrementó entre 37 a 76 veces en tres días. Por otro lado, al comparar el crecimiento de microalgas libres e inmovilizadas, los resultados de diversos estudios muestran tendencias contradictorias (Baillez *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1985; Tam *et al.*, 1994; Lau *et al.*, 1998a y 1998b, Kobbai *et al.*, 2000; Abdel Hammed, 2002; Aguilar-May *et al.*, 2007), aunque por lo general los cultivos inmovilizados suelen tener una fase *lag* de mayor duración que sus contrapartes libres

(Mallick, 2002). Esto se puede deber a diversos factores entre los que se encuentran: 1) la especie o cepa utilizada, 2) la densidad celular inicial, 3) la matriz de inmovilización, 4) la forma de la matriz, 5) el medio de cultivo, 6) pre-tratamiento de los microorganismos y 7) la presencia de otro organismo co-inmovilizado (Mallick, 2002; Abdel Hamed y Hammouda, 2007). Bajo las condiciones de cultivo y características de la matriz señaladas en el presente estudio, los cultivos libres registraron un NTC mayor a los inmovilizados, lo que sugiere un mayor crecimiento de los primeros. Sin embargo, para poder corroborar esto se necesita obtener los diferentes parámetros de crecimiento al evaluar los cultivos inmovilizados de forma diaria.

Con respecto al contenido de clorofila *a*, Lau *et al.* (1998a) indicaron que su contenido es mayor en cultivos inmovilizados, lo que refleja una capacidad fotosintética superior en estos. No obstante, Abdel Hamed y Hammouda (2007) y Moreno-Garrido (2008) señalaron que la principal razón de dicho incremento sería el efecto de auto-sombreado (*self-shading*) que es ocasionado por el crecimiento microalgal en matrices en forma de “perlas”, lo que hace decrecer la incidencia de luz y promueve la síntesis de clorofila y otros pigmentos. En el presente estudio, la cantidad de clorofila *a* final en *Chlamydomonas* sp. fue similar en ambos tipos de cultivos, lo que indica que la matriz no provocó este efecto de auto-sombreado, debido, principalmente, a que la forma utilizada tiene una mayor incidencia de luz que la forma tradicional en “perlas” (Zamani *et al.*, 2012). Tomando esto en consideración, las diferencias encontradas en *Chlorella* sp. para ambos tipos de cultivos se atribuirían a características fisiológicas más que a la matriz en sí. Se sabe que *Chlorella* sp. puede utilizar compuestos orgánicos, presentes en los efluentes de la PTAR (Anexo 4), para su nutrición aún en presencia de luz (mixotrofia) (Safi *et al.*, 2014). Según Lau *et al.* (1998a) dichos compuestos presentan una disponibilidad más alta en cultivos libres que en inmovilizados debido al tamaño de los poros que presenta la matriz. Esto podría explicar el no tan pronunciado aumento de clorofila *a* en los cultivos libres de *Chlorella* sp.

El tamaño promedio y la morfología de las células no se vieron afectados por la inmovilización, sin embargo, estas tendieron a presentar autosporas (*Chlorella* sp.) o células en división secuencial (*Chlamydomonas* sp.) de entre 16 a 32 individuos. Esto es similar a lo reportado por Trevan y Mark (1988) en *Chlorella* sp. inmovilizada en alginato, quienes además señalaron que dicha técnica tiene un pequeño impacto en la morfología celular. Asimismo, para la densidad celular alcanzada, no se evidenció el fenómeno de “fuga” (*leakage*) ni inestabilidad en la matriz, las cuales también son factores importantes a tener en cuenta al momento de realizar cultivos inmovilizados (Mallick, 2002). Todo lo expuesto previamente soporta la idea de que el alginato y la forma utilizada en este estudio son adecuados para el cultivo de microalgas inmovilizadas.

Los rangos de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} estuvieron entre 56% y 75%, y 78% a 84%, respectivamente, con los máximos valores reportados para *Chlamydomonas* sp. libre (N-NO_3^-) y *Chlorella* sp. libre (PO_4^{3-}) y sin remoción alguna en los tratamientos Control y Alginato. Uno de los factores más importantes que influyen en la remoción de nutrientes es la concentración inicial de los mismos (Aslan y Kapdan, 2006), por lo que los resultados obtenidos tan solo pueden ser comparables con trabajos que tengan concentraciones iniciales de N-NO_3^- y/o PO_4^{3-} similares a los de esta investigación. Zamani *et al.* (2012) llevaron a cabo un experimento en condiciones muy semejantes a las descritas en este estudio (volumen de cultivo, tiempo de retención, iluminación, tipo y forma de la matriz de inmovilización). Con una concentración inicial PO_4^{3-} de 1.37 mg/l, obtuvieron una remoción en 12 días de entre 55% a 68% para diferentes cepas de *Chlorella* sp. y de 71.91% para *Chlamydomonas* sp., ambas inmovilizadas en discos de alginato. Asimismo, las tasas de remoción tuvieron valores de entre 0.06 y 0.08 mg/l/día, para *Chlorella* sp. y de 0.14 mg/l/día para *Chlamydomonas* sp. Esto contrasta con lo obtenido en el presente estudio, donde los porcentajes de remoción de PO_4^{3-} fueron superiores en ambos casos y más del 50% de remoción se reportó en un período máximo de 2 días. No obstante, *Chlorella* sp. inmovilizada reportó una tasa de remoción similar al estudio antes mencionado, mientras que *Chlamydomonas* sp. inmovilizada tuvo una

