

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Evaluación de la capacidad de remoción de nitratos  
y fosfatos de la microalga, *Desmodesmus  
asymmetricus*, en aguas residuales de PETAR-  
TABOADA Callao.**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en  
Biología

Andrea Macedo Riva

Lima, Perú

2018

## *DEDICATORIA*

El presente trabajo está dedicado en primer lugar, a Dios, a esa energía constante y precisa que consiguió reanimarme en los momentos críticos de este largo proceso de investigación; dotándome de tranquilidad, perseverancia, ingenio y pasión por mi profesión. En segundo lugar y principalmente, a mi familia; a mis padres, por ser el pilar y el gran ejemplo de que una vida llena de esfuerzo y dedicación siempre conlleva al éxito y la materialización de nuestras metas personales; y por último, a mis hermanas, Dania y Anelisa, mis compañeras incondicionales que simbolizan para mí un compromiso voluntario de reflejar para ellas ese modelo que mis padres proyectan en mí y así poder ser un pilar más en sus vidas y el amparo que esté disponible para cuando lo necesiten.

## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo no se hubiera podido realizar sin el apoyo de algunas personas. En primer lugar me gustaría reconocer el tiempo y trabajo de mis dos grandes asesores, la Dra. Haydee Montoya Terreros, quien con su amplia experiencia en el campo de la psicología supo absolver todas mis dudas y aconsejarme en todo el proceso de redacción, y así mismo hacer una mención especial al Director de esta investigación, el Blgo. Alberto Oscanoa Huaynate, quien fue un gran mentor y guía para la ejecución de esta experimentación. Considero muy satisfactorio haber tenido la oportunidad de trabajar con ellos en esta etapa de mi formación profesional. En segundo lugar me gustaría reconocer a mi madrina de promoción, la Blga. Patricia Ayón Dejo, quién me dio la oportunidad de conocer el IMARPE y me presentó a las personas indicadas para elaborar este trabajo de investigación. De igual manera quiero agradecer al Blgo. José Ávila Peltroche, uno de los pioneros en investigar procesos de biorremediación en el Perú. Muchas gracias José por toda tu buena disposición para orientarme al iniciar esta etapa de investigación.

Así mismo, tengo el placer de agradecer al IMARPE y a todos los profesionales de dicha casa de investigación que me permitieron trabajar en sus respectivos laboratorios, pues no solo me compartieron sus conocimientos, también facilitaron mi trabajo y la elaboración de esta tesis. En este grupo quiero reconocer al equipo del Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos, el Blgo. Alberto Oscanoa, el Ing. Miguel Cervantes, el Ing. Raúl Porras y a dos personas que se unieron en el camino y apoyaron bastante esta investigación, el Bach. Edwin Oliveros y la estudiante de Biología, Fiorella Jiménez, todos ellos fueron unos grandes compañeros, consejeros y un apoyo invaluable durante los meses de experimentación; del mismo modo me es grato mencionar a los laboratorios que fueron colaboradores indispensables para este trabajo: el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos, el Laboratorio de Sala de microalgas (la Blga. Gheraldine Ynga y el Tec. Alex Niño), el Laboratorio de Patobiología

Acuática (la Msc. Violeta Flores, la Msc. Verónica Sierralta y la Blga. Carla Fernández), el Laboratorio de Microbiología Acuática (la Blga. Rita Orosco, el Blgo. Joel Samanez, la Blga. Cristina Flores y el Tec. Elmer Medina) y al Laboratorio de Análisis Instrumental (el Quim. Leenin Flores y el Quim. Anthony Ruiz), muchas gracias familia de IMARPE, por esa amabilidad y predisposición a ayudar que siempre me demostraron, hicieron que tenga una estancia bastante placentera.

No puedo dejar de mencionar y agradecer infinitamente al Ing. Miguel Herrera, quien de no apoyarme con la entrega de muestras, esta tesis no se hubiera podido realizar. Muchas gracias por la confianza y al Bach. Michel López por presentarme al Ing. Miguel Herrera.

A mis amigos, Samantha Calle, Mirtha León, Valeria Ferrario, Carlos Elías, Martín Dávila, Gianfranco Villamonte y en especial a Fernanda Maguiña, quien en el momento más complicado de los ensayos me prestó su apoyo profesional. Gracias chicos, por animarme en este largo camino.

Y por último pero no menos importante, a mis padres, quienes en todo momento me apoyaron no solo económicamente, también me animaron para dedicarme íntegramente a investigar sin presión. Muchas gracias por papás, por todas las facilidades que siempre me han entregado. LOS AMO.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	9
I. INTRODUCCIÓN .....	14
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	17
III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	19
IV. OBJETIVOS .....	21
4.1 Objetivo general .....	21
4.2 Objetivos específicos .....	21
V. HIPÓTESIS .....	22
VI. MARCO TEÓRICO.....	23
6.1 Normatividad del recurso hídrico en el país .....	23
6.2 Aguas Residuales .....	24
6.3 Fosfatos .....	25
6.4 Nitratos.....	26
6.5 Utilización de las microalgas en la remoción de nutrientes.....	28
6.6 Limitación de nutrientes.....	29
6.7 La microalga: <i>Desmodesmus asymmetricus</i> (Chlorophyta).....	30
VII. ANTECEDENTES.....	33
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS .....	38
8.1 Lugar de ejecución .....	38
8.2 Tipo y Diseño de la investigación.....	39
8.3 Variables .....	39
8.4 Operacionalización de las variables (OV).....	40
8.5 Metodología .....	41
IX. ANÁLISIS DE DATOS.....	44
9.1 Caracterización del crecimiento de <i>Desmodesmus asymmetricus</i> .....	44

9.2	Determinación del porcentaje promedio final de remoción de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por <i>Desmodesmus asymmetricus</i> , con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.....	45
9.3	Determinación de la tasa promedio de remoción diaria de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por <i>Desmodesmus asymmetricus</i> , con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.....	47
X.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	50
XI.	RESULTADOS.....	51
11.1	Crecimiento de <i>Desmodesmus asymmetricus</i> en aguas residuales .....	51
11.2	Determinación del porcentaje promedio final de remoción de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por <i>Desmodesmus asymmetricus</i> , con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.....	55
	Determinación de la proporción N/P.....	61
11.3	Determinación de la tasa promedio de remoción diaria de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por <i>D. asymmetricus</i> , con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.....	62
XII.	DISCUSIÓN .....	65
XIII.	CONCLUSIONES .....	71
XIV.	RECOMENDACIONES .....	73
XV.	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA .....	74

# ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ambientes de cultivo inicial e intermedio y obtención de Agua Residual; a) Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos; b) Laboratorio de Sala de Microalgas; c) Canal de salida, PETAR – La Taboada; d) Bidones en reposo (IMARPE).	41
<b>Figura 2.</b> Preparación de las unidades experimentales; a) Filtración de sólidos suspendidos del agua residual; b) Siembra de las unidades experimentales de acuerdo a la tabla 1; c) Disposición final aleatorizada de las unidades experimentales.	43
<b>Figura 3.</b> Medición de nitratos y fosfatos (flecha roja, muestra más reactivo. a) Nitratos al iniciar el ensayo; b) Fosfatos al iniciar el ensayo; c) Medición de nitratos y fosfatos en el fotómetro multiparámetro Hanna HI8320.	46
<b>Figura 5.</b> Comparación de las densidades celulares de los grupos experimentales de <i>D. asymmetricus</i> (barras verticales indican variación de la desviación estándar).	52
<b>Figura 6.</b> Comparación de la biomasa seca en los grupos experimentales de <i>D. asymmetricus</i> (barras verticales indican variación de la desviación estándar).	53
<b>Figura 7.</b> Promedio de la densidad celular de <i>D. asymmetricus</i> cultivada en condiciones de invernadero (Líneas verticales indican variación de la desviación estándar).	54
<b>Figura 8.</b> Promedio de la biomasa seca de <i>D. asymmetricus</i> cultivada en condiciones de invernadero (Líneas verticales indican variación de la desviación estándar).	54
<b>Figura 9.</b> Seguimiento de la biomasa seca del grupo control de <i>D. asymmetricus</i> , cultivado a condiciones de invernadero. a) día 2; b) día 5; c) día 10.	55
<b>Figura 10.</b> Seguimiento de la biomasa seca de los tratamientos de <i>D. asymmetricus</i> cultivados a condiciones de invernadero. a) día 2; b) día 5; c) día 10.	55
<b>Figura 11.</b> Promedio final de la remoción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) con cultivo de <i>D. asymmetricus</i> . (Líneas verticales indican variación de la desviación estándar)	57
<b>Figura 12.</b> Promedio de remoción diaria de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua residual, PTAR-Taboada, tratada con cultivo de <i>D. asymmetricus</i> en condiciones de invernadero. (Barras verticales indican variación del error estándar).	58
<b>Figura 13.</b> Evolución de la remoción de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua residual de PTAR- Taboada, tratada con cultivo de <i>D. asymmetricus</i> en condiciones de invernadero. Flecha roja indica, muestra más reactivo. a) día 1; b): día 4; c): día 8; d): día 10.	59
<b>Figura 14.</b> Promedio de remoción diaria de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en agua residual, PTAR-Taboada, tratada con cultivo de <i>D. asymmetricus</i> en condiciones de invernadero. (Barras verticales indican variación del error estándar).	60

- Figura 15.** Evolución de la remoción de las concentraciones de fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) en agua residual de PTAR-Taboada, tratada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero. Flecha roja indica, muestra más reactivo. a) día 1; b): día 4; c): día 8; d): día 10. \_\_\_\_\_ 61
- Figura 16.** Promedio de la tasa de remoción diaria de nitratos ( $NO_3^-$ ) en agua residual de la PTAR-Taboada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero (Barras verticales indican variación de la desviación estándar). \_\_\_\_\_ 63
- Figura 17.** Promedio de la tasa de remoción diaria de fosfatos ( $PO_4^{3-}$ ) en agua residual de la PTAR-Taboada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero (Barras verticales indican variación de la desviación estándar). \_\_\_\_\_ 64
- Figura 18.** Relación entre la densidad celular promedio y las densidades ópticas de *Desmodesmus asymmetricus*. \_\_\_\_\_ 81
- Figura 19.** Relación entre la biomasa seca promedio y las densidades ópticas de *Desmodesmus asymmetricus*. \_\_\_\_\_ 82
- Figura 20.** Relación entre los valores esperados y experimentales para la densidad celular con respecto a los días de ensayo (barras verticales indican variación de la desviación estándar). \_\_ 83
- Figura 21.** Relación entre los valores esperados y experimentales para la biomasa seca con respecto a los días de ensayo (barras verticales indican variación de la desviación estándar). \_\_ 83

# ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de los grupos de tratamientos para el efluente de la PTAR Taboada con la microalga <i>D. asymmetricus</i> en condiciones de invernadero. _____	42
<b>Tabla 2.</b> Remoción promedio final de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en términos porcentuales (%). _____	56
<b>Tabla 3.</b> Remoción diaria de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3$ ). _____	58
<b>Tabla 4.</b> Remoción diaria de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3$ ) _____	60
<b>Tabla 5.</b> Promedio y desviación estándar de la tasa de remoción diaria de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en $\text{mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , durante un periodo de 10 días de remoción. ( $p= 0.032$ ) _____	62
<b>Tabla 6.</b> Promedio y desviación estándar de la tasa de remoción diaria de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en $\text{mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , durante un periodo de 10 días de remoción. ( $p= 0.046$ ) _____	63

## RESUMEN

La contaminación de fuentes hídricas por diferentes actividades, entre ellas las aguas residuales, es una problemática que ha incrementado por el crecimiento poblacional e industrial. Se han desarrollado diferentes fases en su tratamiento, necesitando un tratamiento terciario con procesos fisicoquímicos que resultan costosos; sin embargo, una alternativa interesante es el empleo de microalgas como biosistema, debido a su capacidad de capturar cantidades significativas de Nitratos y Fosfatos durante su crecimiento. Es así que, en el primer semestre del 2017, se evaluó la capacidad de remoción  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  de la microalga *D. asymmetricus* en aguas residuales de la Planta de Tratamiento la TABOADA y a su vez, se buscó reconocer si esto se ve influenciado por la limitación de nutrientes (72 hrs). Se utilizaron dos tratamientos, T4 (inóculo + agua residual) y T5 (inóculo estresado + agua residual), para cada uno, se acondicionó por quintuplicado cultivos de 7L con una proporción de 1:1 (inóculo: agua residual) por un periodo de 10 días, fotoperiodo 12:12 y aireación constante. El efecto del estrés por limitación de nutrientes fue monitoreado en términos de crecimiento y remoción a través de pruebas de densidad celular, biomasa seca, porcentaje y tasa de remoción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). La microalga *D. asymmetricus* cultivada en agua residual nitrógeno limitada (N/P=11.6), demostró un buen crecimiento en un periodo de 10 días, evidenciado en una densidad celular de  $10.37 \pm 2.78 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  en el T4, equivalente a un aumento de 9 veces el valor inicial; así mismo en T5 se obtuvo uno de los mayores valores de biomasa algal ( $1759 \pm 342.6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), además, tanto para  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se apreció mayor velocidad de absorción hasta el tercer día de experimentación, removiendo más del 90% de la concentración, siendo el mayor porcentaje de remoción final para  $\text{NO}_3^-$  en T5 ( $95.4 \pm 5.7\%$ ), mientras que para  $\text{PO}_4^{3-}$  en T4 ( $98.9 \pm 1.4\%$ ), también observando que el tratamiento de limitación de nutrientes de 72 horas no ocasionó efectos significativos sobre la capacidad de remoción de la microalga. En conclusión *D.*

*asymmetricus* demostró su capacidad potencial de remediador en aguas residuales domésticas.

**Palabras claves:** Microalga, *Desmodesmus asymmetricus*, agua residual doméstica, remoción, limitación de nutrientes.

## ABSTRACT

The pollution of water sources by different activities, including wastewater, is a problem that has increased due to population and industrial growth. Different phases have been developed in its treatment, requiring a tertiary treatment with physicochemical processes that are costly; however, an interesting alternative is the use of microalgae as a biosystem, due to its capacity to capture significant amounts of Nitrates and Phosphates during its growth. Thus, in 1<sup>st</sup> semester of 2017, the removal capacity of  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  of the microalga *D. asymmetricus* in wastewater from the TABOADA Treatment Plant was evaluated and in turn, it was recognized if this was influenced by the starvation period (72 hrs.). Two treatments were used, T4 (inoculum + wastewater) and T5 (stressed inoculum + wastewater), for each one, 7L cultures with a ratio of 1: 1 (inoculum: wastewater) for a period of 10 days, photoperiod 12:12 and constant aeration were conditioned by quintuplicate. The effect of stress due to starvation period was monitored in terms of growth and removal through tests of cell density, dry biomass, percentage and removal rate of nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) and phosphates ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). The microalgae *D. asymmetricus* cultivated in nitrogen-limited wastewater (N/P= 11.6), showed a good growth in a period of 10 days, evidenced in a cell density of  $10.37 \pm 2.78 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$  in T4, equivalent to an increase of 9 times the initial value; likewise, in T5, one of the highest values of algal biomass was obtained ( $1\ 759 \pm 342.6 \text{ mg.L}^{-1}$ ), in addition, both for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  higher absorption rate was observed up to the third experimentation day, removing more 90% of the concentration, being the highest percentage of final removal for  $\text{NO}_3^-$  in T5 ( $95.4 \pm 5.7\%$ ), while for  $\text{PO}_4^{3-}$  in T4 ( $98.9 \pm 1.4\%$ ), also observing that the starvation treatment of 72 hours did not cause significant effects on the microalga removal capacity. In conclusion *D. asymmetricus* demonstrated its potential remedial capacity in domestic wastewater.

**Key words:** Microalgae, *Desmodesmus asymmetricus*, domestic wastewater, nutrient removal, starvation.

# I. INTRODUCCIÓN

La importancia estratégica del agua dulce, es reconocida universalmente, aunque en cuestiones relativas a la gestión sostenible, tanto en el ámbito científico, social o político, los recursos hídricos parecen enfrentarse a una situación grave en términos cuantitativos y sobre todo cualitativos. Es así que en la actualidad, los problemas de contaminación asociados con el agua son una de las principales preocupaciones sociales. Esto debido a que el continuo crecimiento poblacional, la sobreexplotación, los procesos de industrialización y el rápido desarrollo económico, ocasionan el incremento de desechos que pueden llegar a exceder la capacidad de asimilación de la naturaleza, generando la eutrofización de los cuerpos de agua.

