UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

"EFECTOS DE LA MICROALGA *Botryococcus sp*. EN LA REMOCIÓN DE NITRATO Y FOSFATO EN AGUAS RESIDUALES. EN LA EMPRESA MUNICIPAL DE AGUA Y ALCANTARILLADO DE CORONEL PORTILLO-UCAYALI, MARZO 2018"

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AMBIENTAL

ENRIQUE BARRANTES SANTILLÁN
RUDDY PITTMAN TAPULLIMA

Pucallpa – Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES Y AMBIENTALES
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

COMISION DE GRADOS Y TITULO
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS
068/2018-CGyT-FCFyA-UNU

En la ciudad de Pucallpa siendo las 10:30 horas del día 23 de mayo del 2018. En cumplimiento al Memorándum Múltiple N° 085-2018-UNU-FCFyA-CGT, se reunieron los miembros del jurado en el laboratorio de informática de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales con la presencia de los docentes:

DR. CARLOS PANDURO CARBAJAL	**- PRESIDENTE**
DR. MARCO ANTONIO CHOTA ISUIZA	**- MIEMBRO**
DR. MANUEL MAMANI FLORES	**- MIEMBRO**

Para evaluar la sustentación de la tesis titulada **"EFECTOS DE LA MICROALGA *Botryococcus sp.* EN LA REMOCIÓN DE NITRATO Y FOSFATO EN AGUAS RESIDUALES. EN LA EMPRESA MUNICIPAL DE AGUA Y ALCANTARILLADO DE CORONEL PORTILLO-UCAYALI, MARZO 2018".** Presentado por los bachilleres **ENRIQUE BARRANTES SANTILLAN** y **RUDDY PITTMAN TAPULLIMA.**

Terminada la sustentación se procedió a la formulación de las preguntas por los miembros del jurado calificador, habiéndose siendo absueltas por os sustentantes, razón por la cual la tesis ha sido aprobada por unanimidad con el calificativo de muy bueno. Por lo tanto, se les ha considerado apto para optar el título profesional de ingeniero ambiental, siendo asesor el **Mg. Melchor Herberth Dolmos Castro.**

A las 11:45 horas del mismo día se dio por concluido el acto académico

DR. CARLOS PANDURO CARBAJAL
PRESIDENTE

DR. MARCO ANTONIO CHOTA ISUIZA
MIEMBRO

DR. MANUEL MAMANI FLORES
MIEMBRO

Acta de Aprobación

Esta tesis fue sometida a consideración para su aprobación ante el Jurado Evaluador de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales, integrado por los siguientes Catedráticos:

Dr. Carlos Panduro Carbajal _____
Presidente

Dr. Marco Antonio Chota Isuiza _____
Miembro

Dr. Manuel Mamani Flores _____
Miembro

Mg. Melchor Herberth Dolmos Castro _____
Asesor

Dedicatoria

A Dios, por darnos la oportunidad de vivir y por estar con nosotros en cada paso que damos, por fortalecer nuestros corazones e iluminar nuestra mente y sobre todo por darnos salud para lograr nuestros objetivos y llegar a las metas propuestas.

A mis padres Eduardo Barrantes Torres, Maritza Bardales Santillán, Severo Ignacio Pittman y Berita Tapullima, por creer en nosotros, por motivarnos a ser mejor cada día y por su compañía durante todo el periodo de vida y sobre todo el periodo de estudio.

Agradecimiento

- A los representantes de la Empresa Municipal de Agua Potable y Alcantarillado, por las facilidades y permitirme realizar estudios en su planta de tratamiento de aguas residuales.

- A la Universidad Nacional de Ucayali, por ser mí casa durante este tiempo y permitirme ser una profesional.

- A la Facultad de Ciencias de la Salud por permitirme realizar la tesis en el laboratorio de Microbiología y Parasitología.

- Al Mg. Melchor Herbert Dolmos Castro, Asesor de la Tesis, por su esfuerzo y dedicación, quien, con sus conocimientos, su experiencia y su paciencia, me han motivado durante mi formación profesional.

- Al Biólogo Eric Mananita Terrones, por brindarme su apoyo constante y conocimientos.

- Al Sr. Paul Reátegui Ramos, encargado del laboratorio de Microbiología y Parasitología, por las facilidades y apoyo durante la realización de la tesis.

- Al Sr. Nicolas Arroyo Salles, practicante del laboratorio de Microbiología y Parasitología, apoyo durante la realización del estudio

ÍNDICE GENERAL

ACTA DE APROBACIÓN ii
DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTO iv
ÍNDICE GENERAL v
LISTA DE TABLAS vi
LISTA DE FIGURAS vii
LISTAS DE ANEXOS vii
RESUMEN viii
ABSTRACT ix
INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I
EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del problema 3
1.1.1. Formulación del problema 4

CAPÍTULO II
BASES TEÓRICAS

2.1. Antecedentes 5
2.2. Marco teórico 8
2.2.1. Contaminación de los cuerpos de agua 8
2.2.2. Nutrientes en las aguas residuales domesticas 8
2.2.3. Indicadores de la Eutrofización 9
2.2.4. Límites máximos permisibles para descarga de planta de tratamiento de aguas residuales 10
2.2.5. Microalga *Botryococcus sp.* 10
2.2.6. Factores reguladores del crecimiento de las microalgas 11
2.2.7. Aislamiento de microalgas 13
2.2.8. Solución de nutrientes para el crecimiento de la microalga *Botryococcus sp.* 15
2.3. Definición de términos básicos 16

CAPÍTULO III
METODOLOGÍA

3.1. Lugar del estudio 19
3.1.1. Lugar de ejecución 19
3.2. Método de investigación 19
3.3. Población y muestra 20
3.4. Procedimientos de recolección de datos 22
3.4.1. Obtención y acondicionamiento de las muestras para aislamiento de microalgas 22
3.4.2. Preparación del medio de cultivo 22
3.4.3. Aislamiento y cultivos de Microalgas 23
3.4.4. Caracterización de las cepas unialgales 23
3.4.5. Preparación de los efluentes y condiciones experimentales 24
3.5. Técnica e instrumentos de recolección de datos 24
3.5.1. Técnicas Analíticas 24
3.5.2. Instrumentos de recolección de datos 24
3.6. Procesamiento para recolección de datos. 25
3.7 Tratamiento de datos 26

CAPÍTULO IV
RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Crecimiento poblacional de las cepas de microalgas *Botryococcus sp.* 27
4.2. Remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} por parte de los cultivos libres 29
4.3. Discusión 31

CAPÍTULO V
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones 34
5.2. Recomendaciones 34
5.3. Bibliografía 35
5.4. Anexo 39

LISTA DE TABLA

Tabla 1. Límites máximos permisibles para los efluentes de PTAR 10
Tabla 2. Requerimientos principales de los cultivos de microalgas. 13
Tabla 3. Composición del medio Bold Basal 16
Tabla 4. Puntos de Muestreo 21

Tabla 5. Crecimiento de microalgas *ococcus sp* de la laguna 1 y 2. 27
Tabla 6. Remoción de nitrato y fosfatos con dosis de microalgas en aguas residuales Municipales 29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura morfológica de la especie de microalga *Botryococcus sp.* 11
Figura 2. Plano de la Planta de tratamiento de Aguas Residuales..... 21
Figura 3. Crecimiento poblacional de la microalga *Botryococcus sp*. 28
Figura 4. Evaluación de nitrato y fosfato con una dosis de 60 ml..... 30
Figura 5. Evaluación de nitrato y fosfato con una dosis de 40 ml..... 30
Figura 6. Evaluación de nitrato y fosfato con una dosis de 20 ml..... 31

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Componentes del Medio Basal Bold (MBB)..... 39
Anexo 2. Condiciones de cultivo de la microalga *Botryococcus sp.*..... 39
Anexo 3. Monitoreo de parámetros de pH y conductividad..... 40
Anexo 4. Parámetros físico-químicos y biológicos al inicio y al final del estudio 40
Anexo 5. Parámetros físico químicos de la PTAR..... 41
Anexo 6. Análisis de ANOVA de NO_3^- y PO_4^3 de la microalga. 41
Anexo 7. Constancias de laboratorio..... 42
Anexo 8. Iconografías..... 47

“EFECTOS DE LA MICROALGA *Botryococcus sp*. EN LA REMOCIÓN DE NITRATO Y FOSFATO EN AGUAS RESIDUALES. EN LA EMPRESA MUNICIPAL DE AGUA Y ALCANTARILLADO DE CORONEL PORTILLO-UCAYALI, MARZO 2018”

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la capacidad de remoción de nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}) en Aguas Residuales Municipales (ARM), por microalgas libres. Se utilizaron cepas provenientes de los afluentes de la Planta de Recuperación de la Empresa Municipal de Agua Potable y Alcantarillado S.A (Pucallpa, Perú), aplicando dos métodos de investigación exploratorio y experimental cuantitativo; se evaluó su capacidad de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} durante 15 días, a nivel laboratorio, en ARM. Las microalgas *Botryococcus sp*, tuvieron un buen crecimiento en ARM. El cultivo de *Botryococcus sp*. Se realizó con 16 días de reproducción en condiciones controladas de luz, temperatura y pH. El cultivo libre de la especie de microalga *Botryococcus sp*, reportó valores altos de remoción, entre 80% y 70% para NO_3^- y PO_4^{3-} sucesivamente. La dosis optima de inoculación de caldo de cultivo de microalgas *Botryococcus sp,* para tratar aguas residuales y disminuir el exceso de nutrientes causantes de eutrofización o hipoxia, es de 60 ml a tratar 4500 ml de agua cruda, dio como resultado que disminuyó desde 0.25 ml/l hasta 0,05 ml/l de nitrato y de 5 ml/l hasta 1,5 ml/l de fosfato.

Palabras clave: Eutrofización, Inoculación, Microalgas, Aguas residuales, Remoción.

"**Effects of the *Botryococcus microalgae sp*, in the removal of nitrate and phosphate in waste waters, the Municipal Company of water and sewage system of Colonel Portillo-Ucayali; March 2018"**

ABSTRACT

The present study had like objective to determine the capacity of removal of nitrates (NO_3^-) and phosphates (PO_4^{3-}) in Aguas Residuales Municipales (ARM), by free microalgaes. Originating stocks of the affluents of Planta de Recuperación of potable water the Municipal Company were used and sewage system S.A. (Pucallpa, Peru), applying two methods of quantitative experimental and exploratory research; its removal capacity was evaluated of $NO_3^-$and PO_4^{3-} during 15 days, at level laboratory, in ARM. The *Botryococcus sp* microalgaes. They had a good growth in ARM. The culture of *Botryococcus sp.* It was realised with 16 days of reproduction with controlled conditions of light, temperature and pH. The free culture of the species of microalgae *Botryococcus sp*, I report high values of removal, between 80% and 70% for NO_3^- and PO_4^{3-} successively. The optimum dose of inaculation of broth of culture of microalgaes *Botryococcus sp*, to treat waste waters and to diminish the excess of nutrients causes of eutrophication or hypoxia, is of 60 ml to deal with 4500 ml crude water, gave like result that I fall from 0,25 ml/l to 0.05 ml/l of nitrate and 5 ml/l to 1.5 ml/l of phosphate. This stock shows to be efficient in the removal of nutrients in ARM, especially of NO_3^-.

Key words: Eutrophication, Inaculation, Microalgaes, Waste waters, Removal

INTRODUCCION

El vertimiento de efluentes contaminantes de las ciudades constituye en la actualidad un grave problema a escala mundial. No todas las ciudades cuentan con un sistema eficiente de tratamiento de sus efluentes que contribuya a evitar o reducir la degradación y eutrofización de los cuerpos de agua, los sistemas que se utilizan, muchas veces, no son suficientemente eficientes para reducir la carga de contaminantes que se vierten a los cuerpos de agua. (Carrasquillo, 2005).