tasa inferior. Esto último se puede deber a que en el estudio de Zamani *et al* (2012) se consideró un tiempo de retención menor (8 días) al utilizado en esta investigación para *Chlamydomonas* sp., lo cual afecta en el cálculo de la tasa de remoción. Shi *et al.* (2014) reportaron una concentración inicial muy cercana de N-NO₃⁻ (5.85 mg/l) y PO₄³⁻ (2 mg/l) en uno de sus tratamientos (aguas residuales luego de sedimentación secundaria con la adición de PO₄³⁻ para simular el proceso de precipitación inactiva de fósforo). La cepa de *Hallochlorella rubescens*, inmovilizada en láminas de nitrocelulosa en un sistema de capa doble, pudo remover el 82.9% de N-NO₃⁻ y 70.4% de PO₄³⁻ en 24 horas. Si bien todos los cultivos microalgales, con excepción de *Chlorella* sp. libre, pudieron remover un porcentaje mayor de PO₄³⁻ en el mismo tiempo, la reducción en la concentración de N-NO₃⁻ fue de aproximadamente un 25% menor. Otros estudios con concentraciones iniciales similares de PO₄³⁻ han reportado porcentajes de remoción de entre 74% a 100% en un período mínimo de 4 horas y máximo de 24 días (Larsdotter *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012). Todo esto sugiere que las cepas de *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. aisladas en esta investigación, indistintamente de la forma en que hayan sido cultivadas, pueden utilizar PO₄³⁻ incluso a muy bajas concentraciones.

Si tomamos en cuenta el resto de investigaciones sobre remoción de nutrientes por parte de microalgas, encontramos que las diferentes especies de *Chlorella* tienen un rango de remoción de N y P de entre 8% a 100%, mientras que *Chlamydomonas* sp. reportaron un rango de entre 13% a 90% (Gonzalez *et al.*, 1997; Lee y Lee, 2001; Chacón *et al.*, 2004; Aslan y Kapdan, 2006; Khan y Yoshida, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Infante *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2010; Ruiz-Marin *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010b; Hongyang *et al.*, 2011; Hernández-Reyes *et al.*, 2012; Kothari *et al.*, 2013). Los cultivos microalgales del presente estudio tuvieron porcentajes de remoción que se encontraron cercanos a los valores máximos reportados para ambas cepas. En comparación a otros métodos de tratamiento terciario, porcentajes altos de PO₄³⁻ (76-80%) fueron removidos tan solo en un día en casi todos los cultivos, lo que es superior a lo reportado en HRAP (hasta un 80% en 2 a 6 días) pero ligeramente inferior a lo removido por los métodos químicos (de

entre 80 %-100% en 0.3 a 0.5 días) (Oswald, 1998; Hoffmann, 1998; Shi *et al.* 2007). Asimismo, se encontró que la remoción de PO_4^{3-} fue superior a la de N-NO_3^- en casi todos los cultivos, esto debido, principalmente, a que el ratio inorgánico de N/P no estuvo dentro del rango óptimo y, por lo tanto, la absorción de N-NO_3^- se ralentizó (Cai *et al.*, 2013). Las concentraciones finales de ambos nutrientes no superaron los valores máximos permitidos en Perú en lagos y lagunas para la conservación del medio acuático (Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM).

El IE se define como el ratio entre la máxima concentración de P o N y la máxima biomasa alcanzada, medida esta última como el contenido total de clorofila en el cultivo. Este índice ha sido utilizado por Jiménez-Pérez *et al.* (2004) y Pérez-Martínez *et al.* (2010) y, aunque no es muy difundido entre los estudios de remoción de nutrientes por parte de microalgas, es de gran utilidad al momento de seleccionar una cepa ideal para el tratamiento de aguas residuales. La eficacia en la remoción de N-NO_3^- por parte de los cultivos microalgales del presente estudio, especialmente de *Chlorella* sp. libre, fue superior a la reportada en los dos estudios antes mencionados (0.86-25.22 mg N/mg chl *a*). Para el caso de PO_4^{3-} , si bien los valores reportados no superaron el IE máximo (64.34 mg P/mg chl *a*), estuvieron por encima de los valores obtenidos para la mayoría de cepas utilizadas en dichos estudios (0.39-6.21 mg P/mg chl *a*).

Con el fin de determinar si procesos ajenos al metabolismo microalgal pudieron disminuir o aumentar la concentración de nutrientes en el medio, el diseño experimental incluyó los tratamientos Control (solo agua residual) y Alginato (agua residual + discos de alginato sin algas). Se sabe que en pH alto (por encima de 8) los PO_4^{3-} pueden precipitar en presencia de iones Ca (Larsdotter *et al.*, 2007). Asimismo, como resultado de un tiempo corto de gelificación (1 h), la matriz de alginato puede incrementar las concentraciones de dicho nutriente al producirse un intercambio de cationes entre los iones sodio (Na^+) y calcio (Ca^{2+}), lo que vuelve a solubilizar los precipitados, acumular el Ca^{2+} en la matriz y dejar libre los iones PO_4^{3-} en el medio (Zamani *et al.*, 2012). Para el caso de N-NO_3^- , estos pueden quedar adsorbidos en las matrices de inmovilización

