



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA
AMAZÓNICA**

**TESIS
CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE MICROALGAS
AMAZÓNICAS EN LIXIVIADO DE RELLENO
SANITARIO, LORETO- 2015**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR(A) EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA AMAZÓNICA**

PRESENTADO POR : LUZ ESTHER VELA DE TUESTA

**ASESOR (ES) : DRA. MARIANELA COBOS RUÍZ
DR. ROBERTO PEZO DÍAZ**

IQUITOS, PERÚ

2020



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA
AMAZÓNICA**

**TESIS
CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE MICROALGAS
AMAZÓNICAS EN LIXIVIADO DE RELLENO
SANITARIO, LORETO- 2015**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR(A) EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN ECOLOGÍA AMAZÓNICA**

PRESENTADO POR : LUZ ESTHER VELA DE TUESTA

**ASESOR (ES) : DRA. MARIANELA COBOS RUÍZ
DR. ROBERTO PEZO DÍAZ**

IQUITOS, PERÚ

2020



UNAP

Escuela de Postgrado "JOSÉ TORRES VÁSQUEZ"
Oficina de Asuntos Académicos



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
008-2020-OAA-EPG-UNAP

Con Resolución Directoral N° 0151-2020-EPG-UNAP, se autoriza la sustentación de la tesis: "CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE MICROALGAS AMAZÓNICAS EN LIXIVIADO DE RELLENO SANITARIO, LORETO-2015", teniendo como jurados a los siguientes profesionales:

| | |
|--------------------------------------|------------|
| Blgo. Enrique Ríos Isern, Dr. | Presidente |
| Blgo. Luis Exequiel Campos Baca, Dr. | Miembro |
| Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr. | Miembro |
| Blga. Marianela Cobos Ruiz, Dra. | Asesora |
| Blgo. Roberto Pezo Díaz, Dr. | Asesor |

A los catorce días del mes de febrero del 2020, a horas 10:00 a.m., en el Auditorio de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, se constituyó el Jurado evaluador y dictaminador, para presenciar y evaluar la sustentación de la tesis: "CAPACIDAD DE BIORREMEDIACIÓN DE MICROALGAS AMAZÓNICAS EN LIXIVIADO DE RELLENO SANITARIO, LORETO-2015" presentado por la señora LUZ ESTHER VELA DE TUESTA, como requisito para obtener el **Grado Académico de Doctora en Ciencias con mención en Ecología Amazónica** que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron:

.....
abril W. rodriguez
.....

El Jurado, después de la deliberación correspondiente en privado, llegó a las siguientes conclusiones, la sustentación es:

1. Aprobado como: a) Excelente () b) Muy bueno (X) c) Bueno ()
2. Desaprobado: ()

Observaciones :

A continuación, el Presidente del Jurado, da por concluida la sustentación, siendo las ^{12:45}.....a.m. del día catorce de febrero del 2020; con lo cual, se le declara a la sustentante ^{opto}..... para recibir el **Grado Académico de Doctora en Ciencias con mención en Ecología Amazónica**

[Signature]
Blgo. Enrique Ríos Isern, Dr.
Presidente

[Signature]
Blgo. Luis Exequiel Campos Baca, Dr.
Miembro

[Signature]
Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.
Miembro

[Signature]
Blga. Marianela Cobos Ruiz, Dra.
Asesora

[Signature]
Blgo. Roberto Pezo Díaz, Dr.
Asesor

HOJA DE APROBACIÓN

TESIS APROBADO EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA DEL DÍA 14 DE FEBRERO DEL AÑO 2020 EN EL AUDITORIO DE LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA, DE LA CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ.



DR. ENRIQUE RIOS ISERN
PRESIDENTE



DR. LUIS EXEQUIEL CAMPOS BACA
MIEMBRO



DR. JUAN CARLOS CASTRO GOMEZ
MIEMBRO



DRA. MARIANELA COBOS RUÍZ
ASESORA



DR. ROBERTO PEZO DÍAZ
ASESOR

A mi FAMILIA, por darme soporte a lo largo de este proceso, por creer en mis capacidades, incluso en los momentos más difíciles.

LUZ ESTHER

AGRADECIMIENTO

En primer lugar agradecer a DIOS por guiarme con su sabiduría y fortalecerme en momentos difíciles, impulsándome hasta la culminación de ésta etapa lograda.

A mis asesores: Dra. Marianela Cobos Ruiz por compartir el interés en la investigación de éste maravilloso grupo de organismos fotosintéticos; por la orientación, dedicación, el aprecio, y la gran oportunidad de llegar hasta aquí. Al Dr. Roberto Pezo Díaz, por las sugerencias alcanzadas para la culminación de la tesis.

A mi esposo Wilson Manuel, mis hijas Areli y Erika Guadalupe; por su amor a lo largo de mi vida, su ayuda constante y apoyo incondicional a mis decisiones; que me motivaron a emprender y culminar esta importante realidad, de superación personal y profesional.

A mi hermana María del Carmen, por su cariño, por compartir sueños y vivencias a lo largo de estos años.

Al personal del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Científica del Perú, por las facilidades en espacio y equipos; gracias amigos (as) por los buenos momentos, y de manera especial al Licenciado en Ecología Segundo Levi Estela Moreno, por su valioso apoyo en el trabajo experimental ejecutado.

A los profesores del programa de Doctorado en Ciencias con Mención en Ecología Amazónica, y a la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, alma mater, que nos brinda la oportunidad de actualizarnos permanentemente.

A todas aquellas personas que, de una manera u otra, me facilitaron el camino para la culminación de la tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | Páginas |
|--|----------------|
| Carátula | i |
| Contracarátula | ii |
| Acta de sustentación | iii |
| Jurado | iv |
| Dedicatoria | v |
| Agradecimiento | vi |
| Índice de contenido | vii |
| Índice de tablas | ix |
| Índice de gráficos | x |
| Índice de ilustraciones | xi |
| Resumen | xii |
| Abstract | xiii |
| Resumo | xiv |
| | |
| INTRODUCCIÓN | 01 |
| | |
| CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO | 03 |
| 1.1. Antecedentes | 03 |
| 1.2. Bases teóricas | 11 |
| 1.2.1. Biorremediación | 11 |
| 1.2.2. Características generales de las microalgas | 13 |
| 1.2.3. Aplicaciones de las microalgas | 15 |
| 1.2.4. Caracterización Bioquímica de microalgas | 17 |
| 1.2.5. Lixiviado | 18 |
| 1.2.6. Características de los lixiviados | 20 |
| 1.2.7. Efectos ambientales de los lixiviados | 20 |
| 1.3. Definición de términos básicos | 23 |
| | |
| CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS | 27 |
| 2.1. Variables y su operacionalización | 27 |

| | |
|--|----|
| 2.2. Formulación de la hipótesis | 28 |
| CAPÍTULO III: METODOLOGÍA | 29 |
| 3.1. Tipo y diseño de la investigación | 29 |
| 3.2. Población y muestra | 29 |
| 3.3. Técnicas e instrumentos | 31 |
| 3.4. Procedimientos de recolección de datos | 31 |
| 3.4.1. Aislamiento de microalgas <i>Chlorella sp.</i> y <i>Scenedesmus sp</i> provenientes de las cuencas hidrográficas Nanay e Itaya | 31 |
| 3.4.2. Caracterización bioquímica de las microalgas <i>Chlorella sp.</i> y <i>Scenedesmus sp.</i> aisladas y sometidas al lixiviado | 35 |
| 3.4.3. Evaluación de la capacidad de remoción de los contaminantes químicos inorgánicos y metales en lixiviado, usando microalgas amazónicas <i>Chlorella sp.</i> y <i>Scenedesmus sp.</i> | 37 |
| 3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos | 38 |
| 3.6. Aspectos éticos | 38 |
| CAPÍTULO IV: RESULTADOS | 39 |
| CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS | 53 |
| CAPÍTULO VI: PROPUESTA | 63 |
| CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES | 65 |
| CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES | 66 |
| CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 67 |

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

| | | Páginas |
|---------|--|----------------|
| Tabla 1 | Contenido de ácidos grasos en las microalgas <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. en lixiviado. Loreto, 2018 | 42 |
| Tabla 2 | Variables químicas de contaminantes inorgánicos en lixiviado utilizando <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. Loreto, 2018 | 44 |
| Tabla 3 | Remoción de metales y no metales en lixiviado utilizando las microalgas <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. Loreto, 2018 | 46 |
| Tabla 4 | Análisis de Componentes Principales de las variables químicas y metales en lixiviado y con tratamiento de microalgas. Loreto, 2018 | 48 |
| Tabla 5 | Análisis de Similitud (ANOSIM) de las variables químicas y metales de lixiviado y con tratamiento de microalgas. Loreto, 2018. | 52 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | | |
|-----------|--|----|
| Gráfico 1 | Caracterización bioquímica de las microalgas <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. en lixiviado (C/T): cultivo en 50% lixiviado + 50% cultivo microalgal, (G/C): grupo control, cultivo microalgal | 40 |
| Gráfico 2 | Análisis de Componentes Principales de las Variables Químicas y Metales de las microalgas <i>Chlorella</i> sp y <i>Scenedesmus</i> en lixiviado-Loreto 2018 | 50 |

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

| | | |
|-------------|--|----|
| Fotografía1 | Vista parcial de la topografía- Ciudad de Nauta, 2018 | 30 |
| Fotografía2 | Localización del Relleno Sanitario Manual- Ciudad de Nauta, 2018 | 30 |
| Fotografía3 | A: Cultivos de microalgas después del aislamiento | 39 |
| | B: Microalga <i>Scenedesmus</i> sp. 400x | 39 |
| | C: Microalga <i>Chlorella</i> sp., 400x | 39 |

RESUMEN

Las microalgas han sido utilizadas ampliamente en procesos de biorremediación con el fin de remover metales pesados y materia orgánica. El objetivo de la tesis fue evaluar la capacidad de las microalgas amazónicas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, para biorremediación de lixiviado de relleno sanitario. Se aislaron las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* utilizando métodos de lavado celular por pipeteo y siembra en agar. Se desarrolló un sistema experimental por 15 días. Se realizó la caracterización bioquímica de las microalgas sometidas a cultivo en lixiviado. Se evaluó el perfil de crecimiento y se analizó la capacidad de remoción a contaminantes químicos inorgánicos al inicio y al término del experimento. Los resultados muestran que se logró aislar las microalgas de interés. La caracterización bioquímica muestra que lípidos totales, carbohidratos y proteínas disminuyeron sus valores con respecto al grupo "control"; se registró una amplia gama de ácidos grasos, destacando el ácido eláidico por su alto valor 16,33 mgFA/g *Chlorella sp.* y 90,46 mg FA/g *Scenedesmus sp.* Resaltó la capacidad de remoción de amonio en las microalgas 70% *Chlorella sp.*, 81% *Scenedesmus sp.*; nitratos y fósforo fueron removidos más eficientemente por la microalga *Scenedesmus sp.* 79% y 47% respectivamente. Asimismo, se evidenció que la mayoría de los metales fueron removidos, destacando aluminio (99%), calcio (68%) y hierro (79%). Se concluye que, las microalgas amazónicas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, tienen una alta capacidad de biorremediar lixiviado.

Palabras clave: Biorremediación, Lixiviado, Metales pesados, Microalgas.

ABSTRACT

Microalgae have been widely used in bioremediation processes in order to remove heavy metals and organic matter. The objective of the thesis was to evaluate the capacity of the Amazonian microalgae *Chlorella sp* and *Scenedesmus sp.* for bioremediation of landfill leached. *Chlorella* and *Scenedesmus* microalgae were isolated using cell washing methods by pipetting and agar seeding. An experimental system was developed for 15 days. The biochemical characterization of both microalgae undergoing leached culture was performed. The growth profile was evaluated and the ability to remove inorganic chemical contaminants at the beginning and at the end of the evaluation was analyzed. The results show that it was possible to isolate the microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* The biochemical characterization shows that total lipids, carbohydrates and proteins, decreased their values with respect to the "control" group; a wide range of fatty acids was recorded, highlighting the elaidic acid for its high value 16,33 mgFA/g *Chlorella sp.* y 90,46 mg FA/g *Scenedesmus sp.*. I highlight the ability to remove ammonia in microalgae 70% *Chlorella sp.* 81% *Scenedesmus sp.*; nitrates and phosphorus were removed more efficiently by the microalgae *Scenedesmus sp* 79% y 47% respectively. Likewise, it was evidenced that most of the metals were removed, highlighting aluminum (99%), calcium (68%) and iron (79%). It is concluded that, the Amazonian microalgae *Chlorella sp.* and *Scenedesmus sp.* have a high capacity of bioremediate leached.

Keywords: Bioremediation, Leached, Heavy metals, Microalgae.

RESUMO

As microalgas foram amplamente utilizadas em processos de biorremediação para remover metais pesados e matéria orgânica. O objetivo da tese foi avaliar a capacidade das microalgas amazônicas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* em biorremediação de lixiviados de aterros sanitários. Foram isoladas as microalgas de *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* usando métodos de lavagem de células por pipetagem e semeadura em ágar. Desenvolveu-se um sistema experimental por 15 dias. Foi realizada a caracterização bioquímica de ambas as microalgas submetidas à cultura em lixiviado. O perfil de crescimento foi avaliado e a capacidade de remoção de contaminantes químicos inorgânicos foi analisada no início e no final do experimento. Os resultados mostram que se conseguiu isolar as microalgas de interesse. A caracterização bioquímica mostra que lipídios totais, carboidratos e proteínas diminuíram seus valores em relação ao grupo "controle"; uma grande variedade de ácidos graxos foi registrada, destacando o ácido eláidico por seu alto valor 16,33 mgFA/g *Chlorella sp.* y 90,46 mg FA/g *Scenedesmus sp.* Ele destacou a capacidade de remover o amônio em 70% de *Chlorella sp.* 71% *Scenedesmus sp.*; nitratos e fósforo foram removidos com mais eficiência por a microalga *Scenedesmus sp.* 79% y 47% respectivamente. Da mesma forma, evidenciou-se que a maioria dos metais foi removida, destacando-se alumínio (99%), cálcio (68%) e ferro (79%). Concluiu-se que as microalgas amazônicas *Chlorella sp.* e *Scenedesmus sp.* eles têm uma alta capacidade de lixiviado bioremediado.

Palavras chave: Biorremediação, Lixiviado, Metais pesados, Microalgas.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, se ha venido investigando la capacidad de las microalgas para biotransformar y degradar contaminantes orgánicos como hidrocarburos, plaguicidas, lixiviados, etc. que resultan de alta peligrosidad para los seres vivos.¹ Los contaminantes orgánicos en el medio acuático son biodegradados por diversos microorganismos, incluyendo las microalgas, las cuales han demostrado que son capaces de biotransformar y biodegradar contaminantes aromáticos comúnmente encontrados en aguas naturales y residuales.² Las microalgas y cianobacterias proveen carbono reducido y nitrógeno a la microbiota presente en los ecosistemas acuáticos, lo que incrementa el potencial de degradación y eliminación de contaminantes.³

El lixiviado es el líquido producido cuando el agua percola a través de cualquier material permeable transportando sustancias contenidas en el material y producidas en las reacciones de éste, puede contener tanto material suspendido o disuelto, generalmente ambos; es comúnmente hallado y asociado a rellenos sanitarios, resultado de las lluvias percolando a través de los desechos sólidos y reaccionando con los productos de descomposición de la basura ⁴, y tienen una alta concentración de contaminantes, 100 veces superior a la de las aguas residuales, por lo que tiene un riesgo potencial muy alto para el medio ambiente ⁵. Si el lixiviado es recogido de forma inadecuada y no es tratada, puede contaminar las aguas subterráneas, aguas superficiales y suelos, causando consecuentemente problemas medioambientales y de salud ⁶. Típicamente, el lixiviado es anóxico, ácido, rico en ácidos orgánicos, iones sulfato y con altas concentraciones de iones metálicos comunes, especialmente hierro; tiene un olor bien característico, difícil de ser confundido y olvidado ⁷.

Por esta razón, el tratamiento de los lixiviados como parte del desarrollo sostenible es importante por cuanto disminuye la contaminación ambiental, y

se debe buscar soluciones tecnológicas apropiadas de acuerdo a las características de la zona tropical, sobre todo por las temperaturas elevadas y la alta precipitación. En la actualidad, las tendencias de investigación sobre biorremediación de aguas y suelos contaminados con lixiviados e hidrocarburos utilizando microalgas y cianobacterias, se enfocan principalmente a: i) aislamiento *in situ* de microalgas degradadoras, ii) uso de pigmentos de microalgas como biomarcadores de contaminación, iii) análisis de las enzimas involucradas en procesos de remoción de contaminantes, y iv) diseño de reactores para el tratamiento de aguas contaminadas con lixiviados e hidrocarburos.

En este contexto, la biorremediación asistida con microalgas resulta particularmente atractiva debido a su capacidad fotosintética, que les permite convertir la energía solar en biomasa, la misma que incorpora nutrientes como nitrógeno y fósforo causantes de la eutrofización. Los procesos que utilizan microalgas y cianobacterias, están enfocados principalmente a la remoción de nutrientes y de metales pesados presentes en las aguas residuales; no obstante, también se encuentra bien documentada su capacidad para remover elementos radioactivos a partir de efluentes ². Las microalgas y cianobacterias comienzan a jugar un papel cada vez más importante en el tratamiento de sustancias contaminantes ya que son una fuente importante de una amplia gama de compuestos químicos, pigmentos, aceites, polisacáridos y a la vez, son útiles para el tratamiento de aguas residuales, entre otras aplicaciones ⁸.

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de las microalgas amazónicas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, para bioremediar lixiviado de relleno sanitario Nauta-Loreto, y valorar una propuesta de tratamiento de lixiviado, en base a los resultados obtenidos, y a revisión bibliográfica.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

La importancia de la aplicación de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales y lixiviado, tiene sus antecedentes desde la década de los años 40⁹, quien reporta los primeros estudios, sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos purificadores de "aguas residuales", por los nutrientes inorgánicos que contienen, y que favorecen el crecimiento de las microalgas, funcionando estas aguas como medio de cultivo. Las microalgas son capaces de remover microorganismos patógenos, metales pesados, y compuestos orgánicos tóxicos mediante procesos aún en vías de estudio¹⁰. Dado que una gran variedad de estos microorganismos crecen en medios completamente inorgánicos, confiriéndoles capacidades para remover nutrientes, y al mismo tiempo producir material celular potencialmente útil, se iniciaron estudios sobre su aplicación desde la década de los 40, introduciendo un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, al llevar a cabo el tratamiento de las aguas residuales, obteniendo una producción de biomasa vegetal con un alto contenido proteico, lo que finalmente se considera como una valorización de las aguas residuales mediante el cultivo de microalgas y demostrando que los cultivos a gran escala podrían ser simultáneamente utilizados para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa para la obtención de proteína vegetal¹¹.

Es en la década de los años sesenta, en Richmond- California cuando se plantea el sistema de cultivo más grande en los Estados Unidos, llegándose a alcanzar una producción muy alta de biomasa de microalgas (12-18 g m²d⁻¹). Es a partir de este cultivo a gran escala que desencadenó el desarrollo por parte de diversos países en el cultivo masivo de microalgas en sistemas cerrados y abiertos, con diferentes finalidades.