Esta situación requiere claramente de un tratamiento que elimine estos iones inorgánicos (Noüe, 1992); un tratamiento avanzado, consiste en la eliminación de Nitrato y Fosfato (Garza, 1999). Sin embargo, el adicionar un paso más puede incrementar el costo total del tratamiento.

El tratamiento para disminuir el exceso de nutrientes se puede llevar a cabo de dos formas: mediante procesos físicos y químicos que permitan reducir los precursores de los nutrientes, o mediante métodos biológicos en las que microorganismos, como microalgas, incorporan en su metabolismo los nutrientes presentes en el agua. El bio-tratamiento con microalgas, es particularmente atractivo debido a la capacidad fotosintética, que tienen las microalgas, en convertir la energía solar en biomasa y la incorporación al metabolismo de nutrientes como el Nitrato y el Fosfato causantes de la eutrofización.

Los sistemas basados en microalgas tienen un importante futuro en general, por su versatilidad pueden tener diferentes aplicaciones en el mismo proceso, además del tratamiento de aguas residuales, producción de alimentos y de químicos. Una ventaja de las microalgas, es su capacidad fotosintética para convertir energía solar en valores de biomasa con una interesante composición bioquímica, con lo cual las microalgas juegan un papel importante en la biotecnología solar (Pauw, 2002).

El estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de Ucayali, las muestras de las cepas de la

microalga *Botryococcus sp,* y el agua a tratar se obtuvo de la planta de aguas residuales de la Empresa Municipal de Agua y Alcantarillado de Coronel Portillo S.A.

El desarrollo del presente estudio, fue con el objetivo de determinar el efecto de la microalga *Botryococcus sp.* En la remoción de nitrato y fosfato en aguas residuales, en la Empresa Municipal de Agua y Alcantarillado de Coronel Portillo S.A.

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1. Planteamiento del problema

EL veloz incremento de la población mundial y la mejora de los niveles de vida en ciertas regiones del planeta han incrementado el consumo per cápita del agua (Biswas, 2010). Generando efluentes domésticos que son vertidos a los cuerpos de agua ocasionando graves problemas de contaminación y procesos de eutrofización que pueden llevar a la destrucción completa de ecosistemas, al superar la capacidad normal de autodepuración de los mismos. (Rodriguez, 2009).

Sin embargo, en muchos casos los efluentes sin un control adecuado contienen una alta concentración de nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}), lo cual puede causar eutrofización en los cuerpos receptores y otros problemas a largo plazo (Escorihuela, 2007).

La depuración de las aguas residuales domésticas, es una de las necesidades principales de la sociedad moderna debido al peligro que significan el vertimiento de estas aguas al ambiente sin recibir un tratamiento adecuado, capaz de modificar sus condiciones físicas, químicas y microbiológicas que eviten problemas graves de contaminación (Hidalgo, 2010).

En la actualidad, el tratamiento convencional de aguas residuales domesticas enfrenta el reto de disminuir dicho exceso de nutrientes a niveles normales. Los métodos químicos y físicos, que son los más utilizados a nivel mundial, son costosos, no tan efectivos, al ser no naturales, tienen un impacto considerable en el ecosistema. El Tratamiento Terciario Biológico (TBT) usando microalgas tiene la ventaja de ser un método natural, eficiente y productivo, Constituyéndose en una alternativa para mejorar la calidad de los efluentes de la laguna de oxidación del SECTOR 9, del distrito de Manantay, administrado por EMAPACOP S.A. Utilizar microalgas para remover el exceso de nutrientes, los cuales además ya son identificados como una nueva amenaza ambiental dado el inusitado incremento de la temperatura, la intensidad de la radiación UV como nuevos efectos del

cambio climático, que incrementarán la mayor presencia de la flora acuática que acelera el proceso de eutrofización. Por otra parte, en nuestra amazonia se disponen de varios miles de especies de microalgas silvestre de agua dulce, muchas de ellas ya identificadas y en proceso de estudios como el caso de la microalga *Botryococcus sp*, se identifican como una alternativa para afrontar el problema ambiental en el caso de las aguas servidas. Finalmente nos encontramos frente a una situación especial para la gestión ambiental, pues actualmente no se dispone de un estándar de calidad o un Límite Máximo Permisible para saber con cuanto deben salir los efluentes para que no causen eutrofización a los cuerpos naturales de nuestras aguas dulces que ya son patrimonio de la humanidad.

1.1.1. Formulación del problema

- **Problema general:**

  ¿Cuál es el efecto de la microalga *Botryococcus sp*. En la remoción de nitrato y fosfato en aguas residuales domésticas, de la empresa municipal de agua y alcantarillado de Coronel Portillo-Ucayali Marzo 2018?

- **Problemas específicos:**

  1) ¿Cuál es el tiempo de crecimiento de la microalga a estudiar en las aguas residuales de la Empresa Municipal de Agua Potable Alcantarillado S.A?

  2) ¿Cuál es el tiempo de remoción de las aguas residuales domesticas de la Empresa Municipal de Agua potable Alcantarillado S.A?

  3) ¿Cuál es la dosis optima de inoculación de la microalga *Botryococcus sp.* para remover el exceso de nutrientes de aguas residuales domesticas la Empresa Municipal de Agua Potable Alcantarillado S.A?

CAPITULO II
BASES TEÓRICAS

2.1. Antecedentes

Se trata de Giovanni (2015), quien investigó acerca de la "Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel de laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales". Donde se evaluó la capacidad de remoción de nitrato (NO_3^-) y fosfato (PO_4^{3-}) durante 10 días, se trabajó con las cepas de *Chlorella sp* y *Chlamydomonas sp, donde se* reportaron valores altos de remoción, entre 56% a 67% para NO^{3-} y 78% a 81% para $PO4^{3-}$.

Otro antecedente es realizado por Sánchez (2004), quien investigó acerca de la "Evaluación de un sistema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas". Donde su estudio se basó en utilizar una bacteria denominada (*Azospirillum brasilense*), como alimento para las microalgas denominadas (*Chlorella Vulgaris y Chlorella Sorokiniana*), reportando la eliminación del 100 % de amonio, 94% para nitrato y 92 % para fosfato en un periodo de seis días.

Otro antecedente es realizado por Pérez (2009), quien investigó acerca de la "Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizando microalga - bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico". Donde su estudio se basó en la eliminación del exceso de nutrientes (nitratos y fosfatos), utilizando las cepas de *Chlorella Vulgaris*, alimentando a las microalgas en mención con la Bacteria *Azospirrillun Brasilense*, sometidos a un sistema de cultivos Autotrófico, Heterotrófico, y Mixotrófico, durante un periodo de 5 días, reportando la eliminación de 47% - 50% con un sistema Autotrófico, de 60% - 75% con un sistema Heterotrófico y de 60%-70% con un sistema Mixotrofico.

Se trata de Soledad (2015), quien investigó acerca del "Cultivo de consorcio microalgal autóctono y biorremediación de efluentes urbanos ". Donde se estudió al consorcio de

microalgas (*Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp*.) empleando el efluente urbano pretratado proveniente de la planta de tratamiento cloacal "La Viñita", Provincia de Catamarca, Argentina. Analizando la eficiencia del proceso biorremediador realizado por las microalgas, considerando la eficiencia de los tratamientos, en relación a los parámetros que corresponden a días de cultivo, En cuanto al proceso biorremediador se observó que disminuyó la concentración de DBO5 en un 63,63 %, la de DQO en un 51,8 %, la de nitratos en un 38 % y aumentó la cantidad de fosfato, lo que podrá ser corregido con modificaciones en las concentraciones de sales en el medio de cultivo.

Otro antecedente es realizado por Méndez (2010), quien investigo la creciente problemática frente al tratamiento de aguas residuales y su posible reúso ha planteado sistemas biológicos que remuevan los contaminantes manteniendo el ecosistema y disminuyendo costos. Este trabajo consiste en un ensayo de biorremediación evaluando la tasa de crecimiento de la microalga *Scenedesmus quadricauda* cultivada en efluentes domiciliarios de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. Diariamente se determinó conductividad, pH y densidad celular. Al inicio y al final de ensayo se obtienen valores para fosfato, fósforo total, sulfuro, amoníaco, nitrito, nitrato, detergentes, DBO5, DQO y número más probable de coliformes totales y fecales. Se observó una disminución en amoníaco, fósforo, fósforo total, DBO5 y DQO lo que confirma la efectividad en la remoción de nutrientes en aguas residuales de naturaleza orgánica. Por ello, *S. quadricauda* se plantea como una posible alternativa de bajo costo para la descontaminación de aguas residuales urbanas.

Se trata de Romero (2001), quien investigo en la posibilidad de tratar efluentes contaminados de la industria pesquera utilizando para ello la microalga *Chlorella sp.* Siguiendo un método semi continuo con recambio diario del residual líquido. El crecimiento celular se determinó mediante las lecturas de las absorbancias y se corroboró con el cálculo del peso húmedo y seco de la biomasa algal. La efectividad del tratamiento se evaluó mediante las concentraciones de DBO, que fluctuaron entre 92 y 95% para los tratamientos donde el recambio fue de menor volumen (12,5 Y 25%). Se recomienda adoptar el sistema semi continuo para el tratamiento de los efluentes de la industria

pesquera con el porcentaje de recambio aquí señalado, que brinda además la posibilidad de obtener biomasa algal para fines de alimentación.

Se trata de Parra (2012), quien investigo el uso de las microalgas, como sistema biológico alternativo para el tratamiento de las aguas domésticas ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su capacidad de remover cantidades significativas de nitratos, fosfatos y materia orgánica. En este trabajo se estudió la remoción de nitratos y fosfatos del medio de cultivo Bold utilizando la microalga *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado en alginato de calcio, como una nueva alternativa tecnológica de remoción. Se trabajó con dos fotorreactores en condiciones controladas de temperatura (20°C), flujo de aire (1 L/min), durante un periodo de 8 días. Mediante el sistema en estudio se logró en el día 8, una remoción del 60% de la cantidad inicial de nitratos, mientras que los fosfatos disminuyeron en un 47%.

Se trata de Giraldo (2013), quien investigo la captura de carbono a través del cultivo de microalgas, quien reporto un nuevo esfuerzo en la reducción de la concentración de CO2 en la atmósfera. La investigación se realizó para seleccionar cuatro especies de microalgas prometedoras en cuanto a captura de CO2, bajo criterios de Producción de biomasa y Productividad, en donde se hizo necesario realizar ensayos de crecimiento con Aire y ensayos de crecimiento con Aire + CO2 con el fin de determinar características de crecimiento y potencialidades en cuanto a los parámetros de selección establecidos. Fueron evaluadas en este estudio las cepas de microalgas provenientes de American Type Cullture Collection: *Scenedesmus Obliquus* ATCC 457, *Scenedesmus armatus* ATCC 429, *Scenedesmus sp.* ATCC 464, *Chlorella kesslerii* ATCC 468, *Chlorella sp*. ATCC.

Se trata de Ruiz (2013), quien investigo un sistema que permite por un lado el desarrollo de las microalgas, ya que éstas aumentan su población eliminando parte de los nutrientes que se pretenden recuperar del agua tratada anaeróbicamente. El sistema permite asimismo la acción conjunta de una serie de bacterias que han demostrado estar presentes en el cultivo, así como la eliminación, tanto biológica como por precipitación química, de fósforo.

2.2.Marco teórico

2.2.1. Contaminación de los cuerpos de agua

La contaminación de los cuerpos de agua es una consecuencia inherente de la operación y desarrollo de las sociedades y/o comunidades actuales. Los residuos líquidos o solidos de composición variada acarreados por las aguas provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, mineros y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas son llamadas aguas residuales (Semarnat, 2002).

Ya que cualquier comunidad humana debe finalmente regresar sus desechos líquidos a un cuerpo de agua receptor, la contaminación de los cuerpos de agua (subterráneos o de superficie) se produce cuando, las descargas de aguas residuales alcanzan los cuerpos naturales de agua mediante el drenaje o a través del alcantarillado. De esta manera el termino contaminación del agua puede ser definido como la acción y el efecto de introducir materias o formas de energías, o inducir condiciones en el agua, que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica (Metcalf, 2002). Es crucial mantener la calidad de las aguas naturales lo mejor posible, con el fin de conservar su función ecológica o poder darle un uso posterior.