(Abdel Hamed, 2007). Durante todo el experimento, la concentración de nutrientes no varió significativamente ni se apreció precipitación de PO_4^{3-} en dichos tratamientos a pesar de que el pH promedio fue de 8.3. Es interesante notar que el pH promedio en los cultivos microalgales tuvo un valor de 8.2, similar a lo encontrado en los tratamientos Control y Alginato, pero que tampoco se evidenció precipitación alguna de PO_4^{3-} . Esto se puede deber a las bajas concentraciones de PO_4^{3-} encontradas en los tratamientos (Larsdotter *et al.*, 2007). Todo esto sugiere que los procesos ajenos al metabolismo microalgal no tuvieron una influencia significativa en la remoción de nutrientes en la presente investigación y que el tiempo de gelificación (2 h y media) fue el adecuado para evitar el aumento de PO_4^{3-} en presencia de la matriz de alginato.

El análisis de ANOVA de dos vías indicó que el factor que más influyó en el porcentaje y tasa de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} fue la inmovilización, ya que provocó un descenso en los valores de dichos parámetros. Diversos estudios han demostrado que la inmovilización favorece la remoción de nutrientes en cultivos microalgales (Hoffmaan, 1998; Mallick, 2002; Abdel Hamed y Hammouda, 2007; de-Bashan y Bashan, 2010). No obstante, esta tendencia no es apoyada por los resultados presentados y compartida, en el caso de N, con Jiménez-Pérez *et al.* (2004). Una posible explicación es que solamente una proporción de las células inmovilizadas se encontró metabólicamente activa (Tam *et al.* 1994). Además, la concentración celular inicial en la matriz es vital para aumentar la remoción de nutrientes (Zhang *et al.*, 2012), lo que puede explicar las diferencias encontradas en los cultivos de *Chlorella* sp. al presentar NTC iniciales diferentes (*Chlorella* sp. libre: $\text{NTC}=19.65 \times 10^6$ cel; *Chlorella* sp. inmovilizada: $\text{NTC}=10 \times 10^6$ cel; $p=0.016$). Con respecto al IE, el tipo de cepa y su interacción con la forma de cultivo también influyeron significativamente en este parámetro. Las diferencias señaladas en el IE de PO_4^{3-} podrían estar relacionadas a características específicas de cada especie en lo concerniente a su composición o a la capacidad de consumo de lujo de dicho nutriente (Reynolds, 2006). Además, es importante notar que la inmovilización por sí sola también afecta negativamente el IE de N-NO_3^- y PO_4^{3-} , influencia que no había sido reportada previamente (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004; Pérez-Martínez *et al.*,

2010). En cualquier caso, la remoción de nutrientes en los cultivos inmovilizados aún reportaron valores altos, por lo que un tiempo de “inanición” (*starvation*) de 48 horas previas al tratamiento de las aguas residuales o la co-inmovilización con alguna bacteria promotora de crecimiento podría mejorar significativamente dicha capacidad (de-Bashan *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012).

El proceso de inmovilización no afectó la viabilidad celular de las cepas utilizadas en esta investigación. Esto es similar a lo reportado por Roa Parra *et al.* (2012) para *Acutodesmus incrassatulus*, los cuales utilizaron como indicador el crecimiento durante 5 días post-inmovilización, y por Zhang *et al.* (2012) para *Chlorella* sp., quienes usaron el contenido de clorofila *a* para el mismo fin. Esto nos indica que las microalgas utilizadas en el tratamiento de aguas residuales podrían ser reutilizadas en procesos posteriores o mantenerse en ciclos alternados o continuos de tratamiento.

Finalmente, Zamani *et al.* (2012) señalaron tres características que debería tener una cepa microalgal para ser considerada como candidata en el tratamiento de aguas residuales mediante inmovilización: 1) alta remoción de nutrientes; 2) adecuado crecimiento en la matriz de inmovilización con baja “fuga” celular; y 3) manejabilidad y fácil cultivo en el laboratorio. Las cepas de *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. utilizadas en el presente estudio reúnen estas características debido a que: 1) han presentado altos porcentajes de remoción, así como altos IEs, para los nutrientes en cuestión; 2) su crecimiento no se vio afectado significativamente por el proceso de inmovilización ni se detectó “fuga” alguna de células; y 3) son cepas que no tienen requerimientos especiales para su cultivo en laboratorio.

9. CONCLUSIONES

Las cepas unialgales no axénicas aisladas de los afluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales “Ing. Alejandro Vines Araoz” (Lima, Perú) correspondieron a *Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp. (Chlorophyta), las cuales pudieron adaptarse bien a condiciones de laboratorio previo a la experimentación.

En Medio Basal Bold (MBB), *Chlamydomonas* sp. reportó el crecimiento más rápido ($r=2.47\pm 0.17/\text{días}$) comparado con *Chlorella* sp. ($r=1.37\pm 0.10/\text{días}$), aunque esta última alcanzó la densidad celular final más alta ($11.67\pm 2.32 \times 10^6$ cel/ml)

Los cultivos libres crecieron bien en los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales, aunque su cinética de crecimiento se vio ralentizada (*Chlorella* sp. libre, $r=0.51\pm 0.08/\text{días}$; *Chlamydomonas* sp. libre, $r=2.11\pm 0.47/\text{días}$) en comparación a lo presentado en Medio Basal Bold.

Los cultivos inmovilizados presentaron un incremento significativo de su densidad celular, con respecto a su valor inicial, en los efluentes de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (6 veces en *Chlorella* sp. y 27 veces en *Chlamydomonas* sp.).