La incorporación de lixiviados de rellenos sanitarios en instalaciones de plantas de aguas residuales con procesos biológicos, como una medida de tratamiento y/o disposición, es una alternativa atractiva desde el punto de vista técnico-económico. Existen varios antecedentes de tratamientos aerobios y anaerobios de lixiviados que van desde experiencias a escala laboratorio hasta experiencias a escala real. El tipo de tratamiento aerobio más extendido es lodos activos o lagunas aireadas ¹². En cuanto a la aplicación de tratamientos biológicos, la viabilidad de los mismos está condicionada por una serie de elementos y compuestos tóxicos para los microorganismos y que puede inhibir las reacciones, por lo que se hace necesario un estudio detallado de las características de los lixiviados ¹³.

Se reporta estudios, donde se evaluó la capacidad de una planta de tratamiento de 500 L/S de aguas residuales por medio de lagunas de estabilización como método de tratamiento y disposición de lixiviados de rellenos sanitarios, en la cual la incorporación de lixiviados altamente recalcitrantes no afectaron la eficacia del tratamiento biológico, lo que significa que las lagunas de estabilización pueden ser también utilizadas como una alternativa para la disposición de lixiviados estabilizados. Los resultados de este estudio indican que la planta de tratamiento de aguas residuales puede tratar lixiviados de rellenos sanitarios con un gasto del 10% en volumen con respecto al gasto de agua residual, sin alterar la eficacia del sistema de lagunas de estabilización, ni la población algal ¹⁴.

La microalga *Chlorella* ha sido aplicada al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales. Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos ².

Los métodos de tratamiento biológico dependen de la capacidad de los organismos para degradar los contaminantes orgánicos a productos inocuos como dióxido de carbono, agua y biomasa ¹⁵.

En investigaciones realizadas al respecto, pudieron observar que las células de *Scenedesmus obliquus* sufrieron un deterioro a partir de las 8 h de tiempo de experimentación, lo que se puso de manifiesto por la pérdida de color de las mismas, dando como resultado una disminución en los valores de clorofila "a" ¹⁶. Asimismo, en un estudio sobre evaluación de contaminantes en lixiviado, empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas, se reportó que *Chlorella sp.* mostró remoción de dióxido de carbono, dureza, alcalinidad y fosforo ¹⁷, tal como se evidencia en estudios realizados sobre la efectividad de esta especie en la remoción de nitrógeno, fosforo, demanda química de oxígeno y metales en aguas residuales ². La utilización de *Chlorella* en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos. El pH es otro factor ampliamente estudiado en las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* que al ser evaluadas se mantuvieron en valor 9 ¹⁷; resultados similares a lo reportado para la especie *Scenedesmus obliquus* en estudios anteriores, que indican que dicha microalga, tiene una consistencia a pH comprendido entre 4 y 9,5 valores en los que se encuentran los lixiviados ¹⁸.

Las microalgas pueden utilizarse en tratamientos ante contaminantes debido a su capacidad que tienen para incorporar nitrógeno inorgánico y fosforo para su crecimiento ¹¹; además tienen la capacidad de remover metales pesados como también algunas toxinas y compuestos orgánicos ³. Se ha demostrado que, utilizando la tecnología de inmovilización con alginato se puede remover la captación de nutrientes: nitrógeno y fósforo de las aguas residuales municipales ¹⁹.

Lavole y De la Noue, refieren que los lixiviados contienen altas concentraciones de sustancias orgánicas tóxicas, sólidos disueltos, sales y otros componentes que escurren en forma vertical contaminando los acuíferos, de allí la importancia de ubicar los rellenos sanitarios en suelos impermeables por encima del nivel freático, evitando que los lixiviados se acumulen dentro del relleno. A fin de proteger las reservas de aguas subterráneas, es necesario tomar precauciones y medidas complementarias, tales como cubiertas de arcilla o membranas, revestimientos para el relleno, medios para recolectar, extraer y tratar el lixiviado y un sistema de vigilancia de las aguas subterráneas ¹⁶. Los mismos autores afirman que el dióxido de carbono, producto de la descomposición orgánica en combinación con el agua, crea un ambiente ácido en el cual los minerales como el calcio, magnesio, hierro, cadmio, plomo y zinc, presentes en los desechos (o en el suelo), tienden a disolverse y avanzar hacia el nivel freático. El calcio y el magnesio sólo aportan dureza a las aguas subterráneas, pero los metales pesados tóxicos pueden contaminar fuentes de agua para consumo humano.

Las dispersiones de los lixiviados afectan los ecosistemas, la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas; otros riesgos son producidos, por la alteración de variables ambientales determinantes como, las variaciones del pH y la temperatura del medio, entre otras ²⁰.

Las microalgas juegan un rol muy importante durante el tratamiento de lixiviados, ellas pueden remover nutrientes, metales pesados y patógenos, liberan oxígeno y consumen el CO₂ como producto de su respiración. Estudios recientes han mostrado que las microalgas pueden requerir ayuda para la degradación aeróbica de varios contaminantes en el lixiviado; desafortunadamente las microalgas son usualmente muy sensibles en el uso de contaminantes de lixiviado y requieren especial cuidado debido a la actividad microbiana ²⁰. Dentro

de este contexto, la biorremediación asistida con microalgas resulta particularmente atractiva debido a su capacidad fotosintética, que les permite convertir la energía solar en biomasa, misma que incorpora nutrientes como nitrógeno y fósforo causantes de la eutrofización. Los procesos que utilizan microalgas y cianobacterias, están enfocados principalmente a la remoción de nutrientes y de metales pesados presentes en las aguas residuales. No obstante, también se encuentra bien documentada su capacidad para remover elementos radioactivos a partir de efluentes ⁷.

En la actualidad, han aparecido otras alternativas como los bioprocesos, que involucran distintas interacciones entre los microorganismos y los metales, realizando transformaciones que permiten la extracción o estabilización de los metales. Todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son componentes fundamentales de los ciclos biogeoquímicos. Las interacciones metal-microbiota es estudiada en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales y radionúclidos. Los procesos biológicos presentan ciertas ventajas frente a otras alternativas tradicionales, ya que son mucho más selectivos, económicos, menos contaminantes y de mayor eficacia para grandes volúmenes y pequeñas concentraciones ²¹.

Las microalgas, constituyen un grupo muy diversificado y heterogéneo de organismos fotosintéticos, presentan diferente tamaño y forma y existen en casi todos los hábitats tanto marinos como dulceacuícolas. En éste panorama *Chlorella* sp., es una “alga verde” eucariota de la división Chlorophyta, de células siempre solitarias, reniformes o elipsoidales, presenta clorofila a y b, se puede encontrar en medios marinos y en agua dulce ²²; su pared celular se encuentra compuesta por una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido úrico, condición que le da capacidad de incorporar grandes cantidades

de metales ($\text{Cr}^{+2,+3,+6}$, $\text{Fe}^{+2,+3}$, $\text{Cu}^{+1,+2}$, Zn^{+2} , $\text{Pb}^{+2,+4}$ y $\text{Hg}^{+1,+2}$), por medio de mecanismos de absorción y acumulación ²³. Otra “alga verde” eucariota y diversificada en ambientes de aguas continentales es *Scenedesmus* (Chlorophyta); morfológicamente presenta células elipsoidales o fusiformes de 2, 4 a 8, en series lineares para formar colonias planas y, los polos de las células a menudo ornamentadas con espinas, a veces, las células marginales ornamentadas de manera diferente a las medianas; es característico un cloroplasto con un pirenoide ²². Las microalgas tienen un gran potencial de uso en la remoción de nutrientes (metales traza) por su alta capacidad de acumulación de metales, su sensibilidad ante diversos materiales de prueba, sus requerimientos nutricionales, poseen una alta tasa de crecimiento que permite conocer en pocos días la densidad y el efecto causado por el agente tóxico y su manipulación es relativamente sencilla en laboratorio ²³.

Las microalgas han desarrollado estrategias que les permite disminuir el efecto tóxico de los metales a formas inocuas; el proceso consiste en evitar el paso de los iones a través de la pared celular, secretando sustancias que producen uniones específicas con los iones metálicos del medio, para formar complejos quelados que pueden quedar en el exterior de la pared celular o en compartimientos específicos en el interior de la célula. Asimismo, un mecanismo común de detoxificación intracelular en microalgas es la formación de péptidos o proteínas ejm. malato, citrato y polifosfato, son algunos de los compuestos reportados como agentes quelantes intracelulares ²⁴. Debido a que las microalgas presentan adaptaciones y mecanismos de tolerancia, pudiendo ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, ofrecen una alternativa o ayuda a las técnicas convencionales para la eliminación y/o recuperación de metales ²⁵.

Respecto, a la composición bioquímica de las microalgas varía mucho en función de la especie, pero en condiciones normales de producción se admite que los valores de proteína pueden alcanzar hasta un 60% de su peso seco, los lípidos entre un 7 y un 23% y los carbohidratos entre un 5 y un 23% ²⁶. Asimismo, las microalgas representan una muy buena fuente de vitaminas, dado su elevado contenido; sin embargo, estos nutrientes suelen presentar elevadas variaciones intra-específicas, con un ejemplo extremo en la vitamina C cuyo contenido puede variar hasta 16 veces según las condiciones de cultivo ²⁷. En referencia a lípidos totales, los estudios muestran que la microalga *Ankistrodesmus* sp. posee un mayor contenido de estos compuestos, (43 ± 2 %), con respecto a *Scenedesmus* sp. (28 ± 2 %) y *Chlorella* sp. (22 ± 3 %), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($F=71.5$; $GL=2$; $P<0.001$) ²⁸. Estos resultados son comparables a otra investigación que muestra un alto contenido de lípidos totales 24.5% a 40.3% en el mismo género *Ankistrodesmus* ²⁹; sin embargo, difieren con lo reportado por Yang et al.³⁰ para *Chlorella* sp. que presentó un contenido lipídico entre 28% y 43% en cultivo en bioreactores.

En cuanto a la producción de biomasa, un estudio reportó que las microalgas amazónicas *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella* sp. y *Ankistrodesmus nannoselene* evaluadas en lixiviado, la que registro mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus quadricauda* 0,19 mg/L., seguida de *Chlorella* sp. y *Ankistrodesmus nannoselene* con valores de 0,12 mg/L y 0,14 mg/ L respectivamente. Respecto, al contenido de lípidos totales, también se registró incremento en función a la producción de biomasa; la especie *Scenedesmus quadricauda* reportó la mayor acumulación de lípidos totales (27,55%, 17,09%, 20,86% respectivamente) seguido de *Chlorella* sp. con porcentajes lipídicos de (15,3%, 11,7%, 16,1% respectivamente), por lo que, la inducción de lípidos totales en lixiviado no mostró diferencias significativas ($p=> 0,05$) en las tres especies evaluadas ¹⁷.

En las microalgas, los carotenoides funcionan como pigmentos accesorios en los fotosistemas, como componentes estructurales o complejos protectores de la luz, también juegan roles importantes en la fototaxis. Sólo un pequeño número de carotenoides se ha encontrado que tienen aplicación comercial e incluye a beta caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina y luteína, estos son utilizados como alimento en dietas y como aditivos en la acuicultura, además de usar el pigmento para colorear huevos de los pollos ³¹.

Estudios realizados por Flores ³² sobre remoción de contaminantes biológicos en microalgas sometidas a concentraciones de lixiviado, utilizando las microalgas *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella* sp., y *Scenedesmus nannosele*, sus resultados evidenciaron una disminución considerable en sus valores, los cloruros fueron removidos de 24 ppm - 2 ppm; dureza 160 ppm - 28 ppm; alcalinidad 189 ppm - 96 ppm y fósforo 100 ppm - 10 ppm, desde las 0 horas hasta las 120 horas. Asimismo, la especie *Scenedesmus quadricauda* reportó mayor producción de biomasa 0,19 mg/L., y acumulación de lípidos totales 27,55% en función a la producción de biomasa; la microalga *Chlorella* sp. registró 16,1%, lo que evidencia que, las inducciones de lípidos totales en lixiviado nos mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en las tres especies evaluadas.

Además de las típicas y claras diferencias en el perfil bioquímico de las microalgas, se describen también grandes cambios en su composición, dependiendo de las condiciones de cultivo en las que se desarrollen; así, factores como la fase de cultivo, disponibilidad de nutrientes, irradiancia y temperatura se encuentran entre los más comunes que determinan variabilidad en la composición bioquímica de las microalgas; por tanto, es muy impreciso hablar de valores generales en la composición bioquímica de microalgas en su amplio sentido. Sin embargo, para cultivos al final de su fase exponencial de crecimiento, un resumen de la amplia bibliografía disponible permite considerar porcentajes sobre biomasa seca para proteína total entre 30-45%,

carbohidratos entre 10-25%, lípidos entre 10-20% y cenizas entre 5-20% ³³.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Biorremediación

La biorremediación es el empleo de sistemas biológicos (bacterias, **algas**, hongos, levaduras y plantas superiores) para eliminar los contaminantes del suelo, agua o gases (medio ambiente en general) ³⁴. Esta nueva herramienta de la ciencia incluye la fitorremediación y la biosorción. En el primer caso, se utilizan las plantas para la eliminación y/o recuperación de contaminantes, y en el segundo caso, se utilizan microorganismos. También se precisa que esta tecnología es uno de los métodos más baratos entre los muchos que se usan para el tratamiento de desechos peligrosos; puede llevarse a cabo en el sitio de contaminación y causa la mínima alteración física alrededor del área tratada ³⁵.

Otras ventajas que presenta este importante potencial biotecnológico, con respecto a las tecnologías tradicionales utilizadas para la descontaminación ambiental, son: refuerza los procesos biogeoquímicos, los compuestos químicos tóxicos son destruidos o eliminados de los ambiente y no simplemente separados, requiere menos energía en comparación con otras tecnologías y menos supervisión manual. La bioacumulación de metales por las microalgas, puede representar un método factible para el tratamiento de lixiviados que contengan iones metálicos en solución, ofrecen la ventaja de que pueden ser cultivadas en lagunas, con pequeños requerimientos de nutrientes para su mantenimiento y desarrollo. Las lagunas con microalgas constituyen la etapa final del proceso de depuración en muchas plantas de tratamiento de aguas residuales ³⁶.

La biorremediación es el uso de seres vivos para restaurar ambientes contaminados. Es un concepto que no se debe de confundir con depuración.

La depuración es la eliminación, ya sea por métodos físico/químico o biológicos de un contaminante antes de que éste alcance el medio ambiente. Cuando la contaminación ya se ha producido, se precisa restaurar el ecosistema contaminado, para lo que se pueden utilizar diversas estrategias, una de ellas es la biorremediación ³⁷, en este proceso se pueden emplear diversos organismos destacando especialmente las bacterias, los seres vivos con mayor capacidad metabólica del planeta.

Las bacterias pueden degradar prácticamente cualquier sustancia orgánica, si la sustancia se degrada completamente se habla de mineralización; que es el proceso ideal, aunque no siempre ocurre. Algunas sustancias no son degradadas sino transformadas en otras denominándose biotransformación, que puede ser peligrosa, ya que la nueva sustancia formada puede ser tan nociva o más que la sustancia de origen. Finalmente, se podría mencionar sustancias que no son degradadas denominadas recalcitrantes, éstas se acumulan durante mucho tiempo en el medio ambiente, especialmente si además son resistentes a procesos físico/químicos como la radiación ultravioleta o la oxidación ³⁸.

Todos aquellos contaminantes que pueden ser degradados o transformados por los seres vivos, son susceptibles de ser eliminados mediante procesos de biorremediación. Los compuestos orgánicos suelen ser degradados total o parcialmente y eliminados por completo del ecosistema. El estudio de los procesos de biorremediación tiene un gran interés, no sólo por las ventajas que posee la restauración de un ecosistema, también por los procesos bioquímicos que llevan a las reacciones de degradación, así como los genes que codifican las enzimas responsables de estos procesos. Conocer las

proteínas responsables de estos procesos, así como los genes que codifican, cómo han evolucionado y se han dispersado en los diferentes ecosistemas, permite conocer mejor la evolución ligada a procesos geoquímicos de nuestro planeta ³⁹.

La biorremediación puede clasificarse en *in situ* o *ex situ*. La primera consiste en tratar el material contaminado en el lugar en que se encuentra sin trasladarlo a otra parte. Algunos ejemplos de estas tecnologías consisten en operaciones de compostaje, la ventilación biológica, la filtración por raíces o la estimulación biológica. En los procesos *ex situ* el material contaminado es trasladado a otro lugar para realizar o completar su descontaminación. El tratamiento se efectúa en un biorreactor donde se realiza el proceso en forma controlada, es decir se suministran nutrientes, se inoculan los microorganismos deseados, se mantiene una aireación continua y se controla el pH y la temperatura en los valores adecuados para el crecimiento de los microorganismos.

1.2.2. Características generales de las microalgas

Las microalgas constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos procariotas (Cianofíceas) y eucariotas que realizan fotosíntesis oxigénica, y que aprovechando la energía solar son capaces de sintetizar nueva materia orgánica a partir de sustancias inorgánicas, tales como: sales solubles, dióxido de carbono y agua. Poseen una maquinaria fotosintética cuya capacidad para convertir la energía solar en biomasa, presenta una eficiencia de 2 a 5 veces mayor que la de las plantas superiores ⁴⁰. Presentan altas tasas de producción, se adaptan a distintas condiciones ambientales, y se encuentran en cualquier medio acuático donde exista una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con el rango apropiado de temperatura ⁴¹. En el medio acuático, sea marino o dulceacuícola, existe una gran diversidad de microalgas, representada por miles de especies,

que suponen un importante potencial como fuente de proteínas, lípidos, carbohidratos simples o complejos, vitaminas y minerales.

Se entiende por alga los talófitos y protistas clorofilados, algunos inclusive sus grupos no pigmentados, cuyos órganos de reproducción jamás son envueltos por un conjunto de tejidos constituido de células estériles ⁴². De hecho se encuentran incluidos entre las algas desde organismos morfológicamente muy simples, los unicelulares, hasta las gigantescas formas habitantes de los mares fríos, que presentan talos multicelulares con formación de tejidos (inclusive vasos conductores) y elaborada división de trabajo ⁴²; las algas pueden ser autótrofas o heterótrofas, las primeras requieren únicamente compuestos inorgánicos como el dióxido de carbono (CO₂), sales y la luz como fuente de energía para el crecimiento, mientras las heterótrofas requieren una fuente externa de compuestos orgánicos, así como de nutrientes como fuente de energía ¹¹. Algunas algas fotosintéticas son mixotróficas, es decir, tienen la capacidad tanto de realizar la fotosíntesis como de utilizar nutrientes exógenos orgánicos. Para las algas autótrofas, la fotosíntesis es un componente clave de supervivencia, por el que convierte la radiación solar y el CO₂ absorbido por los cloroplastos en Adenosintrifosfato (ATP) y O₂, utilizable a nivel celular para la respiración y para producir energía en sus actividades de crecimiento ⁴³.

