

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL



INFORME DE TESIS

**“EVALUACION DE LA REMOCIÓN DE ARSÉNICO UTILIZANDO LA
MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* EN AGUAS
SUPERFICIALES DEL RÍO UCHUSUMA, TACNA - PERÚ”**

PARA OPTAR:

TITULO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTADO POR:

Bach. Shirley Almendra Bartra Reyna

TACNA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

Tesis:

**“EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE ARSÉNICO UTILIZANDO LA
MICROALGA *CHLORELLA VULGARIS* EN AGUAS SUPERFICIALES DEL RÍO
UCHUSUMA, TACNA - PERÚ”**

Tesis sustentada y aprobada el 09 de diciembre del 2019; estando el jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE:



Dr. Richard Sabino Lazo Ramos

SECRETARIO:



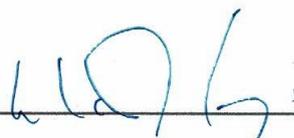
Mtra. Milagros Herrera Rejas

VOCAL:



Biol. Claudia Vanessa Clavijo Koc

ASESOR:



Mtro. César Huanacuni Lupaca

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo Shirley Almendra Bartra Reyna, en calidad de bachiller de la Escuela de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna, identificado(a) con DNI 70143662

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor (a) de la tesis titulada:

Evaluación de la remoción de arsénico utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* en aguas superficiales del río Uchusuma, Tacna – Perú, la misma que presento para optar el:

Título Profesional de Ingeniero Ambiental

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a LA UNIVERSIDAD cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada.

En consecuencia, me hago responsable frente a LA UNIVERSIDAD y a terceros, de cualquier daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello en favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis, libro y/o invento.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.

Tacna, 09 de diciembre del 2019



Shirley Almendra Bartra Reyna

70143662

DEDICATORIA

Con todo mi amor y cariño a mis abuelos,
principalmente a mi madre y a mi hermana por
su apoyo incondicional.

A mis mejores amigos que siempre creyeron en
mí.

AGRADECIMIENTO

Agradecer en primer lugar a Dios, a mi familia por permitirme llegar hasta este punto de mi vida y tener la oportunidad de lograr mis metas e ideales.

A la Universidad Privada de Tacna (UPT), por darme la oportunidad de estudiar esta carrera y poder conocer a docentes que con su experiencia pudieron brindarnos sus conocimientos.

A la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental (EPIAM), por facilitarme los laboratorios para el desarrollo y análisis de mi proyecto tesis.

Agradezco a mi asesor Blgo. Mblgo. César Huanacuni Lupaca que ante las dificultades presentes durante el desarrollo de este proyecto se pudo realizar las correcciones correspondientes a tiempo.

CONTENIDO

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO	IV
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
INTRODUCCION.....	1
CAPÍTULO I:	2
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	2
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	3
1.4. OBJETIVOS.....	4
1.4.1. <i>Objetivo general</i>	4
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	4
1.5. HIPÓTESIS	4
1.5.1. <i>Hipótesis general</i>	4
1.5.2. <i>Hipótesis específica</i>	4
CAPÍTULO II:	5
MARCO TEÓRICO	5
2.1. ANTECEDENTES.....	5
2.2. BASES TEÓRICAS.....	6
2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS	10
CAPÍTULO III	12
MARCO METODOLÓGICO	12
3.1. TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	12
3.2. POBLACIÓN Y/O MUESTRA DE ESTUDIO	12
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	12

3.4. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	12
3.5. PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	20
CAPÍTULO IV.....	21
RESULTADOS.....	21
CAPÍTULO V.....	28
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	29
RECOMENDACIONES.....	30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	31
ANEXOS.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación Taxonómica de Chlorella	9
Tabla 2: Métodos de análisis de Chlorella y Arsénico.....	17
Tabla 3: Disposición de la composición experimental en un diseño en bloque completamente aleatorizado.....	18
Tabla 4: Promedio inicial de la densidad de la microalga y el efluente del río Uchusuma	21
Tabla 5: Resumen estadístico del resultado obtenido de la remoción de arsénico.	25
Tabla 6: ANOVA.....	26
Tabla 7: Pruebas de Múltiple Rangos	26
Tabla 8: Diferencias entre los tratamientos.....	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva de crecimiento de las microalgas.	10
Figura 2: Numeración de matraces para cultivos de microalgas.	15
Figura 3: Cultivo de microalga al momento de siembra	15
Figura 4: Detalle de la Cámara de Neubauer, para la realización del conteo dónde utilizó el cuadro del centro para el conteo celular.	16
Figura 5: Conteo de la cámara de Neubauer, recuadro del centro.....	18
Figura 6: Densidad de la muestra 1.0	21
Figura 7: Densidad de la muestra A – 20%	22
Figura 8: Densidad de la muestra B – 40%	22
Figura 9: Densidad de la muestra C – 60%	23
Figura 10: Densidad de la muestra D – 80%	23
Figura 11: Densidad de la muestra E – 100%.....	24

RESUMEN

El trabajo de investigación evaluó la remoción de arsénico utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* en aguas superficiales del río Uchusuma en Tacna, utilizando una serie de tratamientos en matraces de 500 ml con cultivos de 5mL de microalga y con concentraciones de arsénico de 20, 40, 60, 80 y 100% respectivamente, los mismos que complementaron la composición con el nutriente (Bayfoland). El diseño fue *Experimental* y se tuvo como un valor inicial de 0,119mg/L de As Total el cual se instaló en el Laboratorio de Calidad de aguas de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental (EPIAM).

La evaluación de la densidad celular y/o crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* se realizó mediante la cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y para medir el nivel del arsénico se utilizó el test kit de HACH.

En los resultados, se pudo observar que la microalga *Chlorella vulgaris* presentó una tolerancia, alta tasa, rapidez de crecimiento y absorción del metaloide a la exposición continua y en distintas concentraciones de arsénico, además que el crecimiento celular se triplicó en el día 7 y 8 favorecido por los nutrientes añadidos y por los componentes inorgánicos presentes en el agua; Asimismo, no se observó diferencias estadística significativas entre los 05 (cinco) tratamientos teniendo un porcentaje de remoción superior al 60%. Se recomienda profundizar estudios de aplicación de microalgas para la remoción de metales y metaloides.

Palabras claves: *densidad celular, nutriente, remoción*

ABSTRACT

The research work evaluated the removal of arsenic using the microalgae *Chlorella vulgaris* in surface waters of the river Uchusuma in Tacna, using a series of treatments in 500 ml flasks with 5mL microalgae cultures and arsenic concentrations of 20, 40, 60, 80 and 100% respectively, which supplemented the composition with the nutrient (Bayfoland). Likewise, the design was Experimental and had as an initial value of 0.119mg/L of Total As which was installed in the water quality Laboratory of the Professional School of Environmental Engineering (EPIAM).

The evaluation of the cell density and/or growth of the microalgae *Chlorella Vulgaris* was carried out using the 0.1 mm deep Neubauer chamber and the HACH test kit was used to measure the arsenic level.

In the results, it was observed that the *Chlorella vulgaris* microalgae presented a tolerance, high rate, rapidity of growth and absorption of the metalloid to continuous exposure and in different concentrations of arsenic, in addition to cell growth tripled on day 7 and 8 favored by the added nutrients and by the inorganic components present in the water; Likewise, no statistically significant differences were observed between the 05 (five) treatments having a removal percentage greater than 60%. It is recommended to deepen studies of application of microalgae for the removal of metals and metalloids.

Key Words:., *cell densit, nutrient, removal.*

INTRODUCCION

Las fuentes de agua que mayormente tenemos en el Perú provienen de las montañas y glaciales, que en algunos casos en su trayecto a la costa es contaminada por la explotación minera o impactada por otras actividades de origen humano, siendo ello una preocupación por la presencia de los distintos componentes biológicos y químicos que superan los estándares de calidad ambiental del agua.

La afectación de los ríos de la región de Tacna es una de las problemáticas de hoy en día, causada por la presencia de fuentes hidrotermales que han aportado elementos como el arsénico, boro, aluminio, etc. en las aguas superficiales destinadas para uso poblacional.

El arsénico de origen natural obliga a evaluar y desarrollar procedimientos novedosos para conseguir la eliminación de sustancias tóxicas para el cuerpo humano; en la actualidad a las microalgas se les considera con un alto potencial y una opción de biorremediación para el tratamiento de agua, ya que presenta una alta tolerancia a la exposición de metales tóxicos y metaloides, además que los nutrientes inorgánicos presentes en el agua favorecen al crecimiento funcionando como un medio de cultivo.

En tal sentido, el objetivo del estudio es evaluar la capacidad de la microalga *Chlorella vulgaris* en su adaptación y por ende en la purificación y tratamiento del agua del río Uchusuma, considerando la alta tasa, rapidez de crecimiento, captación y absorción del metaloide por lo que es una posibilidad de uso alternativo económica y amigable para el ambiente.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción del problema

El arsénico que se encuentra en el río Uchusuma representa un problema para los ecosistemas así como a la salud humana y en la realización de la toma de muestra que llevó a cabo el Comité de Monitoreo Ambiental Participativo (CMAP), obtuvo como resultado, que se superó el valor contemplado por la norma ambiental (0,119 mg/L). (Comité de Monitoreo Ambiental, 2013)

En el 2018, el Ministerio de Agricultura Riego, junto con la Autoridad Nacional del Agua expusieron resultados de fuentes contaminantes, dónde el monitoreo de calidad de agua superficial que se halló en la cuenca Uchusuma, indicó que los resultados de arsénico excedían los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) agua de la categoría 1 A2, el cual se debe a que Tacna es una región con suelos volcánicos que genera una afectación natural en el agua. (Autoridad Nacional del Agua, 2018).

En la actualidad, existen algunos métodos para la purificación del agua, y con las tecnologías limpias y/o biotecnologías que tengan una facilidad de acceso e implementación, como también aprovechar las fuentes naturales y procesos biológicos como el uso de microorganismos, que no sea de un elevado costo, el uso de la microalga es muy beneficiaria ya que se reproducen muy rápido y con un adecuado ambiente pueden producir una alta cantidad de biomasa en pocas horas muy aparte de ello presenta un efecto mínimo en lo que se refiere a impactos ambientales para la remoción de arsénico.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Formulación del problema general

- ¿Cuál será la capacidad de remoción de arsénico en aguas superficiales del río Uchusuma en Tacna utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*?

1.2.2. Formulación del problema específicos

- ¿Cuál será el porcentaje de remoción del metaloide arsénico total en muestras experimentales en aguas superficiales del río Uchusuma en Tacna post tratamiento?
- ¿Cuál será la combinación de composición volumétrica más adecuada para la remoción eficiente de arsénico en aguas superficiales del río Uchusuma?

1.3. Justificación e importancia de la Investigación

1.3.1. Justificación Económica

El aprovechamiento de la microalga es una alternativa económica para la remoción de arsénico ya que son microorganismos que se caracterizan por tener un rápido crecimiento que se pueden encontrar naturalmente en los cuerpos de agua dulce, lagos, mares y ríos; por esa razón se considera una opción de biorremediación para el tratamiento de agua, considerando que no requiere de un costo elevado de inversión para su proceso.

1.3.2. Justificación Social

El crecimiento de la población de Tacna en los últimos años se ha incrementado y sólo el 40% de la población recibe este servicio de 18 horas de continuidad; además que la calidad desde sus fuentes de captación está afectada naturalmente por la presencia de arsénico y éstos al ser consumidos sin tratamiento por la población, causa un impacto social.

1.3.3. Justificación Ambiental

La microalga se puede considerar como una fuente de materia prima con alta tolerancia a la exposición de metales como el arsénico, y esta propiedad nos permitiría aprovecharlo ambientalmente para el mejoramiento de la calidad del agua.

1.3.4. Justificación Científica

El presente proyecto de investigación, busca emplear tecnologías que utilicen métodos biológicos y organismos vivos, utilizando un sistema alternativo viable que permita la remoción del arsénico (microalga), teniendo en cuenta los límites establecidos por la norma peruana, y de esta manera beneficiar también a las industrias como a la población.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

- Evaluar la remoción de arsénico utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* en aguas superficiales del río Uchusuma en Tacna.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de remoción del metaloide arsénico en aguas superficiales del río Uchusuma mediante la bioabsorción de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Establecer la combinación de componentes volumétricos más adecuada para la remoción de arsénico en aguas superficiales del río Uchusuma.

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis general

- La microalga *Chlorella vulgaris* posee una elevada capacidad de remoción de arsénico en las aguas superficiales del río Uchusuma.

1.5.2. Hipótesis específica

- La microalga *Chlorella vulgaris* presenta capacidad de resistencia de crecimiento por presencia del arsénico en aguas superficiales del río Uchusuma.
- La combinación de componentes volumétricos más adecuada de remoción en aguas superficiales del río Uchusuma es de un 80%.