Chlorella sp. libre fue el cultivo que reportó uno de los valores más altos de porcentaje ($71.25\pm 10.50\%$) y tasa de remoción (0.43 ± 0.15 mg/l/día) de N-NO_3^- , y los máximos valores de dichos parámetros para PO_4^{3-} ($83.69\pm 1.85\%$; 0.09 ± 0.01 mg/l/día), así como para el Índice de Eficacia (IE) de ambos nutrientes ($\text{IE}_\text{N}=186.67\pm 48.37$ mg $\text{N-NO}_3^-/\text{mg chl } a$; $\text{IE}_\text{P}=38.39\pm 10.19$ mg $\text{PO}_4/\text{mg chl } a$).

Chlamydomonas sp libre reportó el máximo valor de porcentaje de remoción de N-NO_3^- ($75.08\pm 2.32\%$) y una tasa de remoción de este nutriente (0.38 ± 0.02 mg/l/día) y valores en los parámetros de remoción de PO_4^{3-} ($82.11\pm 1.81\%$; 0.09 ± 0.01 mg/l/día) similares a los de *Chlorella* sp. libre. El índice de eficacia (IE) de ambos nutrientes fue similar en

ambos tipos de cultivo de *Chlamydomonas* sp (IE_N: libre=33.98±5.50 mg N-NO₃/mg chl *a*, inmovilizada=29.71±6.86 mg N-NO₃/mg chl *a*; IE_P: libre=6.33±1.39 mg PO₄/mg chl *a*, inmovilizada=5.77±1.13 mg PO₄/mg chl *a*), pero inferiores a los de *Chlorella* sp. libre.

La forma de cultivo (libre o inmovilizado) fue el factor de mayor influencia en la capacidad de remoción de nutrientes, mientras que el IE también se vio afectado por el tipo de cepa y su interacción con la forma de cultivo. El proceso de inmovilización no alteró la viabilidad de las células microalgales.

10. RECOMENDACIONES

Evaluar la utilización de microalgas en el tratamiento terciario de aguas residuales para la conservación de ambientes continentales y marinos

Realizar estudios de remoción de dichos nutrientes en cultivos semi-continuos y continuos con volúmenes mayores de aguas residuales utilizando las mismas cepas o aislando otras residentes en aguas residuales.

Evaluar el efecto del tratamiento de aguas residuales con microalgas sobre otros parámetros fisicoquímicos (DQO, DBO, metales pesados, etc.)

Utilizar otras matrices (naturales o sintéticas) en los procesos de inmovilización con el fin de elegir la más óptima según los requerimientos de cada efluente a tratar.

Experimentar con sistemas de co-inmovilización bacteria-alga o consorcios microalgales que optimice la remoción de contaminantes en aguas residuales.

11. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Abdel Hammeed MS. Effect of Immobilization on growth and photosynthesis of the green alga *Chlorella vulgaris* and its efficiency in heavy metals removal. Bull. Fac. Sci. Assiut University 2002; 31: 233–40.

Abdel Hameed MS. Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. Afr. J. Biotechnol. 2007; 6: 1185-1191.

Abdel Hameed MS, Hammouda O. Biotechnological Potential Uses of Immobilized Algae. Int. J. Agri. Biol. 2007; 9(1): 183-192.

Abdel-Raouf N, Al-Homaidan AA, Ibraheem IBM. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012; 19 (3): 257-75.

Aguilar-May B. Sánchez-Saavedra MP, Lizardi MP, Voltolina D. Growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH. J. Appl. Phycol. 2007; 19: 181-183.

Andersen RA, Berges JA, Harrison PJ, Watanabe MM. Recipes for Freshwater and Seawater Media. En: Andersen RA, editor. Algal Culturing Techniques. Amsterdam: Elsevier; 2005. p. 437.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20da edición. Ed. American Public Health Association, Washington, DC; 1999.

Arad S, Cohen E, Ben-Amotz A. Accumulation of canthaxanthin in *Chlorella emersonii*. Physiol. Plant. 1993; 87:232–36.

Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecol. Eng. 2006; 28: 64–70.

Bailliez C, Largeau C, Casadevall, E. Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1985; 23: 99–105.

Bellinger EG. A note on the use of algal sizes in estimates of population standing crops. *Brit. Phycol. J.* 1974; 9, 157–161.

Bellinger EG, Sigeo DC. *Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators.* Nueva Jersey: Willey-Blackwell; 2010. p. 115.

Benemann JR, Tillet DM, Weissman JC. Microalgae biotechnology. *Trends Biotechnol.* 1987; 5 (2): 47-53.

Borowitzka M. High-value products from microalgae—their development and commercialization. *J. Appl. Phycol.* 2013; 25 (3): 743-56.

Burstein Z. Ingeniero Alejandro Vences Araoz (1919-1999). *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública* 2004; 21 (2): 111-2.

Cai T, Park SY, Li Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2013; 19: 360-9.

Chacón C, Andrade C, Cárdenas C, Araujo I, Morales E. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO en aguas residuales urbanas del Maracaibo, Venezuela. *J. Plant Physiol.* 2004; 144: 307-313.

Chevalier P, de la Noüe J. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb. Technol.* 1985a; 7: 621-624.

Chevalier P, de la Noüe J. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnol. Lett.* 1985b; 7: 395–400.