Los grupos principales de algas presentes en el agua dulce comprenden dos reinos: el procariótico y el eucariótico. En el primero de ellos figura la división Cyanophyta; en el segundo se incluyen las divisiones Chlorophyta, Chrysophyta, Euglenophyta, Pyrrophyta y Cryptophyta ⁴⁴. Las algas de la división Chlorophyta son las más utilizadas en aplicaciones comerciales; sin embargo, existen grupos de microalgas como las diatomeas ricas en silicio, y cianobacterias procariotas que también ofrecen grandes

oportunidades en biotecnología e ingeniería metabólica ²⁴. Asimismo, las microalgas de la división Chlorophyta, llamadas “algas verdes” son consideradas como uno de los grupos más especializados que comprenden una variedad de organismos con alto potencial de estudio. Dentro de este grupo se encuentran microalgas con diversa morfología y aunque muchas provenientes de agua dulce, un gran número de estas también crecen en hábitat marinos y terrestres ²⁵, muchas de estas algas son adaptadas a condiciones extremas de temperatura, salinidad y humedad; esta habilidad para adaptarse a condiciones combinadas y de estrés severos se refleja en el patrón de diversos y a veces inusuales perfiles lipídicos presentes en sus membranas ²³.

1.2.3. Aplicaciones de las microalgas

A pesar del empleo milenario de las microalgas como alimento humano, la biotecnología de estos microorganismos en realidad comenzó a desarrollarse a mediados del siglo pasado. Hoy en día, existen numerosas aplicaciones comerciales de las microalgas, así pueden ser utilizadas para mejorar el valor nutritivo de los alimentos y la alimentación animal debido a su composición química, desempeñan un papel crucial en la acuicultura, y, se cultivan como fuentes muy valiosas de diversas moléculas, por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados de los aceites, se añaden a las formulas infantiles y complementos nutricionales, y los pigmentos, son importantes como tintes naturales, etc. La investigación futura deberá centrarse en la mejora de los sistemas de producción y modificación genética de las cepas; de esta manera las microalgas se constituyen en una alternativa económica cada vez más diversificada y competitiva⁴⁵.

Entre los beneficios que la humanidad obtiene de las cianobacterias, por citar uno de múltiples ejemplos, se encuentra su utilización como biofertilizantes en agricultura, gracias a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N₂) y producir compuestos orgánicos ricos en nitrógeno que contribuyen a incrementar los rendimientos de las cosechas de arroz ⁴⁶ .

El empleo de algunas especies de los géneros *Spirulina* y *Arthrospira* para la alimentación humana está ampliamente comprobado por un sin fin de investigaciones científicas, las que coinciden en su inocuidad (no son tóxicas), gran palatabilidad (más de 90% comestible) y sus importantes cantidades de proteínas (65-70% en base seca), vitaminas y otros nutrientes ⁴⁷.

Está ampliamente comprobado el beneficio alimentario de *Spirulina* y *Arthrospira* en animales de granjas pecuarias (aves de corral, porcinos, etc.) acuícolas (peces, camarones, etc.), y consumo humano ⁴⁸. Las tecnologías empleadas para cultivar masivamente microalgas y obtener productos alimenticios, farmacéuticos y cosméticos de su biomasa son limpias en su totalidad; las granjas a cielo abierto tienen un gran valor ecológico como trampas vivientes de gases de efecto invernadero y purificación de biogás ⁴⁹, así como recuperación de cuerpos de agua contaminados ⁵⁰. Existen diversas especies de microalgas que metabolizan hidrocarburos, los bioacumulan en sus vacuolas y producen aceites, a partir de los cuales se pueden producir biocombustibles (biodiesel). La chlorophyta *Botryococcus braunii* se caracteriza por su capacidad de producir hidrocarburos insaturados de cadena larga, llegando a contenidos que van de 15 a 75% de su peso seco; además, esta microalga produce polisacáridos extracelulares que inducen la formación de colonias, el tamaño de las mismas depende de la hidrodinámica de estrés en el biorreactor. Su gran potencial como fuente renovable de combustibles de base o de productos

químicos ha sido demostrado por diferentes grupos de investigación ⁵¹.

1.2.4. Caracterización bioquímica de microalgas

El perfil bioquímico de las microalgas presenta claras diferencias, de acuerdo a su ubicación taxonómica, se describen cambios significativos en su composición, dependiendo de las condiciones de cultivo en las que se desarrollen; entre las más comunes están factores como la fase de cultivo, disponibilidad de nutrientes, irradiancia y temperatura que determinan variabilidad en su composición bioquímica; es por lo tanto, muy impreciso, hablar de valores generales para la composición bioquímica de microalgas. Sin embargo; para cultivos al final de su fase exponencial de crecimiento, un resumen de la amplia bibliografía disponible, permite considerar porcentajes sobre biomasa seca para proteína total entre 30-45%, carbohidratos entre 10-25%, lípidos entre 10-20% y cenizas entre 5-20% ⁵², de allí que es preciso tener especial cuidado con la posible sobreestima de valores de proteína, ya que muchos análisis realizados sobre la base del contenido total en nitrógeno no contemplan el hecho de que los niveles de nitrógeno no proteico (ADN, ARN, aminos, glucosaminas) puedan llegar a ser del 10%. Los contenidos en proteína suelen disminuir cuando los cultivos experimentan déficit de nutrientes, mientras que los porcentajes de lípidos o carbohidratos experimentan un aumento bajo esas mismas condiciones ³³.

A diferencia de las proteínas, la composición en lípidos totales, en clases lipídicas y perfil de ácidos grasos es muy variable entre microalgas, tanto a nivel interespecífico, como en función de las condiciones externas de cultivo para una misma especie; la información generada a este respecto es amplia, actualizada y de carácter general ⁵³. Las microalgas son los organismos vivos que en mayor medida contribuyen en el ecosistema a la síntesis

de ácidos grasos altamente insaturados y de cadena larga (HUFA), y representan una importante base alimentaria para el resto de la cadena trófica, dado el carácter de esencial que ácidos grasos como eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA) o araquidónico (ARA) tienen a partir de los consumidores primarios ⁵².

Desde el punto de vista del valor nutricional atribuible a ácidos grasos, las Cyanobacterias y las Chlorophyta representan los grupos taxonómicos de menor valor, dada su notoria carencia de ácidos grasos poliinsaturados (HUFAs). Las especies incluidas en grupos taxonómicos más evolucionados presentan perfiles de ácidos grasos en su composición muchos más favorables para la nutrición de otros organismos; así, en diatomeas hay que destacar la presencia de abundante EPA, mientras que Haptophyta y Dinophyta, la dominancia la ejerce el DHA. Un grupo muy interesante, caracterizado por presentar una composición bien balanceada de ácidos grasos esenciales es el de las Criptophyta mientras que las Eustigmatophyta y Rodophyta suelen aportar las mayores cantidades de ARA ⁵⁴.

1.2.5. Lixiviado

Es el líquido residual, generado en la descomposición bioquímica de los residuos o como resultado de la percolación de agua desde fuentes externas (drenaje superficial, lluvia, aguas subterráneas, aguas de manantiales subterráneos), a través de los residuos en procesos de degradación, extrayendo materiales disueltos o en suspensión. Este líquido tiende a salir por gravedad, por la parte inferior del relleno sanitario, hasta que una capa impermeable lo impida⁶. Por tanto, los lixiviados son los líquidos contaminados que drenan de un relleno sanitario, varían ampliamente en cuanto a su composición, la antigüedad del relleno sanitario, y de acuerdo al tipo de residuo que contienen; sin embargo, la cantidad de lixiviados producidos

depende del balance entre la precipitación, la infiltración, la capacidad de campo y permeabilidad (estructura del suelo) y la escorrentía.

Los lixiviados contienen altas concentraciones de sustancias orgánicas tóxicas, sólidos disueltos, sales y otros componentes que escurren en forma vertical contaminando los acuíferos; de allí la importancia de ubicar los rellenos en suelos impermeables por encima del nivel freático, evitando que los lixiviados se acumulen dentro del relleno. A fin de proteger las reservas de aguas subterráneas contra la contaminación, es necesario tomar precauciones y medidas complementarias, tales como cubiertas de arcilla o membranas, revestimientos para el relleno, medios para recolectar, extraer y tratar el lixiviado y un sistema de vigilancia de las aguas subterráneas ¹⁶. Los mismos autores afirman que el dióxido de carbono, producto de la descomposición orgánica en combinación con el agua, crea un ambiente ácido en el cual los minerales como el calcio, magnesio, hierro, cadmio, plomo y zinc, presentes en los desechos (o en el suelo), tienden a disolverse y avanzar hacia el nivel freático. El calcio y el magnesio sólo aportan dureza a las aguas subterráneas, pero los metales pesados tóxicos pueden contaminar fuentes de agua para consumo humano.

También se informa que, la dispersión de los lixiviados afecta los ecosistemas, la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas. Otros riesgos son producidos por la alteración de variables ambientales determinantes como las variaciones del pH y la temperatura del medio, entre otras ²⁰.

1.2.6. Características de los lixiviados

Las características de los lixiviados son muy variables, dependen principalmente de los residuos que provienen, es por ello que resulta muy compleja una composición específica de los lixiviados. A pesar de esto, la composición puede ser medida por parámetros físicos, químicos inorgánicos, químicos orgánicos y toxicidad ²⁰.

Existen numerosas caracterizaciones de los lixiviados, que enfatizan en su alto poder contaminante, siendo así, contienen alto contenido de materia orgánica, alto contenido de nitrógeno y fósforo, presencia abundante de patógenos, sustancias tóxicas como metales pesados y constituyentes orgánicos; características importantes que permiten conocer qué es lo que corresponde removerle a los lixiviados durante su tratamiento ⁶. De la misma manera, la calidad de los lixiviados en un relleno sanitario tiene un amplio rango de variación en el tiempo, así como, con el tipo de relleno sanitario que se tenga ⁶. Como resultado de esto, los lixiviados se denominan jóvenes, cuando las áreas de los rellenos sanitarios han sido recientemente rellenos, y producen un lixiviado altamente contaminante, contienen materia orgánica fácilmente biodegradable, de tal manera estos tienden a ser ácidos con un pH que va de 6 a 7; al mismo tiempo el amonio fluctúa entre 1,000 y 2,000 mg/L y los nitritos se encuentran en muy bajas cantidades. Por el contrario, los lixiviados se denominan maduros, después de transcurridos unos años, el pH se incrementa a un intervalo de 7 a 8, al igual que una baja en el contenido de nutrientes ⁵⁵.

1.2.7. Efectos ambientales de los lixiviados

- **Contaminación de Aguas Superficiales:**

El manejo inadecuado de los residuos sólidos municipales, constituye uno de los efectos ambientales de alto riesgo en los ecosistemas, la contaminación de los suelos y de manera

especial de la atmósfera, por adición de biogás, y de agua superficial y/o subterránea, es consecuencia de la dispersión de lixiviados ⁵⁶. Por una parte, la materia orgánica de los residuos sólidos disminuye el oxígeno disuelto y aumenta los nutrientes (nitrógeno y fósforo), que contribuye al crecimiento exponencial de las algas, conduciendo a los cuerpos de agua a procesos de eutrofización; por otra parte, los residuos domésticos y los lixiviados por lo general, están mezclados con residuos industriales peligrosos, lo que origina contaminación química; consecuencia de estos procesos se produce la pérdida del recurso agua, sea para consumo humano, recreación, inclusive la destrucción de la fauna acuática y del paisaje, con altos costos de remediación ambiental y restauración del hábitat. En algunos casos, los procesos de degradación de la calidad biológica de los cuerpos de agua en condiciones naturales pueden llegar a ser irreversibles ⁵⁷.

- **Contaminación de Aguas Subterráneas:**

Las aguas subterráneas constituyen una importante fuente de abastecimiento de algunos sectores, y la única, de ciertas zonas periurbanas a las ciudades. Los acuíferos, confinados o libres, pueden contaminarse inadvertidamente por la inadecuada disposición final de residuos sólidos. El problema de calidad de las aguas subterráneas más extendido y con mayor información es el lixiviado de nitratos, como una consecuencia indirecta de las altas tasas de uso de nitrógeno de fertilizantes y abonos procedente de zonas agrícolas. Para reducir la intensidad del problema pueden ser tomadas varias acciones, entre ellas revisión de directrices nacionales para una mejor práctica agrícola que incluyan consideraciones sobre el riesgo de contaminación de las aguas subterráneas. Sin embargo, se considera que, a una distancia adecuada del acuífero, el suelo constituye un

medio eficaz para eliminar materiales orgánicos, metales pesados y otros iones inorgánicos en virtud de la filtración, adsorción, actividad biológica y precipitación ⁵⁸.

- **Afectaciones a la Flora y Fauna:**

La dispersión de los lixiviados afecta los ecosistemas, la flora y fauna del lugar, pudiendo ocasionar la muerte de especies animales y vegetales debido a sus altas concentraciones de contaminantes como metales pesados o sustancias tóxicas. Otros riesgos son producidos por la alteración de variables ambientales determinantes para la vida de ciertas especies como, las variaciones del pH, y la variación de la temperatura del medio, entre otras.

Las afectaciones a la flora y fauna no sólo se dan de manera directa sobre los individuos, sino también sobre áreas críticas de alimentación o reproducción, ocasionando alteraciones fisiológicas en los organismos. La presencia de sustancias contaminantes o tóxicas puede alterar funciones vitales para el mantenimiento de poblaciones genéticamente viables o para la sobrevivencia de la especie ⁶.

- **Implicancias sociales:**

El acelerado crecimiento de las ciudades, sin planificación, plantea una difícil situación para enfrentar el tema de servicios básicos como el de la gestión de los residuos sólidos. Los más afectados en este proceso son los estratos más pobres de las ciudades que carecen de servicios básicos, y, el desconocimiento de mecanismos para proteger su salud, pone a la población en una grave situación de vulnerabilidad. Esta vulnerabilidad se relaciona con la calidad del ambiente en el que viven, considerando variables como su situación de vivienda, acceso a servicios, educación e información, lo que los pone en desventaja

frente a la exposición a agentes patógenos, ante los cuales tienen menos posibilidades de protegerse ⁵⁹.

Las toneladas de residuos vertidos al ambiente diariamente, alimentan a roedores e insectos que transmiten peligrosas enfermedades, además de la contaminación que producen en el suelo, el agua y los alimentos a través de los lixiviados producidos por la descomposición de los residuos. La reducción de riesgos provenientes de la mala gestión de residuos sólidos involucra ampliar la noción de “salud pública”, incorporando otros aspectos como lo avanzado en nuestro país, respecto a los sistemas de agua y saneamiento, lo que se ha traducido en políticas públicas e inversión ⁶⁰.

1.3. Definición de términos básicos

Biorremediación: La biorremediación es el empleo de sistemas biológicos (bacterias, **algas**, hongos, levaduras y plantas superiores) para eliminar los contaminantes del suelo, agua o gases (medio ambiente en general).

Ficorremediación: Proceso de depuración de las aguas residuales o residuos por microalgas y macroalgas, no solo en términos de nitrógeno y fósforo (que son micronutrientes), sino también en metales pesados y contaminantes orgánicos.

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

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

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

Relleno Sanitario: Instalación destinada a la disposición sanitaria y ambientalmente segura de los residuos sólidos en la superficie o bajo tierra, basados en los principios y métodos de la ingeniería sanitaria y ambiental.

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

Ácidos grasos: Componentes característicos de muchos lípidos y rara vez se encuentran libres en las células. Son moléculas formadas por una larga cadena hidrocarbonada de tipo lineal y, con un número par de átomos de carbono. Tienen en un extremo de la cadena un grupo carboxilo (-COOH).

pH: Es la medida de la actividad de iones hidrógeno en soluciones. Está determinado por el número de iones libres de hidrógeno (H⁺) en una sustancia; la variación de concentración de los iones hidrógeno originará acidez si es menor a 7 ó alcalinidad si es superior a 7.

Bases nitrogenadas: nitrito de nitrógeno: iones que existen de manera natural y que forman parte del ciclo del nitrógeno. En muchas aguas subterráneas, se ha observado un incremento de los niveles de nitratos debido a la intensificación de las prácticas agrícolas y ganaderas. Las concentraciones pueden alcanzar varios cientos de miligramos por litro.

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

2.1. Variables y su operacionalización

| Variables | Definición Conceptual | Indicador | Índice | Escala | Pregunta |
|---|---|--|----------------|----------|---|
| Independiente Especies de microalgas amazónicas | Microalgas de la división Chlorophyta, considerada uno de los grupos más especializados y diversos en amazonia. Comprende una variedad de organismos con alto potencial de estudio. | Presencia de microalgas del género <i>Chlorella</i> y <i>Scenedesmus</i> | 2 | Nominal | Las microalgas amazónicas <i>Chlorella</i> sp. y <i>Scenedesmus</i> sp. tienen la capacidad de biorremediar los contaminantes químicos inorgánicos presentes en el lixiviado? |
| Dependiente Capacidad de biorremediación de lixiviado | Característica que presentan los microorganismos para remover nutrientes, metales pesados y patógenos del lixiviado. En este proceso, liberan oxígeno y consumen el dióxido de carbono como producto de su respiración. | Porcentaje de remoción de contaminantes. | De 10% al 100% | Discreta | |

2.2. Formulación de la hipótesis

Las microalgas amazónicas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. tienen una alta capacidad de biorremediar los contaminantes químicos inorgánicos, presente en el lixiviado del Relleno Sanitario de Nauta.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

La investigación fue de tipo descriptiva, porque se describió la capacidad de biorremediación de las microalgas amazónicas, además de sus características bioquímicas al ser expuestas al lixiviado.

El diseño de la investigación fue experimental, porque se manipularon variables para ver un determinado efecto.

Consistió en identificar y aislar dos especies de microalgas para su posterior evaluación de capacidad de biorremediación en lixiviado. La evaluación tuvo un período de 15 días, con tres repeticiones. Se contó con dos grupos: el grupo “control” y el grupo problema. Luego se realizó la cosecha de los cultivos para el posterior análisis bioquímico y perfil de ácidos grasos.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Ubicación del área de estudio

La muestra de lixiviado fue colectado del Relleno Sanitario Manual de la Municipalidad Provincial de Loreto-Nauta, ubicada a 30 kilómetros de la ciudad. La ciudad de Nauta (Loreto), fundada en 1830, es uno de los poblados más antiguos de la Amazonía peruana, localizada entre los ríos Marañón y Ucayali, provincia y departamento de Loreto. La ubicación geográfica corresponde a una altitud (msnm) 98, latitud sur 0427'24" y longitud oeste 7331'34". Presenta una topografía ondulada con dos zonas fisiográficas bien definidas: la zona de altura o bosques de seco y la zona baja, llamado bajeal o barzas conformado por terrenos de islas del río Marañón.



Ilustración 1. Vista parcial de la topografía- Ciudad de Nauta, 2018



Ilustración 2. Localización del Relleno Sanitario Manual- Ciudad de Nauta, 2018

Fuente: La autora

Los ensayos experimentales se ejecutaron en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú-UCP.

3.2.2. Población

Estuvo constituida por todas las microalgas presentes en las cuencas hidrográficas Nanay e Itaya

3.2.3. Muestra

Conformada por las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., aisladas de las cuencas hidrográficas Nanay e Itaya.

3.3. Técnicas e instrumentos

La técnica empleada estuvo basada en la observación; se procedió a obtener la información directa de la capacidad de biorremediación, de las variables físico-químicos utilizando métodos: Electrométrico (pH), Colorimétrico (Amonio, Nitratos), Espectrofotométrico (Fósforo) y Volumétrico (Alcalinidad, Anhidrido Carbónico, Cloruros y Dureza).