CAPÍTULO II:

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antecedentes internacionales

En la tesis realizada por López et al (2017), evaluaron la utilización de *Chlorella sp.* En aguas residuales de un sistema de tratamiento de lagunas de oxidación, teniendo como parámetros de estimación la remoción de Amonio, Ortofosfato y DQO, realizaron cuatro (4) tratamientos con diluciones de 100%, 75%, 50% y 25%, en 3 tipos de lagunas de oxidación (lagunas anaerobias, facultativas y de maduración) en un período de tiempo de 23 días, su capacidad adsorbente del amonio fue en un 86%, la de DQO en un 69%, y en Ortofosfato en 50%, concluyeron que la *Chlorella sp.* es una buena alternativa para éste tipo de tratamientos de efluentes.

En el estudio realizado por Cartagena & Malo (2017), efectuaron un proyecto en la que evaluaron a la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de aguas residuales tratadas por la PTAR de “El Salitre”, llevaron a cabo la realización de 2 pre- experimentaciones, la primera consistía, en que condiciones de volumen de 33% y 50% la microalga se adaptaba, en la segunda experimentación evaluaron el crecimiento de la microalga en un nuevo sustrato, dónde disminuyeron el porcentaje de volumen de microalga. Posteriormente ejecutaron el biotratamiento que consistía en 7 muestras con distintos porcentajes de volumen de microalga (0, 10%, 10%, 20%, 20%, 30% y 30%) con agua residual tratada (900ml, 800ml, 700ml, 900ml, 800ml, 700ml y 1000ml), siendo el porcentaje eficiente el de 10% que arrojó porcentajes de DQO y SST de 81,80% y 89,91% respectivamente.

2.1.2. Antecedentes Nacionales

En la tesis presentada por Galvan Jimenez & Rozas LaTorre (2013), estimaron la eficiencia de la remoción de arsénico de efluentes industriales mediante la bioabsorción de la micro alga *Chlorella vulgaris*, sometiendo un flujo por gravedad a velocidades de flujo de 20, 40 y 80 mL/min, los resultados que lograron fueron de un 60% aproximadamente con un decrecimiento de biomasa evidenciada por la reducción en la densidad de la clorofila A, obtuvieron análisis de toxicidad para efectuar una aceptabilidad presentaron 100% de sobrevivencia demostrando la tolerancia que estuvo expuesta la microalga *Chlorella vulgaris* al Arsénico.

Según la investigación de Mariano A. et al (2017), evaluaron el crecimiento de la microalga *Chlorella peruviana* a cinco (5) niveles de salinidad en un porcentaje de 38%, 44%, 59%, 88% y 176%, de la laguna salina Mellisera en Chilca, realizaron cinco (5) tratamientos con tres (3) repeticiones, en matraces de 250ml, 500ml y 1000ml respectivamente, estimaron los resultados de acuerdo a su densidad, biomasa seca y clorofila, demostraron que el primer tratamiento presentó niveles adecuados de salinidad, mientras que en los demás tratamientos la productividad de *Chlorella peruviana* presentó una tendencia decreciente.

2.1.3. Antecedentes Locales

No se registran estudios relacionados directamente con el tema de investigación.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Biorremediación de metales pesados

Mediante numerosas pruebas de laboratorio se ha podido demostrar la capacidad que tienen los microorganismos en la biodegradación y biosorción, que las condiciones físicas y químicas son muy importantes, ya que de éste dependerá su éxito, este método se puede incorporar con otras tecnologías beneficiando al tratamiento de aguas residuales y/o residuos. De este modo la Biorremediación es aplicable para los diferentes medios de contaminados por la actividad humana. (Rodríguez & Sánchez , 2003)

2.2.2. Arsénico

Es un elemento disperso en la corteza terrestre y se caracteriza químicamente por sus propiedades, tanto de metal como de no metal, pero continuamente se suele denominar como un metaloide; se puede encontrar en cuerpos de agua y el consumo o contacto prolongado de este elemento puede causar cáncer y lesiones cutáneas ante una exposición prolongada y a altas concentraciones.

La presencia del arsénico se muestra en el agua potable, superando los límites establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En el ambiente este elemento se encuentra compuesto con otros elementos químicos como oxígeno, cloro y azufre, que resulta ser una amenaza para la salud pública. (Enriquez, 2015)

2.2.3. Microalgas como biorremediador

La biorremediación con microorganismos donde se encuentra una microalga ha sido reconocida como un tratamiento eficaz para la remoción de nutrientes, como también para la eliminación de sustancias tóxicas, ya que las microalgas poseen la capacidad de acumular concentraciones de compuestos tóxicos que no alteran su actividad biológica y logran adaptarse fácilmente, que es un factor determinante para la remoción de compuestos químicos dañinos. (Mehrabadi et al, 2014)

2.2.4. Bioacumulación

Este término tienen relación en la captación de metales, por que almacenan o tienen un aumento en la concentración de sustancias tóxicas en seres vivos, a través de mecanismos como la adsorción o un intercambio iónico, la bioacumulación se aplica para digerir los componentes inorgánicos y cuando no necesita ésta energía se comprende al método conocido como la bioabsorción, los microorganismos son selectivos con algunos contaminantes inorgánicos y en algunos casos ésta selectividad puede ser mayor por los componentes químicos sintéticos (Angelova et. all , 2004)

2.2.5. Bioabsorción

Su concepto describe a la captación por medio de una biomasa viva o muerta, por medio de procesos químicos y físicos, como la adsorción y el intercambio iónico, se involucra una fase sólida y una fase líquida, es un proceso biotecnológico de recuperación y descontaminación de un medio acuoso contaminado con metales pesados, los microorganismos que actúan como biosorbentes son puestos en contacto con el medio acuoso contaminado y una vez que esta biomasa ha removido los iones metálicos del medio acuoso, se tiene la opción de recuperar la biomasa viva e introducirla en un nuevo ciclo de biorrecuperación. (Mejía, 2006)

2.2.6. Capacidad de las algas para remoción de metales pesados

El problema principal es que industrias grandes generan gran cantidad de vertimientos y con ello trae la contaminación al agua con metales pesados, mientras fue avanzando el tiempo se decidieron por utilizar microorganismos y organismos resistentes ante éstos metales, los cuáles fueron destacados por su resistencia, sobre todo en aguas residuales, las algas y microalgas tienen la capacidad de crecer en medios contaminados y su adaptabilidad a remover metales es muy eficiente. (Chong et al, 2000)

2.2.7. Parámetros de crecimiento de las microalgas

Al ser microorganismos vivos, tiene gran influencia las condiciones físicas en el crecimiento de las microalgas. Cada especie presenta un intervalo particular de pH, nutrientes dióxido de carbono, salinidad, intensidad de luz, temperatura y oxígeno para la producción de un máximo crecimiento. (Hernández-Pérez & Labbé, 2014)

- **Luz:** La intensidad de la luz es un factor importante a considerar en un cultivo ya que las microalgas toma la energía lumínica y la transforma en metabólica por medio de la fotosíntesis, puede ser recibida de forma natural en periodos de día, noche o artificial de forma constante (24 horas). (Richmond A. , 2004)
- **Aireación:** Al cepario o cultivo se le proporciona oxígeno y también para homogenizar la distribución entre las células y nutrientes, evitando que se sedimenten y que todas las células accedan a recibir la luz durante su crecimiento (Valdivia et al, 2012).
- **Temperatura:** La temperatura varía según el hábitat y su especie, pero en la gran mayoría de especies soportan temperaturas de 18 a 27°C. (Gualtieri & Barsanti, 2014).
- **Agitación:** Ésta acción es necesaria ya que evita la sedimentación y su adherencia en las paredes del matraz, homogeniza la luz, la temperatura, la aireación, el pH, etc entre las microalgas. (Tantte, 2018).

2.2.8. Clasificación de las microalgas

Aunque presente simplicidad y amplitud en su distribución, las algas habitan dónde se hayan condiciones favorables para su desarrollo, estos factores pueden ser: la temperatura, el oxígeno, la radiación luminosa y concentración de nutrientes (Gomez, 2007).

Según Parra & Bicudo (1996), la clasificación taxonómica la *Chlorophyta* tiene 15 órdenes y se dividen según sus características morfológicas para las formas de las colonias y los unicelulares.

Tabla 1:

Clasificación Taxonómica de Chlorella

División	Chlorophyta	Chlorophyta	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae	Chlorophyceae	Chlorophyceae
Orden	Chlorococcales	Chlorococcales	Volvocales
Familia	Oocystaceae	Oocystaceae	Chlamydomonadaceae
Genero	<i>Chlorella</i>	<i>Monoraphidium</i>	<i>Chlamydomonas</i>

Fuente: Parra & Bicudo, 1996

2.2.9. Curva de crecimiento poblacional de microalgas

Según Richmond A. (2003) menciona el desarrollo de las microalgas en 7 fases de crecimiento que se mencionarán a continuación:

- a) *Fase de adaptación*: Fase inicial de la tasa de crecimiento de la microalga, donde asimila los nutrientes y el medio.
- b) *Fase de crecimiento acelerado*: En esta fase crecen significativamente o exponencialmente ya que suelen multiplicarse.
- c) *Fase de crecimiento lineal*: En esta fase los nutrientes suelen ser limitados ya que al multiplicarse la luz también suele ser limitada.
- d) *Fase estacionaria*: El número de las células se mantienen debido a las condiciones del cultivo, la natalidad y la mortalidad son iguales.
- e) *Fase de muerte*: Las células y/o densidad empiezan a disminuir.

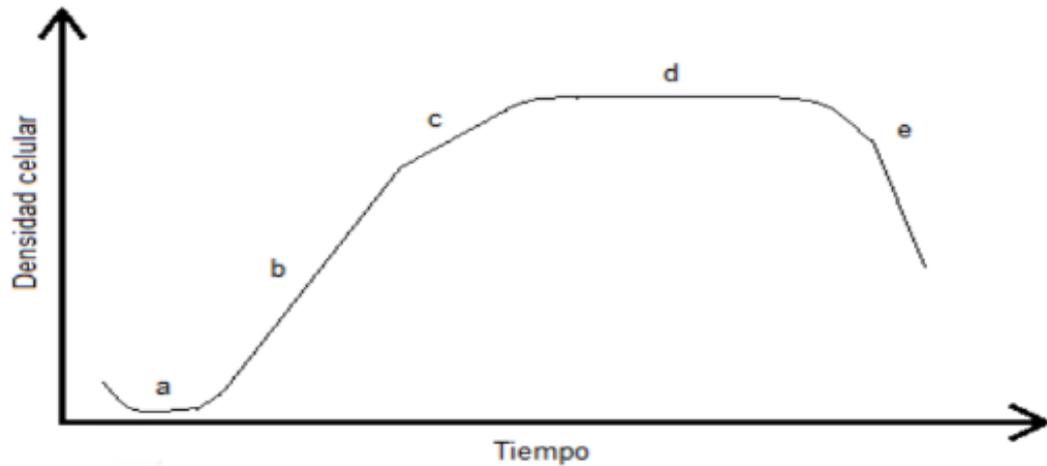


Figura 1: Curva de crecimiento de las microalgas.

Fuente: Voltolina & Arredondo Vega, 2007

2.3. Definición de términos

- **Absorción:** Las plantas poseen una capacidad de separación de uno o varios compuestos de una mezcla gaseosa mediante una disolución seleccionada en un líquido (Mengel & Kirkby, 2000)
- **Acuicultura:** Es el conjunto de conocimientos y/o técnicas que comprende en la cría de especies marinas, desarrollando cultivos de laboratorio (IMARPE, 2013)
- **Bioabsorción:** Es un término que vincula a la absorción que realiza un organismo o microorganismo, en su proceso separa dos componentes, dónde absorbe un compuesto tóxico eliminando de manera eficaz (Mengel & Kirkby, 2000)
- **Biorremediación:** Es una biotecnología que emplea los microorganismos inoculados para el tratamiento de residuos o áreas contaminadas, con éstos microorganismos se puede llevar un tratamiento adecuado, eficaz y controlado (Garzón et al, 2017)

- **Biolixiviación:** Sistema biotecnológico mediante el cual la utilización de microorganismos, que consiguen transformar un compuesto metálico insoluble en soluble (Johnson, 2014)
- **Microalga:** Las microalgas son microorganismos unicelulares que tienen la facultad de realizar fotosíntesis y capaces de generar biomasa orgánica a partir de CO₂ y luz, la utilización del agua les proporciona electrones, oxidándola a O₂; el tamaño de las microalgas puede ser de 2 micras a 2 milímetros (Hasle et al,1997).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

3.1.1. **Tipo:** Investigación aplicada

3.1.2. **Diseño:** Experimental

3.2. Población y/o muestra de estudio

3.2.1. **Población:** Agua del río Uchusuma

3.2.2. **Muestra:** Se trabajará con un promedio total de 7,2 L de agua del río Uchusuma

3.3. Operacionalización de variables

3.3.1. Variable dependiente:

– Porcentaje de remoción de Arsénico total.

3.3.2. Variables independientes:

Tratamiento 1: Inóculo 5 mL de *Chlorella vulgaris* para 20 % de concentración de arsénico más 0,4 mL de nutriente Bayfoland.