Chung P, Pond WG, Kingsbury JM, Walker Jr EF, Krook L. Production and nutritive value of *Arthrospira platensis*, a spiral blue-green alga grown on swine wastes. J. Anim. Sci. 1978; 47: 319–30.

Covarrubias SA, de-Bashan LE, Moreno M, Bashan Y. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2012; 93 (6): 2669-80.

Cohen Y. Biofiltration – the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. Bioresource Technol. 2001; 77: 257-274.

Cruz I, Bashan Y, Hernandez-Carmona G, de-Bashan LE. Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2013 ;97 (22): 9847-58.

Darley WM. Algal biology: A physiological approach. Basic microbiology. Vol. 9. Oxford: Blackwell. 1982. p. 168.

de-Bashan LE, Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. Bioresour. Technol. 2010; 101 (6): 1611-27.

de-Bashan LE, Hernandez JP, Morey T, Bashan Y. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Res. 2004; 38(2): 466-474.

de-Bashan LE, Moreno M, Hernandez J-P, Bashan Y. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Res. 2002; 36: 2941–2948.

de la Noüe J. Algae and waste water. J. Appl. Phycol. 1992; 4: 247-254.

Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM. Aprueban los Estándares Nacionales de Calidad Ambiental para Agua. Diario Oficial El Peruano (31 de julio de 2008).

Dent RM, Han M, Niyogi KK. Functional genomics of plant photosynthesis in the fast lane using *Chlamydomonas reinhardtii*. Trends Plant Sci. 2001; 6(8):364-371.

Durand-Chastel H. Production and use of *Spirulina* in Mexico. En: Shelef G, Soeder CJ, editor. Algae biomass. Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press; 1980. p. 51-64

Ferrera-Cerrato R, Rojas-Avelizapa NG, Poggi-Varaldo HM, Alarcón A, Caziñares-Villanueva RO. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. Rev. Lat. Microbiol. 2006; 48 (2): 179-187.

Figueroa G y de Lara-Isassi G. Crecimiento poblacional de tres microalgas en diferentes medios de cultivo. Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. 1998; 48:1-6.

Grobbelaar JU. Inorganic Algal Nutrition. En: Richmond A, Hu Q, editores. Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology. 2da edición. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. p. 123-133.

Gonzalez LE, Cañizares RO, Baena S. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. Bioresource Technology 1997; 60:259-62.

Gonzalez LE, Bashan Y. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 1527-31.

Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith WL, Chanley MH, editor. Culture of Marine Invertebrate Animals. Nueva York: Plenum Press; 1975. p. 26-60.

Henriques M, Silva A, Rocha J. Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: a simple and reproducible method. En: Méndez-Vilas A, editor. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Madrid: Formatex, España; 2007. p. 586 – 593.

Hernandez J-P, de-Bashan LE, Bashan Y. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. Enzyme Microb. Technol. 2006; 38 (1-2): 190-8.

Hernández-Reyes BM, Rodríguez-Palacios MC, Lozano-Ramírez C, Castilla-Hernández P. Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. Algal 2012; 3(1):80-94.

Hillebrand H, Dürselen CD, Kirschtel D, Pollingher U, Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. J. Phycol. 1999; 35: 403–424.

Hoffman JP. Wastewater Treatment with suspended and nonsuspended algae. J. Phycol. 1998; 34: 757-63.

Hongyang S, Yalei Z, Chunmin W, Xuefei Z, Jinpeng L. Cultivation of *Chlorella pyrenoidosa* in soybean processing wastewater. BioresourceTechnol. 2011; 102:9884–9890.

Horan NJ. 1990. Biological Wastewater Treatment Systems. Theory and operation. John Wiley and Sons Ltd. Baffins Lane, Chichester. West Sussex PO 191 UD, England.

Hwang SW, Horneland W. Survival of algal cultures after freezing by controlled and uncontrolled cooling. Cryobiology. 1965; 1:305-311.

Infante C, León I, Florez J, Zárata A, Barrios F, Zapata C. Removal of ammonium and phosphate ions from wastewater samples by immobilized *Chlorella* sp. Int. J. Environ. Stud. 2013; 70(1): 1-7,

Jeanfils J., Thomas D. Culture and nitrite uptake in immobilized *Scenedesmus obliquus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1986; 24: 417–422.

Jimenez-Perez MV, Sánchez-Castillo P, Romera O, Fernández-Moreno D, Pérez-Martínez C. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. Enzyme Microb. Tech. 2004; 34: 392-398.

Kaya VM, Goulet J, de la Noüe J, Picard G. A comparative study of four systems for tertiary wastewater treatment by *Scenedesmus bicellularis*: New technology for immobilization. J. Appl. Phycol. 1995; 7: 85-95.

Kaya V, Picard G. The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative Humidity. Biotechnol. Bioeng. 1995; 46: 459-464.

Khan M, Yoshida N. Effect of L-glutamic acid on the growth and ammonium removal from ammonium solution and natural wastewater by *Chlorella vulgaris* NTM06. Bioresource Technol. 2008; 99: 575–582.

Klochkova TA, Cho GY, Boo SM, Chung KW, Kim SJ, Kim GH. Interactions between marine facultative epiphyte *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadales, Chlorophyta) and ceramiacean algae (Rhodophyta). J. Environ. Biol. 2008; 29(4):427-435.