Los instrumentos empleados fueron fichas/ guías de observación que se emplearon para la colecta, aislamiento, crecimiento del cultivo microalgal, resultados del análisis químico y de la capacidad de biorremediación de las microalgas.

3.4. Procedimientos de recolección de datos

3.4.1. Aislamiento de microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. provenientes de las cuencas hidrográficas Nanay e Itaya.

▪ Colecta de microalgas:

Las microalgas fueron colectadas como muestras de agua superficial (100 mL), con una malla fitoplanctónica de 25 µm de abertura de malla, de las cuencas hidrográficas Nanay (cuenca baja) e Itaya (cuenca alta). Las muestras fueron almacenadas en frascos transparentes y transportadas al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Científica del Perú- UCP.

En el laboratorio, las muestras (microalgas), fueron concentradas y enriquecidas en caldo CHU N° 10 colocando 25 mL de la muestra microalgal más 25 mL. de medio de cultivo en matraces de 100 mL, por dos semanas aproximadamente. Una vez la muestra presentó coloración verdosa, se procedió a analizar por microscopía para identificar las microalgas. Se utilizaron claves taxonómicas especializadas ^{42, 22}.

▪ **Aislamiento de microalgas:**

Para el aislamiento microalgal se utilizaron dos técnicas, aislamiento con micropipeta por capilaridad y aislamiento en placas con agar.

El aislamiento por capilaridad se utilizó considerando que las microalgas de interés fueron mayores a 10 μm de diámetro. Consistió en aislar una microalga con la ayuda de una pipeta Pasteur con punta reducida y/o con un capilar. Se partió de una gota del cultivo enriquecido, se colocó en una laminilla portaobjetos y se observó al microscopio invertido.

Mediante observación al microscopio y con la ayuda de una micropipeta, se “atraparon” las microalgas, se transfirieron a un portaobjetos conteniendo una gota de medio estéril. Las microalgas aisladas se lavaron al menos en cinco transferencias sucesivas en medio de cultivo estéril, hasta que no se observó contaminación por otro tipo de microorganismo. Las microalgas de interés aisladas, fueron transferidas a microtubos de 1,5 mL con 50 μL de medio de cultivo, incubándose de 1 a 2 semanas hasta observar coloración verdosa. Con el objetivo de garantizar el aislamiento, se procedió a realizar la siembra en placas Petri con agar, hasta observar la formación de colonias, las cuales fueron llevadas a observación por microscopía, para verificar que el cultivo sea unialgal.

De manera paralela se aplicó el aislamiento mediante la técnica de sembrado en estrías sobre una placa de Petri con agar. Se prepararon frascos con el medio de cultivo apropiado al cual se le adicionó agar al 2%, se esterilizó en autoclave a 120°C y 15 lb pie⁻² (1,1 kg cm⁻²) de presión durante 15 minutos. Posteriormente, se dejó a temperatura ambiente y antes que se solidifique, se vaciaron en las placas de Petri hasta su solidificación.

En las placas con medio sólido, se colocaron una o dos gotas de suspensión algal en la periferia de las mismas y con ayuda de un asa de siembra previamente esterilizado a la flama, se esparcieron las gotas en el medio. Después se cubrió la placa con su tapa, se invirtió ésta y se colocó a temperatura y luz controlada, se dejó incubar durante 4 a 8 días. Posteriormente, se hicieron observaciones al microscopio invertido y se seleccionó con la ayuda del asa, las colonias algales libres de otros microorganismos, y se volvió a sembrar en otra placa Petri.

Este procedimiento se realizó por varias veces, hasta asegurar el éxito del aislamiento de un solo tipo de célula de microalga.

- **Cultivo de microalgas:**

Una vez aisladas las microalgas de interés, éstas fueron cultivadas inicialmente en microtubos de 1,5 mL con 15 µL de medio de cultivo, luego se transfirieron a tubos de vidrio con tapa rosca de 5 mL con 2,5 mL de medio de cultivo, hasta observar coloración verdosa.

Luego se transfirieron a frascos erlenmeyer de 50 mL con un volumen de cultivo de 5 mL colocándose en un agitador orbital a 200 rpm. A 28°C., con una intensidad de luz de 100 µmol. Fotones m⁻².s⁻¹ por espacio de una semana.

Posteriormente se procedió al escalamiento a volúmenes mayores, hasta lograr la cantidad de biomasa microalgal necesaria para los experimentos, inoculándose 1×10^6 células/mL en fase de crecimiento exponencial, en un erlenmeyer que contenía un litro de medio de cultivo.

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de las microalgas fue CHU N°10. Las cepas fueron cultivadas en este medio, “acoplados” a un sistema de aireación por seis semanas, hasta el momento de la cosecha.

- **Cosecha de microalgas:**

El cultivo microalgal se cosechó por centrifugación, para ello, se distribuyó 200 mL del cultivo en cuatro tubos para centrifuga de 50 mL (Corning ®) y se procedió a centrifugar a 4 500 rpm a 10°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante e inmediatamente se añadió más cultivo en los mismos tubos, y, se continuó con la centrifugación en las condiciones indicadas. Estos pasos se repitieron hasta obtener toda la biomasa microalgal de 5 litros de cultivo.

Seguido, el precipitado de microalgas de los 4 tubos fueron transferidos a un solo tubo, el que se centrifugó a 4 500 rpm a 10°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el precipitado de microalga se resuspendió con 30 mL de suero fisiológico.

- **Evaluación del crecimiento y biomasa microalgal:**

La evaluación del crecimiento de las microalgas se realizó diariamente a la misma hora, utilizando el Nanoespectrofotómetro NanoDrop 2000.²⁸ Este procedimiento consistió en tomar una alícuota (3 μ L) de la suspensión celular microalgal, se colocó en un microtubo de 50 μ L para la lectura al Nanoespectrofotómetro.

3.4.2. Caracterización bioquímica de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en lixiviado (contenido de lípidos totales, carbohidratos, proteínas, humedad y cenizas).

La caracterización bioquímica se realizó a partir de la biomasa obtenida al finalizar la evaluación. Para ello, se procedió de la siguiente manera:

▪ Extracción de lípidos totales:

La extracción de lípidos totales consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (2:1). El extracto obtenido se transfirió a microtubos de 2 mL y se añadió 100 µL de NaCl 0,9% por cada 1000 µL de extracto.

La solución se homogenizó en vórtex por 30 seg. y centrifugó a 10 000 g a 4°C por 5 min. La fase clorofórmica se esterilizó con filtros para jeringa de 0,45 µm y se transfirió a vasos de precipitado de peso conocido. Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entre fase acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol) después de su homogenización en el vórtex. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron filtrados y transferidos al mismo vaso de precipitado. Los solventes orgánicos se evaporaron del vaso de precipitado en un recipiente a 50°C por 4 horas. Luego los componentes lipídicos retenidos en el vaso de precipitado fueron secados a 50°C por 4 horas. Finalmente, el vaso de precipitado se atemperó a 25°C, se determinó su peso. Por diferencia de peso del vaso de precipitado con y sin los lípidos se determinaron la cantidad de lípidos totales obtenidos.⁶¹

Para el cálculo, se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = PL/PM \times 100$$

Donde:

PL es el peso seco de los lípidos totales,

PM es el peso seco de las microalgas

▪ **Determinación del perfil de ácidos grasos:**

Se usó 1 mg del extracto de lípidos, se le añadió 0.1 mg del estándar interno de tricosanoato de metilo y se aplicó el método de Ichihara y Fukubayashi ⁶² que consiste en añadir tolueno, metanol y ácido clorhídrico para derivatizar la muestra a ésteres de metilo de ácidos grasos, y luego se usó cromatografías gaseosas para su cuantificación bajo las siguientes condiciones: método de inyección splitless (0,5min), volumen de inyección 1 µL, columna WCOT de sílice fundida de 30 m x 0,25 mm x 0,225 µm, temperatura del inyector 250°C, programa del horno 120°C durante 1min, luego 30°C/min hasta 160°C, 160°C durante 1min, 4°C/min hasta 240°C y 240°C durante 7min, temperatura del detector 260°C.

▪ **Proteínas y carbohidratos:**

La determinación de proteínas se realizó por triplicado de acuerdo a Lowry *et al.*, ⁶³ Para la determinación de los carbohidratos, se aplicó el método de Dreywood ⁶⁴ previa hidrólisis ácida con HCl 2N.

▪ **Cenizas:**

El método más común para determinar cenizas es la calcinación en mufla a temperaturas entre 500 y 600°C. El agua y sustancias volátiles son evaporadas, mientras que las sustancias orgánicas son incineradas en presencia del

oxígeno del aire para producir dióxido de carbono y óxido de nitrógeno. La mayoría de los minerales son convertidos a óxidos, sulfato, fosfato, cloruro y silicato.

$$\% \text{ Cenizas} = [(P1 - P2) * 100] / (P - P2)$$

P es el peso en gramos de la cápsula más el de la muestra;

P1 es el peso en gramos de la cápsula más las cenizas;

P2 es el peso en gramos de la cápsula vacía.

3.4.3. Evaluación de la capacidad de remoción de los contaminantes químicos inorgánicos y metales en lixiviado, usando microalgas amazónicas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

Para evaluar la capacidad de biorremediación de contaminantes químicos inorgánicos se utilizó 60 mL de biomasa obtenida de la cosecha de cada especie de microalga, distribuidas en matraces de 500 mL por triplicado.

Se trabajó con dos grupos control: uno negativo de 500 mL de lixiviado y otro positivo con medio CHU N° 10 más 5 mL de biomasa cada uno respectivamente. Asimismo, se contó con un grupo problema (50% de lixiviado más 5 mL de biomasa microalgal).

Los ensayos se realizaron por triplicado, y fueron sometidas a condiciones de aireación constante, a 26 °C y un fotoperiodo de (12:12) luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Se evaluó el perfil de crecimiento microalgal y producción de biomasa durante 15 días de exposición.

Al finalizar la evaluación se procedió a centrifugar cada uno de los tratamientos y se colectó el lixiviado, para el respectivo análisis de concentración final de contaminantes químicos inorgánicos.

Para determinar la capacidad de remoción, se procedió a comparar los resultados de concentraciones iniciales con respecto a las concentraciones finales.

Para conocer la concentración inicial y final de contaminantes químicos inorgánicos y metales en el lixiviado, las muestras fueron remitidas al Laboratorio de la Facultad de Ingeniería Química-Universidad Nacional de la Amazonía Peruana-UNAP, para análisis de las variables: pH, nitrógeno amoniacal, nitratos, fósforo, alcalinidad, dióxido de carbono, cloruro y dureza. Para metales pesados, las muestras se enviaron a la Empresa NSF INASSA S.A.C. que cuenta con un laboratorio certificado para análisis de metales: Mercurio, Cromo, Cadmio, Cobre, Hierro, Litio, Manganeso, Potasio, Plomo, Sodio, Vanadio, Zinc, entre otros elementos; los mismos que fueron analizados por espectrometría de fluorescencia Atómica por Vapor frío (Mercurio), y por espectrometría de emisión plasmático-atómica acoplada inductivamente (otros metales).

3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos

Con los datos obtenidos en los experimentos se elaboró una base de datos en formato Excel de Microsoft Office. Luego se aplicó análisis estadísticos (ANOVA) y la Prueba Multivariada (ANOSIM).

Los resultados se presentan en líneas e histogramas de frecuencia.

3.6. Aspectos éticos

La presente investigación se llevó a cabo cumpliendo todos los protocolos de bioseguridad establecidos en el laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú-UCP. No se trabajó con seres humanos.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Aislamiento de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. provenientes de las cuencas hidrográficas Nanay e Itaya. Loreto 2018

En la figura 3 se evidencia los cultivos de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. aisladas de las cuencas de Nanay e Itaya. El aislamiento se logró con la aplicación de dos métodos: por micropipeta capilar y siembra en placa con agar que garantizó la obtención de cultivos unialgales.

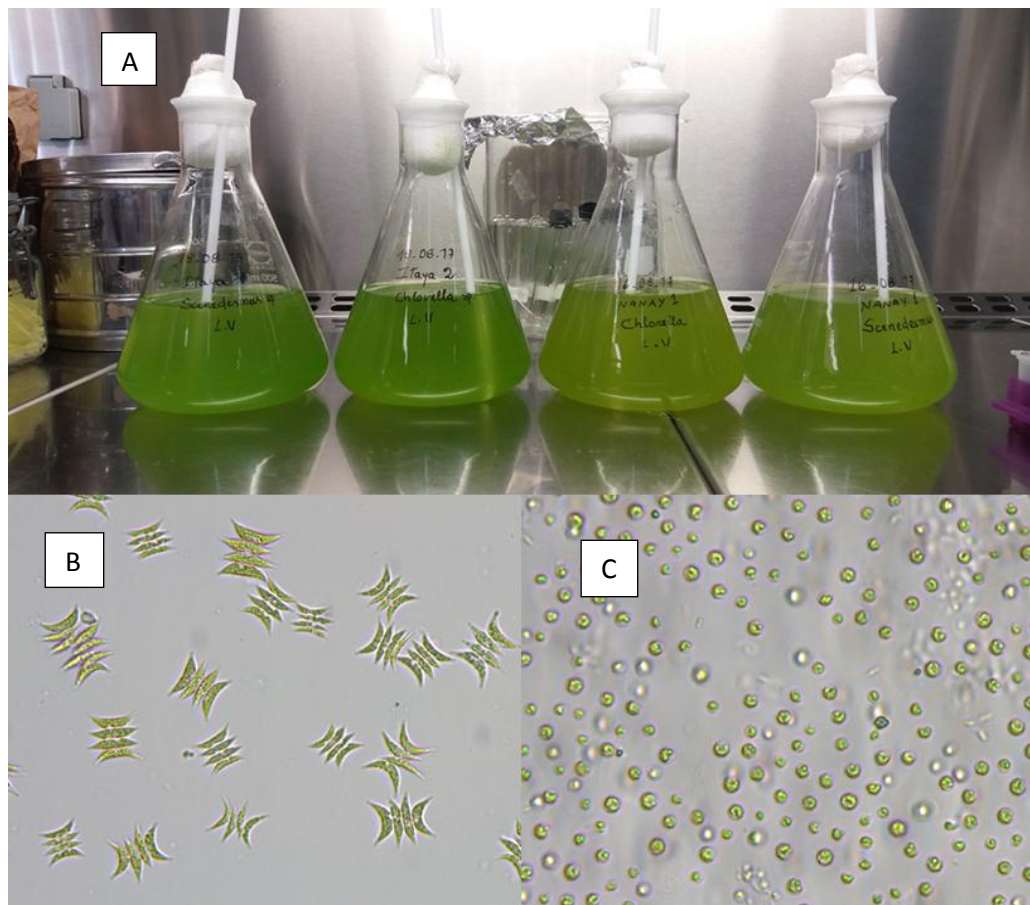


Ilustración 3 - A: Cultivos de microalgas después del aislamiento. **B:** *Scenedesmus* sp.400X **C:** *Chlorella* sp.400X

Fuente: La autora

4.2. Caracterización bioquímica de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en lixiviado - Loreto, 2018.

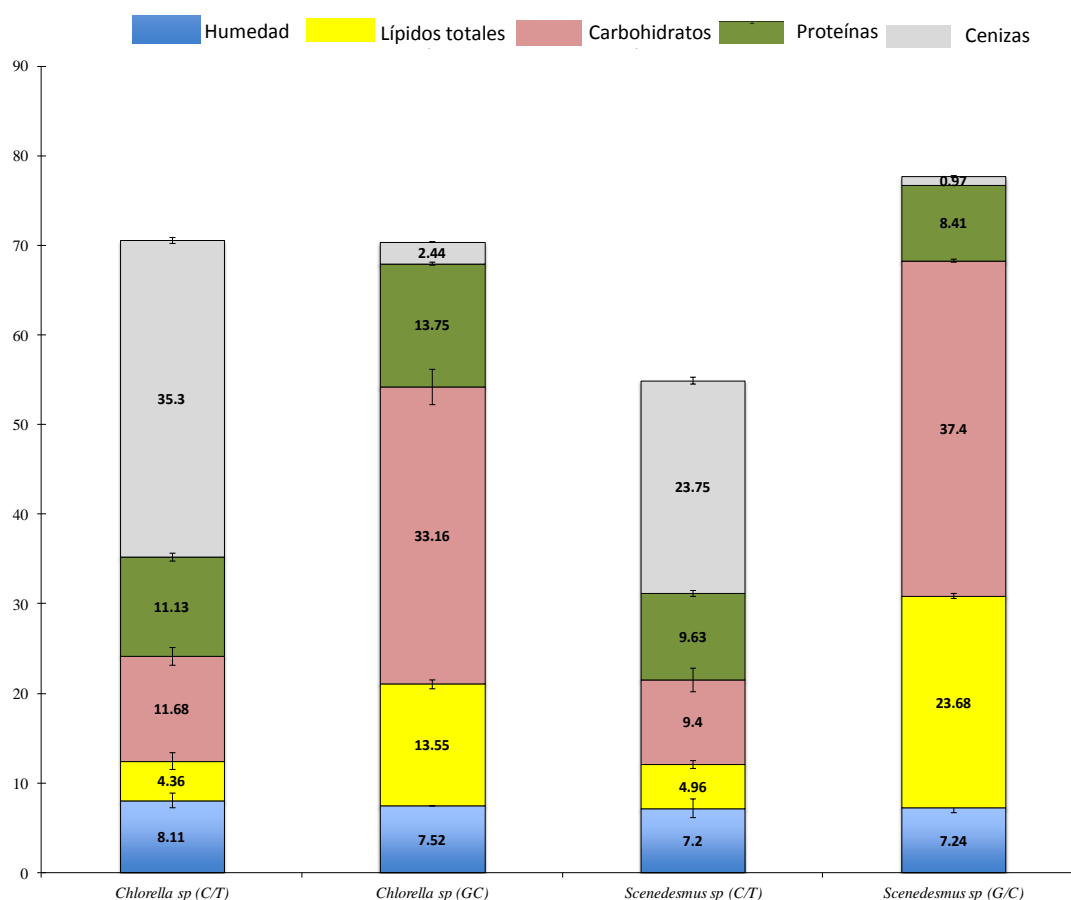


Gráfico 1. Caracterización bioquímica de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en lixiviado (C/T): cultivo en 50% lixiviado + 50% cultivo microalgal, (G/C): grupo “control”, cultivo microalgal.

Fuente: Datos de la autora

La figura, muestra la caracterización bioquímica de los cultivos microalgales, después de 15 días de evaluación. Se observó que las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. al ser cultivadas en medio conteniendo lixiviado (C/T), presentó un incremento significativo en los valores de cenizas ($35,3\% \pm 0,34$ *Chlorella* sp y $23,75\% \pm 0,41$ *Scenedesmus* sp.); sin embargo, los lípidos totales registraron disminución notoria $13,55$ a $4,36\% \pm 0,91$ en *Chlorella* sp. y $23,68$ a $4,96\% \pm 0,44$ en *Scenedesmus* sp.; de igual manera, ocurre con los

carbohidratos cuyos valores disminuyeron notoriamente en ambas microalgas (33,16 a 11,68% \pm 0,97 y 37,4 a 9,4% \pm 1,36); los valores de proteínas se mantuvieron con mínima variación en ambas microalgas (13,75% a 11,13% \pm 0,42 y 8,41% a 9,63 \pm 0,6), igual que la humedad, cuyos valores se mantuvieron sin variación aparente con respecto a los grupos “control”.