El agua residual doméstica es una combinación excreta (heces y orina) animales y humanas con aguas grises resultantes del lavado, bañado y cocinado. Las personas excretan 100-500 g en peso húmedo de heces y entre 1 a 1.3 l de orina per cápita por día, contribuyendo con 15 a 20 g de la demanda bioquímica de oxígeno al quinto día (DBO_5) por día (Bitton, 2005).

2.2.2. Nutrientes en las aguas residuales domésticas

Los nutrientes forman parte de la composición química de cualquier agua residual doméstica. Los nutrientes son elementos indispensables que pueden ser asimilados y metabolizados para el crecimiento de los organismos vivos. Los principales nutrientes o llamados macronutrientes son C, N, O, P y se requieren en grandes cantidades. Estos

nutrientes se encuentran en forma de compuestos. Los compuestos que contienen cadenas de 2 o más átomos de carbono son llamados compuestos orgánicos y constituyen la llamada materia orgánica (MO). Los compuestos orgánicos asimilables por los organismos son los llamados nutrientes orgánicos. Los compuestos que no contiene carbono como los formados por moléculas con nitrógeno y fosforo que son asimilables por los organismos son llamados nutrientes inorgánicos (Madigan., 2004).

2.2.3. Indicadores de la Eutrofización

Son parámetros químicos que proporcionan una alteración a ecosistemas acuáticos las cuales son ricas en nutrientes contribuyendo al cambio trófico del cuerpo del agua receptor. (Moreno Franco, 2010).

Los principales parámetros de análisis son los siguientes**:**

- **Nitratos**

  Los nitratos existentes en el agua son, habitualmente, consecuencia de una nitrificación del nitrógeno orgánico o proceden de la disolución de los terrenos atravesados por el agua. Como contaminantes debido a actividades humanas provienen de contaminación orgánica o de la contaminación por abonos químicos.

  La eutrofización de aguas residuales. La descarga de nitrato a los cuerpos de agua receptores puede estimular el crecimiento masivo de algas y plantas por asimilación autotrófica.

- **Fosfatos**

  El parámetro de la concentración de fosfatos en aguas domesticas es fundamental para evaluar el riesgo de eutrofización. Este elemento suele ser el factor limitante en los ecosistemas para el crecimiento de los vegetales, y un gran aumento de su concentración puede provocar la eutrofización de los cuerpos de aguas. Así, Los fosfatos están directamente relacionados con la eutrofización de ríos, pero especialmente de lagos y embalses. En lo referente a las aguas de consumo humano,

un contenido elevado modifica las características organolépticas y dificulta la floculación - coagulación en las plantas de tratamiento.

2.2.4. Límites máximos permisibles para descarga de planta de tratamiento de aguas residuales

Según los límites máximos permisibles (Lmp), se define como la medida de concentración o grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, que caracterizan a un efluente o una emisión, que al ser excedida puede traer daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente.

Tabla 1. Límites máximos permisibles para los efluentes de PTAR

Parámetros fisicoquímicos	Unidad	Datos generales
Aceites y grasas	mg/L	20
Coliformes termotolerantes	NMP/100 mL	10,000
Demanda bioquímica de oxigeno	mg/L	100
Demanda química de oxigeno	mg/L	200
pH	Unidad	6.5-8.5
Solidos totales en suspensión	(mL/L)	150
Temperatura	°C	<35

Fuente: Decreto supremo N°003-2010-Minam

2.2.5. Microalga *Botryococcus sp.*

La microalga *Botryococcus sp*, es un organismo fotosintético que puede alcanzar productividades en biomasa muy elevadas, mejora la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético, así como el aprovechamiento de nutrientes, que están siendo desechados, al ser incorporados a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno. Lo cual trae como consecuencia, un proceso global: la remoción de sales (amonio, nitritos, nitratos, ortofosfatos), el aumento del pH de los efluentes (proceso fotosintético), lo cual favorece la precipitación de ortofosfatos, la eliminación de nitrógeno amoniacal por efecto de intercambio gaseoso, la disminución de la demanda biológica de oxígeno, la oxigenación del agua, favoreciendo la oxidación continua de materia orgánica, la acción bactericida, reduciendo la sobrevivencia de organismos patógenos, la recuperación de CO_2, liberado en los procesos, mediante su empleo en el proceso fotosintético y un alto rendimiento en la bioconversión de la energía solar (4 y 8 %)

respecto a algunas plantas agrícolas convencionales (azúcar y sorgo), siendo del 1.5 % (Kojima & Lee, 2001).

Esta microalga se encuentra en colonias de mucílago de forma ovalada o esférica, contiene numerosos glóbulos de lípidos (Graham, 2000). Este lípido, y su producción han sido objeto de las investigaciones porque constituye una de las especies más aptas para la generación de biocombustibles. Esta especie crece en lagos oligotróficos templados o tropicales, estuarios, estanques. Además, el *Botryococcus sp.* se caracteriza por su capacidad de producir grandes cantidades de hidrocarburos que se encuentran en los lípidos, es decir, compuestos muy reducidos que contienen solamente carbono e hidrógeno como elementos, que se acumulan en sus paredes exteriores lo que hace fácil su recuperación

Figura 1. Estructura morfológica de la especie de microalga *Botryococcus sp.*



Fuente. Aplicaciones de las microalgas estado de la técnica 2011

2.2.6. Factores reguladores del crecimiento de las microalgas

Ciertas condiciones ambientales, como la luz, temperatura, pH, entre otras pueden afectar el crecimiento y la asimilación de los nutrientes por parte de las microalgas, necesitándose más nutrientes cuando la luz y la temperatura son menores a los valores óptimos para su crecimiento (Stevenson, 2006).

La luz es la fuente de energía que lidera las reacciones fotosintéticas, por lo que la calidad, cantidad y fotoperiodo deben ser considerados al trabajar con microalgas ya que estas características varían de acuerdo al tipo de microalga a ser cultivada afectando al crecimiento y a la síntesis de compuesto orgánicos como lípidos, carbohidratos, proteínas, entre otros. Asimismo, si la intensidad de la luz es muy fuerte puede darse el efecto de fotoinhibición, ocasionando, entre otros efectos, disminución en el crecimiento (Barsanti, 2006).

La temperatura también regula el metabolismo de las microalgas, así como también la composición de la biomasa y la velocidad de crecimiento, siendo el rango óptimo para la mayoría de microalgas, entre 18 y 22° C (FAO, 2008). Con respecto al pH, el rango óptimo de la mayoría de microalgas se encuentra entre 7 y 9 (FAO, 2009), siendo soportables valores mayores a éstos, ya que valores ácidos generalmente causan muerte de las microalgas (Richmond A., 2004). También afecta a la solubilidad de varios compuestos en el medio de cultivo, por lo que a un pH elevado disminuye la asimilación de ciertos metales traza. Diversos valores de pH ocasionan disociación de ciertas sales en sus componentes, pudiendo estos últimos tener efecto tóxico o inhibitorio para el crecimiento microalgal (González,2000).

La turbulencia en el medio de cultivo es de gran relevancia ya que permite una distribución homogénea de las microalgas en su medio, facilita la asimilación de nutrientes y captación de la luz, mejora el intercambio gaseoso y posee función termoreguladora. La salinidad regula el crecimiento principalmente en base a la ósmosis, siendo muy variable entre microalgas y puede ocasionar efectos letales en el cultivo (González, 2000).

Dentro de los nutrientes esenciales para el crecimiento de las microalgas, se destaca el carbono, cuya fuente principal es el dióxido de carbono, el cual representa aproximadamente el 50 % en peso seco (Chisti, 2009). El nitrógeno representa el 7-10% en peso seco y forma parte de moléculas esenciales como proteínas, clorofila, ácidos nucleicos, entre otros. El fósforo también es otro macronutriente importante que interviene en los procesos metabólicos para un crecimiento y desarrollo normal de las microalgas,

generalmente constituye el 1% en peso seco. Otros macronutrientes son el azufre, potasio, sodio, hierro, magnesio y calcio; mientras que los elementos traza pueden ser boro, cobre, manganeso, zinc, molibdeno, cobalto, vanadio y selenio (Richmond, 2004).

La concentración de los nutrientes en el medio de cultivo también regula el metabolismo y la composición de la biomasa de la microalga, siendo conocidas las deficiencias de nitrógeno que provoca un aumento en la síntesis de lípidos o la deficiencia de fósforo un aumento en carbohidratos, sin embargo, no siempre ocurre esto y los efectos son muy variados por lo que no es posible generalizar este comportamiento en todas las microalgas (Richmond, 2004). A pesar de contar con rangos óptimos para los factores de crecimiento, es necesario estudiar las interacciones de los mismos y sus efectos sobre una determinada microalga.

Tabla 2. Requerimientos principales de los cultivos de microalgas.

Parámetros fisicoquímicos	Unidad de medida	Datos generales
Temperatura	(°C)	28-35
pH	-	7-9
Conductividad	(us/cm)	1968
Turbidez	(cm)	>20
Nitrógeno total	(mg/L)	-
Amonio	(mg/L)	20-250
Nitrato	(mg/L)	1.5-2
Fósforo total	(mg/L)	-
Fosfato	(mg/L)	< 100

Fuente. Aplicaciones de las microalgas en cultivos de aguas residuales 2010

2.2.7. Aislamiento de microalgas

Es necesario el aislamiento de una unidad algal y la colocación de la misma en un medio de cultivo adecuado para su multiplicación, a fin de establecer un cultivo unialgal (monoespecífico). El término "unidad" se refiere a cualquier célula, colonia, filamento, pieza o parte del talo y cuerpo reproductivo. Un cultivo unialgal establecido es necesario para preparar un cultivo axénico. (Bardales, 2009)

De todos los métodos nombrados para aislamiento el de pipeta capilar y el de rayado en agar son los más empleados para este fin. Las algas menores a 10 µ difícilmente son aisladas con pipeta capilar. Filamentos pueden aislarse con pipeta capilar.

- **Pipeta capilar (simplificado)**

La tapa de un plato Petri invertido se emplea como área para aislamiento:

a) Coloque de 10 a 15 gotas de una colección natural en el centro de la tapa invertida.

b) Coloque 8 gotas de un medio de cultivo adecuado en 8 posiciones rodeando la colección natural. Marque primero con número la posición de cada gota por la cara interior de la tapa.

c) Usando una pipeta Pasteur nueva estirada y estéril, transfiera las algas deseadas de la colección natural a la gota número 1 del medio de cultivo.

d) Transfiera una sola alga desde la gota número 1 hasta la gota número 2.

e) Repita este proceso de transferencia con el resto de las gotas del medio de cultivo hasta asegurarse que una sola unidad algal requerida está presente en una gota.

f) Transfiera esta unidad algal a tubos de ensayos que contienen el medio de cultivo esterilizado. Como precaución, esta unidad algal en una gota puede ser transferida primero a un fragmento de un cubreobjeto que descansa en un portaobjeto, para examinarla con el microscopio compuesto. El fragmento con la gota y la unidad es entonces transferido al tubo de ensayo con el medio de cultivo para su desarrollo. De esta manera se asegura que una sola unidad algal es aislada y que efectivamente va al medio de cultivo.

g) Coloque los tubos bajo condiciones favorables para crecimiento.