La combinación de estos desechos contaminantes procedentes de las actividades antropogénicas en viviendas y establecimientos comerciales e industriales, generan las denominadas, aguas residuales. Estas deben ser tratadas de manera adecuada para mitigar el impacto sobre los cuerpos de agua debido a su composición física, química y biológica (carga de sustancias y/o microorganismos).

Para aterrizar esta problemática a nuestra realidad, se debe resaltar que el cuidado del recurso hídrico es trascendental en nuestro país, ya que se distribuye de manera heterogénea y desigual en la población, razón por la cual el deterioro de la calidad del agua es considerado uno de los problemas más graves que debemos enfrentar. Debido a esto, se considera importante purificar las aguas residuales, ya que estos vertimientos no solo contaminan la vida acuática, sino que principalmente afectan la salud humana, y según datos del Ministerio del Ambiente en el 2009, sólo en Lima se vierten al menos 400 millones de m<sup>3</sup>/anuales de aguas servidas al mar.

Sin embargo, esta problemática no es ocasionada únicamente por la contaminación ambiental, sino también por la falta de recursos para poder implementar sistemas de depuración de aguas residuales e infraestructuras que se adapten a las condiciones y necesidades de la región.

Este sistema para el tratamiento se compone de diferentes fases. El tratamiento primario sirve para separar mecánicamente los sólidos en suspensión y el secundario, para realizar una degradación bacteriana de la materia orgánica. Esta última fase genera efluentes con elevadas concentraciones de nutrientes (nitratos y fosfatos) por lo que se necesita la aplicación de un tratamiento terciario con procesos fisicoquímicos que resultan costosos.

De este último punto parte el propósito de la presente investigación. Debido a que los tratamientos terciarios fisicoquímicos no solo son costosos, sino poco amigables con el medio ambiente, se considera la necesidad de investigar otras opciones que se adapten a nuestra realidad. Una alternativa interesante, adoptada en los países desarrollados, es el empleo de microalgas como biosistema. Esto se fundamenta en la capacidad de las microalgas para capturar cantidades significativas de Nitratos y Fosfatos durante su crecimiento, absorber metales y acelerar la inactivación de bacterias patógenas. Además, la biomasa producida durante el procesamiento de estos efluentes, representa una fuente potencial de alimentos, químicos y pigmentos, entre otras importantes aplicaciones.

Hasta el momento, se han realizado investigaciones en diversos tipos de microalgas. No obstante, existe escasa bibliografía del biotipo *Desmodesmus asymmetricus*, que podría constituir un gran interés científico y comercial por su posición dentro de las clorófitas, ya que

diversos géneros dentro del grupo han demostrado tener la capacidad para absorber y asimilar rápidamente el dióxido de carbono y los nutrientes de los efluentes. Dicha característica podría convertirla en una buena candidata para los procesos de biorremediación, además de poseer una alta tasa de crecimiento, competitividad y tolerancia a una gran variedad de condiciones ambientales. Adicionalmente, existe la hipótesis de que en el proceso de biorremediación, las células pueden saturarse antes de haber captado todos los nutrientes por lo que someterlas a un periodo de inanición permitiría al cultivo de microalgas eliminar más fósforo de las células saturadas y mejorar la absorción en las aguas residuales.

Es así que el presente trabajo de investigación, evaluó la capacidad de la microalga *Desmodesmus asymmetricus* en la remoción de nitratos y fosfatos de las aguas residuales de la Planta de Tratamiento la TABOADA, a fin de demostrar su posible aplicación en el tratamiento terciario.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales requiere de especial atención por parte de la sociedad e investigadores debido a que, las descargas ocasionan serios problemas de contaminación, ponen en peligro la salud pública, genera eutrofización e incluso la muerte de algunos sistemas acuáticos, produce limitaciones para la agro exportación e incrementa los costos de tratamiento del agua para fines de abastecimiento poblacional (Salazar, 2006 y Méndez, 2008).

Según un estudio de la World Resources Institute, se advirtió que Perú será uno de los 33 países que enfrentaría un estrés hídrico severo para el año 2040. Si a esto, le agregamos que uno de los principales factores de contaminación en las fuentes de agua (superficial y subterránea) se debe a la descarga directa de las aguas residuales sin previo tratamiento; nos encontramos ante un problema latente de sostenibilidad del recurso hídrico, que pone en riesgo la salud y vida de las presentes y futuras generaciones (DAR, 2017; WRI, 2015).

El recurso hídrico se distribuye de manera desigual en nuestro territorio nacional. En la Costa sólo se dispone del 2% del agua y ahí se localiza el 55% de la población; en tanto la Selva dispone del 98% del agua y sólo mantiene al 14% de la población nacional; es así que el deterioro de la calidad del agua es considerado uno de los problemas más graves del país (MINAM, 2009).

La importancia de esta problemática genera que una las metas prioritarias al 2021 del Plan Nacional de Acción Ambiental, sea que el 100% de aguas residuales domésticas urbanas sean tratadas y el 50% de éstas, reusadas (PLANAA, 2011). No obstante, existe un déficit a nivel nacional de cobertura por parte de las Entidades Prestadoras de Servicios de Saneamiento (EPS Saneamiento), ya que no brindan un

servicio adecuado de tratamiento de aguas residuales debido a la sobrecarga e infraestructura insuficiente, lo cual origina que los efluentes tratados excedan los límites máximos permisibles (LMP), y no se cumplan con los estándares de calidad ambiental (ECA), (OEFA, 2014). De las 253 localidades del ámbito de las EPS, 89 no cuentan con un tratamiento de aguas residuales, por lo que éstas son vertidas directamente a los ríos, mares, pampas o drenes; sólo en el 2013 se vertió un total de 298.000 m<sup>3</sup>/día al medio ambiente sin ningún tratamiento, esto representa el 12% de todo el agua residual vertida al alcantarillado de las EPS (SUNASS, 2015) y, según la Dirección General de Gestión de la Calidad de los Recursos Hídricos de la Autoridad Nacional del Agua (ANA), los ríos de Loreto, Piura, Pasco, Arequipa, Moquegua Puno, Ucayali, Madre de Dios, se encuentran contaminados por aguas residuales municipales sin tratamiento (Larios-Meñoño *et al.*, 2015).

### III. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

En el Perú, la gestión inadecuada de las aguas residuales constituye un riesgo importante para la salud pública, calidad de vida y medio ambiente. En el 2015, se han registrado más de 20 denuncias relacionadas a las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) por contaminación ambiental, inadecuado funcionamiento, vertimiento de aguas residuales sin tratamiento al mar, inadecuada operación y mantenimiento, entre otros (Von Hesse y Zavaleta, 2016).

Debido a esto, el Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS) remarcó que para lograr los Objetivos de Desarrollo Sostenible, resulta imperativo revisar los paradigmas tradicionales, introduciendo nuevos enfoques que consideren el tratamiento en el contexto de la gestión integral del recurso hídrico y promoviendo la recuperación de nutrientes (MVCS y Grupo Banco Mundial, 2017). Dicha idea también fue sostenida en otra publicación, recalcando la necesidad de hacer una evaluación práctica de los métodos de tratamiento acordes al presupuesto ya que, en aquellas áreas donde no es factible construir plantas convencionales, podrían emplearse otras opciones naturales de tratamiento. El manejo efectivo de aguas residuales debe dar como resultado un efluente ya sea reciclado o reusable, o uno que pueda ser descargado de manera segura en el medio ambiente (Reynolds, 2002). Como ya se ha mencionado, existen inconvenientes con los métodos de tratamiento convencionales de aguas residuales, primarios y secundarios, pues generalmente requieren de grandes cantidades de energía, grandes áreas de terreno y altos costos de operación y mantenimiento (Mohd et al., 2017). Es por esto que se considera a las microalgas como un enfoque alternativo para el tratamiento terciario, ya que tienen la capacidad de asimilar el nitrógeno y fósforo en su biomasa

para posteriormente utilizarla como fertilizante; los costos de operación son bajos porque las aguas residuales contienen nutrientes inorgánicos que están disponibles para las microalgas y a su vez, la robustez que presentan les permite prosperar en condiciones extremas (Jeong y Mok, 2014). De esta forma se puede decir que el uso de la biomasa de algas es una estrategia exitosa para reciclar los nutrientes de las aguas residuales (Shi *et al.*, 2013).

Finalmente, según una publicación de la Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS), esta temática presenta relevancia científica para el país debido a que una de las propuestas para la mejora de la problemática actual, trata sobre el fomento de la investigación en las universidades para el desarrollo y aplicación de tecnologías sencillas y eficientes del tratamiento de aguas residuales en zonas de costa, sierra y selva y, en ámbitos urbanos y rurales. Todo con el fin de promover su implementación en las PTAR nuevas y extenderlas en el país. Dada esta afirmación, se considera que investigaciones como la presente, sirven como antecedentes para la evaluación de una propuesta alternativa en respuesta a las necesidades del Perú (Loose, 2016).

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de remoción de nitratos y fosfatos de la microalga, *Desmodesmus asymmetricus*, en aguas residuales de PETAR-TABOADA Callao.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar el crecimiento de la microalga *Desmodesmus asymmetricus* en aguas residuales.
2. Determinar el porcentaje promedio final de remoción de nitratos y fosfatos en las aguas residuales por *Desmodesmus asymmetricus*, con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.
3. Determinar la tasa promedio de remoción diaria de nitratos y fosfatos en las aguas residuales por *Desmodesmus asymmetricus*, con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.

## V. HIPÓTESIS

La remoción de nitratos y fosfatos en aguas residuales será mayor por la microalga sometida a un periodo previo de 72 hrs. de limitación de nutrientes, que en aquella microalga no sometida a este tratamiento.

## VI. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Normatividad del recurso hídrico en el país

El cambio climático, la disminución de bosques, la pérdida de diversidad biológica, la creciente escasez de agua y la gestión deficiente de las sustancias químicas y materiales peligrosos, son algunos de los problemas globales que se encuentran bajo normas y tratados internacionales cuyo cumplimiento nacional es necesario impulsar desde el Estado (MINAM, 2009).

La ley N°28611, Ley General del Ambiente, es la norma fundamental para la protección de la calidad del agua como recurso a través de la definición de instrumentos para regular el vertimiento, tratamiento y reúso de las aguas residuales, declarándose al Estado como promotor del uso de las mismas con fines productivos (Méndez, 2008).

En el artículo 90 de la mencionada ley, se destina al Estado como promotor y controlador en el aprovechamiento sostenible de las aguas a través de la gestión integrada del recurso hídrico, previniendo la afectación de su calidad ambiental. Así mismo, en el artículo 114, se detalla que el acceso al agua para consumo humano es un derecho de la población y por tal motivo, le corresponde al Estado asegurar la vigilancia y protección de aguas que se utilizan con fines de abastecimiento poblacional, sin perjuicio de las responsabilidades que corresponden a los particulares; y finalmente en el artículo 120, se menciona que es deber del Estado, promover el tratamiento de las aguas residuales con fines de su reutilización, considerando como premisa la obtención de la calidad necesaria para su reúso, sin afectar la salud humana, el ambiente o las actividades en las que se reutilizarán (MINAM, 2005).

Sin embargo, pese a la normatividad del país, las organizaciones no han estado tomando las medidas adecuadas para la gestión de la calidad del recurso, puesto que éste se ha visto afectado por el desarrollo de actividades extractivas, productivas y de servicios. Sólo en Lima, se vierten al mar 400 millones de m<sup>3</sup>/anuales de agua contaminada, lo que ha generado un gran problema en materia ambiental (MINAM, 2009).

## **6.2 Aguas Residuales**

El “Agua residual” es un término generalmente utilizado para referirse al agua de baja calidad que contiene una gran cantidad de contaminantes y microbios (Sriram y Seenivasan, 2012). Éstas son mezclas complejas de materia natural orgánica e inorgánica y compuestos artificiales; las tres cuartas partes del carbono orgánico se presentan en forma de carbohidratos, grasas, proteínas, aminoácidos y ácidos volátiles, y los constituyentes inorgánicos incluyen grandes concentraciones de sodio, calcio, potasio, magnesio, cloro, azufre, fosfato, bicarbonato, sales de amonio y metales pesados. Este ambiente es un medio ideal para una amplia gama de microorganismos, especialmente bacterias, virus y protozoarios que en su mayoría son inofensivos, sin embargo también contienen un sector patógeno capaz de causar enfermedades como el cólera, tuberculosis, tifoidea, hepatitis y disentería. (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

Estos efluentes se caracterizan, entre otros aspectos, por tener una elevada demanda de oxígeno, ya que esta materia orgánica tiene como efecto directo, el consumo del Oxígeno disuelto (OD) (Orozco, 2014). Si estos efluentes son vertidos directamente a los cuerpos de agua, se ocasionan graves problemas de contaminación y procesos

de eutrofización que pueden llevar a la destrucción completa de los ecosistemas, al superar la capacidad normal de autodepuración de los mismos (Roa y Cañizares, 2012).

Con la finalidad de mejorar la calidad de los efluentes a descargar, se realiza el tratamiento de aguas residuales por etapas, donde el número de fases depende del tipo de agua residual y los costos que se generen; estas son: la etapa preliminar, con ayuda de barras metálicas (20-60 mm), que remueven sólidos o materiales de gran tamaño que pueden taponar tuberías o dañar equipos; la etapa primaria, que busca separar cerca del 70% de los sólidos sedimentables presentes en el agua, este proceso se realiza en tanques de sedimentación y con tiempos de retención altos; la etapa secundaria, donde se busca disminuir la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) reduciendo la materia orgánica; y por último una etapa terciaria enfocada en reducir iones orgánicos (amonio, nitratos y fosfatos), los cuales se pueden eliminar por medios químicos o biológicos, sin embargo, la remediación química es por lo general muy costosa y lleva a una contaminación secundaria por lo cual se tiene preferencia por la remediación biológica (Abdel-Raouf *et al.*, 2012 y Candela R, 2016).

### **6.3 Fosfatos**

El fósforo está presente de diversas formas en el agua, tanto natural como residual. En este último se encuentra casi exclusivamente como fosfato; los cuales se clasifican como ortofosfatos (fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$ ), fosfatos condensados (polifosfatos) y fosfatos unidos orgánicamente. Estos pueden estar en solución, en partículas o detritus, o en los cuerpos de los organismos acuáticos (Bergmann, 2009).

Las principales fuentes de contaminación con fosfato en las aguas naturales son los detergentes utilizados en la industria y los fertilizantes procedentes de la agricultura. Hoy en día es cada vez mayor el uso de estos últimos, por lo que debe haber un mayor control con el fin de evitar la contaminación, ya que esto podría ocasionar el enriquecimiento excesivo del agua natural, conocido como eutrofización, lo cual produciría un crecimiento indeseable de algas y plantas acuáticas, afectando la calidad del agua (Lim, 2011). Las algas asimilan el fósforo disuelto en el agua y luego lo convierten en fósforo orgánico. Los organismos heterótrofos obtienen el fósforo a partir de los autótrofos, cuando los heterótrofos y autótrofos mueren (o cuando los heterótrofos defecan), el fosfato es devuelto al agua por los descomponedores. Este ciclo se repite innumerables veces hasta que el fósforo se pierda y deposite en las profundidades del océano, donde se convierte en parte de las rocas sedimentarias y finalmente cuando la roca es llevada a la superficie y degradada por la intemperie, libera gradualmente el fósforo en iones fosfato soluble en agua (Barsanti y Gualtieri, 2014).