Referente a los grupos “control”, se evidencia que el contenido de lípidos totales y de carbohidratos se ve favorecido ampliamente en el cultivo de *Scenedesmus sp.* 23,68% y 37,4%, en comparación con el 13,55% y 33,16% alcanzado por *Chlorella sp.*

Tabla 1. Contenido de Ácidos Grasos en las Microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en lixiviado. Loreto, 2018

| Ácidos grasos | Ácidos grasos (mg FA/g) | <i>Chlorella</i> sp. (C/T) | <i>Chlorella</i> sp. (G/C) | <i>Scenedesmus</i> sp. (C/T) | <i>Scenedesmus</i> sp. (G/C) |
|----------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Ácido mirístico | C 14:0 | 0,2 ± 0,1 | 0,75 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 | 0,43 ± 0,0 |
| Ácido palmítico | C 16:0 | 6,61 ± 0,7 | 14,92 ± 0,6 | 7,41 ± 1,1 | 47,37 ± 1,8 |
| Ácido palmítico | C 16:1n -7 | 0,7 ± 0,3 | 0,46 ± 0,2 | 0,36 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Ácido hexadecatetraenoico | C 16:4n -3 | 0,91 ± 0,1 | 4,74 ± 0,1 | 0,28 ± 0,0 | 5,64 ± 0,1 |
| Ácido esteárico | C 18:0 | 0,42 ± 0,0 | 0,96 ± 0,0 | 1,07 ± 0,2 | 5,8 ± 0,2 |
| Ácido vaccénico | C 18:1n -7 | 1,09 ± 0,2 | 2,42 ± 0,1 | 0,74 ± 0,0 | 1,55 ± 0,1 |
| Ácido eláidico | C 18:1n -9 | 7,4 ± 0,7 | 16,33 ± 0,4 | 15,15 ± 2,6 | 90,46 ± 2,9 |
| Ácido linoeláidico | C 18:2n -6 | 4,06 ± 0,4 | 16,46 ± 0,4 | 1,42 ± 0,1 | 10,22 ± 0,3 |
| Ácido linolénico | C 18:3n -3 | 1,54 ± 0,1 | 8,4 ± 0,3 | 2,41 ± 0,2 | 23,13 ± 0,4 |
| Ác. omega linolénico | C 18:3n -6 | 0,21 ± 0,0 | 1,15 ± 0,0 | 0,09 ± 0,0 | 1,37 ± 0,0 |
| Ácido estearidónico | C 18:4n -3 | 0,34 ± 0,0 | 2,1 ± 0,1 | 0,27 ± 0,0 | 7,59 ± 0,1 |
| Ácido araquidónico | C 20:4n -6 | 0,25 ± 0,0 | 0,24 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Ác. eicosapentaenoico | C 20:5n -3 EPA) | 0,07 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Ác. grasos saturados | SFA | 16,57 | 52,3 | 20,72 | 139,96 |
| Ác. grasos insaturados | IFA | 7,23 | 16,63 | 8,58 | 53,6 |
| Ác. grasos monoinsaturados | MUFA | 9,19 | 19,21 | 16,25 | 92,01 |
| Ác. grasos poliinsaturados | PUFA | 7,38 | 33,09 | 4,47 | 47,95 |

SFA=ácidos grasos saturados, IFA=ácidos grasos insaturados, MUFA=ácidos grasos monoinsaturados, PUFA=ácidos grasos poliinsaturados

Fuente: Datos de la autora

La Tabla 1, muestra los valores de los ácidos grasos de las microalgas en lixiviado (C/T) y las muestras del grupo “control”. En general, se observa que el perfil de ácidos grasos en las microalgas con tratamiento en lixiviado, muestran valores bajos, con respecto a los grupos “control” de cada microalga evaluada.

En *Chlorella* sp., se observó que el ácido eláidico (C 18:1 n-9) presentó el valor más alto (7,4 ± 0,72 mg FA/g), seguido del ácido palmítico (C 16:0) con 6,61 ± 0,71 mg FA/g y del ácido linoeláidico (C 18:2 n-6) con 4,06 ± 0,38 mg FA/g. Los valores más bajos fueron reportados para el ácido eicosapentaenoico (C 20:5 n-3) con 0,07 ± 0,01 mg FA/g, seguido del ácido mirístico (C 14:0) y del ácido omega linolénico (C 18:3 n-6) con 0,2 mg FA/g ± 0,09 y 0,21 ± 0,02 mg FA/g respectivamente. Sin embargo, para el grupo “control”, muestra valores más altos en cada uno de los ácidos grasos

evaluados, siendo el de mayor cantidad el ácido linoelaídico con $16,46 \pm 0,36$ mg FA/g, registrándose ausencia de ácido eicosapentanoico (EPA).

En *Scenedesmus* sp. el ácido elaídico presentó el valor más alto ($15,15 \pm 2,63$ mg FA/g), seguido del ácido palmítico con $7,41 \pm 10,11$ mg FA/g. Los valores más bajos se registraron para el ácido mirístico ($0,1 \pm 0,0$ mg FA/g) y el ácido linolénico ($0,09 \pm 0,01$ mg FA/g). En el grupo "control" es notorio la ausencia del ácido palmitoleico, araquidónico y eicosapentanoico

Es importante resaltar que en los grupos "control", las microalgas evaluadas registraron valores altos del ácido elaídico. En *Chlorella* sp. el ácido elaídico, y el linoelaídico ($16,46 \pm 0,4$ mg FA/g y $16,33 \pm 0,36$ mg FA/g). En *Scenedesmus* sp., el ácido elaídico con $90,46 \pm 2,92$ mg FA/g.

4.3. Evaluación de la capacidad de remoción de los contaminantes químicos inorgánicos en lixiviado, usando microalgas amazónicas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*

En la tabla, se muestran los resultados de las variables químicas en lixiviado, utilizando las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*

Tabla 2. Variables químicas de contaminantes inorgánicos en lixiviado utilizando *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* Loreto, 2018

| Variables químicas (mg/L) | Análisis inicial lixiviado (0 días) | Microalga | |
|------------------------------|--|---|---|
| | | <i>Chlorella sp.</i> (C/T) (15 días) | <i>Scenedesmus sp.</i> (C/T) (15 días) |
| pH | 7,8 ± 0,1 | 9,4 ± 0,0 | 9,4 ± 0,0 |
| Amonio | 375,7 ± 1,2 | 114 ± 14,9 | 72,7 ± 2,1 |
| Nitratos | 25,4 ± 0,7 | 20,3 ± 0,5 | 5,4 ± 0,4 |
| Fosforo | 57,8 ± 1,3 | 35,6 ± 0,7 | 30,9 ± 2,3 |
| Alcalinidad | 1 744 ± 6 | 1 683,3 ± 76,4 | 1 716,7 ± 38,2 |
| Dióxido carbono | 770 ± 00 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Cloruros | 694,3 ± 1,9 | 794,6 ± 4,5 | 633,3 ± 18,5 |
| Dureza | 576,7 ± 25,2 | 313,3 ± 20,8 | 283,3 ± 15,3 |

Fuente: Datos de la autora

En el estudio, se monitorizaron ocho variables durante el tiempo de cultivo (15 días), para evaluar la capacidad de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de contaminantes inorgánicos en lixiviado de relleno sanitario.

Con respecto al pH, se observó una clara tendencia hacia la basicidad, se registró valores de 7.8 ± 0.1 (día 0) a 9.4 ± 0.00 (día 15).

-*Chlorella sp.* al ser cultivada en lixiviado (50% lixiviado + 50% cultivo microalgal), mostró el valor más alto de remoción de amonio de $375,7 \text{ mg/L} \pm 1,2$ a $114 \text{ mg/L} \pm 14,9$, la dureza fue removido de $576 \text{ mg/L} \pm 25,2$ a $313,3 \text{ mg/L}$; de manera similar el fósforo, cuyo valor refleja remoción de $57,8 \text{ mg/L} \pm 0,7$ a $35,6 \text{ mg/L} \pm 0,7$. En esta tendencia los nitratos y la alcalinidad mostraron ligera disminución al término de los 15 días de evaluación de $25 \text{ mg/L} \pm 0,7$ a $20,3 \text{ mg/L} \pm 0,0$ y la alcalinidad de $1744 \text{ mg/L} \pm 6$ a $1683,3$

mg/L \pm 76,4. Sin embargo, los cloruros mostraron un ligero incremento en su concentración de 694 mg/L \pm 1,9 a 794 mg/L \pm 4,5.-*Scenedesmus sp.* evidenció un comportamiento característico, removi6 de manera significativa el amonio y los nitratos se obtuvo valores de 375,7 mg/L \pm 1,2 a 72,7 mg/L \pm 2,1 y de 25,4 mg/L \pm 0,7 a 5,4 mg/L \pm 0,4 respectivamente), de igual manera la dureza fue removida de 576 mg/L \pm 25,2 a 283,3 576 mg/L \pm 15,3. Uno de los nutrientes importantes para el crecimiento y producci6n de biomasa microalgal, es el f6sforo, el cual present6 remoci6n de 57,8 mg/L \pm 1,3 a 30,9 mg/L \pm 2,3, mientras que cloruros y alcalinidad sus valores disminuyeron ligeramente de 694,3 mg/L \pm 1,9 a 633,3 mg/L \pm 18,5, y, de 1744 mg/L \pm 6 a 1716,7 mg/L \pm 38,2 respectivamente.

Con respecto al di6xido de carbono, tanto *Chlorella sp.* como *Scenedesmus sp.* removieron la totalidad de este componente (de 770 mg/L. (día cero) a 0,0 mg/L. al final de los 15 días de evaluaci6n).

La Tabla 3, resume los valores de remoci6n de los metales en lixiviado al inicio y al final de los 15 días de evaluaci6n, utilizando cultivos de las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*

Tabla 3. Remoción de metales y no metales en lixiviado utilizando las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* Loreto, 2018

| Análisis (mg/L) | Lixiviado inicial (0 días) | Microalga | | |
|--------------------|-------------------------------|---|--|--------------|
| | | <i>Chlorella sp</i> (C/T) (15 días) | <i>Scenedesmus sp</i> (C/T) (15 días) | |
| Aluminio | 11,92 ± 2,46 | 0,16 ± 0,02 | 0,13 ± 0,00 | |
| Bario | 0,09 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | |
| Calcio | 80,05 ± 1,52 | 27,60 ± 3,41 | 23,88 ± 0,79 | |
| Cobalto | 0,01 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | |
| Cromo | 0,10 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | 0,08 ± 0,00 | |
| Cobre | 0,02 ± 0,00 | 0,11 ± 0,00 | 0,10 ± 0,00 | |
| Estroncio | 0,23 ± 0,01 | 0,13 ± 0,01 | 0,13 ± 0,00 | |
| Estaño | 0,04 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | |
| Hierro | 18,12 ± 2,67 | 3,86 ± 0,42 | 3,62 ± 0,07 | |
| Litio | 0,002 ± 0,00 | N.C(<0,001) | N.C(<0,001) | |
| Magnesio | 46,80 ± 1,14 | 48,90 ± 1,29 | 49,35 ± 0,56 | |
| Manganeso | 0,42 ± 0,01 | 0,03 ± 0,01 | 0,04 ± 0,01 | |
| Molibdeno | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | |
| Niquel | 0,05 ± 0,00 | 0,06 ± 0,00 | 0,05 ± 0,06 | |
| Potasio | 1 207, 67 ± 26,50 | 1 428,33 ± 43,98 | 1 429,33 ± 8,14 | |
| Plomo | 0,02 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | 0,01 ± 0,00 | |
| Sodio | 379,53 ± 9,50 | 408,43 ± 14,91 | 406,87 ± 0,67 | |
| Titanio | 0,09 ± 0,01 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | |
| Vanadio | 0,05 ± 0,00 | 0,03 ± 0,01 | 0,03 ± 0,00 | |
| Zinc | 0,19 ± 0,01 | 0,11 ± 0,00 | 0,09 ± 0,00 | |
| NO METALES | Arsénico | 0,02 ± 0,0 | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 |
| | Boro | 0,60 ± 0,01 | 0,63 ± 0,02 | 0,64 ± 0,01 |
| | Fósforo | 11,57 ± 0,69 | 7,60 ± 1,24 | 8,80 ± 0,28 |
| | Silicio | 26,55 ± 3,24 | 13,50 ± 0,34 | 13,41 ± 0,79 |

Fuente: Datos de la autora

En general, se observó que la mayoría de los metales evaluados, tuvieron disminución de sus valores iniciales (día 0).

La microalga *Chlorella sp.* se registró disminución significativa en sus valores de aluminio de 11,92 mg/L a 0,16 mg/L, el calcio de 80,05 mg/L a 27,60 mg/L el hierro disminuyó de 18,12 mg/L a 3,86 mg/L, de igual manera el silicio y el fósforo de 26,55 mg/L a 13,50 mg/L.; de 11,59 mg/L a 7,60 mg/L respectivamente. Sin embargo, en el caso de los iones magnesio, potasio y sodio se registró incremento en sus valores al final de los 15 días de evaluación, la concentración en potasio y sodio con valores de 1207,67 mg/L. a 1428,33 y de 379,53 mg/L. a 408,43 mg/L respectivamente.

De manera similar, *Scenedesmus sp.* mostró disminución significativa para aluminio que fue removida de 11,92 mg/L a 0,13 mg/L, el calcio de 80,05 mg/L a 23,88 mg/L, el hierro de 18,12 mg/L a 3,62 mg/L, y el silicio de 26,55 mg/L a 13,41 mg/L y el fósforo de 11,59 mg/L a 8,80 mg/L. Al igual que en *Chlorella sp.* los iones magnesio, potasio y sodio incrementaron su concentración; el magnesio registró valores de 46,80 mg/L a 49,35 mg/L, potasio de 1207,67 mg/L a 1429,33 mg/L y sodio de 379,53 mg/L a 406,87 mg/L.

De manera general, *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* removieron los metales en el lixiviado; demostrando *Scenedesmus sp.* mayor capacidad de remoción.

Tabla 4. Análisis de Componentes Principales de las variables químicas y metales en lixiviado y con tratamientos de microalgas - Loreto, 2018

| Análisis | Variable | Componente | |
|--------------------------------|---------------------|---------------|---------------|
| | | 1 | 2 |
| Química | pH | 0.210 | 0.097 |
| | Amonio | -0.195 | -0.173 |
| | Nitratos | -0.124 | -0.266 |
| | Fósforo 1 | -0.161 | -0.266 |
| | Alcalinidad | -0.073 | -0.249 |
| | Anhidrido Carbónico | -0.204 | -0.129 |
| | Cloruros | 0.017 | -0.308 |
| | Dureza | -0.214 | -0.041 |
| Metales | Mercurio | 0.020 | 0.241 |
| | Aluminio | -0.216 | 0.010 |
| | Arsénico | -0.125 | -0.007 |
| | Bario | -0.208 | 0.117 |
| | Boro | 0.120 | 0.309 |
| | Calcio | -0.199 | 0.156 |
| | Cobalto | 0.173 | -0.237 |
| | Cromo | -0.162 | 0.029 |
| | Cobre | 0.200 | 0.100 |
| | Estroncio | -0.200 | 0.139 |
| | Estaño | -0.159 | 0.101 |
| | Hierro | -0.212 | 0.071 |
| | Fósforo 2 | -0.157 | 0.245 |
| | Litio | -0.209 | -0.109 |
| | Magnesio | 0.107 | 0.327 |
| | Manganeso | -0.209 | 0.123 |
| | Molibdeno | 0.172 | -0.131 |
| | Niquel | 0.051 | 0.225 |
| | Potasio | 0.200 | 0.057 |
| | Plomo | -0.203 | 0.113 |
| | Sodio | 0.149 | -0.042 |
| | Silicio | -0.207 | -0.014 |
| Titanio | -0.216 | 0.029 | |
| Vanadio | -0.206 | -0.013 | |
| Zinc | -0.161 | 0.264 | |
| % total Variación | | 63.2 | 17.9 |
| % acumulado de variación total | | 63.2 | 81.1 |

Fuente: Datos de la autora

La Tabla 4, muestra el análisis de componentes principales de las variables químicas y metales en lixiviado y con tratamiento utilizando las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

El análisis muestra que las variables químicas y metales, pueden explicar el 81.1% y en dos componentes o dimensiones los cambios en la muestra de lixiviado.

El componente 1, explica el 63,2% y muestra claramente dos grupos opuestos: el lixiviado inicial y el tratamiento con algas, mientras que el grupo de lixiviado después de 15 días de evaluación fue intermedio.

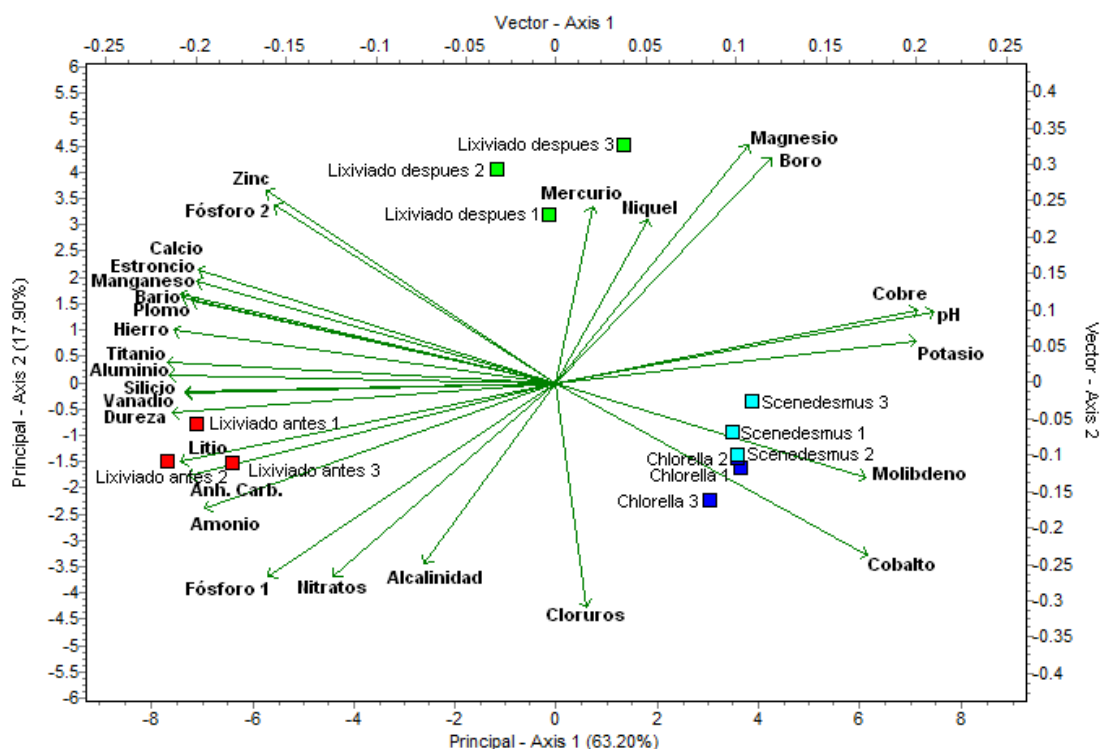


Gráfico 2. Análisis de Componentes Principales de las variables químicas y metales de las microalgas *Chlorella*. sp. y *Scenedesmus* sp. en lixiviado-Loreto 2018

Fuente: Datos de la autora

La figura 5, muestra que 19 variables fueron características de lixiviado inicial, pero los que tuvieron valores mayores fueron: aluminio, titanio, dureza, hierro, litio, manganeso, bario, silicio, vanadio, anhídrido carbónico, plomo y estroncio; mientras que en el tratamiento con algas los valores mayores se dieron en pH, cobre, potasio, cobalto y molibdeno. El grupo de lixiviado, al ser un intermedio, no mostró algún elemento representativo que explique la variabilidad al 81%.