- **Rayado en Agar**

Este método brinda mayor facilidad para aislar algas de tamaño igual o menor a 10 μm de diámetro. También produce cultivos axénicos

a) Prepare cajas de Petri (vidrio o plástico) de 100 x 15 mm, conteniendo medio de cultivo solidificado con 1 a 1,5% de agar.

b) Coloque dos gotas de colección natural cerca de la periferia en el medio solidificado. Con el asa de platino (punta esterilizada sumergida en alcohol y quemada), bajo criterio de asepsia, rayar en paralelo la muestra de la colección en el agar.

c) Cubra el plato, inviértalo e incubar de 4 a 8 días bajo adecuada condición de crecimiento.

d) Pasado este tiempo observar directamente en el estereomicroscopio el rayado y seleccione las colonias deseadas que están libres de otros organismos.

e) Remueva las colonias seleccionadas usando una pipeta Pasteur estirada estéril o el asa de platino y colóquelas en una gota de medio de cultivo estéril sobre un cubreobjeto. En un microscopio compuesto observe las unidades de algas deseadas y que sean de la misma especie.

f) Repita el procedimiento de rayado de una sola zona, constatar y nuevamente incubar para que se formen las colonias. Este segundo rayado reduce la contaminación por bacterias y asegura agrupaciones de unidades algales de la misma especie.

g) Transfiera las unidades algales de una colonia a un medio líquido (tubo de ensayo) o solidificado. Posteriormente podrá realizar un cultivo prolongado. Tenga presente que cualquier tipo de contaminación puede alterar el cultivo

2.2.8. Solución de nutrientes para el crecimiento de la microalga *Botryococcus sp.*

Usar el medio Bold Basal (Umebayashi, 2009) como fuente de nutrientes es lo más recomendado para algas de agua dulce, especialmente *Botryococcus sp*, debido a que

contiene los nutrientes necesarios para lograr un crecimiento celular óptimo, le ofrece al cultivo las condiciones requeridas de pH de 6,6 y se evitan variaciones significativas de éste durante el proceso.

Tabla 3. Composición del medio Bold Basal

Para 1000 ml de solución		
1	$(NH_4)_2SO_4$	0.01g
2	K_2HPO_4	0.1g
3	Na_2CO_3	0.2g
4	$MgSO_4.7H_2O$	0.25g
5	$Ca(NO_3)$	0.4 g
6	NaCl	0.21g
7	$FeSO_4$	0.01g
8	Agar-agar	10g
9	Agua destilada	988.75 ml

Fuente. Medio bold basal para microalgas de agua dulce 2009

El método de preparación de 1000 ml de medio consiste en mezclar los nutrientes y reactivos químicos de la solución y agua destilada.

2.3. Definición de términos básicos

- **Aguas residuales domesticas**

Se define como las aguas procedentes de los vertidos de las actividades humanas. Su composición es muy variable dependiendo del uso que se le dé, a su vez estas pueden clasificarse en:

- Aguas de cocina - (sales, materia, grasa, sólidos etc.).
- Aguas blancas de baño y lavado (jabones, detergentes, líquido de limpieza etc.).
- Aguas negras - Procedente de la defecación del ser humano. Para definir el sistema de depuración a aplicarse es necesario conocer la composición del agua residual y los parámetros de contaminación (Máximo, 2012).

- **Cultivo de microalga**

Se define como la producción de algas y la obtención de sus productos derivados ha sido tal vez uno de los campos menos explorados de la Biotecnología en el mundo. El cultivo de microalgas se presenta como una de las mejores alternativas para la solución de problemas mundiales como depuración de aguas residuales domésticas y disminuir el calentamiento global, ya que sus propiedades fotosintéticas las llevan a ser captadores de CO_2 en altas concentraciones. (Gonzales, 2010).

- **Eutrofización**

Se define como el enriquecimiento excesivo de los elementos nutritivos del agua, que da lugar a una serie de cambios sistemáticos indeseables, entre ellos la producción perjudicial de algas y otras plantas acuáticas, el deterioro de la calidad de agua, la aparición de malos olores y sabores desagradables y la muerte de peces en el cuerpo de agua. La floración excesiva de algas y plantas acuáticas es un fenómeno visible que puede complicar considerablemente la utilización y la calidad estética de las masas de agua. (Garcia, 2012).

- **Índice de eficiencia**

Se define como el elemento de estadístico que permite identificar la relación que existe entre las metas alcanzadas, tiempo y recursos consumidos con respecto a un estándar, una norma o una situación semejante. Posibilita dimensionar el logro del máximo de resultados con el mínimo de recursos utilizados. (Jaramillo, 2008).

- **Medio Bold Basal**

Se define como el sustrato o solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias. El sustrato o una solución de nutrientes que permite el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias. (Lopez, 2006).

- **Porcentaje de remoción**

Se define como la cantidad de todo aquel acto que tenga ver con quitar algo de su lugar. El porcentaje de remoción puede llevarse a cabo respecto de objetos o de elementos así como también de personas de un cargo o de un puesto en el que se encuentran normalmente. (Mercado, 2006).

- **Tasa de remoción**

Se define como la relación entre dos magnitudes que expresa la relación existente entre una cantidad y la cantidad de remoción. de esta forma, la tasa de remoción permite expresar la existencia de una situación que no puede ser medida o calculada de forma directa. (Vargas, 2004).

- **Cuerpo receptor de agua dulce**

Se define como todo río, lago, laguna, aguas subterráneas, cauce, depósito de agua, corriente, zona marina, estuarios, que sea susceptible de recibir directa o indirectamente la descarga de aguas residuales. (Hernandez, 1996)

- **Planta de tratamiento de aguas residuales**

Se define como una Infraestructura y procesos que permiten la depuración de aguas residuales, para su disposición final en un cuerpo receptor de agua. (Balabarca, 2016)

- **Límites máximos permisibles**

Se define como la medida de la concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos, y biológicos, que caracterizan a una emisión, que al ser excedida causa o puede causar daños a la salud, al bienestar humano y al ambiente. Su cumplimiento es exigible por el MINAM y los organismos que conforman el sistema de gestión ambiental. (Minam, 2010).

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1. Lugar del estudio

El estudio se realizó en la ciudad de Pucallpa tiene un clima tropical. En la mayoría de los meses del año en Pucallpa hay precipitaciones importantes. No es sólo una corta estación seca, pero no es eficaz. Este clima es considerado según la clasificación climática de Köppen-Geiger. La temperatura media anual en Pucallpa se encuentra a 26.4 °C. Hay alrededor de precipitaciones de 1667 mm, anual.

3.1.1. Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología y parasitología, perteneciente a la Universidad Nacional de Ucayali, a la facultad de ciencias de salud, en el distrito de Callería, provincia de Coronel Portillo Departamento de Ucayali.

Las aguas residuales que fueron utilizadas en el presente estudio, tanto para el aislamiento de microalgas como para la remoción del exceso de nutrientes, fueron obtenidas de la Planta de tratamiento de Aguas Residuales, de la Empresa Municipal de agua potable y Alcantarillado S.A, ubicada en el sector catorce del distrito de Manantay. Esta planta recibe las aguas contaminadas del sector nueve del distrito de Manantay para someterlas a un pre-tratamiento a base de lagunas de oxidación, Es un proceso natural de autodepuración, donde seda un proceso físico de remoción de materia suspendida. (Sedimentación) y proceso químico que mantiene las condiciones adecuadas para que los organismos puedan realizar la estabilización, transformación, y remoción de contaminantes orgánicos biodegradables.

3.2. Método de investigación

En el presente estudio se utilizaron 2 métodos de investigación: Exploratorio y experimental cuantitativo.

- **Exploratorio:** Porque se estudió y se dio a conocer una especie de microalga nativa de la zona que tienen propiedades de remover el exceso de nutrientes, que a través de su

metabolismo absorbe nutrientes como alimento. Así mismo este estudio es el pionero de la amazonia Ucayalina, en evaluar el exceso de nutrientes causantes de la eutrofización, de las plantas de aguas residuales, y dar una posible solución con un medio biológico natural.

- **Experimental Cuantitativo:** Porque se determinó el efecto de la remoción del exceso de nutrientes (nitrato-fosfato), para crear una información de línea base, debido que no existe un límite máximo permisible (Lmp) para las descargas de efluentes de planta de tratamiento de aguas residuales, y se explicó las causas que pueden generar el exceso de nutrientes en cuerpo receptores naturales.

3.3. Población y muestra

a) Lagunas de oxidación

Para la ejecución del ´proyecto se tomó efluentes de la planta de tratamiento de aguas residuales del sector nueve del distrito de Manantay, que tiene la siguiente Latitud: 8º 25’ 49’ y Longitud: 74º 34’ 29’de ubicación ,esta planta funciona bajo la tecnología de lagunas de oxidación, administrado por la EMPRESA MUNICIPAL DE AGUA POTABLE Y ALCANTARILLADO S.A, lo cual poseen 4 lagunas primarias, de 120 metros de largo x 50 metros de ancho y 2.80 metros de profundidad por cada laguna, con una velocidad de entrada de afluente de 10 l/s y 4 segundarias, 90 de largo x 30 metros de ancho y 1.5 metros de profundidad por cada una con una velocidad de salida del efluente de 5 l/s.

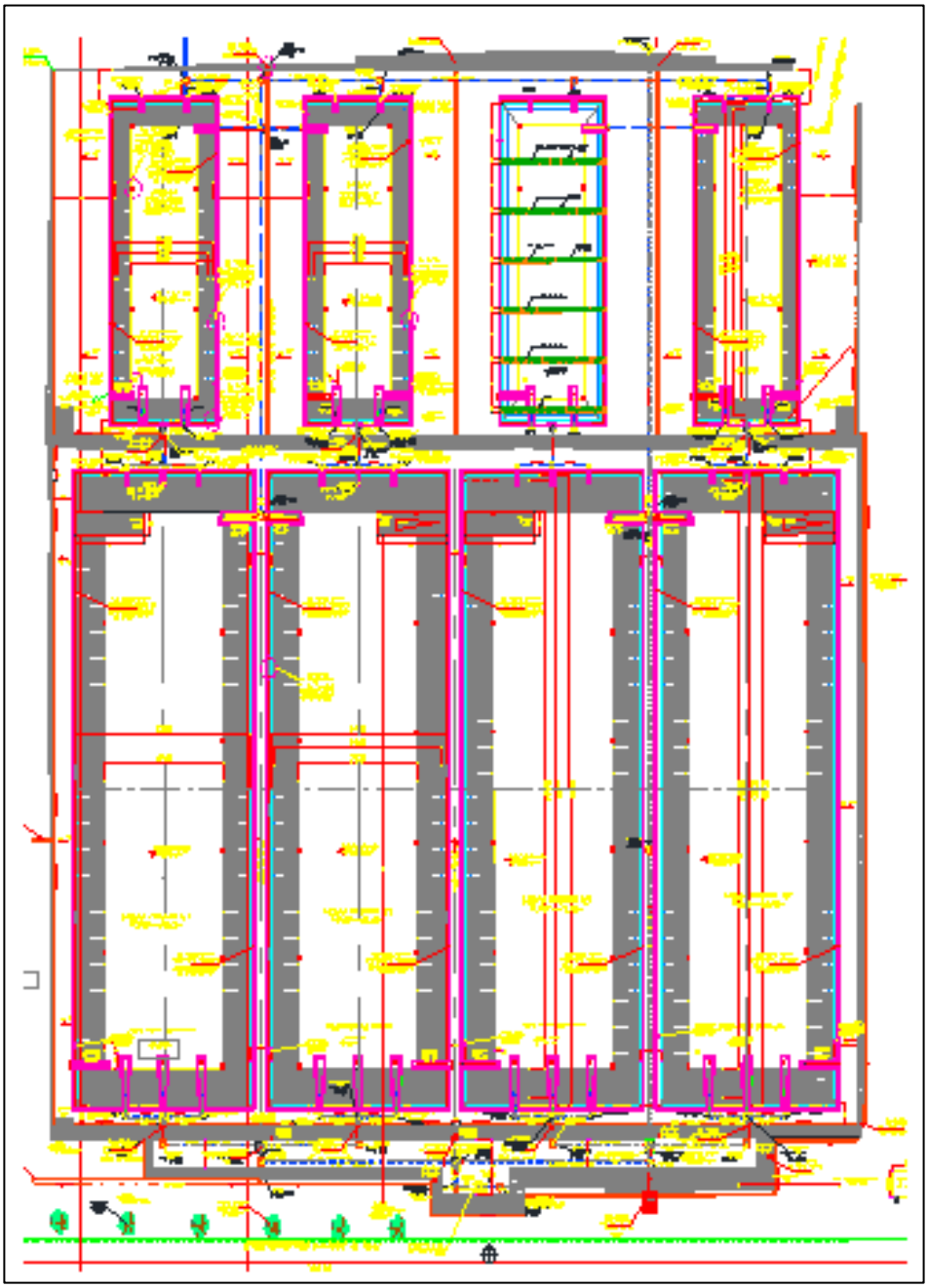
b) Muestra

Los efluentes muestreados fueron las salidas de las lagunas 1 y 2, el día 01 de marzo del 2018 a las 11:00 am, debido a que las lagunas 3-4 son utilizadas para el tratamiento de aguas residuales de derivados de petrolero. Los análisis se realizarán consecutivamente una vez inmovilizado y sembrado las microalgas en los estanques de vidrio en el laboratorio a condiciones normales de temperatura, PH y oxígeno, para saber cuánto por día disminuye el exceso de nutrientes por un periodo de 15 días.