Tratamiento 2 Células por mL de *Chlorella vulgaris* para 40 % de concentración de arsénico más 0,4 mL de nutriente Bayfoland.

Tratamiento 3: Células por mL de *Chlorella vulgaris* para 60 % de concentración de arsénico más 0,4 mL de nutriente Bayfoland.

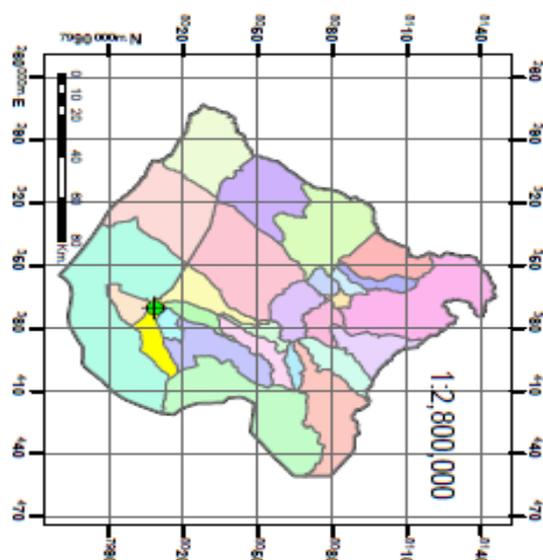
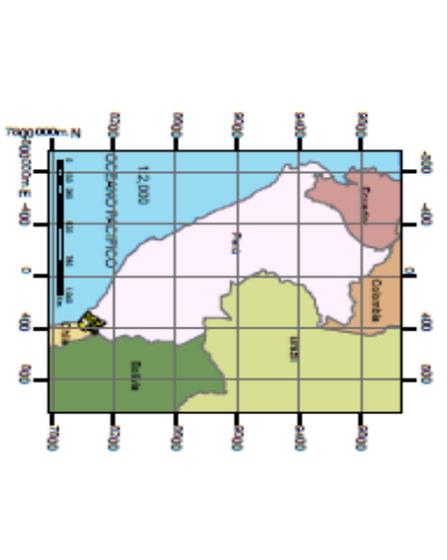
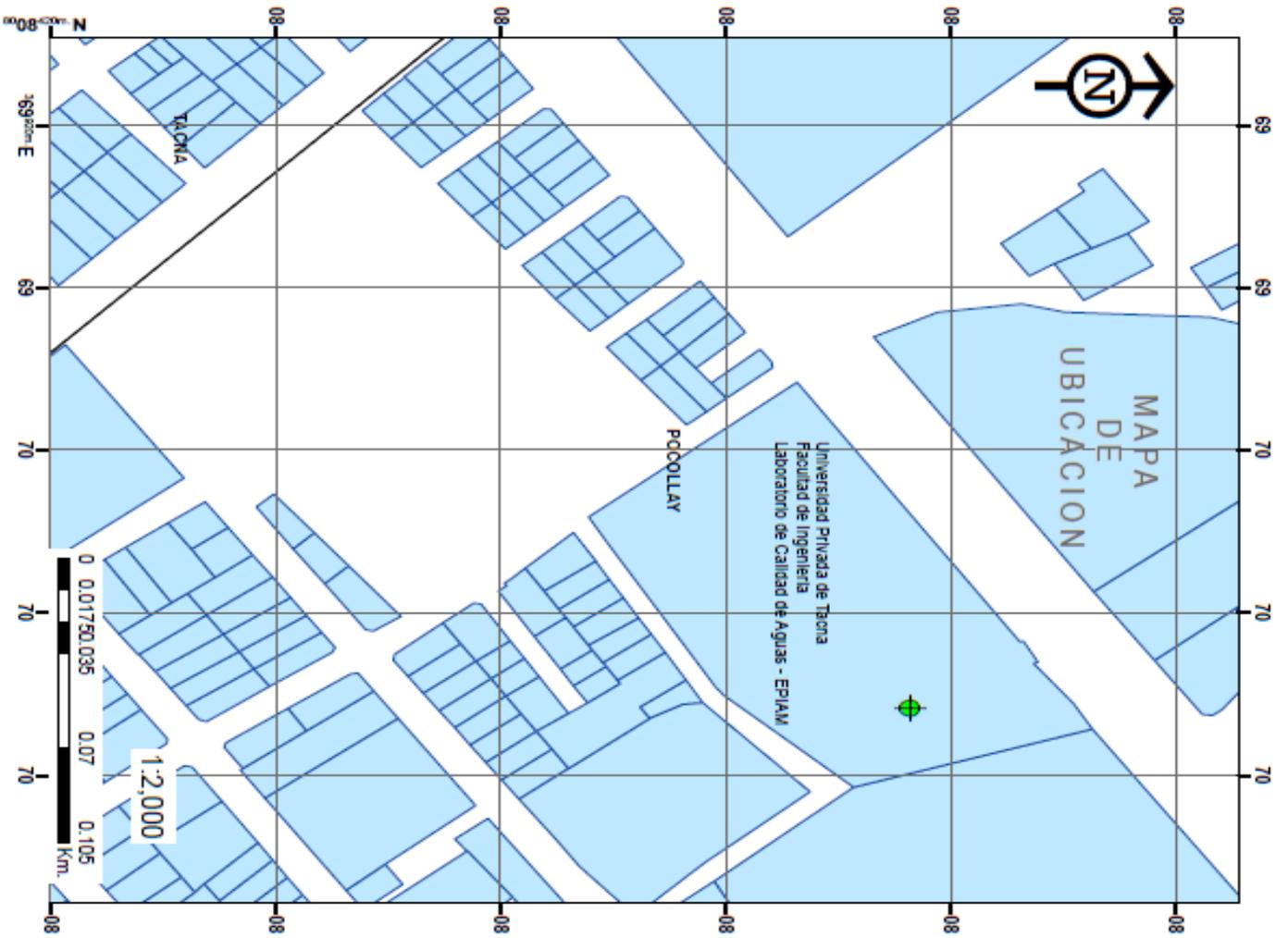
Tratamiento 4: Células por mL de *Chlorella vulgaris* para 80 % de concentración de arsénico más 0,4 mL de nutriente Bayfoland.

Tratamiento 5: Células por mL de *Chlorella vulgaris* para 100 % de concentración de arsénico más 0,4 mL de nutriente Bayfoland.

3.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

3.4.1. Lugar de ejecución:

La presente investigación se realizó en el laboratorio de aguas de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna (UPT) de la Escuela de Ingeniería Ambiental (EPIAM).



- Legend**
- Puntos especiales
 - LIMITE PROVINCIAL
 - LIMITE DISTRITAL
 - ALTO DE LA LUNA
 - CARIARI
 - CAJALICA
 - CANDARAVE
 - OLMANO NUEVA
 - CONDONEL ORGANO ALMORCON LANCIPER
 - CUSIBAMBA
 - ESTOILE
 - ESTOILE PAMPA
 - HERODES ALMORCON
 - HUANQUIBAMBA
 - LABAYCA
 - INCLAN
 - ITE
 - LOCUMBA
 - PACHICA
 - PULLCA
 - POCOLLAY
 - QUILAYUBAMBA
 - SAMA
 - SITUBAMBA
 - SUCABAMBA
 - TACNA
 - TAMBACORSE
 - TILCOCO

3.4.2. Cuantificación de cultivos:

El conteo de las microalgas se realizó con la cámara de Neubauer en un periodo de evaluación de 8 días.

3.4.3. Recolección de muestra

La recolección del agua del río Uchusuma se realizó en la zona de Cerro Blanco, cerca al desarenador Uchusuma, luego de la partición del caudal de agua para uso poblacional y la del uso agrícola, tomando una muestra de 10 L.

Posteriormente, la muestra fue vertida en matraces de 3 L y un recipiente de vidrio de 1 L dónde previamente fue filtrada con algodón para quitar algunos sólidos suspendidos; luego fue llevada al Laboratorio de Microbiología para su esterilización en la autoclave a una temperatura de 121 °C x 15 libras y 01 atmósfera de presión.

3.4.4. Cultivo de *Chlorella vulgaris*

La microalga se obtuvo a partir de una cepa de *Chlorella vulgaris* donada por el Blgo. Jordan Ismael de la Universidad de Nacional Jorge Basadre Grohmann (UNJBG). Previa desinfección se masificó en un reactor batch por espacio de 08 días.

3.4.5. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes concentraciones de As

Para las evaluaciones del crecimiento de cultivo de *Chlorella vulgaris*, se realizó en dieciséis (16) matraces de 500ml de volumen que fueron esterilizados en el autoclave del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ingeniería. Se monitoreó cinco (5) tratamientos con tres (3) repeticiones cada uno dónde se aplicó diluciones a distintas concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80%, 100% y una (1) muestra adicional de referencia solo con agua destilada.

Los matraces fueron colocados de manera aleatoria puestas en 2 filas como se indicará a continuación de izquierda a derecha:

- Fila 1 (adelante) : Muestra 1.0, C1-60, D2-80, E2-100, C2-60, B1-40, C3-60, D3-80.
- Fila 2 (detrás): A1-20, B2-40, D1-80, E3-100, E1-100, B3-40, A2-20, A3.20



Figura 2: Numeración de matraces para cultivos de microalgas.



Figura 3: Cultivo de microalga al momento de siembra

3.4.6. Conteo celular de microalgas

Para evaluar y conocer el número de densidad de la microalga para cada una de las muestras en las diferentes concentraciones del crecimiento diario de la microalga (*Chlorella vulgaris*), se necesitó un (1) microscopio binocular, una (1) cámara de Neubauer de 0,1mm de profundidad marca Marienfeld y una (1) pipeta electrónica de 100 – 1000 μ l de marca BOECO.

La cámara de Neubauer es un material de vidrio para el conteo de diferentes microorganismos que se ajusta al microscopio, está compuesta por 9 cuadros con 1 mm² de superficie. (Figura N° 04)

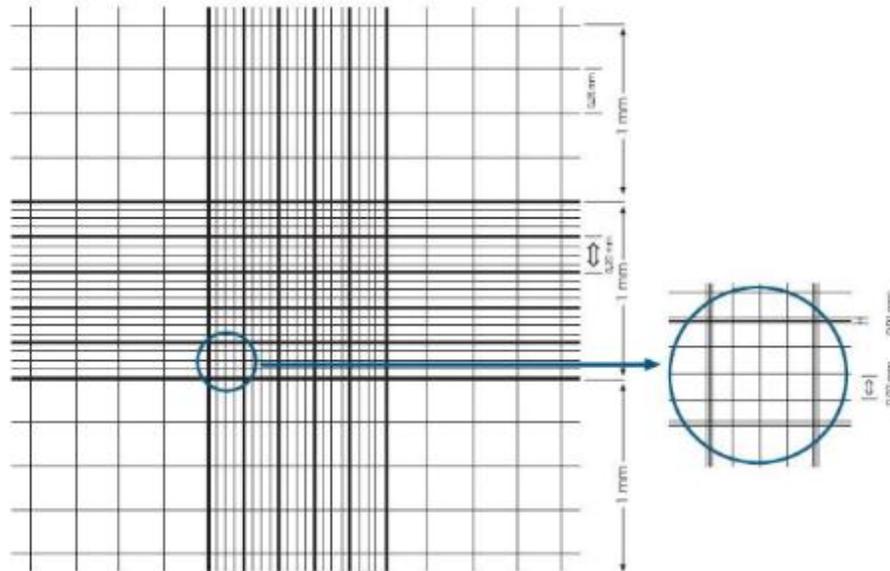


Figura 4: Detalle de la Cámara de Neubauer, para la realización del conteo dónde utilizó el cuadro del centro para el conteo celular.

Fuente: Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II.

3.4.7. Porcentaje de remoción de arsénico

Para calcular el porcentaje de remoción, con el cultivo de la microalga *Chlorella vulgaris*, al culminar el desarrollo de cultivo en aguas superficiales, se utilizó la siguiente ecuación (Scavo et al, 2004).

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(\text{Cantidad inicial} - \text{Cantidad Final})}{\text{Cantidad inicial}} * 100$$

3.4.8. Metodologías de análisis

Las metodologías usadas para el análisis del proceso de crecimiento de la microalga y determinación de concentración de Arsénico fueron los siguientes:

Tabla 2:

Métodos de análisis de *Chlorella* y Arsénico

Análisis	Métodos
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cámara de Neubauer
Arsénico	Arsenic Test Kit HACH

3.4.8.1. Composición del medio de cultivo

Los medios de cultivo presentaron una serie de componentes para el crecimiento y desarrollo de las microalgas como los nutrientes, minerales, la luz, la temperatura, aireación en necesarias condiciones (Barrero, 2016).

La siguiente tabla señala como está conformado el cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* en los distintos porcentajes y su relación volumétrica con el arsénico, agua destilada y nutriente.