El componente 2, explica sólo el 17,9% de los cambios en la muestra o variabilidad, diferenció notoriamente a la muestra de lixiviado después de 15 días y, al tratamiento con microalgas. Se registró mayores valores de magnesio y boro en la muestra de lixiviado después de 15 días y, mayores valores de cloruros en la muestra de microalgas. Es importante notar, que

entre ambos cultivos de microalgas estudiadas, el cultivo con *Scenedesmus sp.* registró menor concentración de cloruros (Tabla 2, figura 05).

El análisis de similitud muestra que hubo diferencia significativa (ANOSIM <0.05), entre las muestras de lixiviado inicial, lixiviado después de 15 días, tratamiento con *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de Similitud (ANOSIM) de las variables químicas y metales de las muestras de lixiviado y con tratamientos de microalgas. Loreto, 2018

| 1er Grupo | 2do. Grupo | P Valor | P valor total | Permutaciones realizadas |
|----------------------|------------------------|---------|---------------|--------------------------|
| antes (3) | <i>Chlorella</i> (3) | 0,05 | 0,001 | 1 000 |
| antes (3) | después (3) | 0,05 | | |
| antes (3) | <i>Scenedesmus</i> (3) | 0,05 | | |
| <i>Chlorella</i> (3) | después (3) | 0,05 | | |
| <i>Chlorella</i> (3) | <i>Scenedesmus</i> (3) | 0,05 | | |
| después (3) | <i>Scenedesmus</i> (3) | 0,05 | | |

Fuente: Datos de la autora

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las microalgas son organismos que cumplen una función esencial en los ecosistemas acuáticos, tienen la capacidad de absorber rápidamente nutrientes y dióxido de carbono, esto genera altas tasas de crecimiento, se adaptan a distintas condiciones ambientales, y se ubican en cualquier medio acuático donde exista precisamente una fuente de carbono, nutrientes y luz suficiente, junto con el rango apropiado de temperatura ⁴¹.

Se aislaron las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. provenientes de las cuencas hidrográficas de Nanay e Itaya, ubicadas en la División Chlorophyta, grupo taxonómico muy diversificado y representativo en Amazonía Peruana, como lo demuestran los trabajos de Vela *et al.*, ⁶⁵ registran 66 especies distribuidas en cinco divisiones taxonómicas, siendo el grupo dominante las Chlorophyta con 34 especies (51.5%); asimismo, en un estudio realizado en la la Cocha LLanchama-Río Nanay se reportan 54 géneros distribuidas en diez clases, siendo Chlorophyceae y Zygothryxaceae la más diversas con un total de 26 géneros ⁶⁶. En la misma línea de investigación, en un estudio realizado en las cuencas del Itaya, Nanay y Amazonas se identificaron 31 especies de microalgas, distribuidas en 6 divisiones y 19 familias, registrándose mayor diversidad de microalgas en la cuenca del Itaya 22 especies, cuenca del Nanay 14 especies, y menor diversidad en la cuenca del Amazonas 5 especies. Los grupos taxonómicos más representativos para las tres cuencas amazónicas fueron: Chlorophyta, Bacillariophyta y Cyanophyta ⁶⁷.

Los métodos de aislamiento de las microalgas fueron óptimos, se logró aislar las microalgas de interés, de las cuencas de Nanay e Itaya. Al respecto, Olguin *et al.*,⁶⁸ aislaron tres microalgas marinas: *Actinocyclus normanii*, *Cyclotella glomerulata* y *Neodelphineis pelágica*; similares resultados fueron reportados para las diatomeas *Amphora cf. marina* y *Amphora cf. terroris* ⁶⁹.

Los resultados de la presente investigación, muestran que las microalgas amazónicas aisladas, utilizando una combinación del método lavado celular con micropipeta capilar, y siembra en agar de manera complementaria, permitieron garantizar un cultivo unialgal ⁷⁰, guardando relación con los resultados obtenidos por Elumalai *et al.*, ⁷¹ quienes aislaron tres especies de microalgas marinas, aplicando la misma metodología.

La composición bioquímica de las microalgas varía mucho en función de la especie, y de factores ambientales, siendo la temperatura uno de los factores determinantes ⁷²; están compuestas básicamente por proteínas, carbohidratos, ácidos nucleicos y ácidos grasos, estos últimos se encuentran en las membranas, en los productos de almacenamiento, metabolitos, etc. representando en algunas especies el 40% de su peso seco ⁷³. En la presente investigación, las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, al ser cultivadas en lixiviado, disminuyeron notoriamente el porcentaje de lípidos totales de 13,55% a 4,36% y 23,65% a 4,96% respectivamente, con respecto al grupo "control". Estos resultados difieren con lo obtenido por Pérez, S.¹⁷ quien reportó para *Chlorella sp.* y *Scenedesmus quadricauda* cultivadas en lixiviado, porcentaje de lípidos totales de 15,33% y 27,55% respectivamente; de manera similar Cobos *et al.*,²⁸ muestran valores de 28% en *Scenedesmus sp.* y 22% en *Chlorella sp.*

Según Montero-Sánchez *et al.* ⁷⁴ el contenido de lípidos y ácidos grasos de las microalgas varía con las condiciones de cultivo, que no son las mismas, y, en algunos casos depende de la fase de crecimiento en la cual fueron cosechadas las microalgas; asimismo Li, Y., *et al* ⁷⁵ y Chen, *et al.* ⁷⁶ sostienen que el contenido de lípidos puede incrementarse por condiciones de no suministro de nitrógeno u otro factor de estrés. En este sentido existen otras investigaciones que muestran un alto contenido de lípidos totales 24,5 % a 40,3% en una especie del género *Ankistrodesmus* ⁷⁷, en *Chlorella sp.* un contenido lipídico entre 28% y 43% en cultivo en biorreactores ⁷⁸.

Además de las típicas y claras diferencias en el perfil bioquímico de las microalgas, se describen también grandes cambios en su composición, dependiendo de factores como la fase de cultivo, disponibilidad de

nutrientes, irradiancia y temperatura que se encuentran entre los más comunes y que determinan variabilidad en su composición bioquímica; por lo tanto es muy impreciso, hablar de valores generales para la composición bioquímica de microalgas en su amplio sentido. No obstante, de manera muy general, y para cultivos sobre la base del contenido total en nitrógeno, no contemplan el hecho de que los niveles de nitrógeno no proteico (ADN, ARN, aminos, glucosaminas) puedan llegar a ser del 10%.

En la misma tendencia, los carbohidratos mostraron una disminución muy significativa en las microalgas estudiadas; sin embargo los valores de proteínas se mantuvieron con mínima variación en ambos cultivos (13,75% - 11,13% y 8,41 – 9,63%); al respecto León *et al.*, mencionan que el contenido en proteína suele disminuir, cuando los cultivos experimentan déficit de nutrientes, mientras que los porcentajes de lípidos o carbohidratos experimentan un aumento leve en esas mismas condiciones. En relación al porcentaje de cenizas se incrementó notoriamente en el tratamiento con microalgas, probablemente este hecho ocurre porque las sustancias orgánicas y la mayoría de los minerales al ser incinerados, son convertidos a óxidos, sulfato, fosfato, cloruro y silicato.

La humedad, cumple una función importante en los procesos de descomposición de los residuos sólidos, los cuales pueden ser físicos, químicos y biológicos, siendo los procesos biológicos los que generan las condiciones para que ocurran reacciones de hidrólisis, transporte de nutrientes y enzimas, disolución de metabolitos, favoreciendo a la vez, el efecto buffer; y expone el área superficial al ataque de los microorganismos⁷⁹; en la presente investigación, la humedad presentó porcentajes bajo, y durante el tratamiento, se mantuvo sin variación significativa, lo que podría explicarse por los altos contenidos de materia orgánica fácilmente biodegradable que contienen los residuos sólidos en países tropicales, produciendo a su vez altas concentraciones de ácidos grasos volátiles y de amoníaco, producto de la fermentación inicial⁶.

El contenido y perfil lipídico de las microalgas son considerados como propios de la especie, varía grandemente entre las especies de cada grupo taxonómico, razón por la cual resulta importante conocer la composición de los ácidos grasos de las diferentes especies, estos se componen de saturados e insaturados con 12-22 átomos de carbono. Estudios sobre diferentes especies de microalgas de agua dulce, han encontrado que en la mayoría de ellas se encuentra ácidos grasos C 14:0, C 16:0, C 18:1, C 18:2 y C 18:3 ⁸⁰. En la presente investigación, las microalgas evaluadas registraron una amplia gama de ácidos grasos de C14:0 a C20:0, los resultados obtenidos muestran que *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* presentaron alto contenido de ácido eláidico y ácido palmítico, y los valores más bajos para el ácido mirístico y el ácido linolénico. En el año 2009 una investigación reportó que los cultivos microalgales en condiciones de estrés (limitados en nitrógeno), muestran una tendencia generalizada a incrementar el contenido de ácidos grasos saturados y monoinsaturados y disminuir los poliinsaturados; mientras que al aumentar la concentración de este nutriente, hay un incremento en la proporción de ácidos grasos poliinsaturados ⁸¹. Así mismo al evaluar el efecto de la salinidad, la intensidad de luz y la disponibilidad de nitrógeno, en medio de cultivo limitado en nitrógeno en la microalga *Nannochloropsis sp.* se reportó incremento en los ácidos grasos mirístico de 0,7 % a 2,9 %, palmítico de 4,8 % a 19,8 %, palmitoleíco de 3,9 % a 15,1 % y oleico de 0,7 % a 6,8 % ⁸². En la presente investigación, las microalgas estudiadas registraron mayor porcentaje de ácidos grasos saturados y monoinsaturados, y, menor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados, lo que concuerda con lo reportado por Garibay *et. al.*, ⁸³ quienes registraron predominio de ácidos grasos poliinsaturados en microalgas de ecosistemas salinos, mientras que en ambientes dulceacuícolas son más comunes los ácidos grasos saturados y monoinsaturados, lo que quedó demostrado en la presente tesis. En la misma tendencia los cultivos de *Chlorella vulgaris* utilizando lixiviado, mostró acumulación de ácidos grasos palmítico y oleico, con disminución de los ácidos grasos poliinsaturados: linoléico, araquidónico, y eicosapentanoico ⁸⁴; resultados concordantes en el caso de los ácidos grasos poliinsaturados, y

comportamiento diferente para el ácido palmítico, que muestra una disminución de 14,92% a 6,61%.

Es importante destacar, que el perfil de ácidos grasos de las microalgas estudiadas, mostraron el valor más alto para el ácido elaídico (C18:1n-9), al respecto Teixeira, C. & Morales, E. ⁸⁵ mencionan que los factores nutricionales, ambientales y las condiciones del cultivo pueden afectar la tasa de crecimiento (biomasa), y la composición de ácidos grasos; señalando que la deficiencia de nitrógeno y el estrés salino inducen la acumulación del ácido elaídico; también Pal y Cohen ⁸⁶ en un estudio con la microalga *Chlorella vulgaris* observaron que bajo condiciones fotoautotrófica y fotoheterotrófica, disminuye el nitrógeno en el medio de cultivo, componente inorgánico que tiene un importante papel en la acumulación de los ácidos grasos palmítico y oleico y disminución de los ácidos grasos poliinsaturados; sin embargo, en condiciones mixotróficas presentó un perfil de lípidos compuesto principalmente por ácido palmítico y ácido oleico (50%-62%) independientemente de la concentración de nitrógeno en el medio ⁸⁶.

Para la especie *Scenedesmus rubescens*, Olguin *et al.* ⁶⁸ registró limitación de nutrientes al aumentar el tiempo de cultivo, evidenciando un aumento en el porcentaje del ácido oleico de 16 % a 54 %, y disminución en los ácidos linoléico y linolénico. Resultados similares fueron reportados por Hu, 2006 ⁸⁴ y Khozin *et al.* ⁸⁷, para *Scenedesmus incrassatulus* al observar un aumento del 78,8 % en el contenido de ácido palmítico y de 133,4 % de ácido oleico, después de 6 a 11 días de cultivo. Asimismo Mollering, ^{20,10} observó para *Nannochloropsis* sp. un incremento en los ácidos grasos poliinsaturados (linoléico, araquidónico, eicosapentanoico, docosaheptanoico) al aumentar la concentración de nitrato y fosfato en el medio, mientras que el contenido de ácido eicosapentanoico se incrementó en un medio rico, sólo en nitrógeno ⁸⁹. Trabajos similares muestran el efecto combinado de la fuente de carbono (bicarbonato o acetato) y los niveles de radiación en el crecimiento y perfil de ácidos grasos de la microalga marina *Pavlova letheri* y se encontró que, el crecimiento y la composición lipídica fueron más sensibles a las variaciones en la intensidad de luz que, a la fuente de

carbono, a una intensidad de luz de 20 uE/m².s ; el porcentaje de los ácidos grasos saturados fue de 25,8% y 23,9% con bicarbonato y acetato respectivamente, y, al aumentar la intensidad de luz a 340 uE/m².s los ácidos grasos saturados alcanzaron un valor de 29% en el medio con bicarbonato y de 29,7% en medio con acetato ⁵³.

Desde mediados del siglo XX se conoce que las microalgas son eficientes en la remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales ^{90,91,92}, adquiriendo los cultivos algales un gran protagonismo, por ser considerados eco-amigables y ofrecer una alternativa de solución a tratamientos de aguas residuales, debido a la capacidad de las microalgas, para utilizar nitrógeno inorgánico y fósforo para su crecimiento, así como también, por su capacidad de remover metales pesados y algunos compuestos orgánicos tóxicos ⁹³. Los componentes de su pared celular contribuyen a su capacidad para retener contaminantes ambientales, presentes en cuerpos de agua ².

En términos de biorremediación, los resultados de la investigación muestran resultados óptimos, y la eficiencia de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en el tratamiento de lixiviado.

El análisis de remoción de contaminantes químicos inorgánicos, evidencian que *Chlorella* sp. cultivada en lixiviado (50% lixiviado + 50% cultivo microalgal) mostró rangos de remoción de amonio de 70%, nitratos 20% y fósforo 38%; *Scenedesmus* sp. cultivada en las mismas condiciones, fue más eficiente con porcentajes de 81% para amonio, 79% nitratos y 47% fósforo. Muchos estudios demuestran el éxito del uso del cultivo de microalgas para eliminar nutrientes ricos en nitrógeno y fósforo entre otros componentes inorgánicos; Avila *et al.*,⁹⁴ reportan rangos de remoción de nitratos (N-NO₃) entre 56% - 75% y fosfatos (PO₄³⁻) entre 78% - 84% en aguas residuales municipales por cultivos libres e inmovilizados de *Chlorella* sp.; Ruíz & Mendoza. ⁹⁵ registraron porcentajes de remoción de amonio entre 60,1- 80 para *Chlorella vulgaris* y 96,6 -100 para *Scenedesmus obliquus*; en la misma tendencia, Bashn & Bashan ¹⁹; Lavoie & de la Noue ;

Wang *et al*^{96.}, reportaron 100 % de remoción de amonio en *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus*.

Estudios realizados por Tam & Wong; Abdel-Raouf *et al.*, con la microalga *Chlorella sp.* Obtuvieron 86% de remoción de nitrógeno inorgánico y 70% en fósforo inorgánico; Wang *et al.*, reportan 75,7-82,5% en nitrito y 62,5-74,7% en fosforo. Li *et al.*, registró 93,9% de remoción de amonio 89,1% de nitrógeno total y 80,9% en fosforo. Autores como Hammouda *et al.*, en cultivos de laboratorio utilizando las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.*, obtuvieron remoción de 100% en nitrato, amonio y fósforo pasados 36, 42 y 48 días. Los resultados obtenidos en la presente investigación, van en concordancia con los porcentajes reportados por los autores mencionados. Según, Ruíz-Marín y Mendoza-Espinosa, la alta remoción de amonio podría explicarse por efecto de la volatilización del amoniaco, como resultado del alto pH registrado en los cultivos; por otro lado, la eficiencia en la eliminación de nutrientes, se podría explicar por el hecho de que las microalgas requieren altas cantidades de nitrógeno para la formación de proteína (45-60% de microalga peso en seco), y el fósforo aun siendo su contenido menor al 1% es fundamental para la formación de ácidos nucleicos y transferencia de energía⁹⁷; asimismo son capaces de reducir altas concentraciones de nitrógeno y fosforo a través de la asimilación de dichas sustancias en la generación de biomasa, por el proceso fotosintético que requiere de componentes de luz, dióxido de carbono, agua y nutrientes inorgánicos: nitratos, fosfatos, hierro y algunos elementos traza⁹²; es importante señalar, condiciones de temperatura, iluminación y pH⁹⁸.

La utilización de *Chlorella sp.* en aplicaciones de biorremediación es bastante amplio, sea en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos. Estudios realizados en Loreto-Perú por Pérez¹⁷ con la microalga *Chlorella sp.* reportó remoción de dióxido de carbono, dureza, alcalinidad y fosforo, resultados concordantes con los valores encontrados en la presente investigación, y en estudios realizados sobre la efectividad de esta especie en la remoción de nitrógeno, fosforo, demanda química de oxígeno y metales en aguas

residuales realizados por Garza *et al.* Asimismo, Pérez, reportó que los valores de pH en las tres especies de microalgas evaluadas se mantuvieron en 9. Estos resultados son similares a lo reportado en estudios anteriores realizados por Borowitzka, donde indica que la especie *Scenedesmus obliquus*, tiene una consistencia a pH comprendido entre 4 y 9,5, valores en los que se encuentran los lixiviados ¹⁸, y que concuerdan con lo registrado en la presente investigación (pH inicial de 7,8 hasta 9,4 al término de los 15 días de evaluación); esta basicidad se podría explicar que como respuesta al proceso de metanización de los ácidos grasos, el pH del lixiviado tiende a aumentar ⁶. Según, Nurdogan y Oswald ⁹⁹, se conoce que el pH tiene influencia en la eficiencia de remoción del nitrógeno y fósforo a través de la volatilización del amonio, además de la precipitación de ortofosfato.

Con respecto al dióxido de carbono (CO₂), la remoción fue del 100% en las microalgas estudiadas; la dureza registró remoción de 46% en *Chlorella* y 51% en *Scenedesmus*, resultados que se podrían explicar por el hecho de que la dureza es determinado sólo por la presencia de sales de calcio y magnesio, (micronutrientes), que son aprovechados por las microalgas; sin embargo, los cloruros evidenciaron un leve incremento, que podría explicarse por el hecho de que los iones Cl⁻ no tienen la capacidad de transformarse químicamente.