Tabla 4. Puntos de Muestreo

Puntos de muestreo	Codificación
Efluente de la laguna primaria 1 de oxidación	**PM01**
Efluente de la laguna primaria 2 de oxidación	**PM02**

Figura 2. Plano de la Planta de tratamiento de Aguas Residuales



Fuente: EMAPACOPSA, 2015

3.4. Procedimientos de recolección de datos

3.4.1. Obtención y acondicionamiento de las muestras para aislamiento de microalgas

Se tomaron, por triplicado, 1500 ml de aguas residuales domésticas sometidas a pre-tratamiento de la Planta de tratamiento de aguas residuales (EMAPACOPSA). Frascos de vidrio transparentes fueron utilizados para trasladar las muestras al Laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la facultad de ciencias de salud, de la Universidad Nacional de Ucayali en donde se dejaron reposar en un estante de vidrio de 45 cm de largo x 35 cm de ancho y 30 cm de profundidad, con 1 fluorescente (Philips) de 30 watts, a una distancia de 30 cm, con aeración a través de bomba de aire NS F160 AQUARIUM PUMP de 220-240 voltios, y a una temperatura ambiente. Dicha iluminación continua se mantuvo durante 1 semana con la finalidad de que las microalgas se adapten a su nuevo ambiente.

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

3.4.2. Preparación del medio de cultivo

Los componentes del Medio Bold Basal (MBB) se presentan en el Anexo 1. En un frasco de dilución de 2 litro se añadieron los siguientes componentes a 988,75 ml de agua destilada estéril: 1) 0.01 g sulfato de Amonio; 2) 0.1 g fosfato acido de potasio; 3) 0.2 g carbonato de sodio; 4) 0.25 g Sulfato de Magnesio Heptahidratado; 5) 0.4 g carbonato de calcio; 6) 0.21 g cloruro de calcio; 7) 0.01 g sulfato de hierro;8) 10 g Agar.

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

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

bolsas de polietileno herméticamente cerradas guardándose en refrigeración hasta su utilización.

3.4.3. Aislamiento y cultivos de Microalgas

Luego del período de adaptación, realizaron inóculos 1ml de la muestra en tubos de ensayo (15 x 100 mm), y se centrifugo a 2000 rpm, por un espacio de 10 minutos. En total, se inocularon 12 tubos (6 réplicas por cada muestra), los cuales se incubaron por una semana en un estante de vidrio, con aeración y con iluminación continua a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se realizaron observaciones microscópicas con el fin de determinar aquellos tubos donde haya habido mejor crecimiento. (Guillard, 1975; Paniagua-Michel *et al.,* 1987). Las microalgas presentes se identificaron con la clave taxonómica de Whitford y Schumacher (1973).

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

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

3.4.4. Caracterización de las cepas unialgales

Se anotó la morfología y características celulares de la cepa, así como el color y morfología de las colonias de *Botryococcus sp*. La concentración de colonias se determinó diariamente con ayuda de una Cámara de recuento de Petroff-Hausse. Este método permite un adecuado conteo de las microalgas, distribuidas al azar, en 10 uL.

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

3.4.5. Preparación de los efluentes y condiciones experimentales

Los efluentes provenientes de la PTAR, sometidos previamente a filtros de arena y grava, fueron nuevamente filtrados 2 veces para asegurar la completa remoción de partículas en suspensión, esterilizados en autoclave en frascos de vidrio de 500 ml y guardados a 4°C hasta su uso.

3.5. Técnica e instrumentos de recolección de datos

3.5.1. Técnicas Analíticas

Se tomaron 10 ml de muestra, por cada repetición, para obtener la concentración NO_3^- y PO_4^{3-} de cada tratamiento durante los 15 días de duración del experimento. En el caso de los cultivos de células microalgales libres, para calcular el Nitrato se utilizó el test kit Nl-14(1416100), para el fosfato se utilizó el test kit Hl 3833. Las determinaciones de dichos valores fueron expresadas en mg/l.

Con estos datos, por día se registraron los valores de pH y temperatura.

3.5.2. Instrumentos de recolección de datos

a). Materiales

- Libreta de apuntes
- 3 fluorescentes (Philips) de 30 watts
- 3 peceras de vidrio de 45 cm de largo x 35 cm de ancho y 30 cm de profundidad
- 3 Bombas de aire modelo NS F160 AQUARIUM PUMP de 220-240 v
- Tubo de aireación de media pulgada de 1 metro
- Mascarilla
- Guantes
- Pipetas
- Probetas
- Vaso de precipitación de 100 ml
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Mechero

- Placas Petri
- Medidor de turbiedad modelo HACH 2100P
- Test kit de hierro modelo HACH con rango 0,1-5 mg/l IR-18
- Test kit de nitrato modelo HACH con rango 0 - 1 mg/L modelo NI-14
- Medidor de temperatura. PH, conductividad, modelo HI9813-6
- Test kit de fosforo modelo HANNA con rango de medición de 0-5 mg/l HI3833

b). Equipos

- Pipetiador
- Micro pipetiador
- Laptop
- GPS
- Centrifuga
- Microscopio electrónico
- Autoclave
- Estufa
- Balanza digital
- Cámara digital

c). Reactivos

- Sulfato de Amonio
- Fosfato acido de potasio
- Carbonato de sodio
- Sulfato de Magnesio Heptahidratado
- Carbonato de calcio
- Cloruro de calcio
- Sulfato de hierro
- Agar agar

3.6. Procesamiento para recolección de datos.

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

Los datos vaciados en el programa se exportaron al paquete estadístico SPSS v. 22 para el cálculo de la media y desviación estándar (DE). La normalidad de los datos se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de varianzas con el test de Levene. En el caso de que no existiera homocedasticidad, los datos se transformaron con raíz cuadrada. Para determinar si las concentraciones de nutrientes se mantuvieron constantes en el tiempo se usó la prueba T para muestras relacionadas. Con el fin de determinar si la concentración y la remoción de nutrientes en los cultivos microalgales. Asimismo, se llevó a cabo la prueba de ANOVA con el fin de determinar si hubo influencia e interacción entre los factores, de cepas y forma de cultivo sobre los parámetros de remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} Todo se evaluó con un 95% de confianza.

3.7. Tratamiento de datos.

Los valores presentados a través del procesamiento de datos utilizando el paquete estadístico, SPSS V. 22, el test de shapiro-wilk, el test de levene y la prueba de anova son significativos al ser comparados con los datos de crecimiento y remoción utilizando las microalgas; como se puede observar en el anexo 6.

CAPITULO IV

RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1.Crecimiento poblacional de las cepas de microalgas *Botryococcus sp.*

Tabla 5. Crecimiento de microalgas *Botryococcus sp* de la laguna 1 y 2.

Días	Laguna primaria 1 x cada 10 ul de muestra	Medio enriquecedor	% de crecimiento	Laguna primaria 2 x cada 10 ul de muestra	Medio enriquecedor	% de crecimiento
0	1	5 ml	1	1	3 ml	1
1	2	5 ml	1	1	3 ml	1
2	3	5 ml	2	1	3 ml	1
3	3	5 ml	2	2	3 ml	3
4	4	5 ml	2	2	3 ml	3
5	4	5 ml	2	2	3 ml	3
6	8	5 ml	4	3	3 ml	4
7	10	5 ml	5	3	3 ml	4
8	10	5 ml	5	4	3 ml	6
9	13	5 ml	7	4	3 ml	6
10	15	5 ml	8	4	3 ml	6
11	15	5 ml	8	5	3 ml	7
12	19	5 ml	10	6	3 ml	9
13	19	5 ml	10	6	3 ml	9
14	19	5 ml	10	7	3 ml	10
15	21	5 ml	11	7	3 ml	10
16	22	5 ml	12	9	3 ml	13
Total	188	80 ml	100	67	48 ml	100

En el crecimiento poblacional de la microalga *Botryococcus sp*, se sometió a condiciones controladas de temperatura, aireación y luz, con la finalidad que se acondicionen a su nuevo ambiente. Así mismo se observa en la tabla.6. El resultado de reproducción de microalgas, donde se hace un conteo total de 188 colonias de cepas, en el día 16 se observó la reproducción más alta al 12 % que representa 22 colonias con un total de 80 ml de medio basal en los días de reproducción para el estanque 1, para el estanque 2 se observa 67 colonias de microalgas, donde se observó la reproducción más alta al 13% que representa 9 colonias en el día 16, con un total de 48 ml de medio enriquecedor.

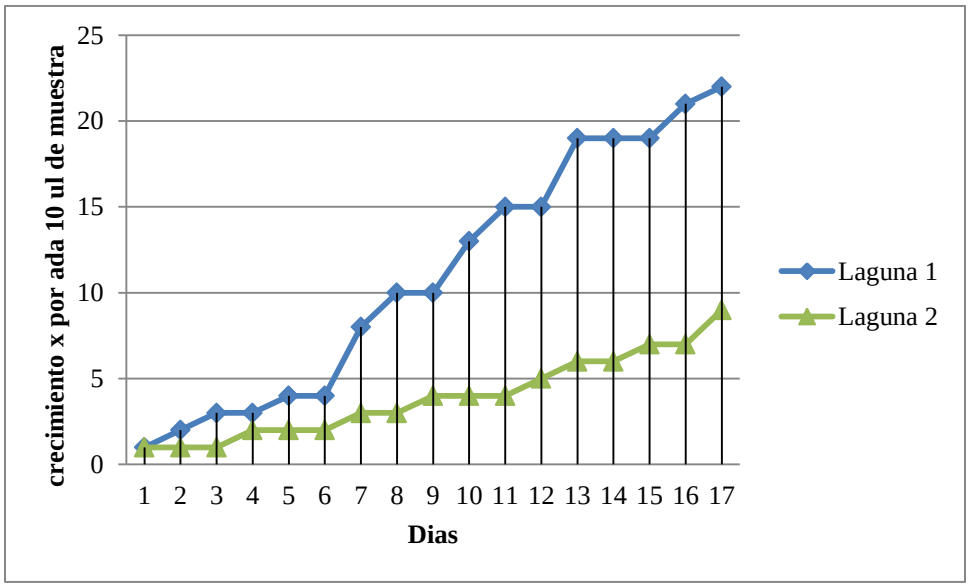


Figura 3. Crecimiento poblacional de la microalga *Botryococcus sp*.

En la figura 3. Se puede observar como el género de la especie de microalga *Botryococcus sp*, se reproduce a condiciones controladas por un periodo de 16 días, en el laboratorio, y se contabiliza con la finalidad de ver cómo es su taxonomía, al mismo tiempo se puede observar que tiene 10 um de largo x 6 um de ancho y posee un cuerpo ovoide con conexiones entre colonias, por lo tanto a través del microscopio con ayuda de una placa de recuento de Petroff-Hausse, se puede dar esta medición por cada 10 ul de muestra, se contabiliza la cantidad de reproducción, por lo cual se observa que el estanque que tiene el efluente de la laguna primaria 1 es más alta la presencia microalgal con una dosis de medio enriquecedor de 5 ml, a diferencia del estanque 2 con el efluente de la segunda laguna primaria, la producción de cepas es menor con una dosis por día de 3 ml.