Previamente el procedimiento que se realizó fue en el orden siguiente:

1. Como primer punto se esterilizó los materiales en la autoclave.
2. Se le añadió primero el agua del río uchusuma en cantidades correspondientes.
3. Luego se continuó con el agua destilada, equilibrando las dosis.
4. Posteriormente se le añadió un nutriente (bayfoland) el cuál no influye en lo que respecta al arsénico, ya que con éste las microalgas podrían tener un crecimiento más acelerado.
5. Por último se añadió el inóculo de la microalga *Chlorella vulgaris*.

Tabla 3:

Disposición de la composición experimental en un diseño en bloque completamente aleatorizado.

TRATAMIENTO	CÓDIGO	VOLUMEN PREPARADO	VOLUMEN DE RÍO UCHUSUMA	CONCENTRACIÓN DE ARSÉNICO	VOLUMEN DE AGUA DESTILADA	VOLUMEN DE INÓCULO	VOLUMEN DE NUTRIENTE (BAYFOLAND)
Control	Muestra 1.0	400 mL	0 mL	0 mg/L	394,6 mL	5 mL	0.4 mL
T - 1	A1 - 20	400 mL	78,9 mL	0,0238 mg/L	315,7 mL	5 mL	0,4 mL
T - 2	B1 - 40	400 mL	157,8 mL	0,0476 mg/L	236,8 mL	5 mL	0,4 mL
T - 3	C1 - 60	400 mL	236,8 mL	0,0714 mg/L	157,8 mL	5 mL	0,4 mL
T - 4	D1 - 80	400 mL	315,7 mL	0,0952 mg/L	78,9 mL	5 mL	0,4 mL
T - 5	E1 - 100	400 mL	394,6 mL	0,119 mg/L	0 mL	5 mL	0,4 mL
T - 1	A2 - 20	400 mL	78,9 mL	0,0238 mg/L	315,7 mL	5 mL	0,4 mL
T - 2	B2 - 40	400 mL	157,8 mL	0,0476 mg/L	236,8 mL	5 mL	0,4 mL
T - 3	C2 - 60	400 mL	236,8 mL	0,0714 mg/L	157,8 mL	5 mL	0,4 mL
T - 4	D2 - 80	400 mL	315,7 mL	0,0952 mg/L	78,9 mL	5 mL	0,4 mL
T - 5	E2 - 100	400 mL	394,6 mL	0,119 mg/L	0 mL	5 mL	0,4 mL
T - 1	A3 - 20	400 mL	78,9 mL	0,0238 mg/L	315,7 mL	5 mL	0,4 mL
T - 2	B3 - 40	400 mL	157,8 mL	0,0476 mg/L	236,8 mL	5 mL	0,4 mL
T - 3	C3 - 60	400 mL	236,8 mL	0,0714 mg/L	157,8 mL	5 mL	0,4 mL
T - 4	D3 - 80	400 mL	315,7 mL	0,0952 mg/L	78,9 mL	5 mL	0,4 mL
T - 5	E3 - 100	400 mL	394,6 mL	0,119 mg/L	0 mL	5 mL	0,4 mL

3.4.8.2. Conteo de células

Para conocer el número de células de cada una de las muestras diariamente se utilizó la cámara de Neubauer de 0.1 mm² (Guillard, 1975).

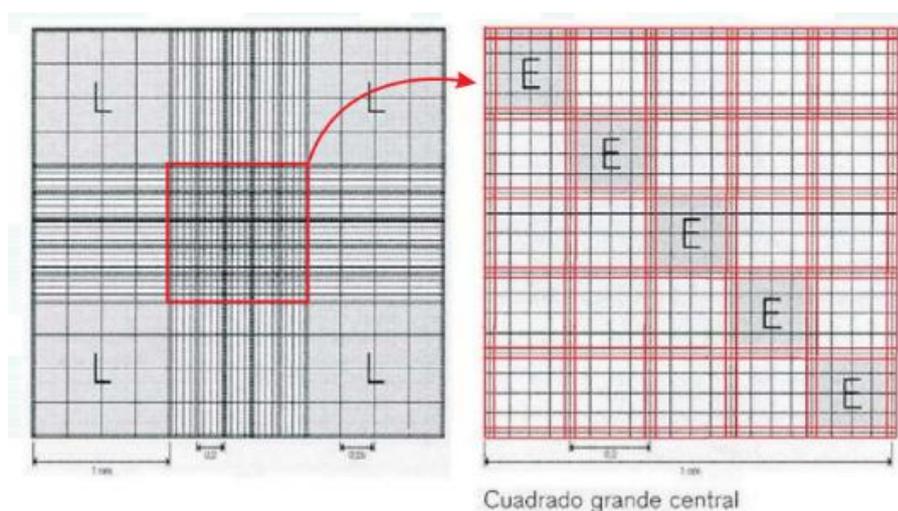


Figura 5: Conteo de la cámara de Neubauer, recuadro del centro.

Fuente: García Barceló, s.f.

a) Fórmula de la densidad:

$$\frac{\left(\frac{\sum n}{5}\right)}{4} \times 10^6$$

Dónde:

$$\frac{\sum n}{5} = \text{Promedio de conteo celular}$$

3.4.8.3. Separación de microalga del efluente

Al concluir con los 08 días del tratamiento, para llevar a cabo la separación de éstos dos componentes se utilizó una (1) microcentrífuga de marca PrO-Analytical C2012, para 12 tubos falcon con un rango de velocidad de 600 RPM.

3.4.8.4. Análisis de Arsénico

Para el análisis de arsénico se utilizó el test kit 2822800 (EZ Arsénico), contiene un (1) frasco de 50ml con línea de carga y un set con una serie de reactivos como; oxono, fosfato de sodio, sal tetrasódica, etanol, zinc, mercurio bromuro y ácido sulfámico.

Se recogió 50 ml de muestra en un vaso precipitado de vidrio que viene en el kit, se añade los dos primeros reactivos y agitando la muestra para que se disuelva los reactivos en polvo y así sucesivamente, parte de éste proceso se debe colocar una tira de análisis en la tapa para que al finalizar en la almohadilla de éstas tiras formen una coloración la cuál serán comparadas con los colores monoparamétricos con un rango de 0 a 500 parte por billón (ppb), para un resultado rápido y eficiente, se realizaron las diluciones correspondientes por cada tratamiento y repetición, así obtener un promedio. (Hach, 2006)

Teniendo las recomendaciones correspondientes ya que la persona se expone a reactivos perjudiciales hasta cancerígenos al ser ingeridos o inhalados, se debe evitar que el ensayo toque la solución del recipiente de reacción.

3.5. Procesamiento y análisis de datos

3.5.1. Análisis Estadístico

Los datos obtenidos fueron trabajados en el programa excel, para obtener tablas y gráficos que permitieron evaluar los parámetros en el experimento.

Otra herramienta de análisis estadística que se utilizó fue Statgraphics Centurión, dónde se analizó tablas de diferencia, promedio, razón-F y valor-P de todas las muestras y también se comparó los cinco (5) tratamientos: A – 20%, B - 40%, C – 60%, D – 80% y E – 100% con sus tres (3) repeticiones respectivamente.

Con el programa STATGRAPHICS se realizó la evaluación estadística y análisis de varianza para evaluar la diferencia entre los tratamientos ($p \leq 0,05$).

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS

Los valores iniciales de los parámetros que se va a trabajar se en la siguiente tabla:

Tabla 4:

Promedio inicial de la densidad de la microalga y el efluente del río Uchusuma.

PARÁMETROS	VALOR EXPERIMENTAL
DENSIDAD <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	5,75 x 10 ⁶ cel/mL
ARSÉNICO	0,119 mg/L

La densidad inicial fue determinada por conteo celular en la cámara de Neubauer, mientras que el valor del arsénico se tomó de los resultados físico-químicos hechas por la Entidad Prestadora de Servicios (EPS).

El crecimiento de las células expuestas a As Total se demuestran en las siguientes figuras, en la muestra 1.0 de control en agua destilada la *Chlorella vulgaris* tuvo dificultad en su crecimiento pero en el día 7 tuvo un crecimiento significativo, en los diferentes tratamientos de arsénico en distintos porcentajes, se muestra una diferencia moderada entre sí, sin embargo, el agua destilada podría influir los resultados en su crecimiento.