## **6.4 Nitratos**

Otro contaminante del agua es el nitrógeno ( $N_2$ ). Los compuestos nitrogenados cobran relevancia, no solo porque el nitrógeno es un elemento esencial en las funciones metabólicas, sino por su abundancia en el aire, suelo y agua. Su presencia se debe a causas naturales como la disolución atmosférica, escorrentías superficiales y subterráneas; y a causas antropogénicas provenientes de usos domésticos e industriales. En el agua, los compuestos nitrogenados inorgánicos más comunes son el amonio, nitrito y nitrato. En algunos casos cuando la contaminación es producida por fertilizantes inorgánicos o por algún proceso industrial, pueden encontrarse

cantidades significativas de nitritos y nitratos (Cárdenas y Sánchez, 2013).

El nitrógeno tiene varias formas químicas lo que hace que presente un ciclo más complejo. La mayoría de los procesos (Fijación, mineralización, nitrificación y desnitrificación) son realizados exclusivamente por bacterias, sin embargo, las algas juegan un rol activo en la fijación y asimilación. Las algas procariotas fijan el nitrógeno atmosférico en compuestos tales como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ); seguidamente las eucariotas lo asimilan, incorporándolo en compuestos orgánicos nitrogenados. Al degradarse la materia orgánica, por el proceso de mineralización, los compuestos orgánicos se descomponen en compuestos inorgánicos ( $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{CO}_2$ ). El amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) resultante puede ser nitrificado por bacterias aerobias quimioautotróficas y finalmente, el ciclo se completa por el proceso de desnitrificación llevado a cabo por bacterias anaerobias facultativas que reducen el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) (Barsanti y Gualtieri, 2014).

Existen métodos fisicoquímicos y biológicos para la eliminación de nitrógeno del agua. Los primeros, en la mayoría de los casos, no resuelven el problema ya que trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Los métodos biológicos sí eliminan al contaminante y, en condiciones idóneas, sus productos finales son  $\text{CO}_2$  y  $\text{N}_2$  (Cervantes *et al.*, 2000).

Ambos compuestos constituyen nutrimentos claves para el crecimiento de los seres vivos, así que tanto el nitrógeno como el fósforo pueden ser eliminados del agua si son asimilados por microorganismos.

## **6.5 Utilización de las microalgas en la remoción de nutrientes**

La idea de cultivar microalgas en aguas residuales se basa en reducir los componentes del medio de crecimiento para el cultivo, limpiar las aguas residuales y obtener un valor comercial de la biomasa cultivada (Abinandan y Shanthakumar, 2015).

Los sistemas de tratamientos con algas han sido utilizados tradicionalmente en los procesos terciarios. Un proceso completo en esta fase se enfoca en remover el amonio, nitrato y fosfato que normalmente es cuatro veces más costoso que el tratamiento primario, sin embargo los cultivos microalgales son una elegante solución por su habilidad de usar el nitrógeno y fósforo para su crecimiento, su capacidad de remover metales pesados, así como también algunos compuestos orgánicos tóxicos, sin ocasionar contaminación secundaria, la cual es producida por el empleo de métodos químicos. Entre otras de las características benéficas están la producción de oxígeno y el efecto desinfectante debido al incremento del pH durante la fotosíntesis (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

Sin embargo, la eliminación de un nutriente depende de la disponibilidad del otro; las microalgas no pueden eliminar nitrógeno sin la presencia de fósforo, o viceversa, y esta eliminación depende también de las concentraciones de estos nutrimentos en su biomasa, de tal forma que pueden ajustar su concentración intracelular con el suministro de estos en las aguas residuales. La concentración de fósforo microalgal puede variar de 0.03% a más de 3% y la de nitrógeno puede variar desde un 3% hasta un 12% (Beuckels *et al.*, 2015).

## 6.6 Limitación de nutrientes

En las microalgas, la privación de nutrientes a largo plazo puede conducir a la muerte celular precedida por la autofagia, un proceso de autodegradación para reciclar parte del citoplasma, incluidos los orgánulos. Sin embargo, lo que para una planta superior es una inanición de corta duración en el contexto de horas, para las algas debe considerarse una inanición a largo plazo (Carfagna *et al.*, 2015).

Varios estudios han demostrado que un menor suministro de nitrógeno o fósforo en las aguas residuales dan como resultado cambios metabólicos y fisiológicos en las células ya que se reduce del contenido proteico y la división celular se ralentiza, pero la adquisición de carbono a través de la fotosíntesis continúa, por lo tanto, las células tienden a acumular metabolitos ricos en carbono como carbohidratos o lípidos. (Beuckels *et al.*, 2015).

La privación del nitrógeno estimula la depresión de enzimas involucradas en el metabolismo del mismo, como la nitrato reductasa y los sistemas de transporte de  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_3^-$ ; además en esta aclimatación a la deficiencia, se degradan los ribosomas y disminuyen las actividades enzimáticas implicadas en la gluconeogénesis y el ciclo de fijación fotosintética del carbono, provocando una pérdida de la capacidad fotosintética y una disminución en el contenido de clorofila. Tales cambios generan intentos para obtener nitrógeno del medio ambiente a través de sistemas de captación altamente específicos para asimilarlos incluso si sus concentraciones externas son muy bajas (Carfagna *et al.*, 2015).

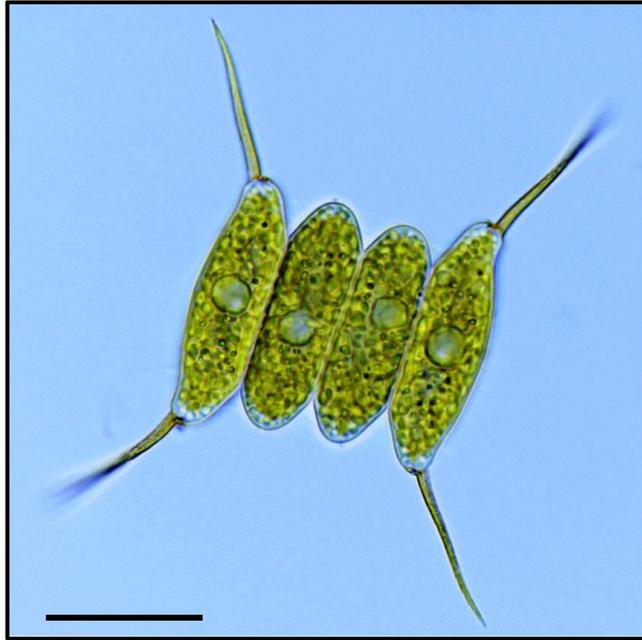
Sin embargo, la inanición de nutrientes fosforados aumenta la biomasa al exponerse a aguas residuales, cambia la composición de

los ácidos grasos en las células de *O. pertusa* y mejora temporalmente la absorción de fosfato (Hernandez; *et al.* 2005). La absorción de fosfato puede explicarse principalmente por un único mecanismo de transporte que depende de la energía generada por la luz y cuya capacidad de transporte se ve favorecida por la inanición del fosfato. Dicho transporte se caracteriza por una absorción rápida potenciada por la inanición de fosfato, seguida por una posterior absorción más lenta que puede ser hasta 100 veces mayor que la tasa de crecimiento máximo; ambos sistemas son definidos como de alta afectividad (HA) y de baja afinidad (LA) (Jansson, 1993).

## **6.7 La microalga: *Desmodesmus asymmetricus* (Chlorophyta)**

*Desmodesmus* es uno de los géneros continentales de algas verdes cocoides más comunes. Habitan cuerpos de agua dulce en todo el mundo, e incluso en el suelo, lo que la hace un género cosmopolita tolerante a una amplia gama de condiciones ambientales. El fácil manejo y crecimiento de estas algas, explica por qué fue uno de los primeros cultivos establecidos para laboratorio (Lüring, 2003).

El género morfológicamente presenta células alargadas, que generalmente están dispuestas en cenobios planos de 2 – 32, en una o dos filas; las dimensiones normalmente varían entre 11-15  $\mu\text{m} \pm 0.48$  de longitud y 4-6  $\mu\text{m} \pm 0.5$  en su punto más ancho. A menudo se visualizan granulaciones en la célula debido a la presencia de capas en la pared celular, estas tienen ornamentaciones formadas por la capa más externa. Además, la mayoría de las especies presentan una o varias espinas (o abolladuras) en las células (Nermin, 2011; Vanormelingen *et al.*, 2007).



*Desmodesmus* sp.

Tomada de: Collection of Microphotographs “Algae”

URL: [http://plankton.image.coocan.jp/c\\_algae2\\_10\\_5.html](http://plankton.image.coocan.jp/c_algae2_10_5.html)

La siguiente clasificación taxonómica de la especie *Desmodesmus asymmetricus* (Schröder) E. Hegewald según los datos de AlgaeBase:

Dominio: Eucariota

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Filo: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Sphaeropleales

Familia: Scenedesmaceae

Subfamilia: Desmodesmoideae

Género: *Desmodesmus*

Especie: *Desmodesmus asymmetricus*



## VII. ANTECEDENTES

**Hernandez, De-Bashan y Yoav Bashan (2004):** Dicha investigación estudió el efecto de la co-inmovilización en gotas de alginato de la microalga (*Chlorella vulgaris* o *Chlorella Sorokiniana*) y la bacteria promotora de crecimiento (MGPB, *Azospirillum brasilense* cepa Cd), sobre la remoción de nutrientes (P y N) de las aguas residuales municipales en la ciudad de La Paz, México. En los resultados se concluyó que *A. brasilense* Cd promueve el crecimiento de ambas especies de *Chlorella* en aguas residuales. Además, la remoción fue superior en los tratamientos con los microorganismos co-inmovilizados que en los que contenían microalgas solas, alcanzando la eliminación de hasta el 100% de amonio, el 15% de nitrato y el 36% de fósforo dentro de los 6 días (varió según la fuente de las aguas residuales), en comparación con el 75% amonio, 6% de nitrato y 19% de fósforo por las microalgas solas.

**Hernandez, De-Bashan y Yoav Bashan (2005):** Esta investigación es la continuación de la citada anteriormente con el nuevo enfoque del periodo de inanición (starvation period) y de cómo éste influye en la remoción. Para esto, incubaron las gotas de alginato que contenían los microorganismos (después de un solo lavado con NaCl al 0,85%) en una nueva preparación estéril de esta solución salina a una intensidad de luz continua de  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 3 días y 5 días. Así finalmente determinaron que el crecimiento y la absorción de fósforo mejoraron significativamente en los tratamientos sometidos a 3 días de inanición. Sin embargo, la inanición de 5 días tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, más no en el de *C. sorokiniana*. Además, el mejor tratamiento para la absorción de fósforo fue reemplazando el cultivo, después de un ciclo de remoción, siendo capaz de eliminar hasta el 72% del fósforo de las aguas residuales. Hubo una

correlación directa entre la carga inicial de fósforo en las aguas residuales domésticas y el nivel de eficiencia de eliminación, siendo más alta en cargas de fósforo más altas en cultivos coinmovilizados. Finalmente, este estudio demostró que los periodos de inanición, combinados con la co-inmovilización con *A. brasilense*, tienen efectos sinérgicos en la absorción de fósforo de las aguas residuales.

**Arbib, Ruiz, et al. (2013):** Realizaron cultivos batch (5% CO<sub>2</sub>) con *Scenedesmus obliquus* (Sc), *Chlorella vulgaris* (Cv), *Chlorella kessleri* (Ck) y algas de floración natural (Bl) en aguas residuales (WW) y aguas residuales sintéticas (SW) con la finalidad de estimar la capacidad de estas en la remoción de nutrientes, biofijación del CO<sub>2</sub> y producción de biomasa. En ambos medios de cultivo, los tratamientos con Bl y Sc mostraron una mayor concentración final de biomasa, sin embargo, los valores máximos de la tasa de crecimiento específico no mostraron diferencias significativas entre ninguna de las 4 cepas analizadas, ni entre los 2 medios de cultivo. Finalmente consiguieron que la eliminación de nitrógeno en todos los reactores fuera superior al 90%, excepto para BISW (79%), y para el fósforo, la remoción fue superior al 98% en todos los ensayos.

**Arbib, Ruiz, et al. (2014):** estudiaron la tasa de crecimiento, remoción de nutrientes y biofijación de dióxido de carbono, así como la composición de la biomasa de *Scenedesmus oblicuo* al ser cultivada en aguas residuales a diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo (N:P), de 1:1 a 35:1. Concluyendo al final que la proporción adecuada de N:P para lograr una productividad óptima de biomasa, oscila entre 9 y 13, rango que también sirve para lograr la remoción total de N y P.

**Jeong y Mok (2014):** Investigaron el efecto de la proporción N:P (en un rango de 5 - 30) sobre la productividad de la biomasa con una remoción simultánea de nutrientes de las aguas residuales municipales,

empleando un fotobiorreactor de panel óptico. Los resultados que obtuvieron les permitió afirmar que no existe una fuerte correlación entre la productividad de la biomasa y la remoción del Nitrógeno total, en contraste, la remoción del fósforo total que sí depende de la proporción N:P como de la productividad de la biomasa.

**Carfagna, Salbitani, et al. (2015):** Investigaron los efectos de la escasez de N o S en la microalga *Chlorella sorokiniana* sometida a 24h de inanición, midiendo la glutamina sintetasa (GS) y la O-acetilserina(tiol)lisa (OASTL), los niveles de proteínas y aminoácidos. También, se determinaron los contenidos de almidón, C, N y S totales para evaluar el impacto metabólico relacionado con el metabolismo del carbono (C). Finalmente, demostraron que la privación de nitrógeno o azufre ocasiona una disminución en la tasa de crecimiento y cambios en el volumen promedio de la célula; siendo la privación de nitrógeno, el nutriente de mayor afectación para las proteínas celulares y el contenido total de C.

**Mennaa, Arbib y Perales (2015):** Evaluaron la capacidad de crecimiento en aguas residuales urbanas, de 7 especies de microalgas y una floración algal. De igual manera se probó la cinética de remoción y la cosecha de biomasa por medio de procesos de centrifugación y coagulación-floculación-sedimentación. Sus resultados mostraron una mejor productividad en la biomasa de las floraciones algales y *Scenedesmus obliquus* (118 y 108 mgSS L<sup>-1</sup>d<sup>-1</sup>). Con respecto a la remoción de nutrientes, las microalgas removieron las concentraciones totales de fósforo disuelto y nitrógeno en más del 80% y 87% respectivamente. Finalmente sugirieron que las floraciones algales y *Scenedesmus obliquus* parecen ser los mejores candidatos para crecer en aguas residuales pretratadas, de acuerdo con su producción de biomasa, capacidad de remoción de nutrientes y cosechabilidad.

**Beuckels, Smolders y Muylaert (2015):** Evaluaron en qué medida las microalgas pueden ajustar las concentraciones de N y P en su biomasa de acuerdo al suministro de N y P en las aguas residuales, y en qué medida el suministro de un nutriente influye en la eliminación del otro. Para ello, utilizaron las microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* y, cuantificaron el crecimiento y la composición de la biomasa en un medio con diferentes concentraciones iniciales de N y P. El suministro de nutrientes afectó marginalmente el rendimiento de la biomasa de ambas microalgas, pero tuvo una fuerte influencia en la composición de ella. Las concentraciones de nutrientes en la biomasa oscilaron, para *Chlorella*, entre 5.0 - 10.1% (N) y 0.5 - 1.3% (P) y, para *Scenedesmus*, entre 2.9 - 8.4% (N) y 0.5 - 1.7% (P). Para ambas especies, la concentración de N en la biomasa incrementó con el suministro de N al medio; sin embargo, esta concentración no fue afectada por el suministro de P y en ambos casos, la concentración de P en la biomasa fue alto cuando el suplemento de N fue alto, mientras que fue bajo, si el suplemento de N fue bajo. Por último, sus resultados les permitió concluir que se necesitan concentraciones de N suficientemente altas para asegurar la eliminación efectiva de P de las aguas residuales debido al efecto positivo de N en la acumulación de P.