4.2. Remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} por parte de los cultivos libres

Tabla 6. Remoción de nitrato y fosfatos con dosis de microalgas en aguas residuales Municipales

DIAS	DOSIS ml	Cantidad De efluente ml	NITRATO mg/l	FOSFATO mg/l	DOSIS ml	Cantidad De efluente ml	NITRATO mg/L	FOSFATO mg/L	DOSIS ml	Cantidad De efluente ml	NITRATO mg/L	FOSFATO mg/L
1			0,25	5			0,25	5			0,25	5
2			0,25	4,8			0,25	4,9			0,25	5
3			0,22	4,6			0,25	4,7			0,25	4,9
4			0,2	4,5			0,24	4,5			0,25	4,9
5			0,18	4,5			0,24	4,3			0,24	4,7
6			0,16	4,3			0,22	4			0,23	4,6
7			0,15	4			0,2	3,9			0,23	4,3
8	60	4500	0,13	3,9	**40**	4500	0,19	3,7	20	4500	0,19	4,2
9			0,1	3,7			0,18	3,5			0,18	4
10			0,1	3,4			0,14	3,1			0,15	3,9
11			0,05	3			0,14	2,9			0,15	3,7
12			0,05	2,7			0,13	2.6			0,15	3,5
13			0,05	2,6			0,12	2,3			0,15	3,2
14			0,05	1,5			0,12	2,2			0,15	3,2
15			0,05	1,5			0,12	2,2			0,15	3,2

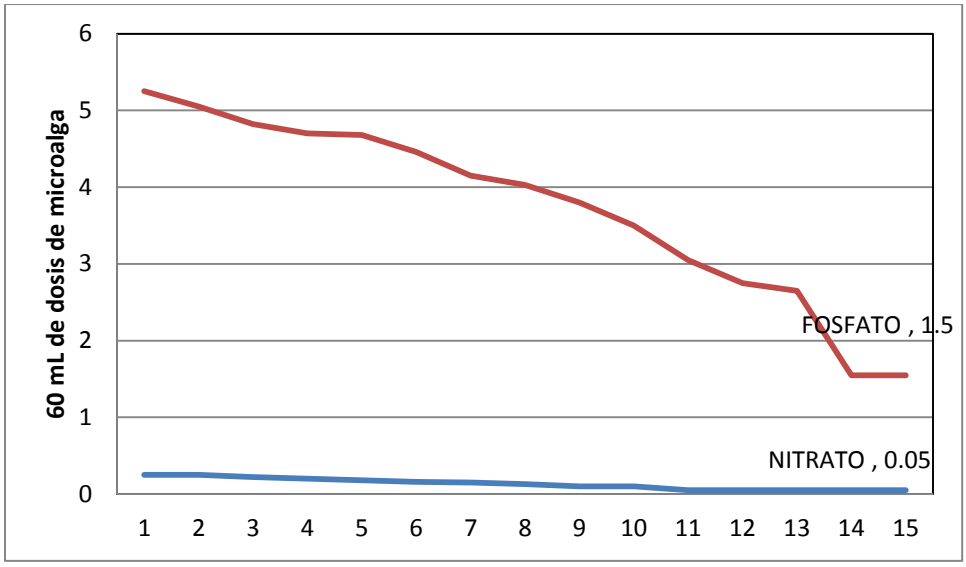


Figura 4. Evaluación de nitrato y fosfato con una dosis de 60 ml.

En la figura 4. En la evaluación de nitrato y fosfato se puede apreciar el comportamiento del monitoreo suministrando 60 ml de dosis de cultivo de microalga *Botryococcus sp*, en los 15 días de remoción del exceso de nutrientes, por lo cual el nitrato comenzó con 0,25 m/l y disminuyo hasta 0,05 ml/l teniendo un rango aceptable, cabe mencionar que a partir del día 11 al 15 se mantuvo en 0,05 ml/l. Así mismo el fosfato comenzó con un elevado indicador de 5 ml/l y durante los 15 días de remoción disminuyo hasta 1,5 ml/l lo cual garantiza la remoción efectuada por la microalga.

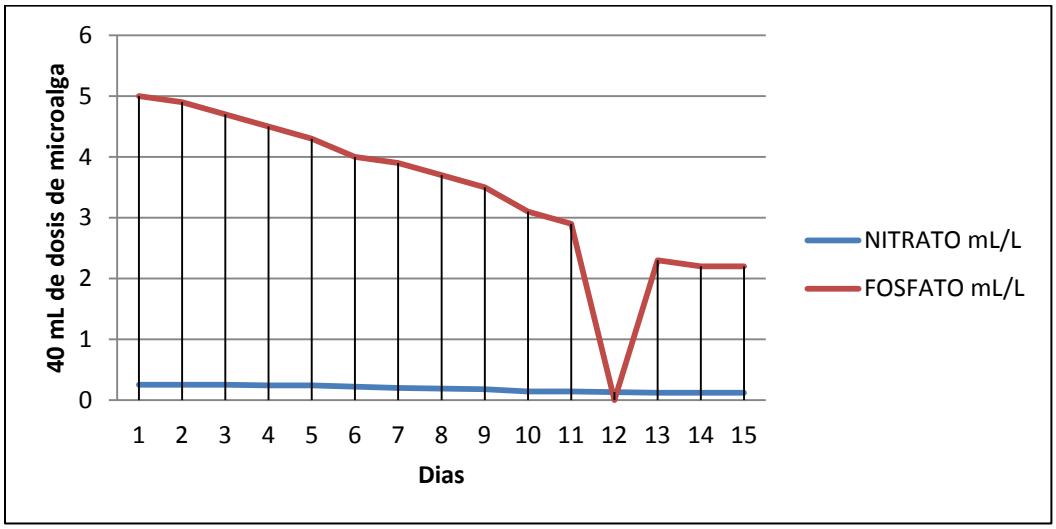


Figura 5. Evaluación de nitrato y fosfato con una dosis de 40 ml.

En la figura 5. En la evaluación de nitrato y fosfato se puede apreciar el comportamiento del monitoreo suministrando 40 ml de dosis de cultivo de microalga *Botryococcus sp*, en los 15 días de remoción del exceso de nutrientes, por lo cual el nitrato comenzó con 0,25 m/l y disminuyo hasta 0,12 ml/l teniendo un rango aceptable, cabe mencionar que a partir del día 13 al 15 se mantuvo en 0,12 ml/l. Así mismo el fosfato comenzó con un elevado indicador de 5 ml/l y durante los 15 días de remoción disminuyo hasta 2,2 ml/l, por ende, el penúltimo y último días de remoción se observó que se mantenía en 2,2 ml/l lo cual garantiza la remoción efectuada por la microalga.

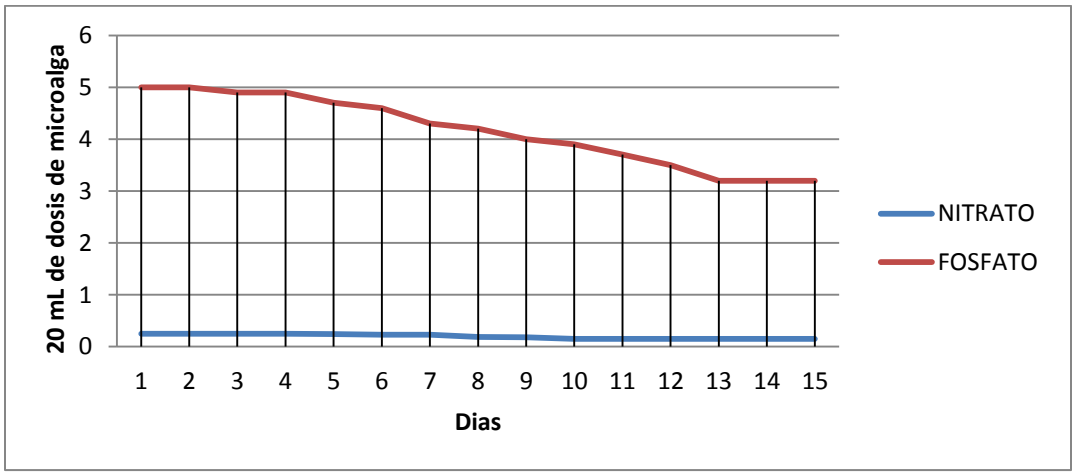


Figura 6. Evaluación de nitrato y fosfato con una dosis de 20 ml.

En la figura 6. En la evaluación de nitrato y fosfato se puede apreciar el comportamiento del monitoreo suministrando 20 ml de dosis de cultivo de microalga *Botryococcus sp*, en los 15 días de remoción del exceso de nutrientes, por lo cual el nitrato comenzó con 0,25 m/l y disminuyo hasta 0,15 ml/l teniendo un rango aceptable, cabe mencionar que a partir del día 10 al 15 se mantuvo en 0,15 ml/l. Así mismo el fosfato comenzó con un elevado indicador de 5 ml/l y durante los 15 días de remoción disminuyo hasta 3,2 ml/l lo cual garantiza la remoción efectuada por la microalga.

4.3.Discusión

El crecimiento de la microalga libres *Botryococcus* sp. En el estudio en medio basal fue de 16 días a diferencia del estudio Giovanni (2015), quien evaluó la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento

Terciario de Aguas Residuales Municipales, se reprodujeron sus cepas en 10 días en condiciones controladas de *Chlorella sp* y *Chlamydomonas sp*. Así mismo Sánchez (2004), trabajo con un sistema de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* teniendo una reproducción a los 12 días para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales. Por ende, Pérez (2009), investigo la eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado de microalgas, utilizando *Chorella vulgaris* quien se reprodujo a los 10 días y sirve de alimento para sus bacterias *Azospirrillun Brasilense*. Comparados con nuestros resultado, (16 días) resulta que los menores valores correspondientes a las otras cepas han sido desarrolladas en condiciones más optimas y en un ambiente diferente al nuestro, sin embargo las cepas nativas con las que hemos trabajado resultan las primeras que se están realizando en nuestra amazonia, por la pesquisa bibliográfica donde no se han encontrado referencia hasta el presente; lo que amerita recomendar que se repita nuestras pruebas en las mismas condiciones de los autores antes citados.

El efecto de la remoción de nitrato (NO^{3-}) y fosfato (PO_4^{3-}) en aguas residuales domésticas, utilizando la microalga *Botryococcus sp*, es de 80 % y 70% sucesivamente en un periodo de 15 días, a diferencia de la investigación realizado por Giovanni (2015), Donde evaluó la capacidad de remoción de nitrato y fosfato, con las cepas de microalgas de *Chlorella sp* y *Chlamydomonas sp,* reportaron valores altos de remoción, entre 56% a 67% para NO^{3-} y 78% a 81% para $PO4^{3-}$, en un tiempo 10 días. Pero Sánchez (2004), en su investigación denominada *Evaluación de un sistema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas,* da a conocer valores de remoción de 94% para nitrato y 92 % para fosfato en un periodo de seis días. Así mismo Pérez (2009), investigó acerca de la "*Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizando de microalga***,** durante un periodo de 5 días, reportando la eliminación de 47% - 50% con un sistema Autotrófico, de 60% - 75% con un sistema Heterotrófico y de 60% - 70% con un sistema Mixotrófico de nitrato y fosfato. Así mismo con nuestros resultados, obtenidos en 15 días, se puede apreciar que, si es una alternativa para el tratamiento de aguas residuales dementicas, en la disminución del exceso de nutrientes, por ende, es un recurso natural de la zona para un

tratamiento biológico sin la utilización excesiva de procesos físicos químicos que son muy costosos hoy en día.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- El efecto de la microalga *Botryococcus sp*., en la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} es de 80 % y 70% sucesivamente.
- El crecimiento de las cepas en condiciones controladas fue de 16 días.
- El tiempo de remoción en condiciones controladas es 15 días.
- La dosis óptima es de 60 ml de caldo de cultivo. El nitrato comenzó con 0,25 mg/l y disminuyo hasta 0,05 mg/l el fosfato comenzó con un elevado indicador de 5 ml/l y durante los 15 días de remoción disminuyo hasta 1,5 mg/l.