Las microalgas son conocidas y estudiadas por su capacidad de remover metales disueltos sea de un medio líquido o gaseoso ¹⁰⁰, y debido a su carga superficial negativa poseen una alta afinidad por los iones de metales pesados ¹⁰¹, y lo introducen al sistema por adsorción, absorción y por formación de fitoquelatinas ¹⁰².

Los resultados obtenidos en la presente investigación, demostró que las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. son eficientes en la remoción de metales. Se evidenció que de los 32 metales analizados, 20 disminuyeron su concentración en el tratamiento con microalgas, registrando para el aluminio, calcio y hierro los más altos valores de remoción. Pellón *et al.*, ⁷⁹ reportan que los mecanismos fisiológicos que presentan las microalgas les

permite tomar metales pesados del medio ambiente, concentrarlos y acumularlos en grandes cantidades en diferentes estructuras citoplasmáticas, sin que lleguen a producir efectos tóxicos en los mismos; también se precisa que el proceso de bioabsorción de metales por microalgas se produce en dos fases, una fase (rápida) de adsorción extracelular (ejm. polisacáridos, mucílagos), además de componentes celulares (ejm. grupos carboxilos, hidroxilos y sulfatos), que puede ser reversible, y una segunda fase (lenta) de absorción del metal de acumulación dentro de la célula, no es reversible y puede traer como consecuencia la intoxicación y muerte de la biomasa, si las concentraciones de metal en la solución son elevadas,²⁴; hecho que no se presentó en el presente estudio, evidenciado por un crecimiento microalgal sostenido, hasta el final de la evaluación.

Para Tam, los metales juegan un papel esencial en el metabolismo de las microalgas a concentraciones bajas, tal el caso del Zn y Cu, además de participar en diferentes rutas metabólicas; otro factor importante en la remoción de los metales pudo ser el aumento de pH (de 7,8 a 9,4), tal como lo afirma Pellon *et al.*, en el sentido de que el pH afecta la solubilidad de los metales, la actividad de los grupos funcionales en la biomasa, así como la competencia de los iones metálicos por los sitios o lugares de enlace de la biomasa microalgal; Al respecto, Kuyacak y Volesky ¹⁰², señala que a valores de pH altos, los grupos carboxilos de la biomasa, estarían disociadas a tal extremo que generan superficies cargadas negativamente, así como los grupos aminos de la pared celular de la microalga, los cuales juegan un papel importante en la acumulación de metales por la biomasa microalgal.

En el análisis, también es importante señalar que la temperatura se mantuvo entre 24°C -28°C, condición óptima para el crecimiento y desarrollo de las microalgas estudiadas, así como para el proceso de eliminación de los metales, confirmado por Kuyacak & Volesky ¹⁰² quienes afirman, que temperaturas por debajo de 10°C o por encima de 60°C el proceso de captura de iones por parte de las microalgas comienza a disminuir considerablemente, siendo el intervalo óptimo de temperatura para éste tipo de proceso entre 10° y 40°C. En investigaciones reportadas por Wilde & Benemann,; Piotrowska et al.¹⁰³ mencionan que existe una amplia gama de

microalgas que absorben diferentes metales pesados, con capacidad para adaptarse fisiológicamente al estrés por este tipo de contaminación.

También se podría hipotetizar, que probablemente la remoción reportada en este estudio, se debe a la acción compleja de los iones metálicos presentes en el lixiviado. Se conoce que los iones metálicos, como el Fe^{2+} , Zn^{2+} o Cu^{2+} , no atraviesan libremente la membrana celular; las formas de paso de estos metales son quelatos. Los quelatos son sintetizados biológicamente y actúan como ionóforos, que acarrean los iones metálicos. Los ionóforos específicos para el caso del hierro son conocidos como sideróforos,¹⁰³. Al igual que otros metales del grupo de transición, el Fe^{2+} puede dar lugar a estrés oxidativo, el cual es controlado por los niveles de compuestos reductores como los tioles glutatión y cisteína, así como por la actividad de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa y la catalasa. La presencia de calcio en el lixiviado, se considera como un elemento muy necesario en la estructura de los organismos, al combinarse con el fosforo mantiene libre el hierro para su absorción y utilización. Varios minerales también pueden ayudar a eliminar el exceso de hierro almacenado como el manganeso y el zinc.

En el tratamiento con algas, hubo menor concentración de cloruros en *Scenedesmus* sp., que podría deberse a su mayor capacidad o un actuar mejor que *Chlorella* sp., en la actividad de eliminación o reducción de elementos en el lixiviado.

De las pruebas realizadas, se puede determinar que los metales que son removidos en mayor cantidad por las microalgas son el aluminio, calcio, hierro y silicio, mientras que el magnesio, potasio y el sodio aparentemente no.

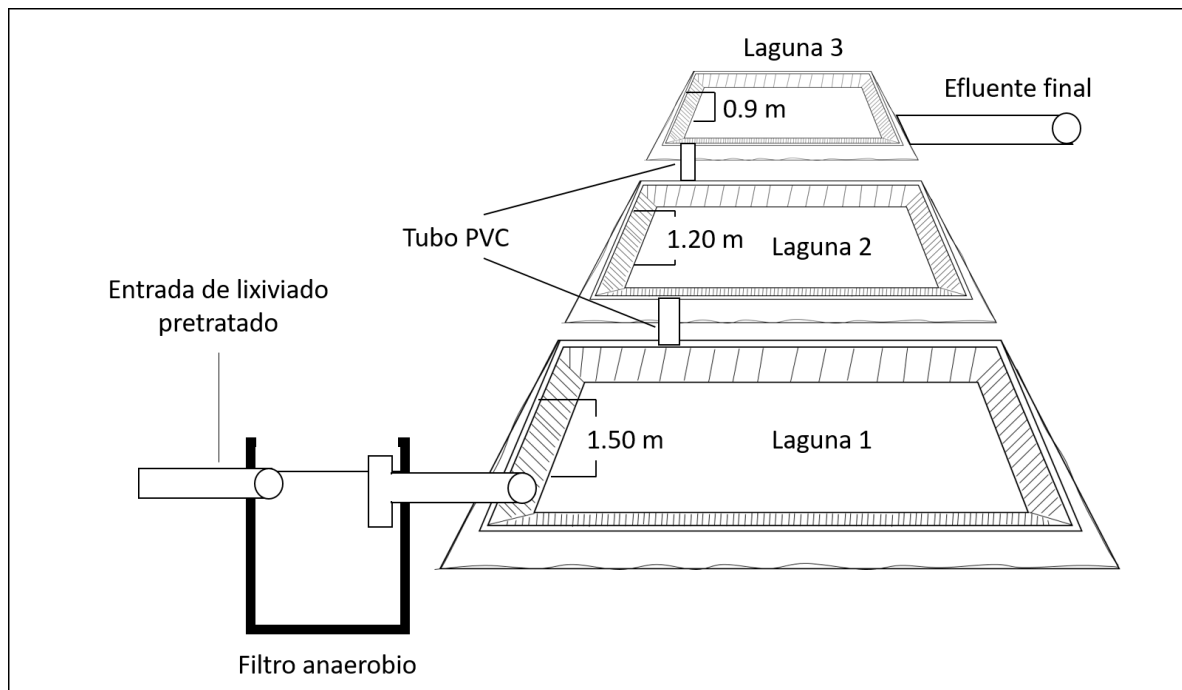
Existe diferencia significativa (ANOSIM <0.05) en las muestras de lixiviado inicial, después de 15 días de evaluación y con los tratamientos empleando las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.

CAPÍTULO VI: PROPUESTA

La recolección y tratamiento de lixiviados, como parte de un manejo adecuado e integral, y como parte del desarrollo sostenible es importante, por un tema ambiental y de salud pública. Los rellenos sanitarios producen grandes cantidades de lixiviado que, por su alto poder contaminante, generan enfermedades y deterioro ambiental; de allí, la importancia de darle el tratamiento adecuado, empleando técnicas viables y de bajo costo.

La investigación demuestra de manera científica, las ventajas que presentan las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en el tratamiento de lixiviado, por sus características estructurales y funcionales como: la composición de su pared celular, alta capacidad fotosintética, fácil y rápido crecimiento celular, alta resistencia, crecimiento en aguas con concentraciones considerables de materia orgánica, reducción de compuestos inorgánicos, y por su capacidad de bioacumulación de metales; constituyéndose las microalgas, en una alternativa viable y sostenida de tratamiento; además de ser un grupo de organismos muy diversificado e importante en ambientes acuáticos continentales.

Considerando, que los sistemas de lagunas son procesos que están regulados por las condiciones climáticas de temperatura, intensidad y duración de luz solar, por tanto favorecidos en regiones tropicales, y, presentan ciertas ventajas como, baja inversión, facilidad de operación, dilución de lixiviados por agua de lluvias, etc. se propone la construcción de Lagunas Facultativas, una de las formas más simples para el tratamiento de lixiviado por su fácil construcción, operación, mantenimiento, alta eficiencia en el tratamiento, y simplicidad tecnológica a bajo costo. En éste tipo de lagunas las microalgas desempeñan un papel fundamental, por la remoción de la materia orgánica que se realiza por medio de la actividad coordinada, con las bacterias heterotróficas.



Esquema de la serie de lagunas

Para la construcción de las lagunas se requiere, además, la evaluación de la carga orgánica del relleno sanitario, el análisis de los parámetros de DBO_5 , DQO, tiempo de retención hidráulica, evaporación y pluviometría.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir, lo siguiente:

1. Se logró el aislamiento de las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* provenientes de las cuencas hidrográficas de Nanay e Itaya.
2. La composición bioquímica de las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en cultivos con lixiviado, se caracterizó por presentar lípidos totales, carbohidratos y proteínas. Asimismo, una amplia gama de ácidos grasos, destacando el ácido elaídico por su alto valor 16.33 mg FA/g en *Chlorella sp.* y 90.46 mg FA/g para *Scenedesmus sp.*
3. Se obtuvieron altos porcentajes de remoción de Amonio 70%, Nitratos 20% y Fósforo 38% en *Chlorella sp.*; *Scenedesmus sp.* demostró ser más eficiente en la remoción de nutrientes Amonio 81%, Nitratos 79% y Fosforo 47%.
4. El Análisis de Componentes Principales demuestra que las microalgas *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* pueden remover eficientemente aluminio, calcio y hierro.; además de otros iones metálicos.
5. Se propone las Lagunas Facultativas como alternativa de bajo costo, para la descontaminación de lixiviado.

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios de DBO/DQO, para conocer el grado de biodegradabilidad de la materia orgánica en el relleno sanitario-Nauta.
2. Caracterizar de manera completa el lixiviado de relleno sanitario manual de la ciudad de Nauta, que permita adoptar el tratamiento más adecuado.

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Juhasz A. and Naidu R. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. 2000. (45), 57-88p.
2. Garza M, Almaguer V, Rivera J, Loredó J. Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chorella sp.* Inmovilizada para la remoción de metales pesados, 2010. 2(13), 174-177p.
3. Semple K, Cain B, Schmidt S. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae; 1999; 170, 291-300p.
4. Morales J. Estudio para la remoción de metales pesados en los lixiviados de rellenos sanitarios. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ingeniería y Arquitectura. Especialización en Ingeniería Ambiental con Énfasis en Ingeniería Sanitaria, 2007.
5. Parra A. Tratamiento de lixiviado con la microalga *Chlorella sp.* 2010
6. Giraldo E. Tratamiento de Lixiviados de Rellenos Sanitarios. Universidad de los Andes, *Rev. de Ingeniería*; 2001; Vol 47 (14).
7. Ferrera N, Rojas G, Poggi M, Alarcón A, Cañizares R. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos; 2006, 48(2), 179 – 187p.
8. Conam. Manejo de residuos sólidos. Situación en América latina y el Caribe, 2007.
9. Caldwell J. New Genera and Species of Jumping Plant-lice from the Hawaiian Islands with Descriptions of Several Immature Stages, (Homoptera: Psyllidae).1940; 10, 389-397p.
10. Durand. The Effects of Earthworm Maturity on Arsenic Accumulation and Growth After Exposure to Soils Containing Mine Tailings; 2009. 295-302p.
11. Oswald W, Lembi C, Waaland J. The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation; 1988. 225-281p.
12. Abalde J, Cid P, Fidalgo E, Herrero C. Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Facultad de ciencia, Laboratorio de microbiología. Universidad de Coruña, 1995.

13. Mulligan C, Yong R, Gibbs B. An evaluation of technologies for the heavy metal remediation of dredged sediments; 2001. 145-163p.
14. Arredondo B, Voltolina D. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal, 2007. 97p.
15. Salazar M, Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales, mediante el uso combinado de digestión anaerobia y microalgas, 2009.
16. Lavole A, y De la Noue J, Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A new approach for Wastewater biological tertiary treatment, 1985. 1437-1442 p.
17. Pérez S. Evaluación de la remoción de contaminantes en lixiviado empleando tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. Tesis para obtener el título de licenciado en ecología. Universidad Científica del Perú, Iquitos - Perú. 2015.
18. Borowitzka, M. Microalgae Biotechnology. University Press. Cambridge, 1988.
19. Bashan Y, Holguin G, and de-Bashan LE. Azospirillum–plant relationships: Physiological, molecular, agricultural, and environmental advances; 2004. 50, 521–577p.
20. Núñez VJ, Voltolina D, Nieves M, Piña P, Medina A, Guerrero M. Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater; 2001. 78, 161-164p.
21. Maroto A. Empresa ARETECH (Advanced Research Technologies). España. 2009.
22. Parra O, González, M, Dellarossa, V. Manual taxonómico del fitoplancton de aguas continentales. V- Chlorophyceae Parte I: Volvocales, Tetrasporales, Chlorococcales y Ulothricales. Universidad de Concepción, 1983. 353 p.
23. Graham L, Wilcox L. Algae London: Prentice Hall International; 2000. 420p.
24. Kaplan D. Water pollution and bioremediation by microalgae; 2005. 439-447p.
25. Cañizares R. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev. Latinoamericana de Microbiología*; 2000. 42:131-143 p.

26. Becker E, Micro-algae as a source of proteins; 2007. 25, 207-210p.
27. Brown M, Mular M, Miller I, Farmer C, Trenerry C. The vitamin content of microalgae used in aquaculture; 1999. 11, 247–255p.
28. Cobos M, Castro J, y Cerdeira L. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del río Itaya, Loreto, Perú; 2014. 2(13).
29. Jayanta T, Mohan K, & Bhabesh G. Growth, Total Lipid content and Fatty Acid Profile of a Native Strain of the Freshwater Oleaginous Microalgae *Ankistrodesmus falcatus* (Ralf) grown under Salt Stress Condition; 2012.
30. Yang X, Liu P, Hao Z, Shi J, & Zhang S. Characterization and Identification of Freshwater Microalgal strain Toward Biofuel Production; 2012. 1(7), 686-695p.
31. Del Campo J, García M, & Guerrero, M. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*; 2007. 74(6), 1163-1174 <https://doi.org/10.1007/s00253-007-0844-9>
32. Flores D. Remoción de contaminantes biológicos en microalgas sometidas a concentraciones de lixiviado. [Título Licenciado en Ecología]. [Iquitos -Perú] Universidad Científica del Perú. 2017.
33. León R, González D, Galván A, Fernández E. Transgenic microalgae as green cell-factories; 2004. 22: 45–52p.
34. Gronlund E. Microalgae at wastewater treatment in cold climate. *Europeiska unionen*; 2002.
35. Ramos A, Salazar M, Ríos A, Díaz A. Utilización de microalgas en el tratamiento biológico de efluentes secundarios. Presentado en En: *Memorias del VII Congreso Nacional «La Ingeniería Ambiental y la Salud»*; Oaxaca.1990.
36. Alvarez, M, y Gallardo, T. *Complutensis*, 1989.15: 9-60.
37. Arenas M, de-Bashan L, Hernandez ,J, Morey T, Bashan Y. Evaluación de la planta *Lemna minor* como biorremediadora de aguas contaminadas con mercurio. 2011.

38. Jaramillo M, Flores E. Fitorremediación mediante el uso de dos especies vegetales *Lemna minor* (Lenteja de agua), y *Eichornia crassipes* (Jacinto de agua) en aguas residuales producto de la actividad minera. Universidad Politécnica Salesiana-Cuenca. 2012.
39. Orozco C. Contaminación ambiental una visión desde la química. 2003.
40. Thomas K, Rios M., and Fitzpatrick, S. 1984. Purification and characterization of acidic fibroblast growth factor from bovine brain; 2003. 81: 357-361p.
41. Shelef, G. and Soeder CJ. Algae biomass: production and use. *Rev. Elsevier/North-Holland Biomedical Press*. 1980. 852p.
42. Bicudo C, Menezes M. Géneros de algas de águas continentais do Brasil. Chave para identificação e descrições, II. 2006.
43. Falkowski PG, Raven JA. Aquatic photosynthesis. 1997. 375p.
44. Roldán, G. Fundamentos de Limnología Neotropical (Vol. 1). Ed. Universidad de Antioquia (Antioquía). Medellín, Colombia. 1992.
45. Spolaore P, Joannis C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae; 2006. 101: 87–96p.
46. Prospero, CH. Cyanobacteria in human affairs; 2000. 6: 6-25p.
47. Mani U, Sadliwala, A, Iyer U, Parikh P. The effect of Spirulina supplementation on blood hemoglobin levels of anemic adult girls; 2000. 6 (37), 642 – 644p.
48. Gonzalez S, Larrosa M, García MT, Tomaás FA., & Espín, JC. Nutraceuticals for older people: facts, fictions and gaps in knowledge. *Maturitas*; 2013. 75 (4), 313-334p. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas>.
49. Conde J, Moro L, Travieso L, Sánchez E, Leiva A, Dupeirón R. Biogas purification process using intensive microalgae cultures; 1993. 3 (15): 317-320p.
50. Cañizares R, Domínguez A, Rivas L, Travieso L, Benítez F. Free and immobilized cultures of *Spirulina maxima* for swine waste treatment; 1993. 15: 320 – 326 p.
51. Banerjee A, Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. *Botryococcus braunii*: a renewable source of hydrocarbons and other chemicals; 2003. 3(22): 245 – 279 p.

52. Cañavate J, Lubián L. Obtención de biomasa concentrada de microalgas marinas para su utilización como alimento larvario de especies marinas. Editado por Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla. 2001. 49 p.
53. Guschinai A. and Harwood J. Algal lipids and effect of the environment on their biochemistry'; 2009. 1–24 p.
54. Richmond A, Hu Q. Handbook of microalgae culture: Applied Phycology and Biotechnology; 2013. 719 p.
55. Charles M. Remoción de los compuestos nitrogenados en un Sistema piloto de estabilización. Universidad de Zulia; 1983.
56. Oeltzschner H, Mut D. Guidelines for an appropriate management of sanitary landfill sites, Segunda edición: Munich, Alemania, Deutsche Gessellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ); 1996. 79 p.
57. Espinosa Lloréns, Ma. del C., López, M., Pellón, A., Robert, M., Díaz, S., González, A., Rodríguez, N. y Fernández, A. Análisis del comportamiento de los lixiviados generados en un vertedero de residuos sólidos municipales de la ciudad de la Habana. Rev. Int. Contam. Ambient vol.26 no.4 México nov.2010.
58. Foster, Stephen. Políticas de protección de las aguas subterráneas en Europa. Jornadas sobre la contaminación de las aguas subterráneas: un problema pendiente. Valencia 1998.
59. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura "El concepto del desarrollo sostenible". 2002.
60. Tam N.F, Wong y.S. Repeated use of two *Chlorella* species, *C. Vulgaris* and for cyclic nickel bioadsorption, 2001. 85-92 p.
61. Yu X, Zhao P, He C, Li C, Zhou J, Huang Z. Isolation of a novel strain of *Monoraphidium* sp. and characterization of its potential application as biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.* 2012; 121: 256-2 p.
62. Ichihara, K, & Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*; 2010 51(3) : 635-640. <https://doi.org/10.1194/jlr.D001065>
63. Lowry O H, Rosebrught, N H, Lewis, F A, and Randa, R I . Protein measurement with the folin phenol reagent; 1951. 193: 256-257 p.
64. Dreywood R. Qualitative test for carbohydrate material; 1946. (18), 499.