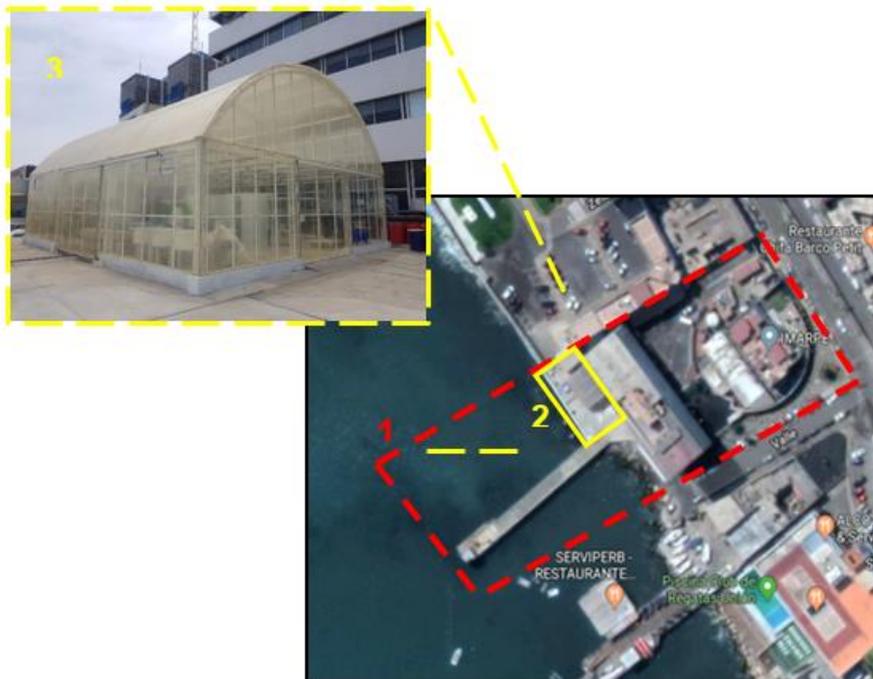
**Chaudhary, Dikshit y Tong (2018):** Resaltaron el uso de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales junto con la absorción de CO<sub>2</sub> y el empleo de biomasa para la producción a escala piloto de biodiesel, biogás, suplementos alimenticios para animales, etc., minimizando así los costos de producción. Esto lo consiguieron realizando cultivos batch de cepas puras de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* empleando un fotobioreactor de columna, suplementado con 5% de CO<sub>2</sub>, 7L de agua residual municipal, en un periodo de 10 días. Finalmente demostraron una reducción de la concentración inicial de amoníaco (43.7 mgL<sup>-1</sup>) se redujo a 2.9 y 3.7 mgL<sup>-1</sup> por *C. vulgaris* y *S. obliquus*,

respectivamente. Y, la concentración inicial de fosfato ( $18.5 \text{ mgL}^{-1}$ ) se redujo a  $1.1$  y  $1.6 \text{ mgL}^{-1}$  por *C. vulgaris* y *S. obliquus*, respectivamente.

## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Lugar de ejecución

Los experimentos fueron desarrollados durante el primer semestre del año 2017, en el laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos del Instituto del Mar del Perú (IMARPE), ubicado entre la Esquina Gamarra y General Valle S/N Chucuito, distrito de La Punta, provincia Callao y departamento de Lima; en coordinación con el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Ricardo Palma, Santiago de Surco - Lima.



Vista extraída de Google Maps.

1) Instalaciones del Instituto del Mar del Perú (IMARPE). 2 y 3) Laboratorio de Invernadero y Sala de Procesos.

## 8.2 Tipo y Diseño de la investigación

De acuerdo al enfoque, corresponde a una investigación cuantitativa con diseño experimental aleatorio simple. Debido a esto, se diseñaron tres controles (C1, C2 y C3) con tres réplicas cada uno y, dos tratamientos (T4 y T5) con cinco réplicas cada uno; donde C1 fue considerado el patrón de medida para fosfatos y nitratos en agua residual; C2, representó el efecto del medio suplementado con Bayfolan sobre la microalga y; C3, el mismo efecto sobre la microalga estresada por limitación de nutrientes. T4, representó el efecto de la microalga en agua residual y T5, el efecto de la microalga estresada en agua residual.

Para el análisis de las variables, se contrastó los grupos C2 y C3 con T4 y T5 para evaluar el crecimiento celular mediante ensayos de densidad celular y biomasa seca y por último, C1, fue contrastado con T4 y T5 para analizar el porcentaje y la tasa de remoción de los nutrientes.

## 8.3 Variables

En el experimento se analizaron 6 variables consideradas como fundamentales para la solución de la hipótesis:

- *Variables independientes:* Limitación de nutrientes (periodo de 72 hrs. en medio carente de N y P).
- *Variables dependientes:* Biomasa, porcentaje promedio final de remoción de nitratos y fosfatos, tasa promedio de remoción de nitratos y fosfatos.

## 8.4 Operacionalización de las variables (OV)

Variable					
Tipo	Nombre	Definición	Naturaleza	Indicador	Autor
Independiente	Limitación de nutrientes	Periodo de 72 hrs previo al ciclo de remoción, en medio carente de N y P. (Sin el nutriente bayfolan en el medio de cultivo)	Cualitativa	----	----
	Biomasa seca	Cantidad de materia algal acumulada	Cuantitativa	$DW (g mL^{-1}) = [m2 (g) - m1 (g)] / 2 mL$	Lee y Shen (Richmond y Hu, 2013)
Dependiente	Porcentaje promedio final de remoción de nitratos	Promedio de la cantidad de nitrato removido, durante el experimento, en relación a la concentración inicial.		$\bar{X} \rightarrow \%R = \left( \frac{C_0 - C}{C_0} \right) x 100$	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2014
	Porcentaje promedio final de remoción de fosfatos	Promedio de la cantidad de fosfato removido, durante el experimento, en relación a la concentración inicial.		$\bar{X} \rightarrow \%R = \left( \frac{C_0 - C}{C_0} \right) x 100$	Gutiérrez <i>et al.</i> , 2014
	Tasa promedio de remoción de nitratos	Promedio de la cantidad de nitrato removido por día.		$\bar{X} \rightarrow R_i = - \frac{C_0 - C_t}{t_0 - t_t}$	Aslan y Kapdan, 2006
	Tasa promedio de remoción de fosfatos	Promedio de la cantidad de fosfato removido por día.		$\bar{X} \rightarrow R_i = - \frac{C_0 - C_t}{t_0 - t_t}$	Aslan y Kapdan, 2006

## 8.5 Metodología

Para el experimento se seleccionó la cepa IMP-BG-249 *Desmodesmus asymmetricus*, la cual fue donada por el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos y proporcionada como inóculo, en fase exponencial, por el Laboratorio de Sala de microalgas del IMARPE, mientras las muestras del efluente fueron proporcionados por la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PETAR) - La Taboada, ubicada en el cruce de las avenidas Néstor Gambeta y Canta (Callao, Lima). Se colectaron, por experimento 50L del efluente, luego fueron trasladados en bidones al IMARPE, donde estuvieron en reposo y oscuridad por un intervalo de 7 días.



**Figura. 1.** Ambientes de cultivo inicial e intermedio y obtención de Agua Residual; a) Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos; b) Laboratorio de Sala de Microalgas; c) Canal de salida, PETAR – La Taboada; d) Bidones en reposo (IMARPE).

Transcurrido el tiempo, en el laboratorio de Invernadero y Sala de procesos del IMARPE, se acondicionaron cultivos discontinuos totalmente al azar, en envases de 7 Litros de acuerdo a las mezclas descritas en la tabla 1, aireación constante mezclado con CO<sub>2</sub>, fotoperiodo 12:12 y por un periodo de 10 días. En los grupos del control 3 y tratamiento 5, el inoculo fue sometido a un periodo de estrés por limitación de nutrientes, este tratamiento se realizó previo a los 10 días de experimentación con fines de obtener una mayor captación de nutrientes en la fase de remediación, y tuvo una duración de 72hrs.

**Tabla 1.** Resumen de los grupos de tratamientos para el efluente de la PTAR Taboada con la microalga *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero.

Grupo	Tratamiento	N° de réplicas
<b>Control 1 (C1)</b>	Agua residual (100%)	3
<b>Control 2 (C2)</b>	Inóculo + agua enriquecida con nutriente foliar Bayfolan® (0,28 mL/L) (1:1)	3
<b>Control 3 (C3)</b>	Inóculo estresado (limitación de nutrientes) + agua enriquecida con nutriente foliar Bayfolan® (0,28 mL/L) (1:1)	3
<b>Tratamiento 4 (T4)</b>	Inoculo + Agua residual (1:1)	5
<b>Tratamiento 5 (T5)</b>	Inoculo estresado (limitación de nutrientes) + agua residual (1:1)	5



**Figura 2.** Preparación de las unidades experimentales; a) Filtración de sólidos suspendidos del agua residual; b) Siembra de las unidades experimentales de acuerdo a la tabla 1; c) Disposición final aleatorizada de las unidades experimentales.

## IX. ANÁLISIS DE DATOS

### 9.1 Caracterización del crecimiento de *Desmodesmus asymmetricus*.

Diariamente, se tomaron muestras de 50 mL de c/u de los envases, con el fin de medir la densidad celular (Cel/mL) por dos métodos: uno de ellos por recuento celular, empleando la cámara de Neubauer y un microscopio óptico (Leica modelo DM1000 LED), con el objetivo de 40X y el segundo método fue por Densidad óptica, dicha medición fue realizada a una longitud de onda de 678 nm en un espectrofotómetro (VARÍAN Cary 50 BIO UV-Visible). Las cuantificaciones fueron realizadas diariamente y por triplicado, solo durante los dos primeros ensayos.

El número de células se estimó con la siguiente ecuación (Aguilar *et al.*, 2011):

$$N_b = \frac{\Sigma Cel. C_b}{4} \times 10^4$$

Donde:

- $N_b$ : Número de células por mL (cel/mL)
- $\Sigma Cel. C_b$ : Suma de las células en los 4 cuadrantes externos de la cámara Neubauer.

Paralelamente a la caracterización del crecimiento de la cepa, se realizó un seguimiento de la producción de la cepa, mediante la biomasa seca ( $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se calculó el peso seco de la muestra (DW), siguiendo el protocolo de Lee y Shen (Richmond y Hu, 2013). Donde, se humedecieron los bordes de los filtros previamente

pesados ( $m_1$ ) (Filtro Whatman GF/F 25 mm) para evitar la difusión del líquido por los márgenes, seguidamente se filtró bajo presión al vacío (35 - 55 mm Hg) 2 mL de la suspensión algal, se enjuagó la biomasa con 1 mL de agua desionizada, se colocaron dichos filtros en placas petri y fueron llevados a secar a una estufa (Memmert modelo UF750) a 95°C durante 4hrs. Finalmente, fueron retirados y colocados en un desecador por 30 min, transcurrido el tiempo, fueron pesados en una microbalanza (KERN modelo ABJ 220-4M) ( $m_2$ ).

Donde:

- $m_1$ : Peso del filtro seco solo
- $m_2$ : Peso del filtro más la muestra seca

Además, diariamente se tomaron datos de pH de los cultivos con un Multiparámetro (WTW modelo 2F40-114B0E), además de la temperatura con un termómetro de columna max/min (TFA modelo 282E) y luminosidad dentro del Invernadero con un luxómetro (Control Company modelo 3252).

## **9.2 Determinación del porcentaje promedio final de remoción de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por *Desmodesmus asymmetricus*, con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.**

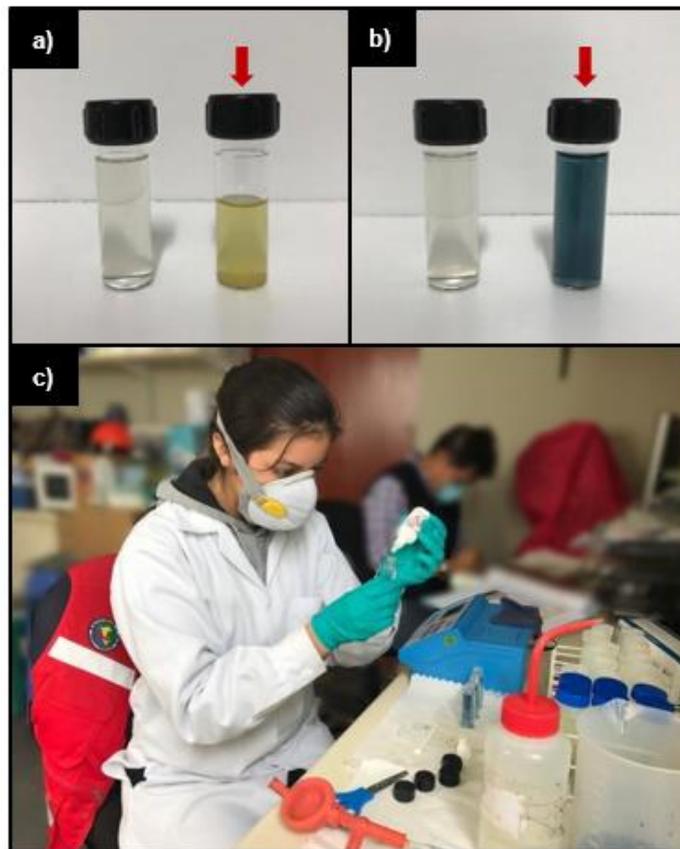
Diariamente, se tomaron 16 mL de cada unidad experimental, de las cuales se midieron las concentraciones de nitratos y fosfatos, empleando el fotómetro multiparámetro (Hanna modelo HI8320), mediante técnicas colorimétricas de reducción por cadmio para el

caso de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) (Fig. 3a) y molibdato para fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (Fig. 3b). Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de remoción según la fórmula ubicada en (Aslan y Kapdan, 2006):

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

Donde:

- $\%R$ : Porcentaje de remoción del nutriente
- $C_0$ : Concentración inicial del nutriente en agua residual
- $C$ : Concentración del nutriente luego del tratamiento.



**Figura 3.** Medición de nitratos y fosfatos (flecha roja, muestra más reactivo. a) Nitratos al iniciar el ensayo; b) Fosfatos al iniciar el ensayo; c) Medición de nitratos y fosfatos en el fotómetro multiparámetro Hanna HI8320.

### **9.3 Determinación de la tasa promedio de remoción diaria de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por *Desmodesmus asymmetricus*, con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.**

Con los datos obtenidos del procedimiento anterior, se determinó la tasa de remoción (Gutiérrez *et al.*, 2014) según la siguiente fórmula:

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

Donde:

- $R_i$ : Tasa de remoción en  $mg.L^{-1}.día^{-1}$
- $C_t$ : Concentración del nutriente en  $t_t$
- $t_0$ : Tiempo inicial (días)
- $t_t$ : Tiempo en el que la concentración del nutriente no cambia significativamente.

#### **Determinación de la proporción N/P.**

Con las mediciones obtenidas del fotómetro se calculó la proporción N/P propuesta por Redfield en 1958.

Para esto se utilizaron las concentraciones de nitrato ( $NO_3^-$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), amonio ( $NH_4^+$ ) y fosfato ( $PO_4^{3-}$ ) en mg/L.

<b>Número de moles de N en:</b>	<b>Número de moles de P en:</b>
<p><b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mol N= 14 g.</li> <li>- 1 mol O= 16 g.</li> <li>- 1 mol de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>= 1N+3O</li> <li>- <u>Proporción de N en NO<sub>3</sub><sup>-</sup></u>  <math display="block">N/(N+3O) = 14/(14+3 \times 16) = 0.226</math> </li> </ul> <p>⇒ (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>mg/L)(0.226mg/L N)</p> <p>⇒ “a” mg/L N</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mmol N= 14mg =&gt; “a”/14</li> </ul> <p>= “x” mmol N</p> <p><b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mol N= 14 g.</li> <li>- 1 mol O= 16 g.</li> <li>- 1 mol de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>= 1N+2O</li> <li>- <u>Proporción de N en NO<sub>2</sub><sup>-</sup></u>  <math display="block">N/(N+2O) = 14/(14+2 \times 16) = 0.3</math> </li> </ul> <p>⇒ (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>mg/L)(0.3mg/L N)</p> <p>⇒ “b” mg/L N</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mmol N= 14mg =&gt; “b”/14</li> </ul> <p>= “y” mmol N</p> <p><b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mol N= 14 g.</li> <li>- 1 mol H= 1 g.</li> <li>- 1 mol de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>= 1N+4H</li> <li>- <u>Proporción de N en NH<sub>4</sub><sup>+</sup></u>  <math display="block">N/(N+4H) = 14/(14+4 \times 1) = 0.8</math> </li> </ul> <p>⇒ (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>mg/L)(0.8mg/L N)</p> <p>⇒ “c” mg/L N</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mmol N= 14mg =&gt; “c”/14</li> </ul> <p>= “z” mmol N</p>	<p><b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mol P= 31 g.</li> <li>- 1 mol O= 16 g.</li> <li>- 1 mol de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>= 1P+4O</li> <li>- <u>Proporción de P en PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></u>  <math display="block">P/(P+4O) = 31/(31+4 \times 16) = 0.326</math> </li> </ul> <p>⇒ (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>mg/L)(0.326mg/L N)</p> <p>⇒ “d” mg/L N</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 1 mmol N= 14mg =&gt; “d”/14</li> </ul> <p>= “w” mmol P</p>

Entonces:

- Nitrógeno total= "x+y+z"
- Fósforo total= "w"

$$\Rightarrow \boxed{N/P = (x+y+z)/w}$$

## X. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La descripción de los datos se efectuó en Excel (versión 2013), utilizando el promedio y la desviación estándar. Con la finalidad de estandarizar las ecuaciones de crecimiento, se correlacionaron los promedios de la densidad celular (cel/mL) y peso seco (g/L) con la densidad óptica (nm) calculándose los índices de correlación de Pearson (r) mediante una regresión lineal. En cuanto a los ensayos de remoción, se relacionaron los promedios de la concentración de nitratos y fosfatos con respecto al tiempo de cultivo a fin de obtener la tendencia de la remoción.