Kobai I, Dewedar AE, Hammouda O, Abdel Hamed MS y May E. Immobilized algae from wastewater treatment. Proc. 1st Int. Conf. Biol. Sci. (ICBS) Fac. Sci. Univ. Tanta. 2000; 1: 114-122.

Kothari R, Prasad R, Kumar V, Singh DP. Production of biodiesel from microalgae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industry wastewater. Bioresource Technol. 2013; 144: 499-503.

Kong Q, Li L, Martinez B, Chen P, Ruan R. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. Appl. Biochem. Biotechnol. 2010; 160: 9-18.

Koo S, Cha K, Song D-G, Chung D, Pan C-H. Optimization of pressurized liquid extraction of zeaxanthin from *Chlorella ellipsoidea*. J. Appl. Phycol. 2012; 24: 725–30.

Kumar S, Bansal A, Jha MK, Dey A. Comparative studies on uptake of wastewater nutrients by Immobilized Cells of *Chlorella minutissima* and Dairy Waste Isolated algae. Indian Chemical Engineer 2011; 53:4, 211-219.

Larsdotter K, Janse J, Dalhammar G, Biologically mediated phosphorus precipitation in wastewater treatment with microalgae. Environm. Technol. 2007; 28:953-960.

Lau PS, Tam NFY, Wong YS. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. Environ. Technol. 1997; 18: 945–951.

Lau PS, Tam NFY, Wong YS. Effect on carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. Bioresource Technol. 1998a; 63: 115-121.

Lau PS, Tam NFY, Wong YS. Operational Optimization of Batchwise Nutrient Removal from Wastewater by Carrageenan Immobilized *Chlorella vulgaris*. Wat. Sci. Tech. 1998b; 38: 185-192.

Lee K, Lee CG. Effect of light/dark cycles on wastewater treatments by microalgae. Biotechnol. Bioprocess Eng. 2001; 6: 194–199.

Lee Y-K, Shen H. Basic Culturing Techniques. En: Richmond A, editor. Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Oxford: Blackwell Science; 2004. p. 47-48.

Lemoine Y, Schoefs B. Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. Photosynth Res. 2010; 106:155–77.

- Li Y, Horsman M, Wu N, Lan CQ, Dubois-Calero N. Biocatalysts and bioreactor desing. *Biotechnol. Prog.* 2008; 24: 815-20.
- Lupo B, Gonzáles C, Maestro A. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Rev. Venez. Cienc. Technol. Aliment.* 2012; 3(1): 130-151.
- Mallick N, Rai LC. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae. *World J. Microb. Biotechnol.* 1994; 10: 439–443.
- Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 2002; 15: 377-90.
- Martin C, de la Noüe J, Picard G. Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass.* 1985; 7: 245–259.
- Ministerio del Ambiente. Agenda de Investigación Ambiental (2013-2021). Lima: Ministerio del Ambiente, Viceministerio de Gestión Ambiental/Dirección General de Investigación e Información Ambiental; 2013. pp. 47-60.
- Mitchell SA, Richmond A. Optimization of a growth medium for *Spirulina* based on cattle waste. *Biol. Wastes* 1988; 25 (1): 41-50.
- Moreira SM, Moreira-Santos M, Guilhermino L, Ribeiro R. Immobilization of the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme Microb. Technol.* 2006; 38 (1-2): 135-41.
- Moreno-Garrido I. Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology* 2008; 99 (10): 3949-64.
- Moreno-Garrido I, Campana O, Lubian LM, Blasco J. Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. *Mar. Pollut. Bull.* 2005; 51(8-12): 823-9.

Moreno M, Naranjo B, Koch A. Evaluación de dos métodos para la reducción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales, mediante un cultivo axénico de cianobacterias y un consorcio microbiano, inmovilizados y en suspensión. *Ciencia*. 2010; 13(1): 55-61.

Moscoso J. Estudio de Opciones de Tratamiento y Reuso de Aguas Residuales en Lima Metropolitana [Informe en Internet]. Lima: Lima Water; 2011 [acceso 9 de noviembre de 2013]. Disponible en: http://www.lima-water.de/documents/jmoscoso_informe.pdf

Myers J, Neal P, Graham J-R. On the mass culture of Algae. *Plant. Physiol.* 1951; 26 (3): 539-48.

Olguin EJ, Galicia S, Mercado G, Perez T. Annual productivity of *Spirulina*(*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. *J. Appl. Phycol.* 2003; 15: 249–57.

Oswald WJ. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. En: Lembi CA, Waaland JR, editores. *Algae and human affairs*. Cambridge University Press, Cambridge. 1988. pp. 255-281.

Ozkan A, Kinney K, Katz L, Berberoglu H. Reduction of water and energy requirement of algae cultivation using an algae biofilm photobioreactor. *Bioresource technology*. 2012 ; 114: 542-8.

Paniagua-Michel JM, Buckle-Ramírez LF, Granados C., Loya DM. 1986. Manual de Metodologías y Alternativas para el Cultivo de Microalgas. Tijuana: CICESE; 1987. Informe Especial 01/Oct/86.

Papageorgiou GC. Immobilized photosynthetic microorganisms. *Photosynthetica* 1987; 21: 367–383.

Pérez-Martínez C, Sánchez-Castillo P, Jiménez-Pérez M. Utilization of immobilized benthic algal species for N and P removal. *J. Appl. Phycol.* 2010; 22: 277-82.