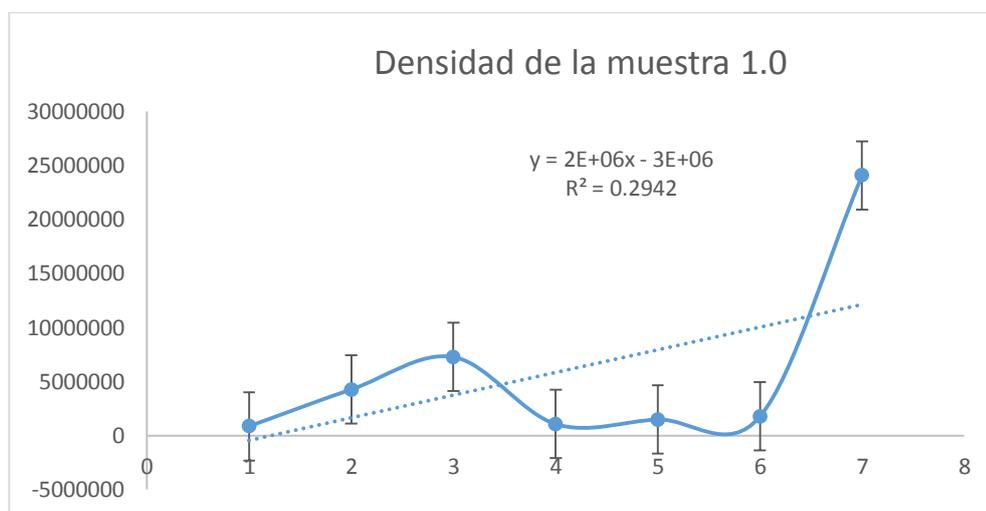


Figura 6: Densidad de la muestra 1.0

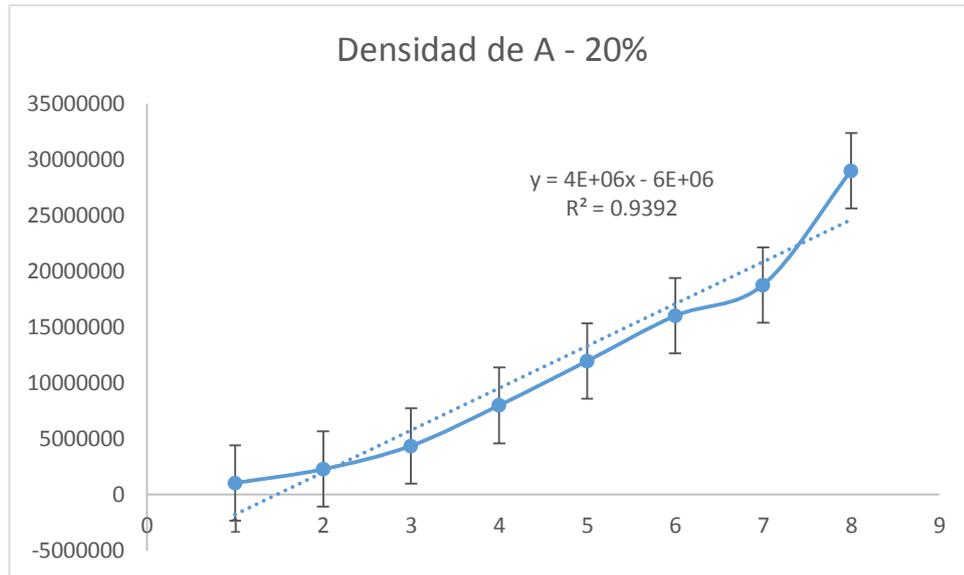


Figura 7: Densidad de la muestra A – 20%

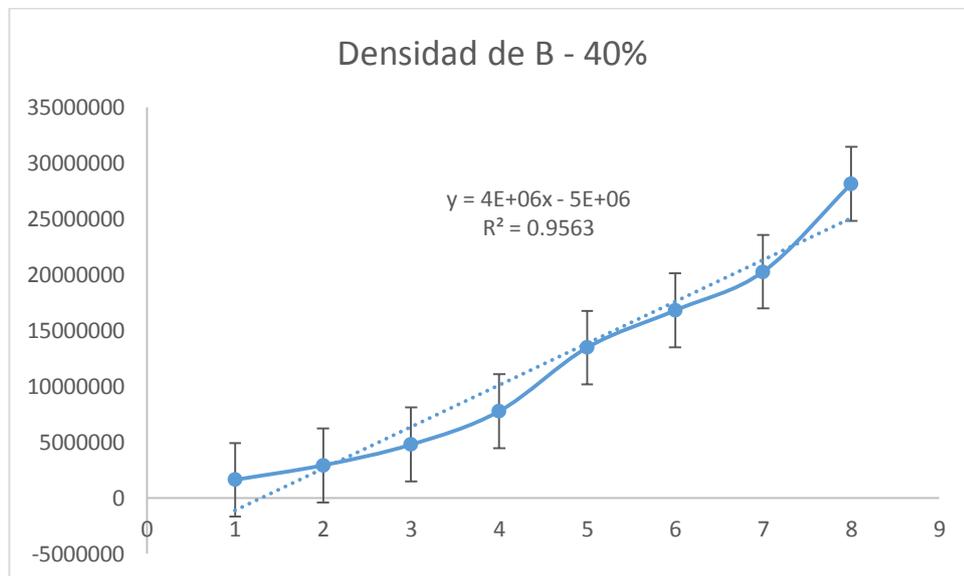


Figura 8: Densidad de la muestra B – 40%

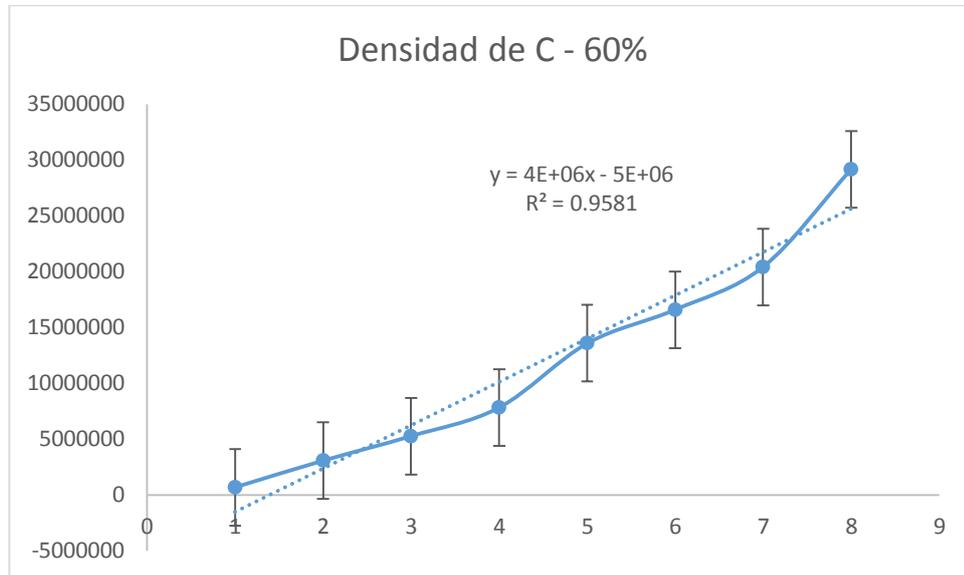


Figura 9: Densidad de la muestra C – 60%

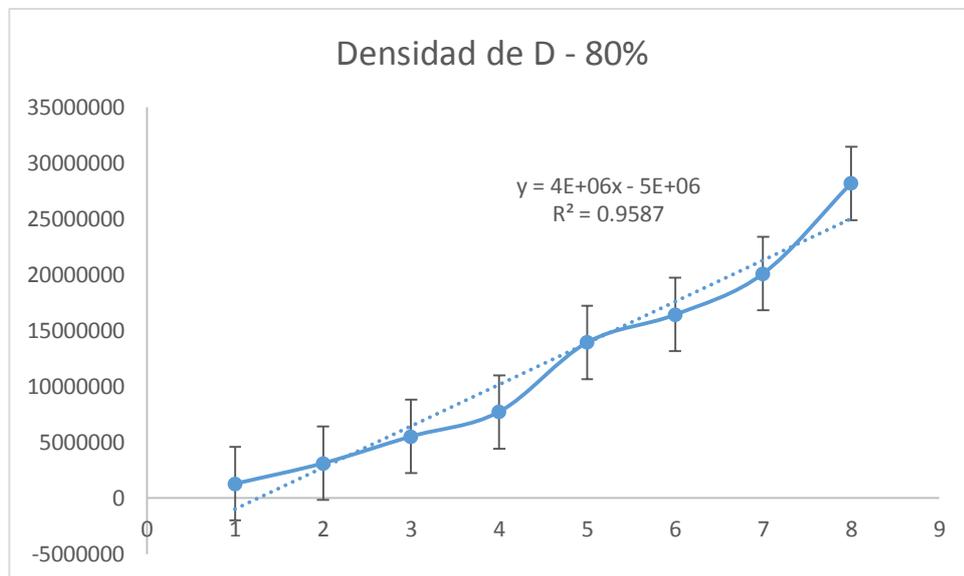


Figura 10: Densidad de la muestra D – 80%

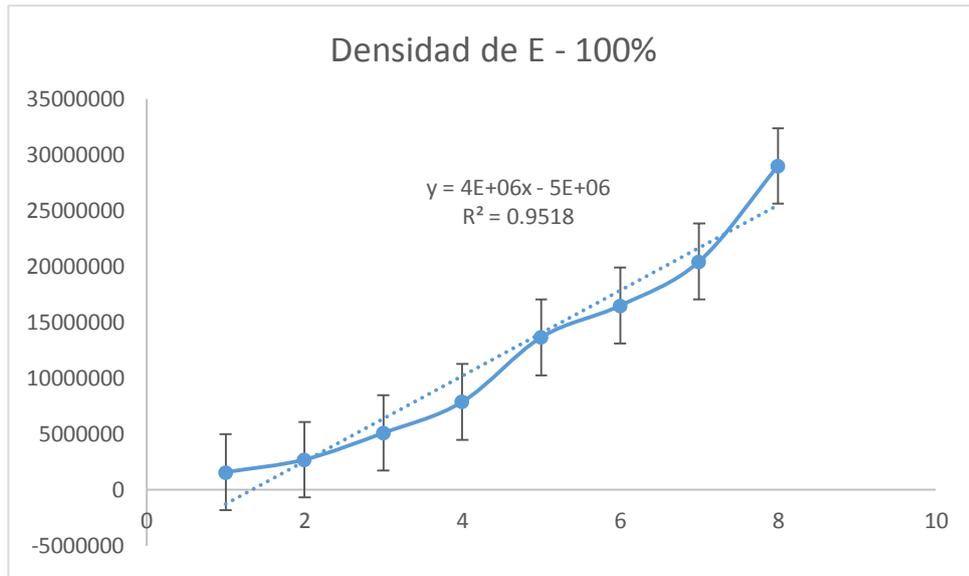


Figura 11: Densidad de la muestra E – 100%

Tabla 5:

Resumen estadístico del resultado obtenido de la remoción de arsénico.

<i>Código</i>	<i>Ci</i>	<i>Cf</i>	<i>%Remoción</i>	<i>Promedio</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Promedio</i>
A1 -20	23,8	5	78,9915966	5,66667	18,8	76,1904762
A2-20	23,8	8	66,3865546		15,8	
A3-20	23,8	4	83,1932771		19,8	
B1-40	47,6	12	74,789916	11,33333	35,6	76,1904762
B2-40	47,6	9	81,092437		38,6	
B3-40	47,6	13	72,6890756		34,6	
C1-60	71	15	78,8732394	16,66667	56	76,5258216
C2-60	71	20	71,8309859		51	
C3-60	71	15	78,8732394		56	
D1-80	95,2	25	73,7394958	23,33333	70,2	75,4901961
D2-80	95,2	20	78,9915966		75,2	
D3-80	95,2	25	73,7394958		70,2	
E1-100	119	35	70,5882353	29,33333	84	75,3501401
E2-100	119	28	76,4705882		91	
E3-100	119	25	78,9915966		94	

En la siguiente tabla se logra interpretar de acuerdo a la cantidad inicial (ci) y la cantidad final (cf) que se obtuvo el promedio de cada tratamiento, las diferencias entre ellas, y de éste mismo su promedio.

Tabla 6:

ANOVA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3,05543	0,763859	0,03	0,9983
Intra grupos	279,896	27,9896		
Total (Corr.)	282,952			

La tabla ANOVA se puede interpretar la varianza de los datos en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro de grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 0,0272908, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, esto quiere decir que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los 5 tratamientos con un nivel del 95,0% de confianza.

Tabla 7:

Pruebas de Múltiple Rangos

Método: 95,0 porcentaje LSD

	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Tratamiento 5	3	75,3501	X
Tratamiento 4	3	75,4902	X
Tratamiento 1	3	76,1905	X
Tratamiento 2	3	76,1905	X
Tratamiento 3	3	76,5258	X

Las pruebas múltiple de rangos, nos permite estadísticamente tener un resultado del promedio de muestras con datos cuantitativos, y que no existe una variación entre los tratamientos.

Tabla 8:

Diferencias entre los tratamientos

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
Tratamiento 1 – Tratamiento 2	0	9,6249
Tratamiento 1 – Tratamiento 3	-0,335345	9,6249
Tratamiento 1 - Tratamiento 4	0,70028	9,6249
Tratamiento 1 - Tratamiento 5	0,840336	9,6249
Tratamiento 2 - Tratamiento 3	-0,335345	9,6249
Tratamiento 2 - Tratamiento 4	0,70028	9,6249
Tratamiento 2 - Tratamiento 5	0,840336	9,6249
Tratamiento 3 - Tratamiento 4	1,03563	9,6249
Tratamiento 3 - Tratamiento 5	1,17568	9,6249
Tratamiento 4 - Tratamiento 5	0,140056	9,6249

La siguiente tabla tiene un procedimiento que aplica una comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Si hay diferencias estadísticamente significativas entre cualquier par de medias, con un nivel del 95,0% de confianza. En la parte superior de la página, se ha identificado un grupo homogéneo, según la alineación de las X's en columna. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5,0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

CAPÍTULO V:

DISCUSIÓN

1. Lo favorable de la microalga *Chlorella vulgaris* es que en ambientes de alta carga contaminante o altas concentraciones con contaminantes, logra adaptarse de manera eficiente y con facilidad indica Kurade et al (2017), de los resultados obtenidos del análisis de las 16 muestras, se presentó una dinámica de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris*, que se da a mayor crecimiento en los días 7 y 8 en los 5 tratamientos no teniendo una diferencia significativa entre ellos.
2. En cuanto a la capacidad de crecimiento Astocondor et al (2007) registró que es de forma factible el crecimiento de la microalga un periodo de 30 días, ya que la microalga toma un aproximado de 15 días en adaptarse en el medio y a partir del 16 al 20 es dónde empieza a remover el metal, con éstos datos se puede establecer un rango de días, éste puede ser un factor de crecimiento que la *Chlorella vulgaris* pudo verse afectado, ya que al inducir el nutriente se aceleró el proceso, en el cultivo la microalga tuvo 1 – 2 días para adaptarse al medio y a partir del 3er día procedió a remover el arsénico.
3. Con respecto a los resultados de arsénico Abdel-Raouf et al (2012) indica que las microalgas son eficientes para la remoción de nutrientes como: nitrógeno y fósforo, en cuanto al arsénico el presente estudio demuestra que la *Chlorella vulgaris* son capaces de tolerar distintas concentraciones de arsénico, lo que sugiere que ésta microalga pudo haber desarrollado la capacidad de detoxificación de arsénico en el agua.

CONCLUSIONES

1. Se identificó que la microalga *Chlorella vulgaris* no tuvo muchas complicaciones en el crecimiento poblacional en los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5, que presentaban un tamaño, forma y color adecuado que resulta ser fácilmente analizable en condiciones de laboratorio.
2. En los resultados de las muestras analizadas, se evidencia que no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos con respecto al porcentaje de remoción, siendo las muestras A - 20%, B - 40% y C - 60% las que obtuvieron un 76,19%, 76,19% y 76,52% respectivamente, las mismas que se encuentran dentro de los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua.
3. Finalmente se concluye que en la remoción de arsénico por *Chlorella vulgaris* resultó de manera efectiva, lo que promueve el uso potencial de ésta microalga *Chlorella vulgaris* en el agua del río Uchusuma en Tacna.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar estudios con arsénico al 100% con distintas concentraciones de volúmenes de microalga.
2. Se recomienda utilizar otros nutrientes como fuentes orgánicas como aditivo para nuevos medios de cultivo y evaluar su influencia en el crecimiento.
3. Se recomienda profundizar estudios de aplicación de microalgas para la remoción de metales y metaloides.
4. Se recomienda utilizar para la muestra control agua neutra.
5. Se recomienda hacer repeticiones con la muestra control.
6. Finalmente se recomienda, utilizar el equipo IPC masa acoplado a HPLC para el análisis de arsénico, ya que daría resultados más exactos, para la determinación de arsénico pre y post tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Mohammad Ibraheem, I. B. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 257-275.
- ANA. (12 de Junio de 2018). *Autoridad Nacional del Agua*. Obtenido de <https://www.ana.gob.pe/noticia/autoridad-nacional-del-agua-difunde-resultados-de-calidad-de-agua-en-tacna>
- Angelova, V., Ivanova, R., Delibaltova, V., & Ivanov, K. (2004). Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops. *Industrial Crops and Products*, 197-205.
- Aréchaga, D., Arregui, D., González de la Rosa, D., & López-Vallejo, A. (2016). *Manual de prácticas de laboratorio de Biología Molecular II*. Mexico: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Astocondor, M. M., Mayta Huatuco, E., Montoya Terreros, H., & Tarazona Delgado, R. (2007). Crecimiento Poblacional y Productividad de la Microalga Nativa *Chlorella* peruviana bajo Diferentes Salinidades. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 976-986.
- Barrero Cuevas, L. (2016). *Microbiología Clínica*. Madrid: Síntesis.
- Cartagena Arévalo, J. C., & Malo Malo, B. O. (2017). Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la PTAR el salitre a nivel de laboratorio. *Proyecto integral*. Universidad de América, Bogotá.
- Chong, A., Wong, Y., & Tam, N. (2000). Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere*, 251-257.
- Comité de Monitoreo Ambiental. (2013). *Monitoreo al río Uchusuma revela alta contaminación*. Tacna: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.
- Enriquez Castro, D. (2015). Nivel alto del arsénico y su repercusión en la salud. *Ciencia y Desarrollo*, 19; 7-10.