5.2. Recomendaciones

- Evaluar la utilización de microalgas de agua dulce en el tratamiento terciario de aguas residuales para la conservación de cuerpos receptores naturales
- Combinar la utilización de microalgas *Botryococcus sp.* con las plantas nativas como la *Pistia stratiotes* (lechuga de agua) para el tratamiento de aguas de residuales, para hacerle más eficiente en la remoción de nutrientes**.**
- Experimentar con sistemas de co-inmobilización bacteria-alga o consorcios microalgales que optimice la remoción de contaminantes en aguas residuales.

5.3. Bibliografía

- Acleto, C. "Algas Marinas del Perú de Importancia económica". U.N.M.S.M. Museo de Historia Natural, Departamento de Botánica, 1986 pp. 88-107
- Ana, S. (2015). "Cultivo de consorcio microalgal autóctono y biorremediación de efluentes urbanos "en la Universidad Nacional de Cuyo, Argentina
- APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20da edición. Ed. American Public Health Association, Washington, DC; 1999.
- Aslan S, Kapdan IK. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecol. Eng. 2006; 28: 64–70.
- Barsanti L. & Gualtieri P., (2006). Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Raton, Florida: Taylor & Francis Group
- Bashan, L. E., y Bashan, Y. 2003. "Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales (Microalgae growth-promoting bacteria: a novel approach in wastewater treatment)", Revista Colombiana de Biotecnología p: 85-90.
- Biswas, A. (2010). "Cambiar el paisaje global de la gestión del agua", revista mexicana p:12-15.
- Bitton, G.2005. "Wastewater microbiology.3rd edition .Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology", Wiley and Sons Publications.New Jersey.p.213-222.
- Borowizka, M. (1999).Algal biotechnology products and process.matching science and economics . journal of applied phycology p:267-279.
- Caldwell, 1940. "Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales", Madrid .p. 324.
- Chisti, Y. (2009). Biodiesel from microalgae. Biotechnology Advances. Palmerston North, Nueva Zelanda: ELSEVIER. [Versión electrónica]: 294–306
- Chisti, y.(2007).biodisel from microalgae. boitechnol 294-306
- Escorihuela, A., Núñez, M., Rosales, N., Mora, R., Morales, E. (2007). Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Revista Facultad Agronómica (LUZ). 24: 225–230.
- Organización de las naciones unidas (2008). Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico. Tercera parte – Funcionamiento del criadero: cultivo de algas.

- Organización de las naciones unidas (2009). Departamento de Pesca. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. CULTIVO DE MICROALGAS.
- García, T. (2012). "Determinación de la eficiencia de remoción de nutrientes en el tratamiento de aguas residuales domesticas", Lima.
- González M., (2010). Alternativas en el Cultivo de Microalgas. Tesis de Grado. Universidad Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador
- Guillard RRL. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith WL, Chanley MH, editor. Culture of Marine Invertebrate Animals. Nueva York: Plenum Press; 1975. p. 26–60.
- Hidalgo, S. (2010). "Diagnóstico de la contaminación por aguas residuales domésticas, cuenca baja de la quebrada la Macana, San Antonio de Prado, Municipio de Medellin", Medellin.
- Huntley, M, 2007. mitigation and renewable oil from photosyntheticmicrobes p: 573 – 608
- Jimenez-Perez MV, Sánchez-Castillo P, Romera O, Fernández-Moreno D, Pérez-Martínez C. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. Enzyme Microb. Tech. 2004; 34: 392-398.
- José Giovanni (2015). "Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales", Lima - Perú.
- Lee S., Kim S., Kim J., Kwon G., Yoon B., Oh H., (2001). Effects of harvesting method and growth stage on the flocculation of the green alga *Botryococcus* braunii. Andong, Korea: Letters in Applied Microbiology. [Versión electrónica]
- Li, Y, et al, 2008. biofuels from microalgae. biotechnol prog 24 p: 815-820
- Madigan, M.2004. brock, "Biologia de organismos. 10 ma Edición. Pearsons Education", Madrid .p.137.
- Metcalf y Eddy Inc. (1995) "Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización", Ed. Mc. Graw-Hill. España. 3 Volúmenes.
- Moreno, F. (2010). "Metodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia", Mexico.

- NORM-001-SEMARNAT-1996. “Norma Oficial Mexicana que establece los límites permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales. Secretaria del medio ambiente, Recursos Naturales y pesca”, Diario oficial de la federación Mexico, DF.
- O’reilly, A. M. and Scott, J.A. (1995). “Defined co immobilization of mixed microorganism cultures”, Enzyme and Microbial Technology 17: 636-646.
- Octavio Pérez (2009) “Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizando microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico”, La Paz.
- Ogbonna, J.C., Yoshisawa, H. and Tanaka, H. (2000). “Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms”, Journal of Applied Phycology.12: 277-284.
- Orosa, M., Valero, J.E., Herrero, C. y Abalde, J. (2001). “Comparison of the accumulation of astaxanthin in Haematococcus pluvialis and other green microalgae under N-starvation and high light conditions”, Biotechnol. Lett. 23: 1079-1085.
- Oswald, W.J. (1988). “Microalgae and wastewater treatment. En; Microbial biotechnology. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (eds)”, Cambridge University Press. Pp. 691-707.
- Oswald, W.J. y Gotaas H.B., (1957). “Photosynthesis in sewage treatment”, Trans. Am. Soc. Civ. Eng. 122: 73-105.
- Pablo, H. (2004). “Evaluación de un sistema de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas”, Bolivia - La Paz.
- Pearcy, R.W. (1991). *“Radiation and Light Measurements*. In: R.W. Pearcy, J.R. Ehleringer, H.A. Mooney and P.W. Rundel (Eds.). Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation”, Chapman and Hall, London. pp. 97-116.
- Pelczar, M. J., Reid, R. D. Y Chain, E. C. S. (1982) “Microbiologia. 4ª. Edición”, McGraw- Hill Ed. México. 826 pp.
- Richmond A., (2004). Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology. Primera edición. USA: Blackwell Publishing
- Rodríguez, Omar (2009), "contaminación del agua -Eutrofización, Quito-Ecuador

- Stevenson J., Bothwell M. & Lowe R., (1996). Algal Ecology: Fresh water Benthic Ecosystems. USA: Elsevier.
- Whitford LA, Schumacher GJ. A manual of fresh-water algae. Carolina del Norte: Sparks Press; 1973.
- Witt, v, borchardt, j.a. 1960. the removal of nitrogen and phosphorus from sewage effluents through the use of algal culture- journal of biochemical and microbiological technology and engineering. 2:187-203

5.4. Anexo

Anexo 1. Componentes del Medio Basal Bold (MBB)

		Para 1000 ml de solución
1	$(NH_4)_2SO_4$	0.01g
2	K_2HPO_4	0.1g
3	Na_2CO_3	0.2 g
4	$MgSO_4.7H_2O$	0.25g
5	$Ca(NO_3)$	0.4 g
6	NaCl	0.21g
7	$FeSO_4$	0.01g
8	Agar-agar	10g
9	Agua destilada	988.75 ml

El método de preparación de 1000 ml de medio consiste en mezclar los nutrientes y reactivos químicos de la solución y agua destilada.

Anexo 2. Condiciones de cultivo de la microalga *Botryococcus sp.*

Parámetros	Condiciones
Temperatura	24°C
Luz	Florecentes de 30 watts
Iluminación	Continua-ciclo 24 horas
Agitación	Aireación constante

Anexo 3. Monitoreo de parámetros de pH y conductividad

Tiempo (día)	pH	Conductividad (mS/cm)
1	7,86	2,70
2	8,39	2,74
3	8,45	2,72
4	8,57	2,66
5	8,62	2,77
6	8,69	2,70
7	8,73	2,68
8	8,81	2,75
9	8,89	2,66
10	8,97	2,69
11	9,16	2,73
12	9,23	2,77
13	9,25	2,74
14	9,25	2,71
15	9,25	2,68

La conductividad no mostró diferencias significativas durante el ensayo. El pH aumentó desde valores de 7,86-9,25 debido a un mayor consumo de CO2 coincidiendo con una elevada densidad algal.

Anexo 4. Parámetros físico-químicos y biológicos al inicio y al final del estudio

Parámetros	Inicio del estudio	Final del estudio
Fosfato	5 mg/L	1,5 mg/L
Nitrato	0,25 mg/L	0,05 mg/L
DBO	239 mg/L	35mg/L
DQO	323 mg/L	65 mg/L
Coliformes totales	24 000 NMP/100 mL	3200 NMP/100 mL
Coliformes fecales	7 700 NMP/100 mL	1 000 NMP/100 mL

Anexo 5. Parámetros físico químicos de la PTAR

Parámetro	Unidad de medida	Valor	Lmp
Aceite y grasas	mg/L	43	20
Coliformes termotolerantes	NMP/100 mL	24000	10,000
Demanda bioquímica de oxigeno	mg/L	239	100
Demanda química de oxigeno	mg/L	323	200
pH	Unidad	7,86	6,5-8,5
Solidos totales en suspensión	mL/L	230	150
Temperatura	°C	26	<35

Anexo 6. Análisis de ANOVA de NO_3^- y PO_4^3 de la microalga. Los asteriscos señalan factores altamente significativos (**).

Nutriente	factor	F	P
NO_3^-	Remoción	79,7	<0.001**
PO_4^{3-}	Remoción	69,4	<0.001**
	Crecimiento	68,10	<0.001**

Anexo 7. Constancias de laboratorio

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Certificado referencial N° 180505

Solicitante	Bch. Barrantes Santillan Enrique. Bch. Pittman Tapullima Ruiddy
Tipo de muestra	Agua Residuales tratadas con microoalgas – Dosis 20ml
Fecha de muestreo	15 de Abril del 2018
Hora de toma de muestra	9:30 am
Hora de ingreso de muestra	1:00 pm
Fecha de emisión de certificado	04 de Mayo del 2018
Cadena de custodia N°	001- 03-2018
Condición de almacenamiento	Refrigeración
Responsable del muestreo	Bch. Barrantes Santillan Enrique.
Responsable de laboratorio	Blgo. Mg. Mcblg. EMILIO PASCUAL VALENTÍN
Normativa comparada	--

RESULTADOS DE ANÁLISIS

Días	Unidad	Resultados NO3	Resultados PO4
1	mg/l	0,25	5
2	mg/l	0,25	5
3	mg/l	0,25	4,9
4	mg/l	0,25	4,9
5	mg/l	0,24	4,7
6	mg/l	0,23	4,6
7	mg/l	0,23	4,3
8	mg/l	0,19	4,2
9	mg/l	0,18	4
10	mg/l	0,15	3,9
11	mg/l	0,15	3,7
12	mg/l	0,15	3,5
13	mg/l	0,15	3,2
14	mg/l	0,15	3,2
15	mg/l	0,15	3,2

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Blgo. Mg. Mcblg. Emilio Pascual Valentin
JEFE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Certificado referencial N° 180504

Solicitante	Bch. Barrantes Santillan Enrique. Bch. Pittman Tapullima Ruiddy
Tipo de muestra	Agua Residuales tratadas con microoalgas – Dosis 40ml
Fecha de muestreo	15 de Abril del 2018
Hora de toma de muestra	9:30 am
Hora de ingreso de muestra	1:00 pm
Fecha de emisión de certificado	04 de Mayo del 2018
Cadena de custodia N°	001- 03-2018
Condición de almacenamiento	Refrigeración
Responsable del muestreo	Bch. Barrantes Santillan Enrique.
Responsable de laboratorio	Blgo. Mg. Mcblg. EMILIO PASCUAL VALENTÍN
Normativa comparada	--