Porra RJ. A simple method for extracting chlorophylls from the recalcitrant alga, *Nannochloris atomus*, without formation of spectroscopically-different magnesium-rhodoclorin derivatives. *Biochem. Biophys. Acta* 1990; 1019: 137-41.

Prieto D. Blog de Procesos de Manufactura II [Internet]. Lima: David Prieto. 2011 [acceso el 10 de noviembre de 2013]. Disponible en: <http://procesosdem manufactura2.blogspot.com/2011/04/visita-la-planta-intihuatana.html>

Pulz O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2001; 57: 287-93.

Rai LC, Mallick N. Removal and assessment of toxicity of Cu and Fe to *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris* using free and immobilized cells. *Microbiol. Biotechnol.* 1992; 8: 110-4.

Rawat I, Ranjith Kumar R, Mutanda T, Bux F. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy.* 2011; 88 (10): 3411-24.

Reynolds CS. The ecology of freshwater phytoplankton. Cambridge: Cambridge University Press; 1984. pp. 157-191.

Reynolds CS, Bellinger EG. Patterns of abundance and dominance of the phytoplankton of Rostherne Mere, England: Evidence from an 18-year data set. *Aquat. Sci.* 1992; 54, 10-36.

Reynolds CS. Ecology of phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge. 2006.

Roa AL, Cañizares RO. Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. Bistua :Revista de la facultad de Ciencias Basicas 2012; 10(1):71-79.

Robinson PK, Dainty AL, Goulding KH, Simpkins I, Tervan MD. Physiology of alginate immobilized *Chlorella*. Enz. Microb. Technol. 1985; 7: 212–6.

Robinson PK, Reeve JO, Goulding KH. Kinetics of phosphorus uptake by immobilized *Chlorella*. Biotechnol. Lett. 1988; 10: 17–20.

Robinson PK, Reeve JO, Goulding KH. Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous-flow culture. Enzyme Microb. Technol. 1989; 11: 590–596.

Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa LG, Stephenson T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technol. 2010; 101: 58–64.

Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier P-Y, Vaca-Garcia C. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. Renew. Sust. Energ. Rev. 2014; 35: 265-278.

Shi J, Podola B, Melkonian M. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. J. Appl. Phycol. 2007; 19: 417-423.

Shi J, Podola B, Melkonian M. Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. Bioresour. Technol. 2014; 154: 260-266.

Shimamatsu H. Mass production of *Spirulina*, an edible microalga. Hydrobiologia 2004; 512: 39-44.

Singh SK, Bansal A, Jha MK, Dey A. Comparative Studies on Uptake of Wastewater Nutrients by Immobilized Cells of *Chlorella minutissima* and Dairy Waste Isolated Algae. Indian Chemical Engineer 2011; 53 (4): 211-219.

Soong P. 1980. Production and development of *Chlorella* and *Spirulina* in Taiwan. En Shelef G, Soeder CJ. Algae Biomass. Amsterdam: Elsevier/North- Holland Biomedical Press; 1980. p. 97-113.

Subgerencia de Parques y Jardines. Memoria Descriptiva de la Planta de Recuperación y Tratamiento de Aguas de Regadío – Intihuatana. Municipalidad de Surco (Lima, Perú). 2006.

Tam NFY, Wong YS. Wastewater Nutrient Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. Environ. Pollut. 1989; 58: 19-34.

Tam NFY, Lau PS, Wong YS. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. Water Sci. Technol. 1994; 30: 369–374.

Tam NFY, Wang YS. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. Environ. Pollut. 2000; 107: 145-51.

Tamiya H. Mass culture of algae. Ann. Rev. Plant. Physiol. 1957; 8: 309–44

Tampion J, Tampion MD. Immobilized Cells: Principles and Applications. Universidad de Cambridge, Cambridge, Reino Unido. 1987. p. 257.

Tapia N, Cabrejos J, Rojas N, Torres F, Reyes I. Preparación de perlas de alginato de calcio con propiedades magnéticas y su aplicación en la adsorción de Cu (II). Rev. Per. Quím. Ing. Quím. 2009; 12(2): 29-33

Travieso L, Benitez F, Dupeiron R. Sewage treatment using immobilized microalgae. Bioresour. Technol. 1992; 40: 183–187.

Travieso L, Benitez F, Weiland P, Sanchez E, Dupeyron R, Dominguez AR. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresour. Technol.* 1996; 55: 181–186.

Trevan MD, Mak AL. Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. *Trends Biotechnol.* 1988; 6: 68-73.

Wang C, Yu X, Lv H, Yang J. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga *Chlorella* sp. *J. Environ. Biol.* 2013; 34: 421-425.

Wang L, Li YC, Chen P, Min M, Chen YF, Zhu J, Ruan R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technol.* 2010a; 101:2623–2628.

Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, Wang Y, Ruan R. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010b; 162 (4):1174-86.

Whitford LA, Schumacher GJ. A manual of fresh-water algae. Carolina del Norte: Sparks Press; 1973.

Wood AM, Everroad RC, Wingard LM. Measuring growth rates in microalgal cultures. En: Andersen RA, editor. *Algal Culturing Techniques*. Amsterdam: Elsevier; 2005. p. 272.

Xu J, Hu H. Screening high oleaginous *Chlorella* strains from different climate zones. *Bioresource Technol.* 2013; 144: 637-643.

Yang C, Ding Z, Zhang K. Growth of *Chlorella pyrenoidosa* in wastewater from cassava ethanol fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2008; 24:2919-2925.