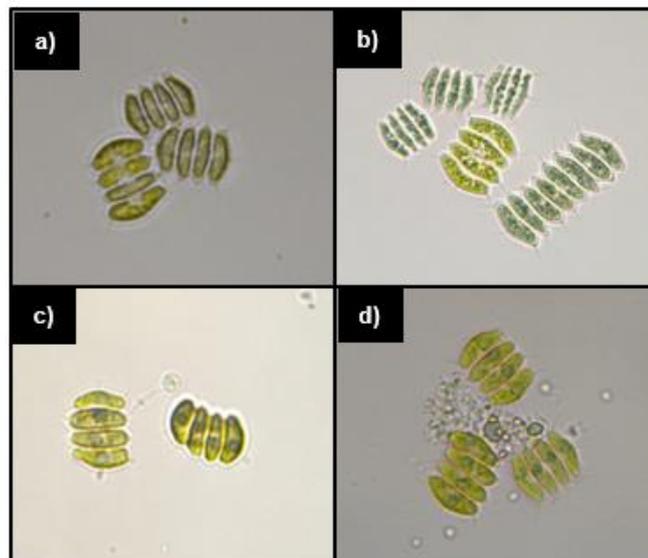
Así mismo, a través del programa estadístico, Minitab 16, se evaluó la normalidad mediante la prueba de Anderson-Darling, y la homocedasticidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Según las características de los datos, se utilizaron pruebas paramétricas (ANDEVA) y no paramétricas (Kruskal-Wallis) para analizar el efecto de la limitación de nutrientes, considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$  para todos los ensayos.

# XI. RESULTADOS

## 11.1 Crecimiento de *Desmodesmus asymmetricus* en aguas residuales

Las condiciones del invernadero registraron promedios de temperatura de  $25.0 \pm 2.8$  °C y luminosidad de  $16195 \pm 8421.4$  Lux. Por otro lado, el pH de los cultivos, mostró diferencias ( $p=0.000$ ); se registró  $7.1 \pm 0.3$  y  $7.2 \pm 0.2$  en los controles C2 y C3, mientras que  $8.2 \pm 0.2$ ,  $8.3 \pm 0.4$  y  $8.5 \pm 0.4$  en el control C1 y los tratamientos T4 y T5, respectivamente.

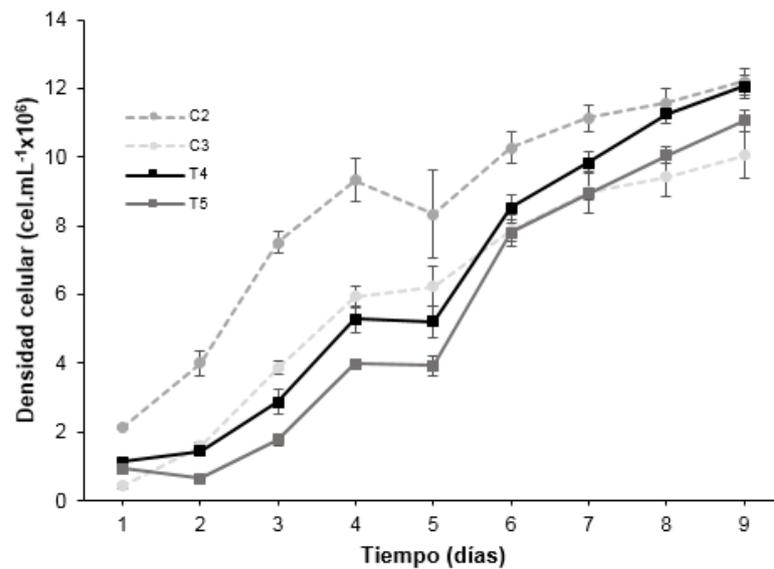
Además, durante la etapa de crecimiento, no se vio afectada la morfología de las células estresadas, tanto por limitación de nutrientes como por el agua residual; con respecto a las células del control (Fig. 4).



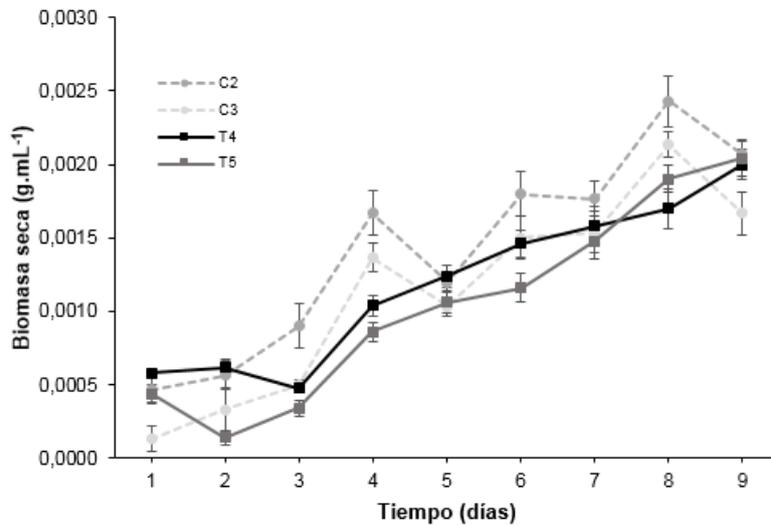
**Figura 4.** Morfología de las células en el día 10 de tratamiento (40x). a) Control 2; b) Control 3; c) Tratamiento 4; d) Tratamiento 5.

Con los resultados obtenidos en los dos primeros ensayos de densidad óptica, densidad celular y biomasa seca, se realizó un análisis de regresión lineal, dónde finalmente se observó una correlación directa significativa entre la densidad óptica y el crecimiento de la microalga, tanto al ser evaluado como densidad celular ( $r=9.89$ ;  $p<0.001$ ) y como biomasa seca ( $r=9.89$ ;  $p<0.001$ ). De esta manera se pudo ajustar los datos al modelo lineal para los posteriores ensayos (ver anexo 01).

Al graficar los datos de densidad celular y biomasa seca de los grupos experimentales, se evidenció el crecimiento con una tendencia exponencial (Fig.5 y Fig. 6)



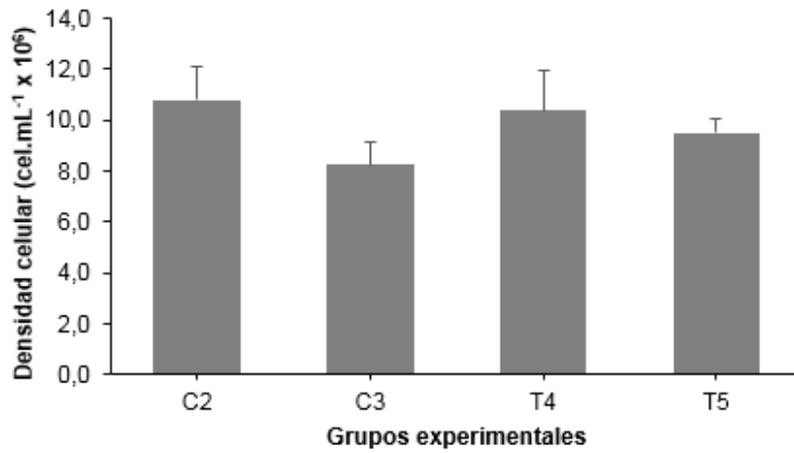
**Figura 5.** Comparación de las densidades celulares de los grupos experimentales de *D. asymmetricus* (barras verticales indican variación de la desviación estándar).



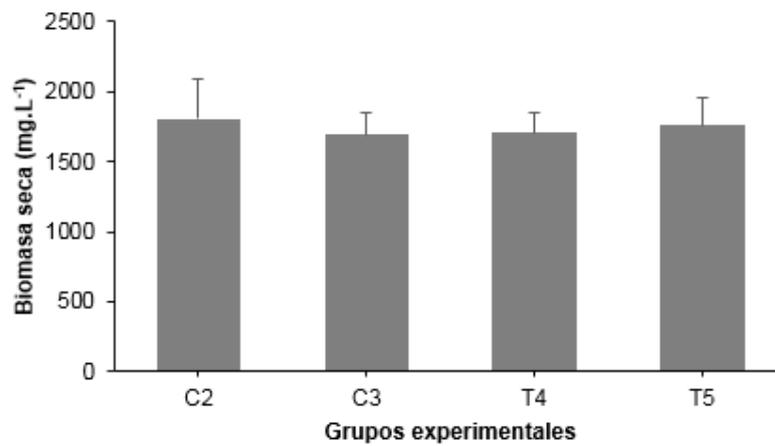
**Figura 6.** Comparación de la biomasa seca en los grupos experimentales de *D. asymmetricus* (barras verticales indican variación de la desviación estándar).

Al realizar la evaluación entre todos los ensayos (ANDEVA), con respecto a la densidad celular, no mostraron diferencias significativas entre los grupos controles y los tratamientos ( $p=0.406$ ); sin embargo, se pudo observar el incremento de las densidades celulares con respecto al valor inicial de la siguiente manera, en C2, incrementó en casi 10 veces su concentración celular ( $10.82 \pm 2.28 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ), seguido de T4 con un aumento de 9 veces más ( $10.37 \pm 2.78 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ), luego T5 que logró un incremento de más de 7 veces ( $9.51 \pm 0.93 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ) y finalmente C3 ( $8.27 \pm 1.78 \times 10^6 \text{ cel.mL}^{-1}$ ) Fig. 7.

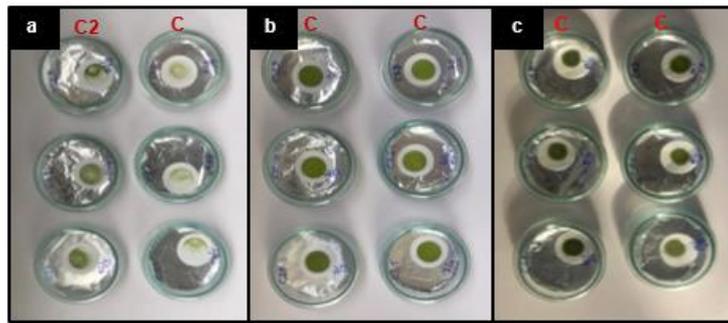
De igual manera con la biomasa seca, no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p=0.972$ ). Los valores en orden decreciente fueron los siguientes: C2=  $1\ 807.8 \pm 477.5 \text{ mg.L}^{-1}$ , T5=  $1\ 759.1 \pm 342.6 \text{ mg.L}^{-1}$ , T4=  $1\ 701.3 \pm 263.8 \text{ mg.L}^{-1}$  y, C3=  $1\ 688.3 \pm 268.3 \text{ mg.L}^{-1}$ , Fig. 8.



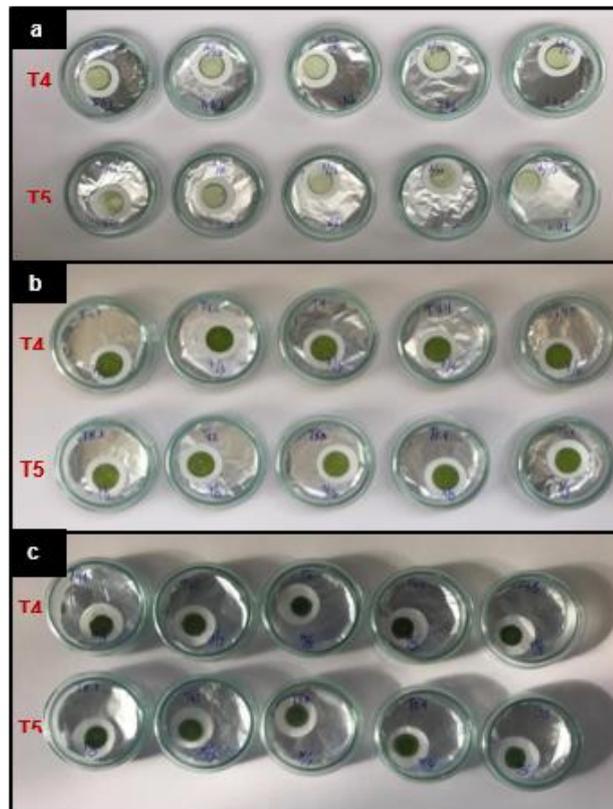
**Figura 7.** Promedio de la densidad celular de *D. asymmetricus* cultivada en condiciones de invernadero (Líneas verticales indican variación de la desviación estándar).



**Figura 8.** Promedio de la biomasa seca de *D. asymmetricus* cultivada en condiciones de invernadero (Líneas verticales indican variación de la desviación estándar).



**Figura 9.** Seguimiento de la biomasa seca del grupo control de *D. asymmetricus*, cultivado a condiciones de invernadero. a) día 2; b) día 5; c) día 10.



**Figura 10.** Seguimiento de la biomasa seca de los tratamientos de *D. asymmetricus* cultivados a condiciones de invernadero. a) día 2; b) día 5; c) día 10.

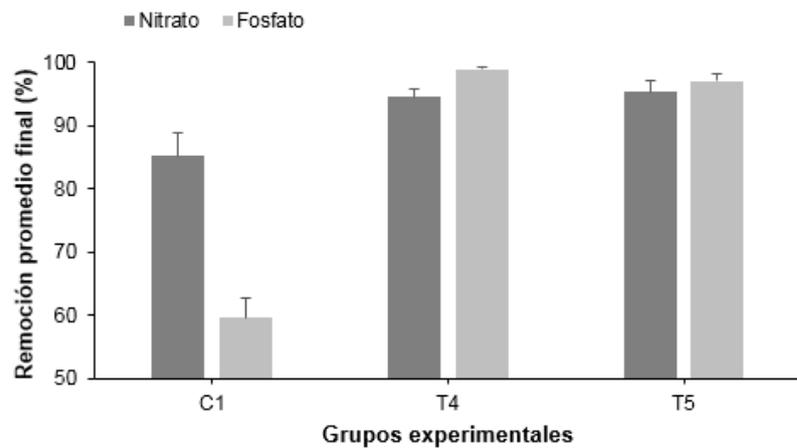
## 11.2 Determinación del porcentaje promedio final de remoción de nitratos y fosfatos de las aguas residuales

por *Desmodemus asymmetricus*, con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.

El porcentaje de remoción final de nitratos y fosfatos, demostró que el cultivo de *Desmodemus asymmetricus* tiene una alta capacidad de absorción, llegando a remover más del 90%, siendo la mayor remoción la de los fosfatos, con más del 97%.

**Tabla 2.** Remoción promedio final de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en términos porcentuales (%).