- Galvan Jimenez, K., & Rozas LaTorre, H. (2013). *Remoción de arsénico de efluentes industriales mediante bioabsorción con Chlorella vulgaris*. Arequipa: Universidad Católica de Santa María.
- García Barceló, J. (s.f.). *GAB Sistemas Analíticos S.L.* Obtenido de www.gabsystem.com
- Garzón, J., Rodríguez-Miranda, J., & Hernández-Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Artículo de Revisión*. Universidad y Salud, Bogotá, Colombia.
- Gomez, L. (2007). Microalgas : Aspectos Ecológicos y Biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, 3-20.
- Gualtieri, P., & Barsanti, L. (2014). *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. Taylor & Francis group.
- Guillard, R. (1975). *Culture of marine invertebrate animals*. New York: Plenum Press.
- Hach, C., & Hach, K. (2006). *HACH*. Obtenido de <https://es.hach.com/>
- Hasle, G., Syvertsen, E., Steidinger, K., Tangen, K., & Tomas, C. (1997). *Identifying Marine Phytoplankton*. (C. Tomas, Ed.) San Diego: Academic Press.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 157-173.
- IMARPE, I. d. (2013). Obtenido de <http://www.imarpe.gob.pe/imarpe/>
- Johnson, D. (2014). Biomining — biotechnologies for extracting and recovering metals from ores and waste materials. *Current Opinion in Biotechnology*. College of Natural Sciences, Reino Unido.
- Kurade, M., Roh, H.-S., Xiong, J.-Q., & Kim, J. (2017). Ciprofloxacin toxicity and its co-metabolic removal by a freshwater microalga *Chlamydomonas mexicana*. *J. Hazard Mater.*
- López Mendoza, S. P., & Meza Vera, J. A. (2017). Eficiencia de la Microalga *Chlorella sp.* para la remoción de nutrientes en las Lagunas de Oxidación de la Ciudad de Manta. *Tesis de Grado*. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí - Facultad De Ciencias Agropecuarias, Manta - Ecuador.

- Mariano Astocondor, M., Mayta Huatuco, E., Montoya Terreros, H., & Tarazona Delgado, R. (2017). Crecimiento Poblacional y Productividad de la Microalga Nativa *Chlorella* peruviana bajo Diferentes Salinidades. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*.
- Mehrabadi, A., Craggs, R., & Farid, M. (2014). Tratamiento de aguas residuales de alta tasa de estanques de alga. *Biosurce Technology*.
- Mengel, K., & Kirkby, E. A. (2000). *Principios de Nutrición Vegetal* (4ta ed.). Basilea, Suiza: Instituto Internacional de la Potasa.
- MINAGRI. (12 de Junio de 2018). *Ministerio de Agricultura y Riego*. Obtenido de <https://www.ana.gob.pe/noticia/autoridad-nacional-del-agua-difunde-resultados-de-calidad-de-agua-en-tacna>
- Parra, O., & Bicudo, C. (1996). *Introducción a la biología y sistemática de las algas de aguas continentales*. Santiago: Eds. Universidad de Concepción.
- Revilla, S. (2018). *Eficiencia del homogenizado proveniente del tracto digestivo de la galleria mellonella en la Biodegradación de dos tipos de polietileno de baja densidad, lima - 2018*. Lima: Tesis pre-grado.
- Richmond, A. (2003). *Handbook of microalgal cultures: Biotechnology and applied phycology*. Blackwell Publishing Ltd .
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture. En *Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Science Ltd.
- Rodriguez, J., & Sanchez, J. (2003). Biorremediación: Fundamentos y aspectos microbiológicos. *Industria y minería*, 12-6.
- Sandoval, G. M. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Aproximación teorica a la biosorciós de metales pesados, por medio de microorganismos*, 1-23.
- Scavo, M., Oscar, R., & Luque, O. (2004). Estudio de un sistema de tratamiento de aguas residuales complementario, con pasto vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.), provenientes de una planta de producción de gaseosas, en Villa de Cura, Estado Aragua. *Tesis de Maestría Ingeniería Agrícola*. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía., Caracas, Venezuela.

- Tantte, J. (2018). Evaluación de la capacidad depuradora de *Chlorella vulgaris* beyerinck inmovilizada en alginato para el tratamiento de aguas residuales. (*Tesis de Investigación*). Universidad Católica Sedes Sapientiae, Huacho.
- Tapia, P., Santandes, M., Pávez, O., Valderrama, O., Guzmán, D., & Romero, L. (2011). Bioabsorción de iones cobre con biomasa de algas y orujos deshidratados. *Revista metalúrgica*, 15-28.
- Valdivia, B., Méndez - Zavala, A., Aguilar, C., Montañez, C., & Benavente , J. (2012). Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores. *Acta Química Mexicana*, 4(7).
- Voltolina, D., & Arredondo Vega, B. O. (2007). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal* (2º ed.). La Paz, B.C.S., México C.P. 23096: Centro de investigadores biológicas del noroeste, s.c.

ANEXOS

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Problemas	Objetivos	Justificación	Hipótesis	Variable	Método
Formulación del problema: ¿Cuál será la capacidad de remoción de arsénico en aguas superficiales del río uchusuma – Tacna utilizado la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> ?	Objetivo General: Evaluar la capacidad de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> para remoción del arsénico en aguas superficiales del río uchusuma.	Justificación Económica: El aprovechamiento de la microalga es una alternativa económica ya que se pueden encontrar fácilmente en los cuerpos de agua dulce, lagos, mares y ríos. Justificación Social: El crecimiento de la población de Tacna en los últimos años	Hipótesis General: La microalga <i>Chlorella vulgaris</i> posee una elevada capacidad de remoción de arsénico en las aguas superficiales del río uchusuma.	Variable dependiente: Porcentaje de remoción de arsénico.	- Se tomará la cepa de <i>Chlorella Vulgaris</i> . - Se procederá a cultivos preliminares de la microalga en matraces de 500ml. - Para el tratamiento

<p>Formulación específica:</p> <p>-¿Cuál será el porcentaje de remoción del metaloide arsénico en aguas superficiales del río uchusuma - Tacna?</p> <p>-¿Cuál será la concentración óptima de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> para la remoción eficiente de arsénico en aguas superficiales del río uchusuma.</p>	<p>Objetivos Específicos:</p> <p>-Determinar el porcentaje de remoción del metaloide arsénico en aguas superficiales del río uchusuma mediante la bioabsorción de la microalga <i>Chlorella Vulgaris</i>.</p> <p>-Cuantificar la concentración óptima de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> para la remoción de arsénico en aguas superficiales del río uchusuma.</p>	<p>se ha abastecer de agua potable a todos resulta ser difícil.</p> <p>Justificación Ambiental:</p> <p>La microalga se puede considerar como una fuente de materia prima con alto potencial por tener una alta tolerancia al ser expuesta al arsénico.</p> <p>Justificación Científica:</p> <p>Se busca emplear tecnologías que utilicen métodos biológicos y organismos vivos, demostrando un sistema alternativo viable.</p>	<p>Hipótesis Específica:</p> <p>La microalga <i>Chlorella vulgaris</i> presenta un alto porcentaje en presencia del arsénico en aguas superficiales del río uchusuma.</p> <p>La cantidad óptima de remoción en aguas superficiales del río uchusuma es de un 80%.</p>	<p>Variable independiente:</p> <p>Densidad de microalga <i>Chlorella vulgaris</i>.</p> <p>Tratamiento 1, 2, 3, 4 y 5</p>	<p>del agua, se pondrá las concentraciones de arsénico en 20%, 40%, 60%, 80% y 100%.</p> <p>-Se realizará los ensayos de remoción.</p>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



Figura N° 12: Recolección de muestra de agua de Río Uchusuma en la desviación de agua poblacional y agua para riego en Cerro Blanco.



Figura N° 13: Muestra de agua de Río Uchusuma



Figura N° 14: Armado de medio de cultivo



Figura N° 15: Armado de medio de cultivo



Figura N° 16: Autoclave



Figura N° 17: Esterilización de materiales en autoclave



Figura N° 18: Rotulado de código y porcentaje de concentraciones.

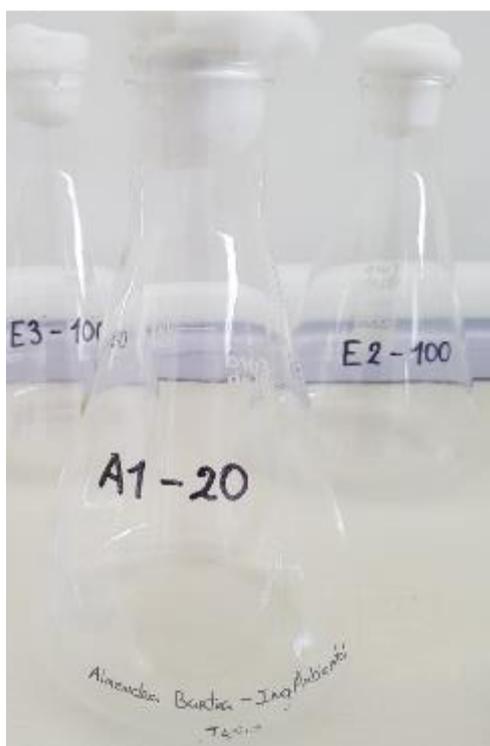


Figura N° 19: Rotulado



Figura N° 20: Medición en volúmenes del agua del río uchusuma



Figura N° 21: Agregado de agua destilada



Figura N° 22: Nutriente (bayfolan)



Figura N° 23: Agregado nutriente (bayfolan)



Figura N° 24: Agregado de microalga *Chlorella Vulgaris*.

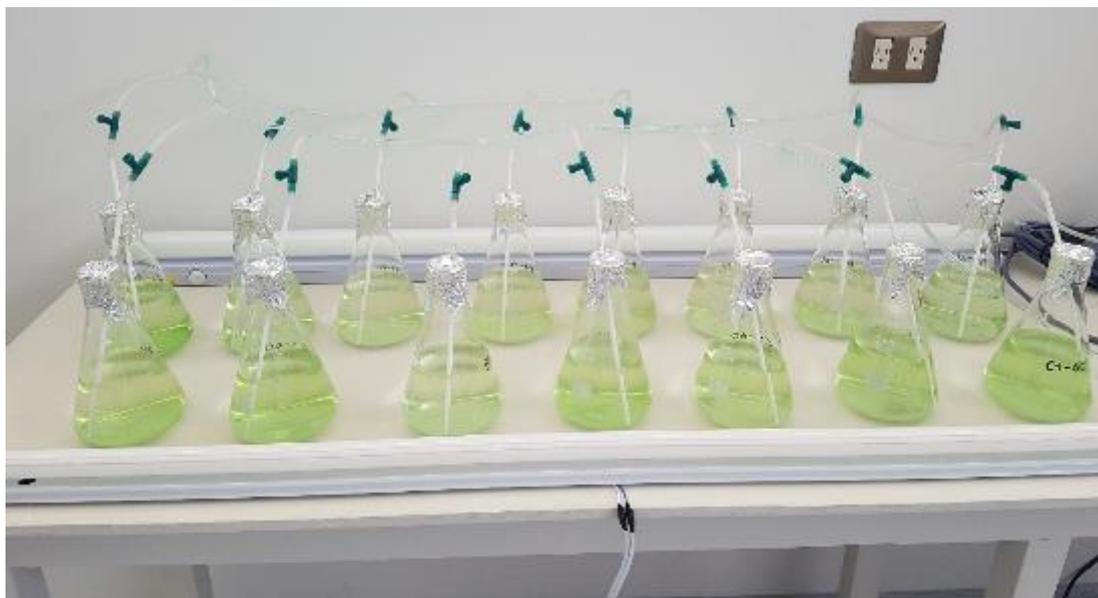


Figura N° 25: Sistema de cultivo de microalga en matraces

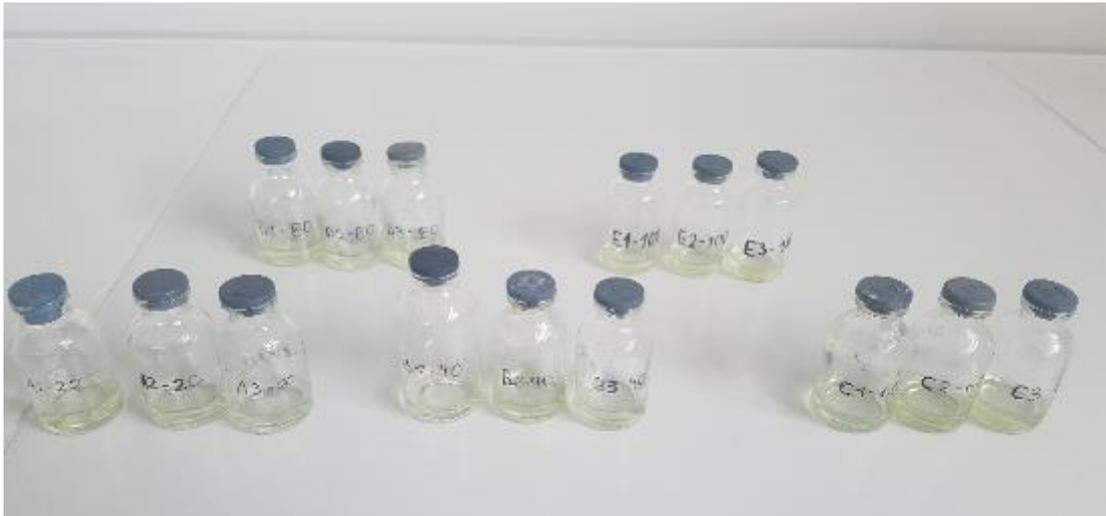


Figura N° 26: Pequeñas concentraciones de cultivo para analizar su densidad.