65. Vela, L., Aguilar, C., Gonzáles, M. y López, R. Estudio de la Flora Ficológica de Bellavista- Río Nanay, Loreto-2006. II Congreso Peruano de Ficología, Arequipa-Perú.
66. López, R., Vela, L. Densidad y Diversidad del Fitoplancton de la cocha Llanchara en los períodos hidrológicos de creciente y media vaciante, Loreto Perú. Revista Conocimiento Amazónico. 2011. 2 (2): 157-166.
67. Urcia M, y Díaz L. Aislamiento e Identificación de Microalgas Oleaginosas en las Cuencas de los Ríos Amazonas, Itaya y Nanay, Loreto. Tesis para optar el título profesional de Ecóloga. 2013. Universidad Científica del Perú.
68. Olguín E, Galicia S, Mercado G, Pérez T. Annual productivity of *Spirulina* (*Arthrospira*) and nutrient removal in a pig wastewater recycling process under tropical conditions. Journal of Applied Phycology; 2003. 15: 249-257.
69. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. (8ª ed.). Madrid: Prentice Hall; 1999
70. Cobos M, Castro J, Vargas G. Protocolos para el Aislamiento, Caracterización Bioquímica y Molecular de Microalgas Oleaginosas. Universidad Científica del Perú. Vicerrectorado de Investigación e Innovación; 2016. Iquitos, Perú.
71. Elumalai S. Sakthivel R, Santhosh B, Murugan PA. Isolation, Identification, Morphological Studies and Lipid Granules Staining (Nile red) of Different Micro-Algae for Biodiesel Production from Fresh Water and Saline Water. *Journal of Experimental Sciences*. 2011. 2(7):26-29
72. Hernández A y Labbè J. Microalgae, culture and benefits. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 2014 vol. 49, 2:157-173p
73. Li, H.; Liu, Z., Y Zhang et al., "Conversión efficiency and oil quality of low-lipid high-protein and high-lipid low -protein microalgae via hydrothermal liquefaction", *Bioresource Technology*; 2014 vol. 154:322-329p
74. Montero-Sánchez, Y., Gallo, A., Gómez, L., Álvarez, I., Sabina, L., Támbara, Y., Álvarez, A., Alfonso, M., y Ramírez, L., Productividad de Lípidos y Composición de Ácidos Grasos de Cinco Especies de Microalgas. *Investigación y Saberes*; 2012 vol. 1 N^o.(2) : 37-43 p.

75. Li Y, Y-F Chen, M Min, W Zhou, B Martínez, J Zhu & R Ruan. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. *Rev. Bioresource Technology*; 2011. 102: 5138-5144.
76. Chen C.Y., et al. Strategies to enhance cell growth and achieve high-level oil production of a *Chlorella vulgaris* isolate. *Biotechnol Prog.* 2010 26(3): p.679-86.
77. Jayanta T., Mohan k. & Bhabesh G. Growth, Total Lipid content and Fatty Acid Profile of a Native Strain of the Freshwater Oleaginous Microalgae *Ankistrodesmus falcatus* (Ralf) grown under Salt Stress Condition. 2012.
78. Yang X., Liu P. Hao, Z. Shi, J. & Zhang S. Characterization and Identification of Freshwater Microalgal strain Toward Biofuel Production; 2012. (7), 686-695.
79. Pellón A, López M, Espinoza M, González O. Propuesta para tratamiento de lixiviados en un vertedero de residuos sólidos urbanos; 2015. vol. 36 (2) .
80. Benitez T, Hernao D, Alvear M, Castillo, C. Caracterización y perfil lipídico de aceites de microalgas, Facultad de Ingeniería; 2015. vol. 24, (39) 43-54 p.
81. Rodolphi I, Zitelli C, Bassi N, Padovani G, Biondi N, Tedici G, M.R. Microalgae for oil: Strain selection, inducción of lipid sybthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor; *Rev Biotechnol Bioeng.* 2009; 102 (1): 100-12 p.
82. Khoo HH, Sharratt PN, Das P, Balasubramanian RK, Narahariseti PK, Shaik S. Life cycle energy and CO₂ analysis of microalgae-to-biodiesel: preliminary results and comparisons. *Rev Bioresour Technol*; 2011. 102(10):5800-7 p.
83. Garibay, A., et al., Biodiesel a partir de Microalgas. *Rev BioTecnología*, 2009.13 (3)
84. Hu H, GK. Response of growth and fatty acid compositions of *Nannochloropsis* sp. to environmental factors under elevated CO₂ concentration; 2006. 28 (13):987–92 p

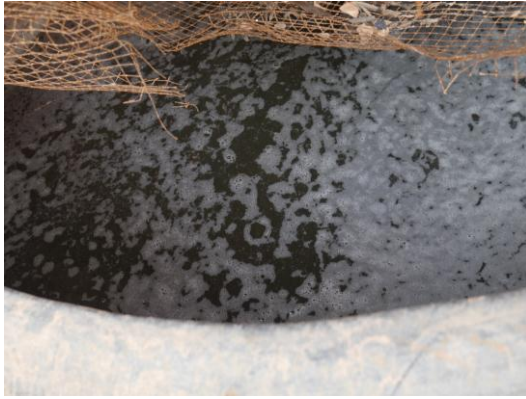
85. Teixeira C. M, & Morales E. "Microalga como materia-prima para a producao de biodiesel", Annals of I Congress of the Brazilian Network of Biodiesel Technology, Brasilia, 2006.
86. Pal D K-GI, Cohen Z BS. The effect of light, salinity, and nitrogen availability on lipid production by *Nannochloropsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2001. 90(4):1429-41 p.
87. Khozin-Goldberg I, Bigogno C, Shrestha P, Cohen Z. Nitrogen starvation induces the accumulation of arachidonic acid in the freshwater green alga *Parietochloris incisa* (Trebuxiophyceae); 2002, 38(5):991–4 p.
88. Moellering ER BC. Interference silencing of a major lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot*; 2010, 9(1):97–106 p.
89. Hu Q, Sommerfeld, M, Jarvis E, Ghirardi M, Posewitz M, Seibert D. Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances; 2008, 54(4):621–39 p.
90. Hammouda O, Gaber A, N Abdel-R. Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 1995. 31: 205-210 p.
91. Tam N, Wong S. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Rev Bioresource Technology*; 1996. 57: 45-50
92. Brennan L, Owende. Biofuels from microalgae: A review of technologies for production, processing and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy*; 2010. 14: 557-577 p.
93. Abdel R , Al-H, Ibraheem M. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*; 2012.19: 257-275 p.
94. Avila J, Laos A. & Verano R. Remoción de nitratos y fosfatos por cepas nativas de *Chlorella* sp (Chlorellaceae) y *Chlamydomonas* sp. (Chlamydomonadaceae) libres e inmovilizadas en aguas residuales municipales. 2018. 25 (2)., Lima, Perú.
95. Ruíz, A. Ammonia removal and biomass characteristic of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. *Fresenius Environ. Bull*; 2008. 17 (9): 1236-1241.

96. Wang I, Y Li, Chen P, Min, Y Chen J, Zhu Ruan R. Anaerobic digested dairy manure as a nutrient supplement for cultivation of oil-rich green microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*; 2010. 101: 2623-2628.
97. Grobbelaar JU. Algal nutrition: mineral nutrition. In: Richmond A (ed) Handbook of microalgal culture: *Biotechnology and applied phycology*; 2004. 97-115 p.
98. Hernández A, Hernández M, Jiménez D, Venegas J. Producción de lípidos a partir de *Chlorella protothecoides* mantenida con CO₂ proveniente de la fermentación alcohólica. *Revista de Sistemas Experimentales*, Diciembre 2016. 3 (9) 24-28 p.
99. Nurdogan Y, Oswald W J, Enhanced nutrient removal in high rate ponds. *Water Science Technology*; 1995. (31) 31-43p.
100. Voltolina D, Cordero B, Nieves M, Soto L. Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*; 1995. 68: 265-268 p.
101. Wilde E, Benemann JR. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*; 1993. 11: 781-812 p.
102. Kuyacak N, Volesky B. *Tra Boletín* 81: 95-99; 1988.
103. Piotrowska A, Bajguz A, Zambrzycka & Godlewska-Zylkiewicz. Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry*; 2012. 52: 52-65.

ANEXOS

1. Valores Promedios de las Variables Químicas y Metales en los Tratamientos con las microalgas *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp.

| Variables | Lixiviado antes | | Lixiviado después | | <i>Scenedesmus</i> sp. | | <i>Chlorella</i> sp. | |
|-------------|-----------------|--------|-------------------|--------|------------------------|--------|----------------------|--------|
| | X | SD | X | SD | X | SD | X | SD |
| pH | 7.827 | 0.067 | 9.253 | 0.093 | 9.397 | 0.015 | 9.367 | 0.015 |
| Amonio | 375.667 | 1.155 | 61.833 | 1.258 | 72.667 | 2.082 | 114.000 | 14.933 |
| Nitratos | 25.367 | 0.723 | 4.617 | 0.104 | 5.433 | 0.404 | 20.333 | 0.473 |
| Fósforo 1 | 57.833 | 1.258 | 21.067 | 0.702 | 30.867 | 2.346 | 35.567 | 0.666 |
| Alcalinidad | 1744.000 | 6.000 | 1633.333 | 28.868 | 1716.667 | 38.188 | 1683.333 | 76.376 |
| Anh. Carb. | 770.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Cloruros | 694.283 | 1.934 | 585.747 | 23.479 | 633.080 | 18.476 | 794.607 | 4.470 |
| Dureza | 576.667 | 25.166 | 361.667 | 2.887 | 283.333 | 15.275 | 313.333 | 20.817 |
| Mercurio | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Aluminio | 11.915 | 2.458 | 4.137 | 1.184 | 0.134 | 0.003 | 0.161 | 0.024 |
| Arsénico | 0.022 | 0.004 | 0.020 | 0.001 | 0.020 | 0.001 | 0.019 | 0.001 |
| Bario | 0.088 | 0.008 | 0.059 | 0.003 | 0.015 | 0.001 | 0.016 | 0.002 |
| Boro | 0.601 | 0.010 | 0.659 | 0.013 | 0.636 | 0.010 | 0.627 | 0.021 |
| Calcio | 80.050 | 1.519 | 65.363 | 0.829 | 23.880 | 0.790 | 27.600 | 3.412 |
| Cobalto | 0.007 | 0.001 | 0.007 | 0.000 | 0.020 | 0.002 | 0.021 | 0.002 |
| Cromo | 0.096 | 0.003 | 0.090 | 0.012 | 0.084 | 0.002 | 0.085 | 0.003 |
| Cobre | 0.019 | 0.004 | 0.101 | 0.014 | 0.103 | 0.003 | 0.108 | 0.005 |
| Estroncio | 0.226 | 0.005 | 0.198 | 0.027 | 0.134 | 0.002 | 0.129 | 0.009 |
| Estaño | 0.037 | 0.001 | 0.035 | 0.003 | 0.033 | 0.003 | 0.032 | 0.002 |
| Hierro | 18.117 | 2.666 | 10.998 | 3.264 | 3.619 | 0.067 | 3.859 | 0.419 |
| Fósforo 2 | 11.593 | 0.692 | 11.940 | 0.432 | 8.800 | 0.282 | 7.603 | 1.235 |
| Litio | 0.002 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.001 | 0.000 | 0.001 | 0.000 |
| Magnesio | 46.797 | 1.138 | 51.810 | 1.315 | 49.350 | 0.555 | 48.900 | 1.290 |
| Manganeso | 0.423 | 0.010 | 0.279 | 0.036 | 0.037 | 0.006 | 0.030 | 0.013 |
| Molibdeno | 0.007 | 0.001 | 0.007 | 0.000 | 0.008 | 0.001 | 0.008 | 0.000 |
| Níquel | 0.053 | 0.002 | 0.057 | 0.001 | 0.052 | 0.002 | 0.056 | 0.002 |
| Potasio | 1207.667 | 26.502 | 1378.000 | 84.125 | 1429.333 | 8.145 | 1428.333 | 43.981 |
| Plomo | 0.016 | 0.002 | 0.013 | 0.002 | 0.007 | 0.002 | 0.007 | 0.000 |
| Sodio | 379.533 | 9.500 | 391.500 | 25.082 | 406.867 | 0.666 | 408.433 | 14.913 |
| Silicio | 26.553 | 3.242 | 16.983 | 3.685 | 13.407 | 0.792 | 13.500 | 0.340 |
| Titanio | 0.085 | 0.012 | 0.044 | 0.014 | 0.017 | 0.000 | 0.018 | 0.001 |
| Vanadio | 0.053 | 0.005 | 0.040 | 0.008 | 0.034 | 0.001 | 0.035 | 0.001 |
| Zinc | 0.193 | 0.013 | 0.209 | 0.019 | 0.093 | 0.015 | 0.107 | 0.004 |



2. Lixiviado



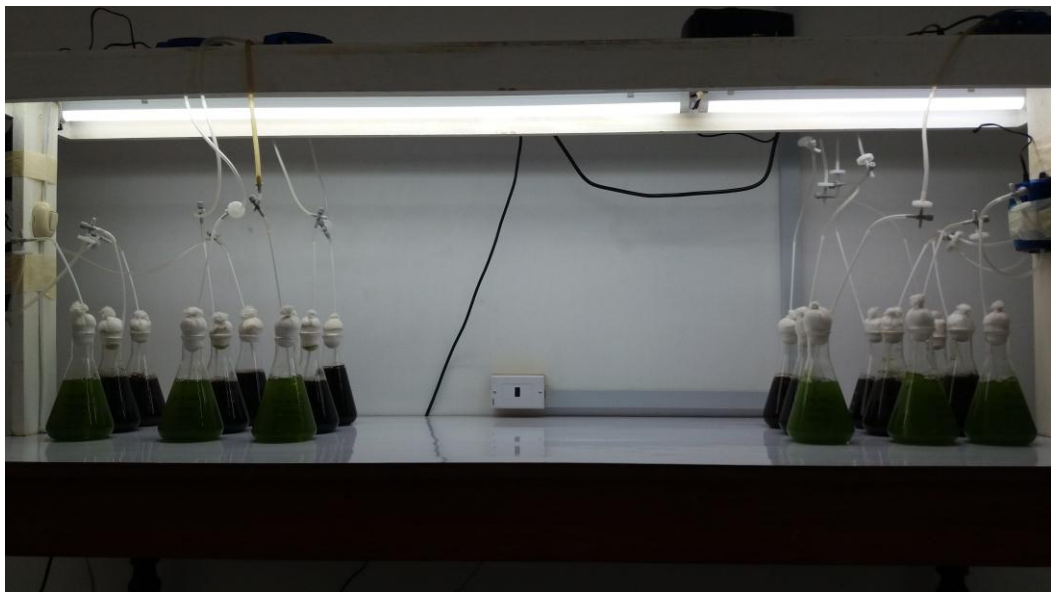
3. Pozo de Almacenamiento
-Lixiviado



4. Aislamiento y cultivo de las microalgas amazónicas *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp.

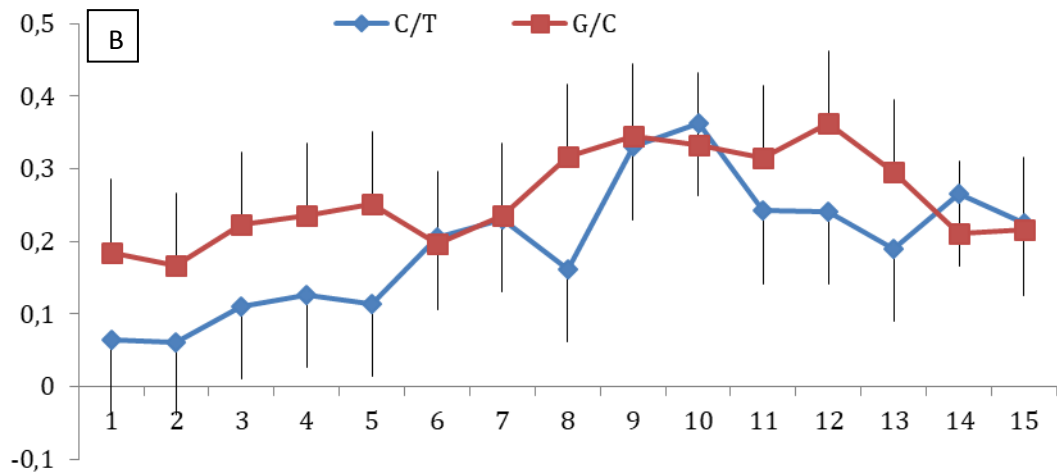
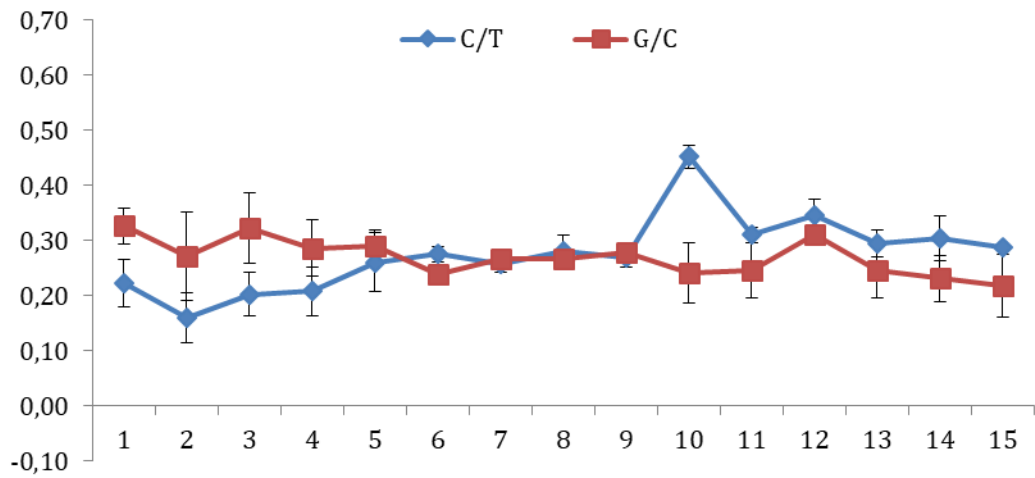


5. Cultivo Intermedio



6. Bioensayo-Remoción de componentes inorgánicos

7. Crecimiento de las microalgas *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en lixiviado



Perfil de crecimiento de las microalgas evaluadas. A: *Chlorella* sp, B: *Scenedesmus* sp., C/T= con tratamiento, G/C=grupo control.



8. Cosecha de la biomasa