RESULTADOS DE ANÁLISIS

Días	Unidad	Resultados NO3	Resultados PO4
1	mg/l	0,25	5
2	mg/l	0,25	4,9
3	mg/l	0,25	4,7
4	mg/l	0,24	4,5
5	mg/l	0,24	4,3
6	mg/l	0,22	4
7	mg/l	0,2	3,9
8	mg/l	0,19	3,7
9	mg/l	0,18	3,5
10	mg/l	0,14	3,1
11	mg/l	0,14	2,9
12	mg/l	0,13	2.6
13	mg/l	0,12	2,3
14	mg/l	0,12	2,2
15	mg/l	0,12	2,2

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Blgo. Mg. Mcblg. Emilio Pascual Valentín
JEFE

*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Certificado referencial N° 180503

Solicitante	Bch. Barrantes Santillan Enrique. Bch. Pittman Tapullima Ruiddy
Tipo de muestra	Agua Residuales tratadas con microoalgas – Dosis 60ml
Fecha de muestreo	15 de Abril del 2018
Hora de toma de muestra	9:30 am
Hora de ingreso de muestra	1:00 pm
Fecha de emisión de certificado	04 de Mayo del 2018
Cadena de custodia N°	001- 03-2018
Condición de almacenamiento	Refrigeración
Responsable del muestreo	Bch. Barrantes Santillan Enrique.
Responsable de laboratorio	Blgo. Mg. Mcblg. EMILIO PASCUAL VALENTÍN
Normativa comparada	--

RESULTADOS DE ANÁLISIS

Días	Unidad	Resultados NO3	Resultados PO4
1	mg/l	0,25	5
2	mg/l	0,25	4,8
3	mg/l	0,22	4,6
4	mg/l	0,2	4,5
5	mg/l	0,18	4,5
6	mg/l	0,16	4,3
7	mg/l	0,15	4
8	mg/l	0,13	3,9
9	mg/l	0,1	3,7
10	mg/l	0,1	3,4
11	mg/l	0,05	3
12	mg/l	0,05	2,7
13	mg/l	0,05	2,6
14	mg/l	0,05	1,5
15	mg/l	0,05	1,5

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Blgo. Mg. Mcblg. Emilio Pascual Valentin
JEFE

*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Certificado referencial N° 180501

Solicitante	Bch. Barrantes Santillan Enrique. Bch. Pittman Tapullima Ruiddy
Tipo de muestra	Agua Residuales
Fecha de muestreo	01 de Marzo del 2018
Hora de toma de muestra	9:30 am
Hora de ingreso de muestra	1:00 pm
Fecha de emisión de certificado	04 de Mayo del 2018
Cadena de custodia N°	001- 03-2018
Condición de almacenamiento	Refrigeración
Responsable del muestreo	Bch. Barrantes Santillan Enrique.
Responsable de laboratorio	Blgo. Mg. Mcblg. EMILIO PASCUAL VALENTÍN
Normativa comparada	D.S.003-2010-MINAM –Limites Máximos Permisibles para efluentes de PTAR.

RESULTADOS DE ANÁLISIS

Parámetros	Unidad	Resultados	D.S.003-2010-MINAM
Fosfato	mg/L	5 mg/L	**
Nitrato	mg/L	0,25 mg/L	**
DBO	mg/L	239 mg/L	100
DQO	mg/L	323 mg/L	200
Coliformes totales	NMP/100 mL	24 000 NMP/100 mL	**
Coliformes fecales	NMP/100 mL	7 700 NMP/100 mL	10 000

Nd: No Detectable a Nivel de Cuantificación.
*** El parámetro no aplica para esta sub categoría*

La muestra analizada comparada con el D.S.003-2010-MINAM –Límites Máximos Permisibles para efluentes de PTAR., ***NO CUMPLEN*** .

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Blgo. Mg. Mcblg. Emilio Pascual Valentín
JEFE

*

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Certificado referencial N° 180502

Solicitante	Bch. Barrantes Santillan Enrique. Bch. Pittman Tapullima Ruiddy
Tipo de muestra	Agua Residuales
Fecha de muestreo	15 de Abrl del 2018
Hora de toma de muestra	9:30 am
Hora de ingreso de muestra	1:00 pm
Fecha de emisión de certificado	04 de Mayo del 2018
Cadena de custodia N°	001- 03-2018
Condición de almacenamiento	Refrigeración
Responsable del muestreo	Bch. Barrantes Santillan Enrique.
Responsable de laboratorio	Blgo. Mg. Mcblg. EMILIO PASCUAL VALENTÍN
Normativa comparada	D.S.003-2010-MINAM –Limites Máximos Permisibles para efluentes de PTAR.

RESULTADOS DE ANÁLISIS

Parámetros	Unidad	Resultados	D.S.003-2010-MINAM
Fosfato	mg/L	1,5 mg/L	**
Nitrato	mg/L	0,05 mg/L	**
DBO	mg/L	35mg/L	100
DQO	mg/L	65 mg/L	200
Coliformes totales	NMP/100 mL	3200 NMP/100 mL	**
Coliformes fecales	NMP/100 mL	1 000 NMP/100 mL	10 000

Nd: No Detectable a Nivel de Cuantificación.

*** El parámetro no aplica para esta sub categoría*

La muestra analizada comparada con el D.S.003-2010-MINAM –Límites Máximos Permisibles para efluentes de PTAR., ***SI CUMPLEN***.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Blgo. Mg. Mcblg. Emilio Pascual Valentin

*

Anexo 8. Iconografías

Foto 1. Toma de muestra



Foto 2. Toma de parámetros fisicoquímicos de la laguna de oxidación





Foto 3. Centrifugación de muestra



Foto 4. Pesado de reactivos químicos

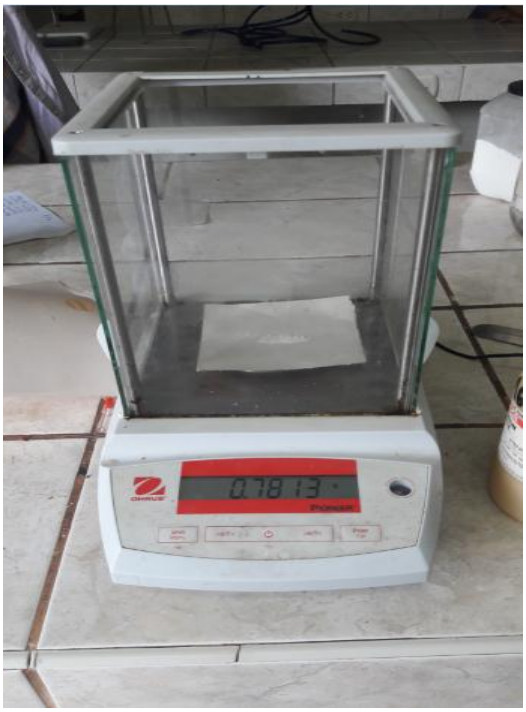




Foto 5. Preparación de medio basal

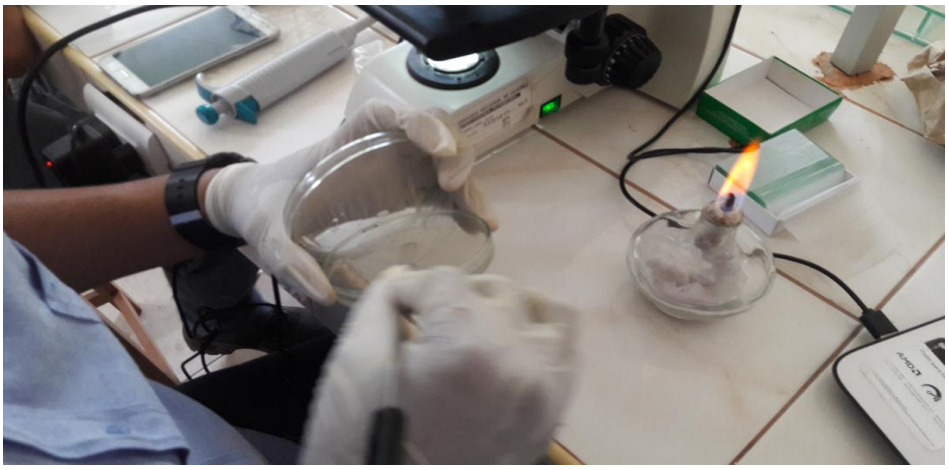


Foto 6. Observación de microalgas en el microscopio





Foto 7. Raspado de agar



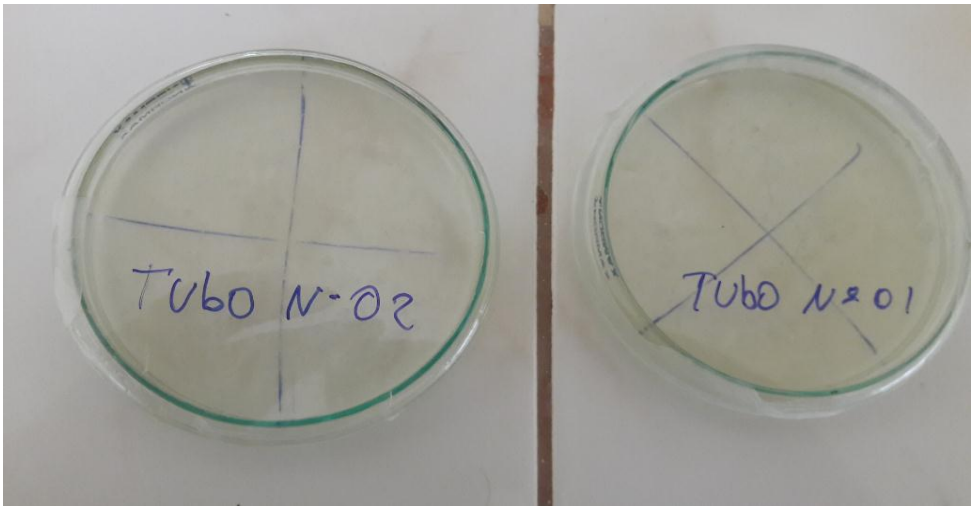


Foto 8. Aislamiento de microalgas



Foto 9. Crecimiento de microalgas *Botryococcus sp.*

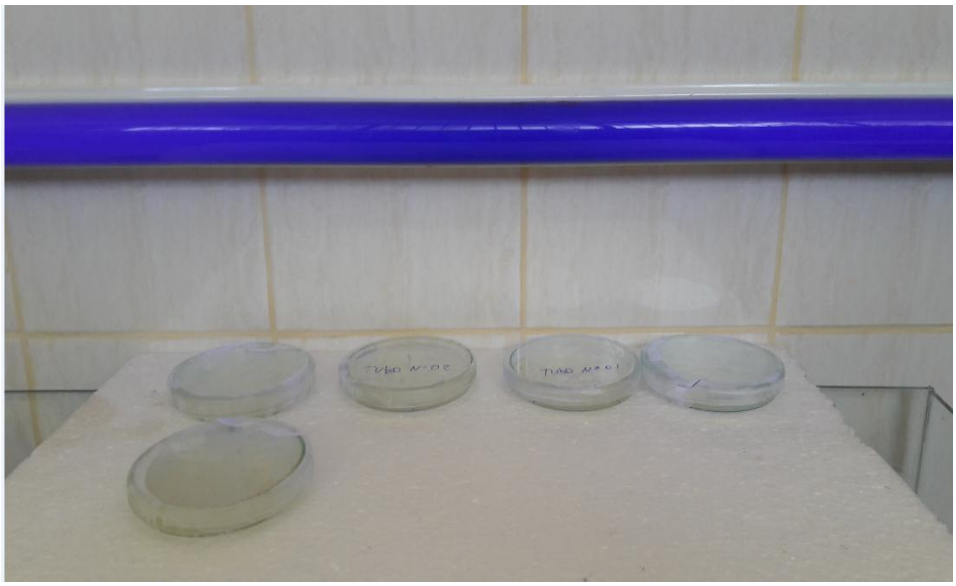


Foto 10. Remoción de nitrato y fosfato



Foto 11. Análisis de nitrato y fosfato