Grupos experimentales	Remoción (%)	
	$\text{NO}_3^-$	$\text{PO}_4^{3-}$
<b>C1</b>	85.2 ± 10.9	59.6 ± 8.9
<b>T4</b>	94.6 ± 4.3	98.9 ± 1.4
<b>T5</b>	95.4 ± 5.7	97.1 ± 4.2



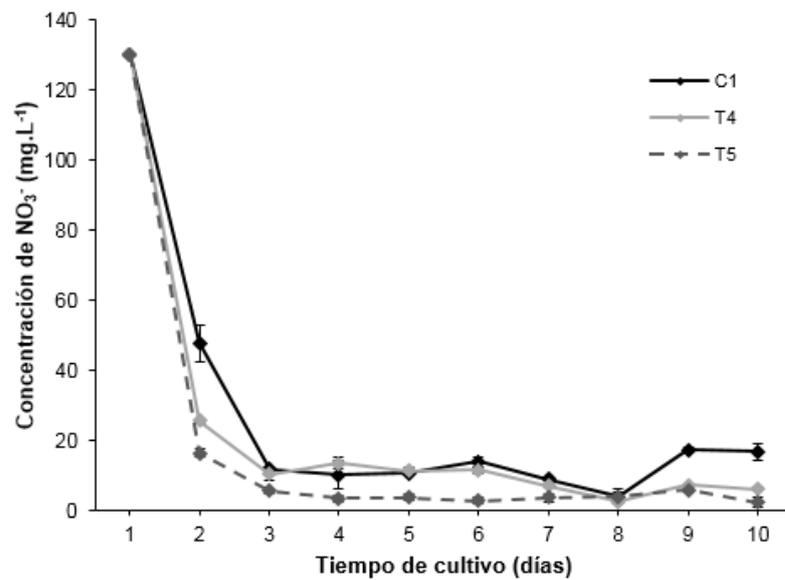
**Figura 11.** Promedio final de la remoción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) con cultivo de *D. asymmetricus*. (Líneas verticales indican variación de la desviación estándar)

Las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), en todos los grupos experimentales, registraron una caída abrupta de más del 90% al tercer día de experimentación, con diferencias significativas ( $p=0.024$ ). En T5 se obtiene la menor concentración del nutriente ( $5.6 \pm 1.38 \text{ mg.L}^{-1}$ ) seguido del T4 ( $10.5 \pm 3.22 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y finalmente C1 ( $11.8 \pm 0.07 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

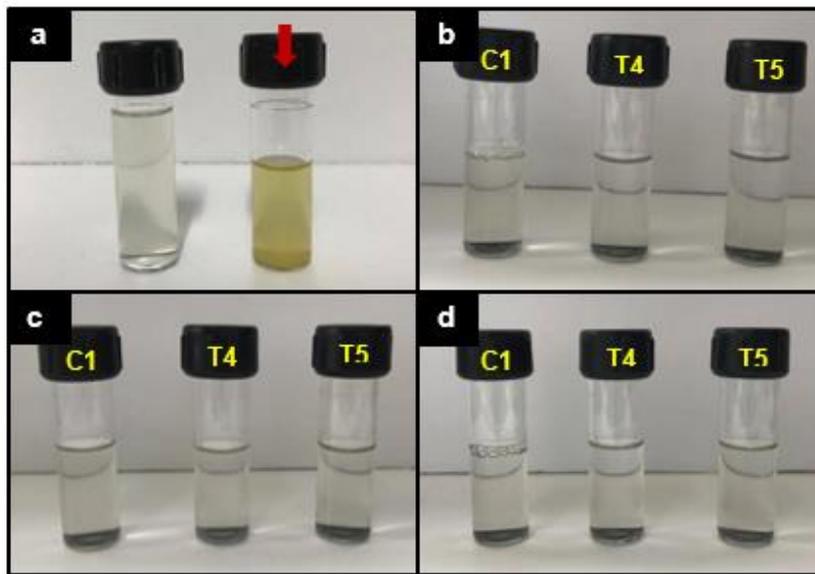
A partir del cuarto día, la tendencia de la remoción se mantuvo constante hasta el último día de experimentación, presentándose sólo variación estadística con respecto al control, más no entre los tratamientos (C1=  $16.8 \pm 3.54 \text{ mg.L}^{-1}$ ; T4=  $6.1 \pm 1.14 \text{ mg.L}^{-1}$ ; T5=  $2.4 \pm 2.81 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $p=0.000$ ) (Fig. 12).

**Tabla 3.** Remoción diaria de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ).

Día	Concentración					
	(mg.L <sup>-1</sup> )			(%)		
	C1	T4	T5	C1	T4	T5
1	130.1	130.1	130.1	100.0	100.0	100.0
2	47.8	25.5	16.3	36.8	19.6	12.5
3	11.8	10.5	5.6	9.0	8.0	4.3
4	10.3	13.6	3.5	7.9	10.4	2.7
5	10.7	11.3	3.8	8.2	8.7	2.9
6	14.0	11.6	2.9	10.8	8.9	2.2
7	9.0	7.1	3.6	6.9	5.5	2.8
8	3.9	2.6	4.0	3.0	2.0	3.1
9	17.4	7.3	6.0	13.3	5.6	4.6
10	16.8	6.1	2.4	12.9	4.7	1.8



**Figura 12.** Promedio de remoción diaria de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua residual, PTAR-Taboada, tratada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero. (Barras verticales indican variación del error estándar).



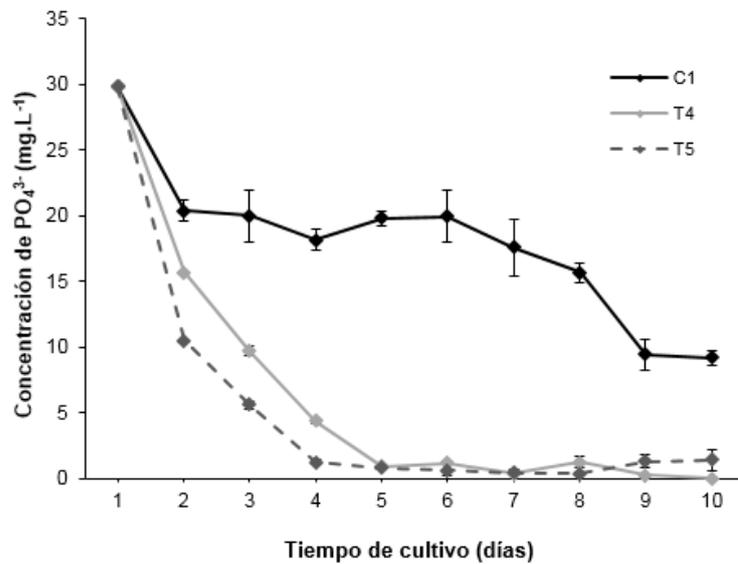
**Figura 13.** Evolución de la remoción de las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua residual de PTAR- Taboada, tratada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero. Flecha roja indica, muestra más reactivo. a) día 1; b): día 4; c): día 8; d): día 10.

En relación a las concentraciones de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), se presentó la misma tendencia que en el caso de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), hubo una disminución de las concentraciones hasta el tercer día, con diferencias significativas entre los grupos experimentales. La máxima remoción (81%) la presentó T5 y la mínima (30%), el grupo control, ( $\text{C1} = 20 \pm 3.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{T4} = 9.7 \pm 0.83 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{T5} = 5.6 \pm 0.73 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $p=0.005$ ).

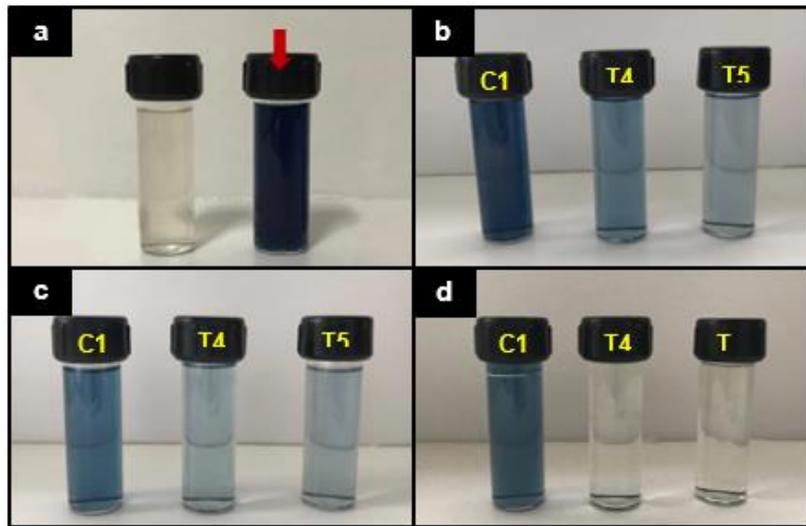
Posteriormente, del cuarto al décimo día, la reducción se volvió constante, con diferencias entre el grupo control y los tratamientos, destacando T4 por presentar el 100% de la remoción ( $\text{C1} = 9.2 \pm 0.95 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{T4} = 0 \pm 0.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $\text{T5} = 1.4 \pm 1.75 \text{ mg.L}^{-1}$ ;  $p= 0.007$ ) (Fig. 14).

**Tabla 4.** Remoción diaria de las concentraciones de nitrato (NO<sub>3</sub>)

DÍA	Concentración					
	(mg.L <sup>-1</sup> )			(%)		
	C1	T4	T5	C1	T4	T5
1	29,8	29,8	29,8	100,0	100,0	100,0
2	20,4	15,7	10,5	68,3	52,6	35,2
3	20,0	9,7	5,6	67,0	32,4	18,8
4	18,2	4,4	1,2	61,0	14,6	4,2
5	19,8	0,9	0,8	66,4	3,2	2,8
6	19,9	1,2	0,6	66,9	4,0	2,1
7	17,6	0,4	0,5	58,9	1,3	1,5
8	15,7	1,3	0,4	52,6	4,2	1,3
9	9,4	0,2	1,3	31,7	0,7	4,3
10	9,2	0,0	1,4	30,9	0,0	4,8



**Figura 14.** Promedio de remoción diaria de fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) en agua residual, PTAR-Taboada, tratada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero. (Barras verticales indican variación del error estándar).



**Figura 15.** Evolución de la remoción de las concentraciones de fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en agua residual de PTAR- Taboada, tratada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero. Flecha roja indica, muestra más reactivo. a) día 1; b): día 4; c): día 8; d): día 10.

### Determinación de la proporción N/P

Con las concentraciones de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en mg/L y las ecuaciones propuestas en la metodología, se determinó lo siguiente:

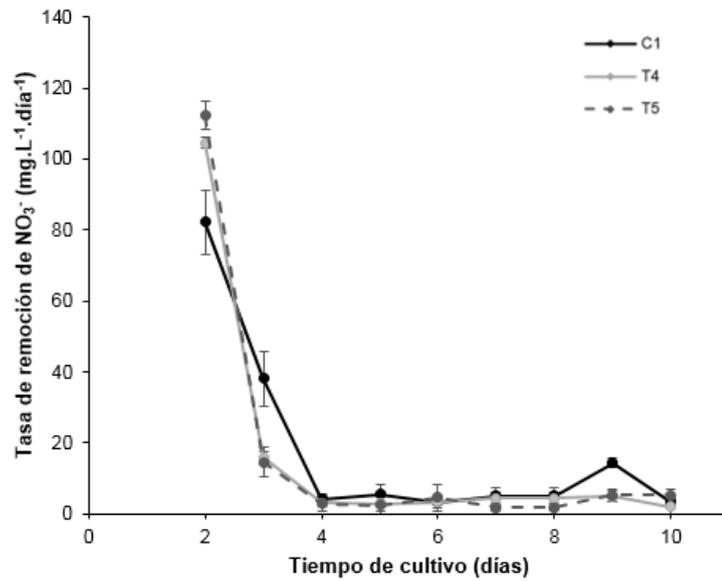
	<b>TN</b>	$2.1 + 0.9 + 0.7 = 3.7$
	<b>TP</b>	<b>0.32</b>
	<b>N/P</b>	$3.7/0.32 = 11.6$
La proporción es		<b>Medio nitrógeno limitado</b>

### 11.3 Determinación de la tasa promedio de remoción diaria de nitratos y fosfatos de las aguas residuales por *D. asymmetricus*, con y sin tratamiento de limitación de nutrientes.

Al efectuarse el Test de Kruskal-Wallis, se evidenció que los grupos experimentales no presentaron diferencias significativas con respecto a la tasa de remoción de nitratos y fosfatos ( $p=0.381$ ;  $p=0.964$ , respectivamente), (Tabla 5 y 6); sin embargo, en relación a los días, se apreció mayor velocidad de absorción hasta el tercer día, en ambos nutrientes.

**Tabla 5.** Promedio y desviación estándar de la tasa de remoción diaria de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en  $\text{mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , durante un periodo de 10 días de remoción. ( $p=0.032$ )

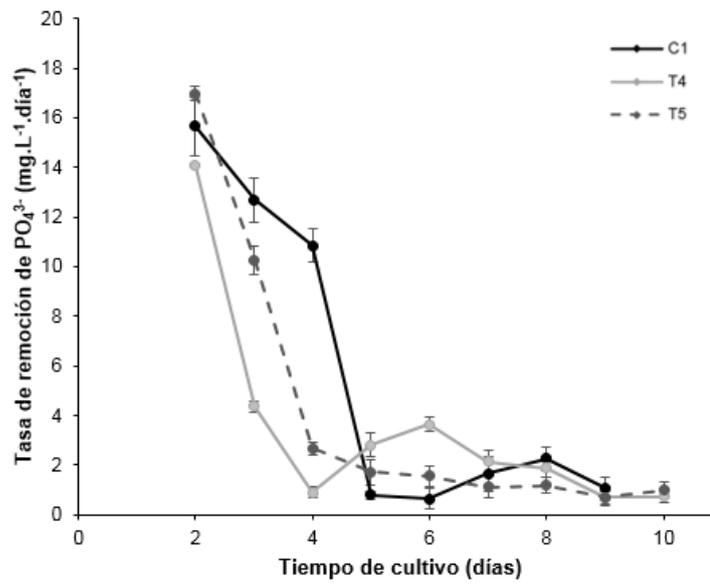
DÍA	Control 1	T4	T5	Z
2	82.27 ± 9.07	104.58 ± 1.71	112.24 ± 3.93	2.78
3	38.13 ± 7.72	16 ± 1.75	14.6 ± 4.22	2.08
4	4.13 ± 1.55	3.13 ± 1.20	2.93 ± 2.27	-1.43
5	5.53 ± 2.78	2.93 ± 2.08	2.53 ± 3.61	-0.96
6	3.33 ± 1.46	3.28 ± 0.82	4.65 ± 3.86	-0.85
7	5.07 ± 2.36	4.52 ± 1.49	1.72 ± 0.82	-0.93
8	5.07 ± 2.36	4.52 ± 1.49	1.90 ± 0.44	-0.85
9	14.40 ± 1.27	4.93 ± 1.55	5.28 ± 1.64	0.96
10	3.45 ± 0.92	2.06 ± 2.05	5.28 ± 1.64	-0.81



**Figura 16.** Promedio de la tasa de remoción diaria de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) en agua residual de la PTAR-Taboada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).

**Tabla 6.** Promedio y desviación estándar de la tasa de remoción diaria de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en  $\text{mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , durante un periodo de 10 días de remoción. ( $p=0.046$ )

DÍA	Control 1	T4	T5	Z
2	0.00 ± 0.00	14.08 ± 0.13	16.96 ± 0.62	2.21
3	15.67 ± 2.06	4.36 ± 0.49	10.26 ± 1.32	2.05
4	12.70 ± 1.27	0.90 ± 0.51	2.68 ± 0.51	0.44
5	10.85 ± 0.92	2.80 ± 1.06	1.72 ± 1.12	1.00
6	0.80 ± 0.26	3.65 ± 0.61	1.56 ± 0.95	-0.44
7	0.65 ± 0.74	2.15 ± 0.90	1.12 ± 1.03	-1.24
8	1.65 ± 1.26	1.89 ± 0.78	1.20 ± 0.65	-0.36
9	2.27 ± 0.85	0.71 ± 0.56	0.72 ± 0.74	-1.57
10	1.10 ± 0.69	0.75 ± 0.58	1.00 ± 0.74	-1.73



**Figura 17.** Promedio de la tasa de remoción diaria de fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) en agua residual de la PTAR-Taboada con cultivo de *D. asymmetricus* en condiciones de invernadero (Barras verticales indican variación de la desviación estándar).