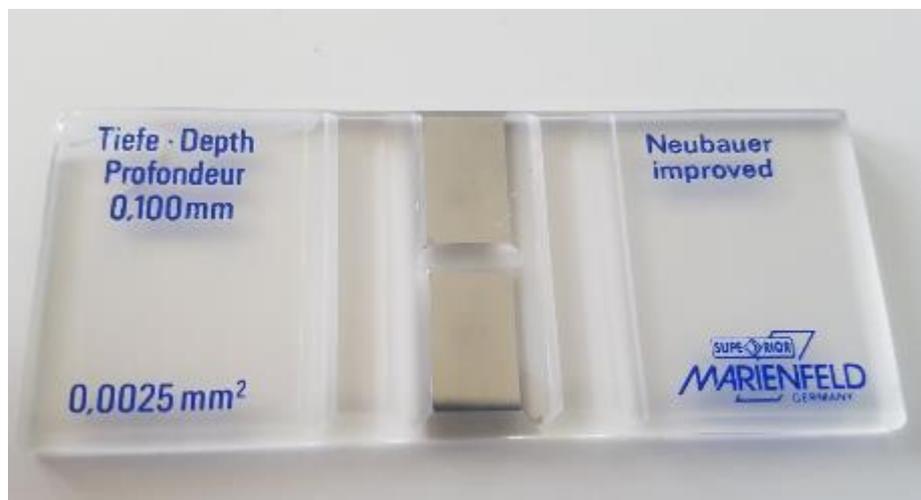


Figura N° 27: Cámara de Neubauer



Figura N° 28: Muestra de cultivo de microalga a 200 μ l

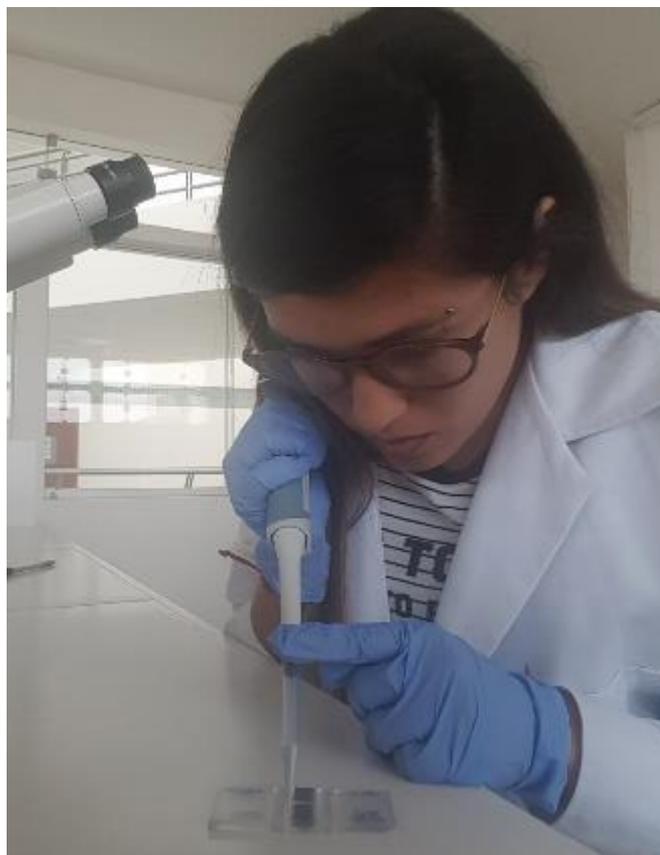


Figura N° 29: Colocación de muestra en la cámara de Neubauer

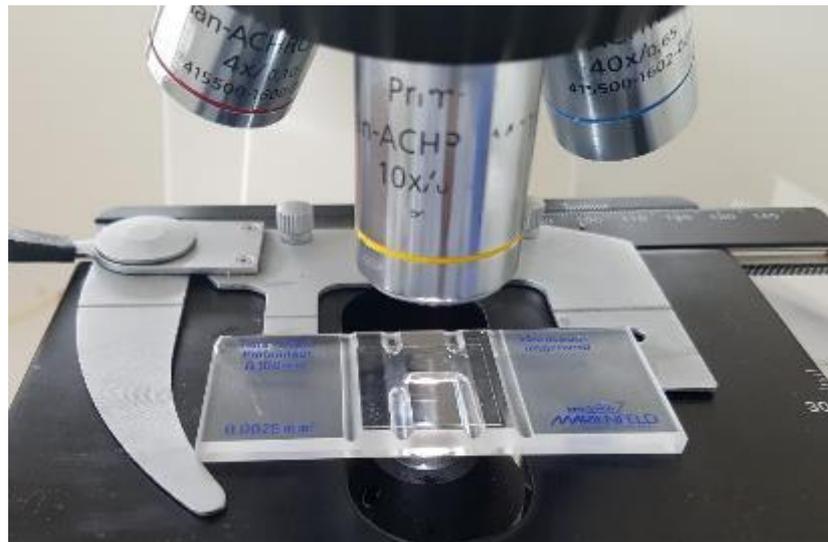


Figura N° 30: Conteo celular en 10x y 40X en el microscopio



Figura N° 31: Conteo de microalgas en el microscopio

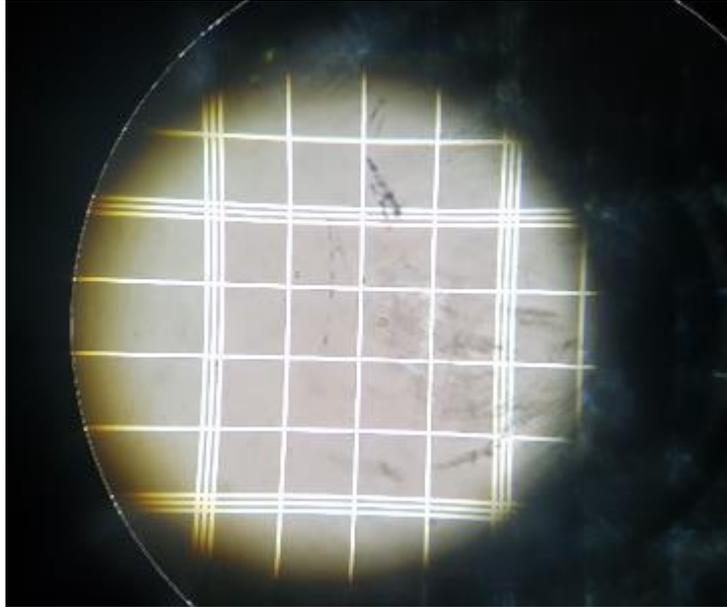


Figura N° 32: Primer día de muestra 1.0 en cámara de Neubauer.

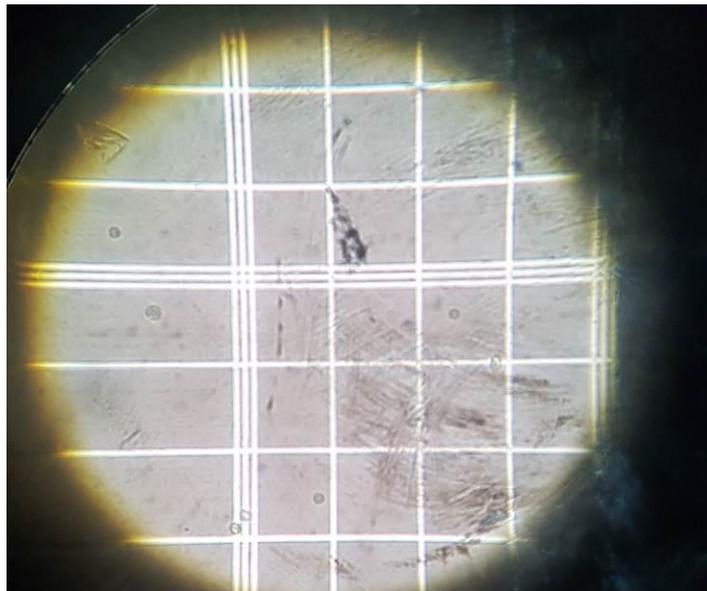


Figura N° 33: Primer día de muestra A – 20% en cámara de Neubauer.

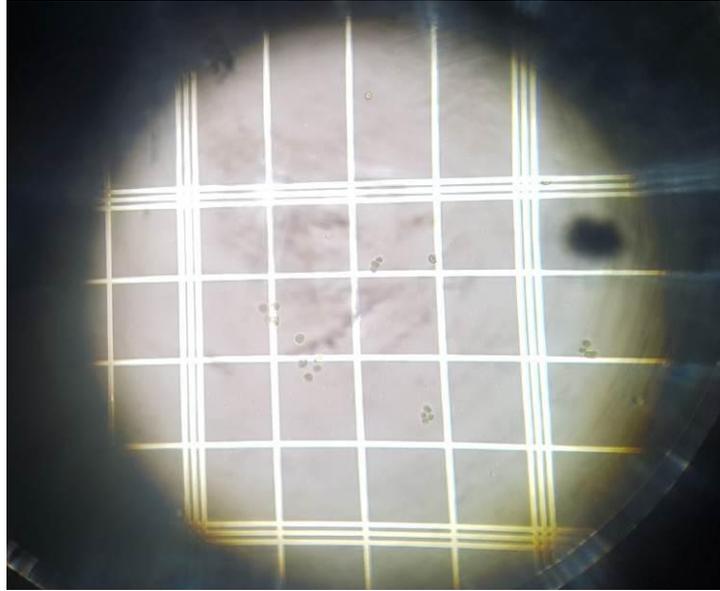


Figura N° 34: Primer día de muestra B – 40% en cámara de Neubauer.

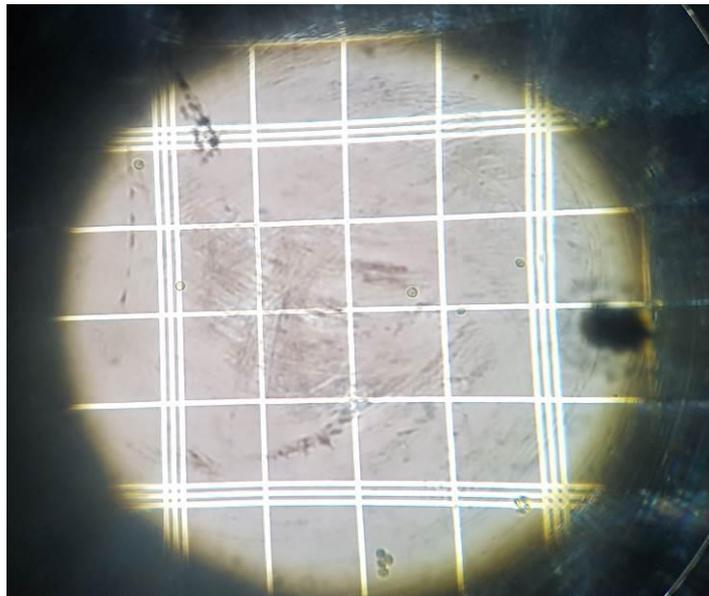


Figura N° 35: Primer día de muestra C – 60% en cámara de Neubauer.