Zamani N, Noshadi M, Amin S, Niazi A, Ghasemi Y. Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater. *J. Appl. Phycol.* 2012; 24(4):649-56.

Zhang E, Wang B, Ning S, Sun H, Yang B, Jin M, Hou L. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Afr. J. Biotechnol.* 2012; 11(24): 6529-6534.

Zhang E, Wang B, Wang Q, Zhang S, Zhao B. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *Bioresour. Technol.* 2008; 99 (9): 3787-93.

12. ANEXOS

ANEXO 1

Componentes del Medio Basal Bold (MBB) (Bold, 1949 y Bischoff y Bold, 1963).
Tomado de Andersen *et al.* (2005).

<i>Componente</i>	<i>Solución stock (g/L dH₂O)</i>	<i>Cantidad usada</i>	<i>Concentración (M) en el medio de cultivo final</i>
<i>Macronutrientes</i>			
NaNO₃	25.00	10 ml	2.95 x 10 ⁻³
CaCl₂ · 2H₂O	2.50	10 ml	1.70 x 10 ⁻⁴
MgSO₄ · 7H₂O	7.50	10 ml	3.04 x 10 ⁻⁴
K₂HPO₄	7.50	10 ml	4.31 x 10 ⁻⁴
KH₂PO₄	17.50	10 ml	1.29 x 10 ⁻³
NaCl	2.50	10 ml	4.28 x 10 ⁻⁴
<i>Solución alcalina de EDTA</i>		1 ml	
Na₂EDTA	50.00		1.71 x 10 ⁻⁴
KOH	31.00		5.53 x 10 ⁻⁴
<i>Solución de fierro acidificada</i>		1 ml	
FeSO₄ · 7H₂O	4.98		1.79 x 10 ⁻⁵
H₂SO₄		1 ml	
<i>Solución de Boro</i>		1 ml	
H₃BO₃	11.42		1.85 x 10 ⁻⁴
<i>Solución de metales traza</i>		1 ml	
ZnSO₄ · 7H₂O	8.82		3.07 x 10 ⁻⁵
MnCl₂ · 4H₂O	1.44		7.28 x 10 ⁻⁶
MoO₃	0.71		4.93 x 10 ⁻⁶
CuSO₄ · 5H₂O	1.57		6.29 x 10 ⁻⁶
Co(NO₃)₂ · 6H₂O	0.49		1.68 x 10 ⁻⁶

ANEXO 2

Fórmulas para el cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento (Wood *et al.*, 2005) y biovolumen final (adaptado de Hillebrand *et al.*, 1999)

1) Tasa intrínseca de crecimiento

$$r = \frac{\ln(N_t \div N_0)}{\Delta t}$$

Donde:

r = tasa intrínseca de crecimiento (días⁻¹).

N₀ = la concentración celular al inicio del intervalo de tiempo.

N_t = la concentración celular al final del intervalo de tiempo

Δt = intervalo de tiempo en días.

2) Número de divisiones por día

$$k = \frac{\log_2(N_t \div N_0)}{\Delta t}$$

3) Tiempo de duplicación

$$T_2 = \frac{0.6931}{r}$$

4) Biovolumen final

$$B = V_c \times 1000 C_f \times 10^{-9}$$

Donde:

B = Biovolumen en $\frac{mm^3}{L}$

V_c = Volumen celular promedio en μm^3

C_f = Concentración celular final en $\frac{células}{ml}$

ANEXO 3

Fórmulas para el cálculo de parámetros de remoción de N-NO_3^- y PO_4^{3-} (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004; Aslan y Kapdan, 2006)

1) Porcentaje de remoción

$$\%R = \left(\frac{C_0 - C}{C_0} \right) \times 100$$

Donde:

%R: porcentaje de remoción del nutriente
C₀: la concentración inicial del nutriente en el agua residual.
C: la concentración del nutriente luego del tratamiento

2) Tasa de remoción

$$R_i = - \frac{C_0 - C_t}{t_0 - t_t}$$

Donde:

R_i = tasa de remoción en $\text{mg} \times \text{l}^{-1} \times \text{día}^{-1}$
C_t = concentración del nutriente en t_t
t₀ = tiempo inicial (días)
t_t = tiempo (días) en el que la concentración del nutriente no cambia significativamente

3) Índice de eficacia

$$IE = \frac{K_N}{K_C}$$

Donde:

IE = índice de eficacia $\frac{\text{mg nutriente}}{\text{mg chl a}}$
K_N = cantidad máxima total del nutriente durante el experimento
K_C = cantidad máxima (final) total de chl a durante el experimento

ANEXO 4

Parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales de la PTAR “Ing. Alejandro Vences Araoz”.

Parámetros	Afluente	Efluente
Conductividad	560 $\mu\text{S}/\text{cm}$	346 $\mu\text{S}/\text{cm}$
Nitrato	12.52 mg/l	5.06 mg/l
Nitrito	0.8 mg/l	0.04 mg/l
Fosfatos	0.6 mg/l	1.00 mg/l
Amonio	0.06 mg/l	0.08 mg/l
DBO ^T	5.38 mg/l	4.78 mg/l
Aceites y grasas ^T	4.8 mg/l	2.2 mg/l

^T Parámetros tomados de la “Memoria Descriptiva de la Planta de Recuperación y Tratamiento de Aguas de Regadío – Intihuatana” (2006).