## XII. DISCUSIÓN

La curva del crecimiento microalgal representa la evolución del número de células viables presentes en un cultivo a lo largo del tiempo de estudio, por eso la cuantificación de forma exacta y efectiva, es importante para la mayoría de estudios de fisiología y biotecnología algal (Griffiths *et al.*, 2011), para su realización, existen numerosas metodologías que pueden ser tediosas y difíciles de automatizar, por ejemplo el conteo celular por microscopia, peso seco o por determinación de biomoléculas. Es así, que en este estudio se buscó optimizar el monitoreo del crecimiento de la cepa *D. asymmetricus*, obteniendo ecuaciones predictivas del crecimiento microalgal mediante la relación entre la densidad celular, biomasa seca y absorbancia de cultivo ( $DO_{678}$ ), los cuales obtuvieron una correlación directa significativa entre la Densidad óptica y el crecimiento de la microalga, tanto al ser evaluado como densidad celular ( $r = 9.89$ ;  $p < 0.001$ ) y como Biomasa seca ( $r = 9.89$ ;  $p < 0.001$ ).

En estudios realizados con microalgas marinas (*Nannochloropsis oculata*, *N. salina*, *N. oceánica*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Cylindrotheca fusiformis*), donde se compararon tres métodos cuantitativos, también se determinó a la densidad óptica como la mejor alternativa para medir la biomasa algal, encontrando altas correlaciones entre ésta, la densidad celular y la biomasa, con ajustes lineales (99%) a una longitud de onda de 750 nm (Lu *et al.*, 2017). Otros estudios con cepas dulceacuícolas y empleando diferentes longitudes de onda, 680 nm (*Scenedesmus quadricauda*, *S. obliquus*, *S. dimorphus*, *Scenedesmus sp.*, *Chlorella zofingiensis*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp.*) y 600 nm (*Chlorella vulgaris*), también encontraron buenas correlaciones utilizando la densidad óptica,  $R^2 = 98-99\%$  y  $99\%$  (Huo *et al.*, 2015; Rashid *et al.*, 2015). Esto puede explicarse por la variación en el contenido del pigmento celular debido al tiempo de cultivo o las

condiciones de crecimiento; una investigación determinó que los errores son mayores si se utilizan longitudes de ondas dentro del rango máximo de absorbancia del mayor pigmento (Clorofila a) por lo cual recomendaron el empleo de 750 nm ya que se encuentra fuera del rango de absorbancia, aseguraron también que se obtienen buenos resultados a 680 nm, longitud cercana a la del presente estudio, si las concentraciones del pigmento son altas, (Griffiths *et al.*, 2011).

El pH es un parámetro relacionado con el crecimiento celular. En la presente investigación, se registraron diferencias significativas entre los pH neutros de los grupos C2 ( $7.1 \pm 0.3$ ) y C3 ( $7.2 \pm 0.2$ ), con respecto a los alcalinos de los grupos C1 ( $8.2 \pm 0.2$ ), T4 ( $8.3 \pm 0.4$ ) y T5 ( $8.5 \pm 0.4$ ). Se conoce que la neutralidad es una característica de la mayoría de especies de microalga, sin embargo, en un medio de cultivo de agua residual se produce un aumento gradual del pH debido al efecto sobre el equilibrio de especies carbonatadas en el agua, esto se explica durante la asimilación de CO<sub>2</sub> en la fase luminosa de la fotosíntesis (García-Gozalbes, Arbib, *et al.*, 2015). Este comportamiento fue similar al de otro estudio en el que se aprovecharon las floraciones microalgales del agua residual; en este se reportó un ligero aumento durante los primeros cuatro días, de aproximadamente 7.5 a 8.3, lo que también justifican que podría deberse a la captación de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis de algas (Su y Mennerich, 2012).

Por investigaciones pasadas se conoce que la limitación de nutrientes (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) induce cambios metabólicos y fisiológicos en la célula microalgal (Hernandez *et al.*, 2005). En este estudio, la decoloración inicial observada en los cultivos de C3 y T5 fueron, según Grobbelaar, una respuesta típica a la limitación de nitrógeno (Richmond y Hu, 2013). Esto debido a un proceso de aclimatación celular, en el cual al degradarse los ribosomas y las proteínas, disminuyen las actividades enzimáticas (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) implicadas en el ciclo de fijación fotosintética del carbono, provocando así una

degradación del fotosistema II (PSII) y por ende una disminución en el contenido de clorofila (Carfagna *et al.*, 2015).

La máxima producción alcanzada por *Desmodesmus asymmetricus* en relación a los tratamientos, fue en T5 ( $1\ 759.1 \pm 342.6\ \text{mg.L}^{-1}$ ), un valor ligeramente mayor que T4 ( $1\ 701.3 \pm 263.8\ \text{mg.L}^{-1}$ ), ambos con un N/P de 11.6; sin embargo estos valores no se diferenciaron significativamente entre sí, ni con respecto a los controles; esto podría atribuirse a la alta variabilidad en los análisis de biomasa, que se debió a la formación de agregados. Un estudio previo (Arbib *et al.*, 2014), empleó una especie de la misma familia, *Scenedesmus obliquus*, pero sin condiciones de estrés por limitación de nutrientes, no obstante la biomasa reportada fue ligeramente menor ( $1\ 684 \pm 105\ \text{mg.L}^{-1}$ ). En otro estudio con *Scenedesmus obliquus* (Arbib *et al.*, 2013), se señaló que para obtener una óptima productividad en aguas residuales (entre  $1\ 661.0 \pm 32\ \text{mg.L}^{-1}$  y  $2\ 429.6 \pm 114.2\ \text{mg.L}^{-1}$ ), la proporción de N/P debería variar entre 9 y 13 respectivamente, rango que incluye a los valores alcanzados en la presente investigación con *Desmodesmus asymmetricus*. Asimismo, la producción de biomasa de este estudio, no difirió significativamente a lo reportado como una biomasa óptima y mejorada por *Chlorella vulgaris* ( $2\ 000\ \text{mg.L}^{-1}$  aprox.) con N/P entre 11-19 (Jeong y Mok, 2014), estos autores fundamentaron sus resultados indicando que un mayor contenido de fósforo en el medio, favorece a la productividad de la biomasa más que un mayor contenido de nitrógeno, característica presentada en esta investigación al trabajar con aguas residuales nitrógeno limitadas (N/P 11.6); para complementar esta idea, una experimentación que empleó un cultivo mixto de microalgas (Prathima *et al.*, 2012) concluyó que un mayor crecimiento en la biomasa se obtuvo en medios de agua residual enriquecidos en fósforo (P=  $1\ 640\ \text{mg.L}^{-1}$ , N+P=  $1\ 690\ \text{mg.L}^{-1}$ , C+P=  $1\ 320\ \text{mg.L}^{-1}$ , C+N+P=  $1\ 200\ \text{mg.L}^{-1}$ ) y esto podría deberse a la participación del fósforo en su forma inorgánica en la formación de ATP ya que el fosfato que constituye el

ATP proporciona la energía necesaria para las actividades metabólicas y, por lo tanto, apoya un mayor crecimiento.

*Desmodesmus asymmetricus* demostró ser un buen agente remediador, al presentar una alta capacidad en el proceso de remoción de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). No hubo diferencia significativa entre la remoción de los tratamientos, pero se resalta a T5 por presentar la mayor remoción de  $\text{NO}_3^-$  ( $95.4 \pm 5.7\%$ ), y por ser el tratamiento con la mejor tasa de remoción a corto plazo (día 2) para ambos nutrientes ( $\text{NO}_3^-$ :  $112.24 \pm 3.93$  y,  $\text{PO}_4^{3-}$ :  $16.96 \pm 0.62 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ ); no obstante, para el caso de  $\text{PO}_4^{3-}$ , T4 fue el de mayor remoción ( $98.9 \pm 1.4\%$ ). Se reportaron menores valores en estudios previos; (Jeong y Mok, 2014) demostraron, con *Chlorella vulgaris*, un 82% de remoción del nitrógeno total, sugiriendo una óptima remoción cuando las proporciones N/P estuvieron entre 11 y 30, rango que incluye a la proporción de esta investigación; y a su vez, en otro estudio con *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*, al trabajar con el mismo periodo de remoción (10 días) pero menor N/P (2.3), se reportó también menores porcentajes ( $\text{NH}_3\text{-N}$ : 93.4%;  $\text{PO}_4^{3-}$ : 94.1% y,  $\text{NH}_3\text{-N}$ : 91.5%;  $\text{PO}_4^{3-}$ : 91.3%, respectivamente) (Chaudhary *et al.*, 2018).

Sin embargo, también cabe destacar la presencia de remoción, relativamente menor, en el grupo control ( $\text{NO}_3^- = 85.2 \pm 10.9\%$  y,  $\text{PO}_4^{3-} = 59.6 \pm 8.9\%$ ), esto debido a la floración natural de algas, al sexto día de ensayo, por las condiciones enriquecidas del medio, más conocido como el fenómeno de eutrofización (Bulent *et al.*, 2013; Lapoine *et al.*, 2015); similar a lo realizado por (Mennaa *et al.*, 2015) quien también obtuvo floraciones algales mediante la incubación de aguas residuales urbanas asentadas en las mismas condiciones que el resto de los inóculos de microalgas, esto para un estudio de crecimiento.

El proceso de remoción registró dos fases, una inicial que duró los tres primeros días, donde se absorbió casi el 90% de la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  y más del 90% de la de  $\text{NO}_3^-$ . En ambos casos, se diferenció el tratamiento con algas estresadas (T5) por ser el de mayor absorción,

disminuyendo a una concentración de  $5.6 \pm 0.73 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $5.6 \pm 1.38 \text{ mg.L}^{-1}$  respectivamente. Algunos estudios previos podrían sustentar esta tendencia, (Jansson, 1993), ya que al experimentar sobre la absorción del  $\text{PO}_4^{3-}$  se demostró que la captación del nutriente avanza a dos velocidades diferentes en la fase inicial, una tasa inicial rápida (HA: sistema de alta afinidad) seguida de una absorción posterior más lenta (LA: sistema de baja afinidad), donde el fósforo se fija primero a la célula por el sistema HA en forma intercambiable, después de lo cual el sistema LA mantiene la transferencia interna, transformando el fósforo en forma no intercambiable.

Además, una experimentación que también estudió la privación de nutrientes en la remoción del fósforo (Hernandez *et al.*, 2005), reportó que después de las 48 hrs. las células estresadas de *Chlorella vulgaris* absorbieron más fósforo que las no estresadas, lo que se observó desde las 24 hrs. en esta investigación con *Desmodesmus asymmetricus*; esto podría deberse a que durante un período de inanición, se disminuye el polifosfato inorgánico de las células por lo que una saturación rápida de  $\text{PO}_4^{3-}$ , sería la respuesta para la acumulación de polifosfatos. La fase final en ambos tratamientos se caracterizó por mostrar una remoción constante pero menor a la inicial; en esta fase la remoción no presentó diferencias significativas, sin embargo T5 presentó la menor concentración final de  $\text{NO}_3^-$  ( $2.4 \pm 2.81 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y T4 presentó una remoción total de los  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $0 \pm 0.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Esta tendencia en las fases fue similar a un estudio de también 10 días, reportado en *Chlorella* sp. inmovilizada, con concentraciones finales parecidas a los de esta investigación ( $\text{N-NO}_3^-$ :  $2.25 \pm 0.65 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ :  $0.29 \pm 0.05 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (Ávila, 2015), sin embargo, el mencionado estudio trabajó con aguas residuales de baja concentración inicial ( $5.06 \pm 0.03$  y  $1.00 \pm 0.04 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente). Del mismo modo, (Arbib *et al.*, 2013), señalaron que al igual que en la biomasa, una proporción óptima

de N/P entre 9 y 13, en *Scenedesms obliquus*, produce una eliminación simultánea y eficiente de nitrógeno y fósforo, cumpliendo con los límites de descarga a las 100 hrs. ( $10 \text{ mg.L}^{-1}$  y  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ , respectivamente); en la presente investigación, T5 superó el límite de  $\text{NO}_3^-$  ( $5.6 \pm 1.38 \text{ mg.L}^{-1}$ ) a las 72 hrs y alcanzó una concentración similar  $\text{PO}_4^{3-}$  también en un promedio de 100 hrs.

## XIII. CONCLUSIONES

De la presente investigación se concluye que:

- La microalga *Desmodesmus asymmetricus* demuestra un buen crecimiento celular al ser cultivada por un periodo de 10 días en agua residual diluida 1:1 (agua residual doméstica: inóculo) y, en condiciones de invernadero. Esto fue respaldado por la curva de crecimiento con tendencia exponencial hasta el final de la experimentación.
- La tendencia del crecimiento celular fue evidenciado en una densidad celular de  $10.37 \pm 2.78 \times 10^6$  cel.mL<sup>-1</sup> en el Tratamiento 4 (T4), equivalente a un aumento de 9 veces el valor inicial; así mismo el Tratamiento 5 (T5) obtuvo uno de los mayores valores de biomasa algal, alcanzando los  $1\ 759 \pm 342.6$  mg.L<sup>-1</sup>; sin embargo, en ambas pruebas, no se registraron diferencias significativas entre los grupos experimentales y los grupos controles.
- Las ecuaciones lineales determinadas en el presente estudio por la técnica de espectrofotometría, se pueden emplear para estimar la densidad celular y la productividad de *Desmodesmus asymmetricus*.
- *D. asymmetricus* demostró su capacidad potencial de remediador en aguas residuales domésticas nitrógeno limitadas (N/P=11.6), al remover más del 90% de la concentración de los nutrientes, indistintamente del tratamiento experimental. Siendo, el mayor porcentaje promedio de remoción final para NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en el Tratamiento

5 (T5) ( $95.4 \pm 5.7\%$ ), mientras que para  $\text{PO}_4^{3-}$  en el Tratamiento 4 (T4) ( $98.9 \pm 1.4\%$ ).

- El tratamiento de limitación de nutrientes de 72 horas no ocasionó efectos significativos sobre la capacidad de remoción de la microalga.
- No existe variación significativa con respecto a la tasa de remoción entre los grupos experimentales, sin embargo, en relación a los días experimentación, se observó diferencia significativa en la velocidad de remoción hasta el tercer día, para ambos nutrientes ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ).
- La mayor tasa promedio de remoción diaria para  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  se obtuvo al segundo día de experimentación por el Tratamiento 5 (T5) con  $112.24 \pm 3.93 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$  y,  $16.96 \pm 0.62 \text{ mg.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ , respectivamente.

## XIV. RECOMENDACIONES

La principal limitación al ejecutar este estudio fue la disponibilidad del material biológico, específicamente, el agua residual. En el desarrollo de esta tesis se reportó la importancia de ejecutar investigaciones y tecnologías para la calidad del agua, por lo cual las casas de estudios deberían incentivar proyectos acordes a esta temática, buscando aliarse o ejecutar convenios con organismos como SEDAPAL y las PTAR bajo su cargo, para facilitar el acceso y/o disponibilidad de los volúmenes necesarios del material (agua residual) con fines de investigación y desarrollo.

Finalmente, se deberían investigar y desarrollar otras metodologías con un mayor control en el proceso del estrés por limitación de nutrientes de las microalgas para verificar la influencia existente sobre la remoción.

## XV. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abdel-Raouf N, Al-Homaidan A, Ibraheem I. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences. 2012; 19: 257–275.
2. Abinandan S. and Shanthakumar S. Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment: A review. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2015; 52: 123–132.
3. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18ava Edición. 1992
4. APHA, AWWA, WEF. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20ava Edición. 1998
5. Arbib, Z; Ruiz, J; Álvarez-Díaz, P; Garrido-Pérez, C; Barragan, J; Perales, J.A. Photobiotreatment: influence of nitrogen and phosphorus ratio in wastewater on growth kinetics of *Scenedesmus obliquus*. International Journal of Phytoremediation. 2014; 15(8): 774-788.
6. Arbib, Z; Ruiz, J; Álvarez-Díaz, P; Garrido-Pérez, C; Perales, J.A. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO<sub>2</sub> bio-fixation and low cost biofuels production. Water Research. 2014; 49: 465-474.
7. Arnáiz, F. Experimentos para el Laboratorio de Química Inorgánica Verde. 1era Edición. 2014.
8. Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecol. Eng. 2006; 28: 64–70.
9. Ávila J. 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 Licenciatura].

Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. 2015

10. Bahadar A, Khan M. Progress in energy from microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 27. 2013; 128–148.
11. Barsanti L. y Gualtieri P. *Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 2da edición. CRC Press. 2014. 326 pp.
12. Bergmann E. *Techniques for water analysis*. The Royal Australian Chemical Institute Inc. Sec/Tert Interface. 2009
13. Beuckels A., Smolders E. y Muylaert K. Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*. 2015; 77:98-106.
14. Bulent Sen, Mehmet Tahir Alp, Feray Sonmez, Mehmet Ali Turan Kocer and Ozgur Canpolat. Relationship of Algae to Water Pollution and Waste Water Treatment. *Water Treatment*. InTech. 2013. DOI: 10.5772/51927. Available from: <https://www.intechopen.com/books/water-treatment/relationship-of-algae-to-water-pollution-and-waste-water-treatment>
15. Candela R. *Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones: Una revisión bibliográfica*. [Tesis de Licenciatura] Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. 2016.
16. Cárdenas, G; Sánchez, I. Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Revista Universidad y Salud*. 2013; 15(1): 72-88.
17. Carfagna, S; Salbitani, G; Bottone, C; De Marco, A y Vona, V. Cross-Effects of Nitrogen and Sulphur Starvation in *Chlorella sorokiniana* 211/8K. *Natural Resources*. 2015; 6:221-229.
18. Cervantes F., Pérez J. y Gómez J. Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2000; 42: 73-82
19. Chaudhary, R., Dikshit, A.K. y Tong, Y.W. Carbon-dioxide biofixation and phycoremediation of municipal wastewater using *Chlorella*

vulgaris and Scenedesmus obliquus. Environ Sci Pollut Res. 2018 (25): 20399–20406.

20. Derecho, Ambiente y Recursos Humanos (DAR). (2017). Perú: Planificación en gestión de aguas residuales. Lima-Perú: DAR. Recuperado de: [http://www.dar.org.pe/noticias/daropina\\_plani\\_aguas/#\\_ftn2](http://www.dar.org.pe/noticias/daropina_plani_aguas/#_ftn2)
21. DINAMA. Manual de procedimientos analíticos para aguas y efluentes. Laboratorio de DINAMA. 1996
22. Fay, M; Andres, LA; Fox, C; Narloch, U; Straub, S; Slawson, M. Repensar la infraestructura en América Latina y el Caribe: Mejorar el gasto para lograr más. Grupo Banco Mundial. 2017 (2): 10 p.
23. García-Gozalbes, C; Arbib, Z; Perales-Vargas-Machuca, J. Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. Tecnología y Ciencias del Agua. 2015; 6(1): 49-68.
24. González L., Cañizares R., 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: 259-262.
25. Griffiths, M; Garcin, C; P. van Hille, R; T.L. Harrison, S. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. Journal of Microbiological Methods. 2011; 85: 119–123.
26. Gutiérrez N, Valencia E y Aragón R. EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE DBO5 Y SS EN SEDIMENTADOR Y LECHO FILTRANTE PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DEL BENEFICIO DE CAFÉ (*Coffea arabica*). Colombia Forestal. 2014; 17(2): 151 - 159.
- 27.
28. Hernandez, J.P.; De-Bashan, L. y Yoav Bashan, T. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. Water Research. 2004 (38): 466-474.

29. Hernandez, J.P.; De-Bashan, L. y Yoav Bashan, T. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. 2005; 38(2005R): 190-198.
30. Jansson, M. Uptake, exchange, and excretion of orthophosphate in phosphate-starved *Scenedesmus quadricauda* and *Pseudomonas* K7. 1993; 38(6): 1162-1178.
31. Jeong H., Mok S. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2014
32. Jouanneau S, Recoules L, Durand M, Boukabache A, Picot V, Primault Y, Lakel A, Sengelin M, Barillon B, Thouand G. Methods for assessing biochemical oxygen demand (BOD): A review. *Water Research*. 2014; 49: 62-82.
33. Kiepper B. *Microalgae Utilization in Wastewater Treatment*. UGA Cooperative Extension. 2013; Bulletin 1419. 6pp.
34. Klinthong W, Yang Y-H, Huang Ch-H, Tan Ch-S. A Review: Microalgae and Their Applications in CO<sub>2</sub> Capture and Renewable Energy. *Aerosol and Air Quality Research*. 2015; 15: 712–742.
35. Lapoine, B; Herren, L; Debortoli, D; Vogel, M. Evidence of sewage-driven eutrophication and harmful algal blooms in Florida's Indian River Lagoon. *Harmful Algae*. 2015; 43: 82-102.
36. Larios-Meño J, Gonzáles C, Morales Y. Las aguas residuales y sus consecuencias en el Perú. *Revista Saber y Hacer*. 2015; 2(2): 09-25 pp.
37. Loose, D. Diagnóstico de las Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales en el ámbito de operación de las entidades prestadoras de servicios de saneamiento. SUNASS. 2016.
38. Lürling M. Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Ann. Limnol. - Int. J. Lim.* 2003; 39 (2): 85-101

39. Mennaa, F.Z; Arbib, Z; Perales, J.A. Urban wastewater treatment by seven species of microalgae and an algal bloom: Biomass production, N and P removal kinetics and harvestability. *Water Research*. 2015; doi: 10.1016/j.watres.2015.06.007.
40. Méndez J, Marchán J. Diagnóstico Situacional de los Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales en las EPS del Perú y Propuestas de Solución. SUNASS y GTZ/PROAGUA. Lima; 2008. 53 p. Depósito legal N°2008-14631.
41. M.D. Guiry in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2017. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 25 October 2017.
42. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento; Grupo Banco Mundial. Tratamiento y Reúso de las Aguas Residuales - Perú ¿un reflejo de la región?. 2017.
43. Ministerio del Ambiente. Agenda de Investigación Ambiental. Dirección General de Información e Investigación Ambiental. 2013.
44. Ministerio del Ambiente. Política Nacional del Ambiente. 2009.
45. Ministerio del Ambiente. Ley General del Ambiente – Ley N°28611. 2005.
46. Mohd A, Abu H, Sobri M, Sheikh S. A review of the potentials, challenges and current status of microalgae biomass applications in industrial wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*. 2017; 20:8-21.
47. Mohd, N; Nita, H; Chia, T; Mutalib, A. The Growth Performance of Freshwater *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. in Different media. *AENSI Journal*. 2014; 9(11): 119-125.
48. Nermin A. The polyphasic description of a *Desmodesmus* spp. isolate with the potential of bioactive compounds production. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*. 2011; 15(2): 231-238
49. Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA). *Fiscalización Ambiental en Aguas Residuales*. 2014.

50. Orozco, A. Bioingeniería de aguas residuales. 2da Edición. 2014. 566 pp.
51. Plan Nacional de Acción Ambiental - PLANAA - Perú 2011 – 2021. 2da Edición. 2011.
52. Prathima, M; Venkata, G; Venkata, S. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*. 2012; 43: 276-283.
53. Priyadarshani I, Rath B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. *J. Algal Biomass Utiln.* 2012; 3 (4): 89–100.
54. Reynolds, K. Tratamiento de Aguas Residuales en Latinoamérica - Identificación del Problema. *AGUA LATINOAMÉRICA*. 2002.
55. Richmond A. y Hu Q. *Handbook of Microalgal Culture - Applied Phycology and Biotechnology*. 2da edición. Oxford: Wiley-Blackwell, 2013. 726p.
56. Roa L., Cañizares R. Biorremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua*, 2012; 10(1):71-79.
57. Salazar M. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS*. 2006; 59: 64-70.
58. 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. *Bioresource Technology*, 2013.
59. Sriram S, Seenivasan R. Microalgae Cultivation in Wastewater for Nutrient Removal. *J. Algal Biomass Utiln.* 2012; 3(2): 9- 13.
60. Su, Y; Mennerich, A; Urban B. Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: Influence of algae and sludge inoculation ratios. *Bioresource Technology*. 2012; 105: 67-73.
61. Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento (SUNASS). Diagnóstico de las Plantas de Tratamiento de aguas

residuales en el ámbito de operación de las Entidades Prestadoras de Servicios de Saneamiento. 1era Edición. 2015.

62. Vanormelingen P, Hegewald E, Braband A, Kitschke M, Friedl Th, Sabbe K, W Vyverman W. THE SYSTEMATICS OF A SMALL SPINELESS DESMODESMUS SPECIES, D. COSTATO-GRANULATUS (SPHAEROPLEALES, CHLOROPHYCEAE), BASED ON ITS2 rDNA SEQUENCE ANALYSES AND CELLWALL MORPHOLOGY. J. Phycol. 2007; 43: 378–396.
63. Van Deuren, J; Z. Wang y J, Ledbetter. Remediation technologies screening matrix and reference guide. 3era Edición. Technology Innovation Office, EPA. 1997.
64. Von Hesse, M; Zavaleta, C. Propuesta de Bases para una Política Nacional de Saneamiento. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento. 2016.
65. World Resources Institute (WRI). (2015). Aqueduct Projected Water Stress Country Rankings. Washington, DC-USA: WRI. Recuperado de: <http://www.wri.org/resources/data-sets/aqueduct-projected-water-stress-country-rankings>

# ANEXOS

## Anexo 1. Estandarización de las ecuaciones de crecimiento celular

Los datos de los dos primeros ensayos, sirvieron para realizar análisis de correlaciones y estandarizar posteriormente, ecuaciones de crecimiento. De estos, se seleccionó la mejor correlación para Densidad celular ( $Y_D$ ) y Biomasa seca ( $Y_B$ ), obteniendo las siguientes ecuaciones lineales:

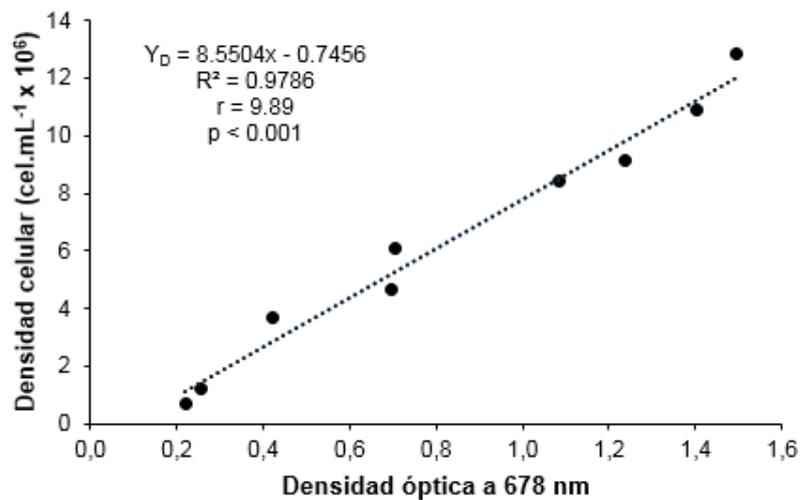
$$Y_D = 8.5504X - 0.7456$$

Dónde:

$Y_D$  = Densidad celular expresada en  $10^6$  (cel.mL<sup>-1</sup>)

X = La densidad óptica (DO) de muestras de cultivo a 678 nm.

*Ecuación tomada del Tratamiento 4 (T4), ensayo 2.*



**Figura 18.** Relación entre la densidad celular promedio y las densidades ópticas de *Desmodesmus asymmetricus*.

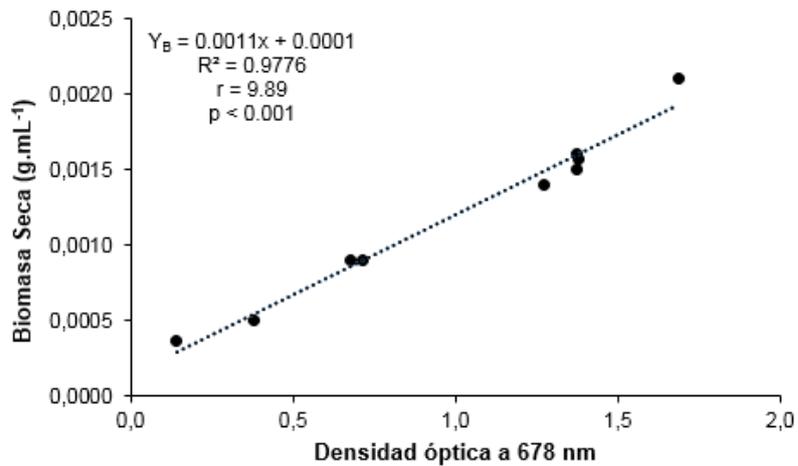
$$Y_B = 0.0011X + 0.0001$$

Dónde:

Y<sub>B</sub> = Biomasa seca (g.mL<sup>-1</sup>)

X = La densidad óptica (DO) de muestras de cultivo a 678 nm.

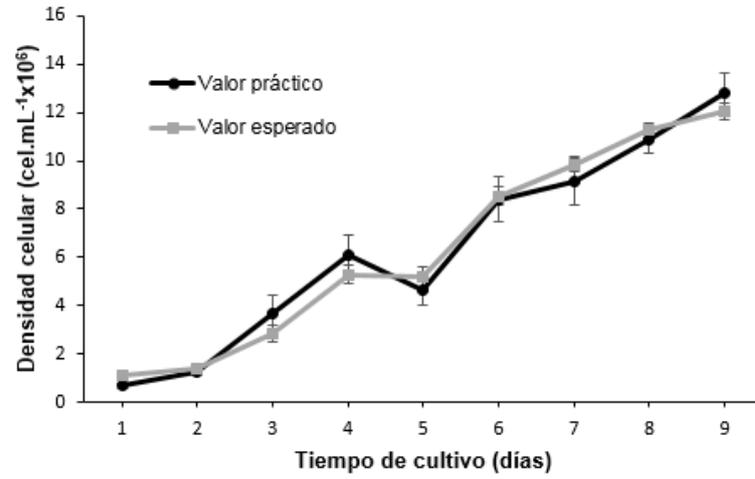
*Ecuación tomada del Control 2 (C2), ensayo 1.*



**Figura 19.** Relación entre la biomasa seca promedio y las densidades ópticas de *Desmodesmus asymmetricus*.

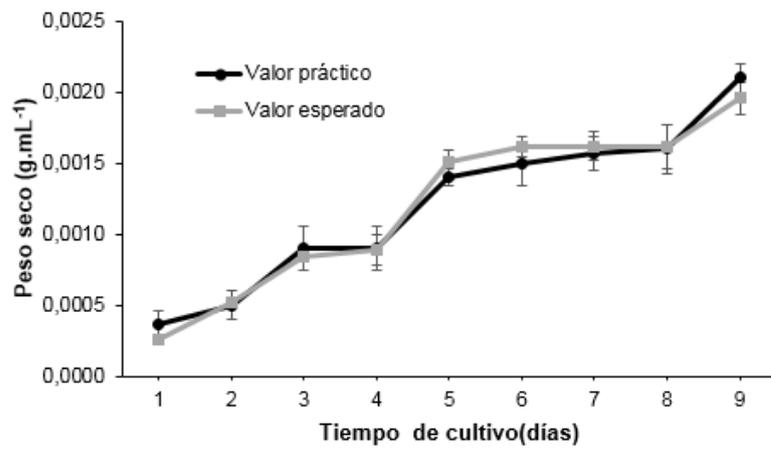
Al graficar, los valores experimentales de la densidad celular y la biomasa seca, en contraste con los valores esperados obtenidos a través de las ecuaciones, se observaron tendencias similares sin diferencias significativas ( $p = 0.999$ ;  $p = 0.993$ , respectivamente).

a)



**Figura 20.** Relación entre los valores esperados y experimentales para la densidad celular con respecto a los días de ensayo (barras verticales indican variación de la desviación estándar).

b)



**Figura 21.** Relación entre los valores esperados y experimentales para la biomasa seca con respecto a los días de ensayo (barras verticales indican variación de la desviación estándar).