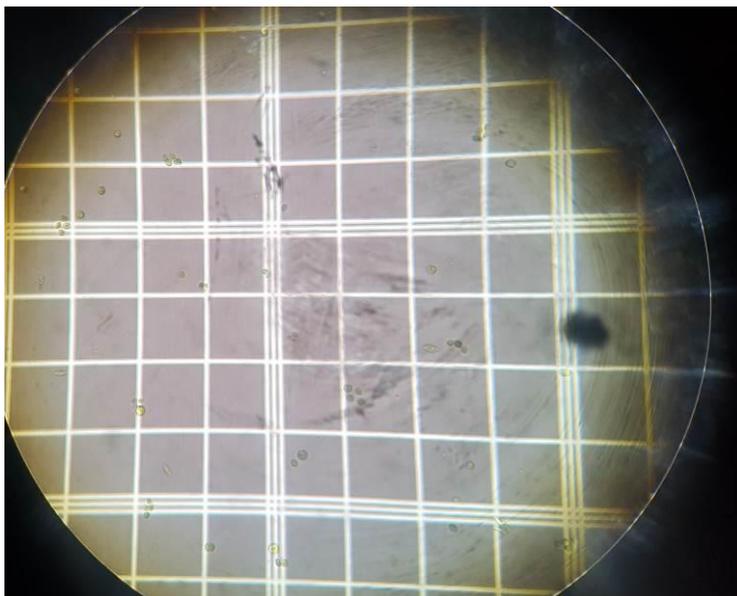


Figura N° 36: Primer día de muestra D – 80% en cámara de Neubauer.

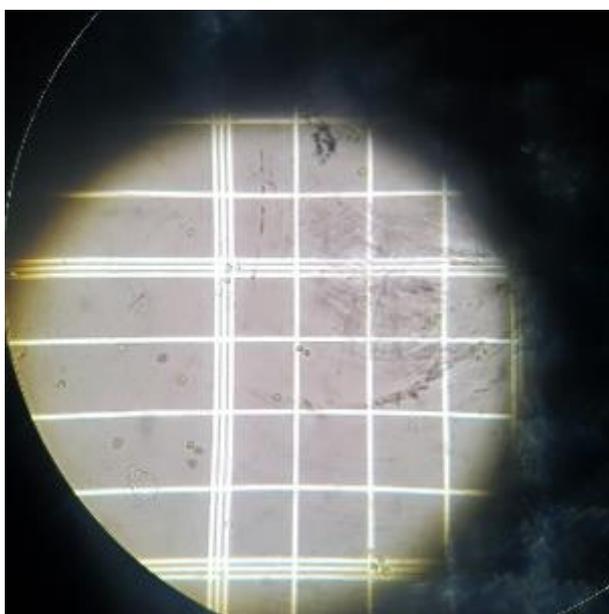


Figura N° 37: Primer día de muestra E – 100% en cámara de Neubauer.



Figura N° 38: Sistema de cultivo - día 04

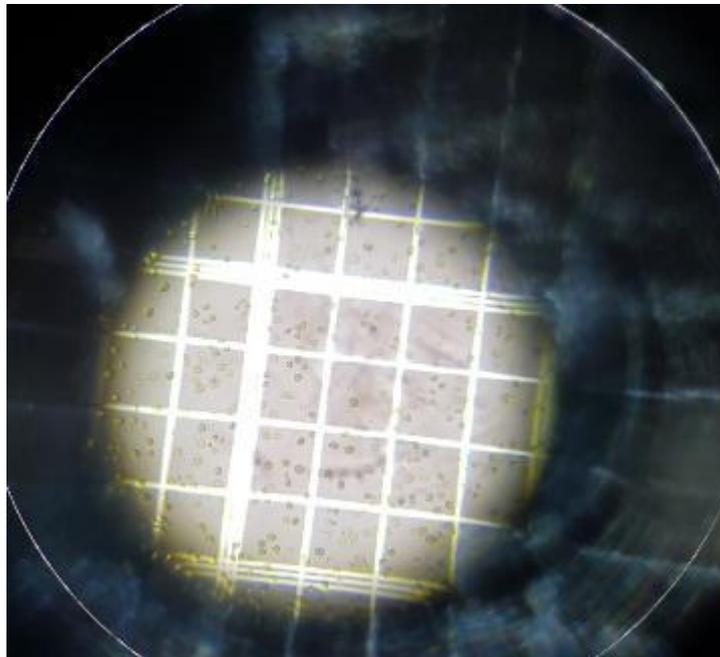


Figura N° 39: Día 8, conteo celular A – 20% en cámara de Neubauer.

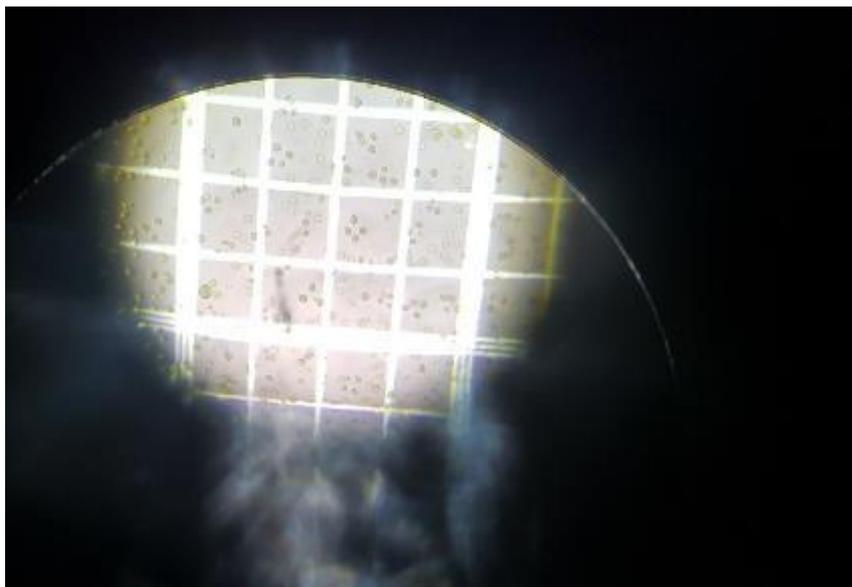


Figura N° 40: Día 8, conteo celular B – 40% en cámara de Neubauer.

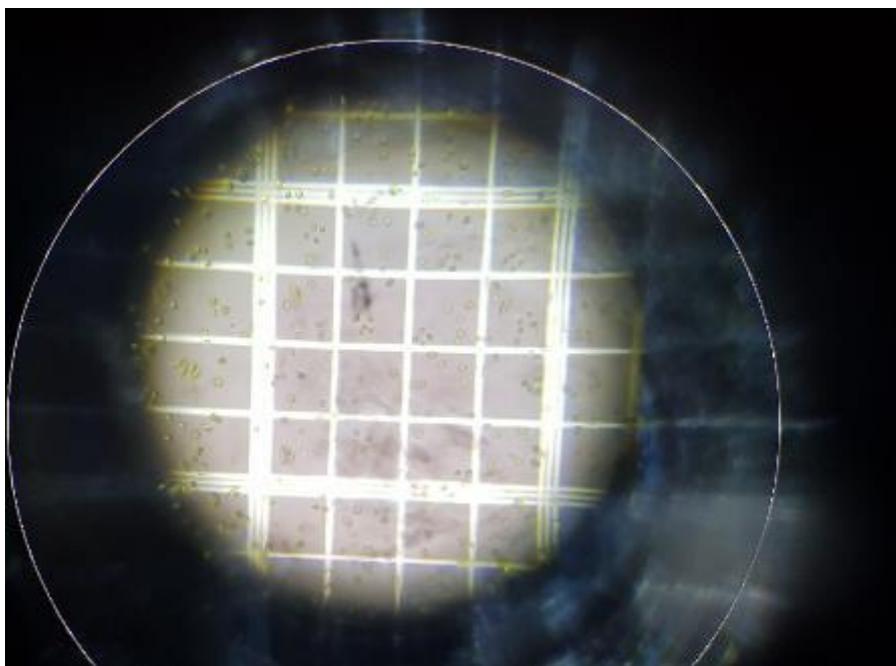


Figura N° 41: Día 8, conteo celular C – 60% en cámara de Neubauer.

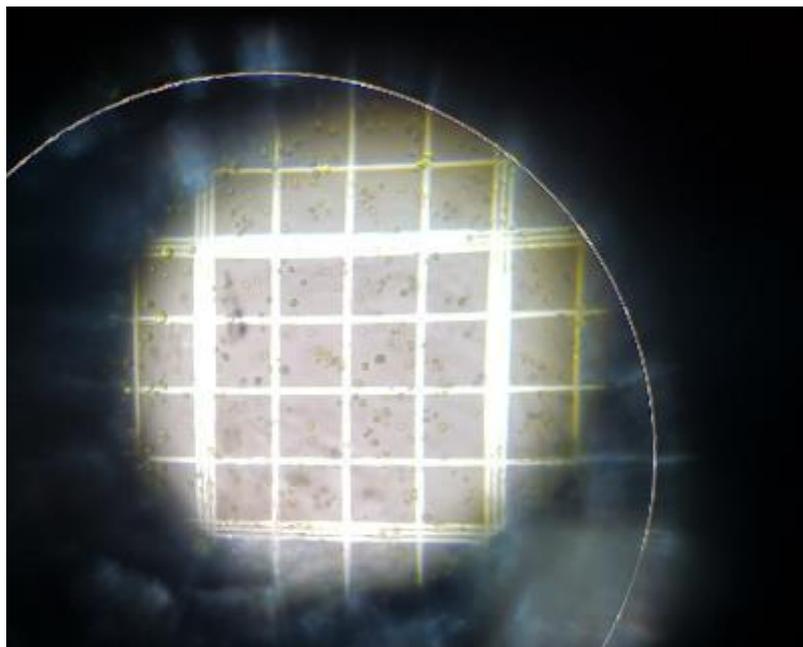


Figura N° 42: Día 8, conteo celular D – 80% en cámara de Neubauer.

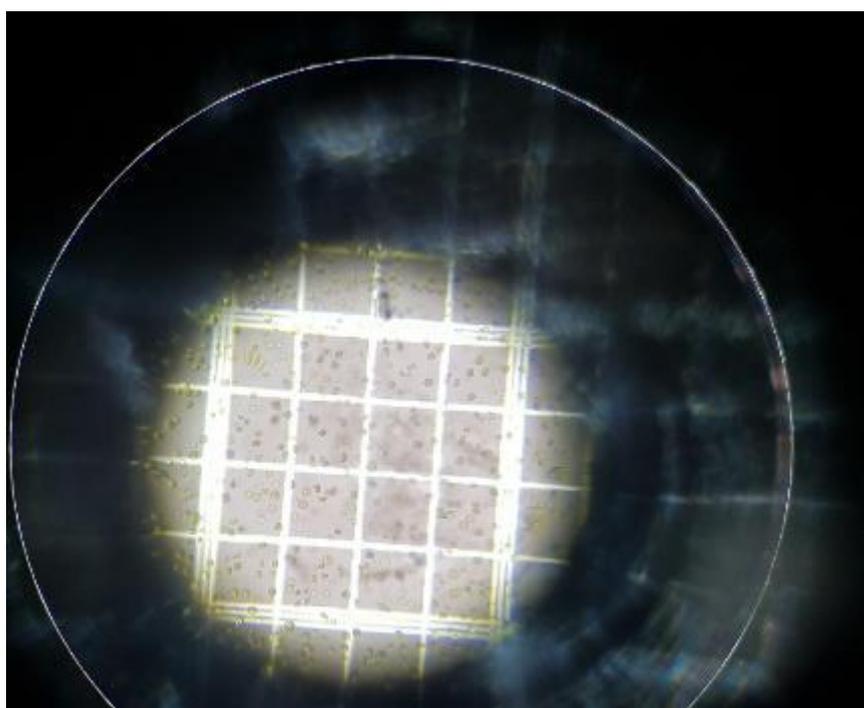


Figura N° 43: Día 8, conteo celular E – 100% en cámara de Neubauer.

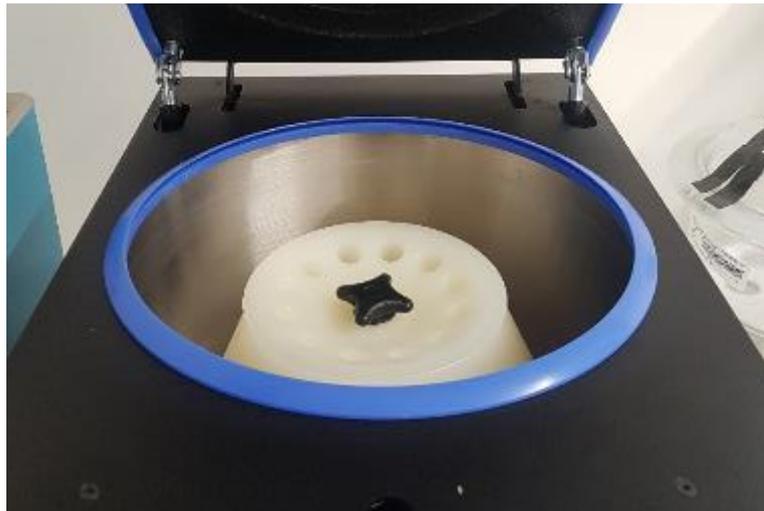


Figura N° 44: Centrifuga

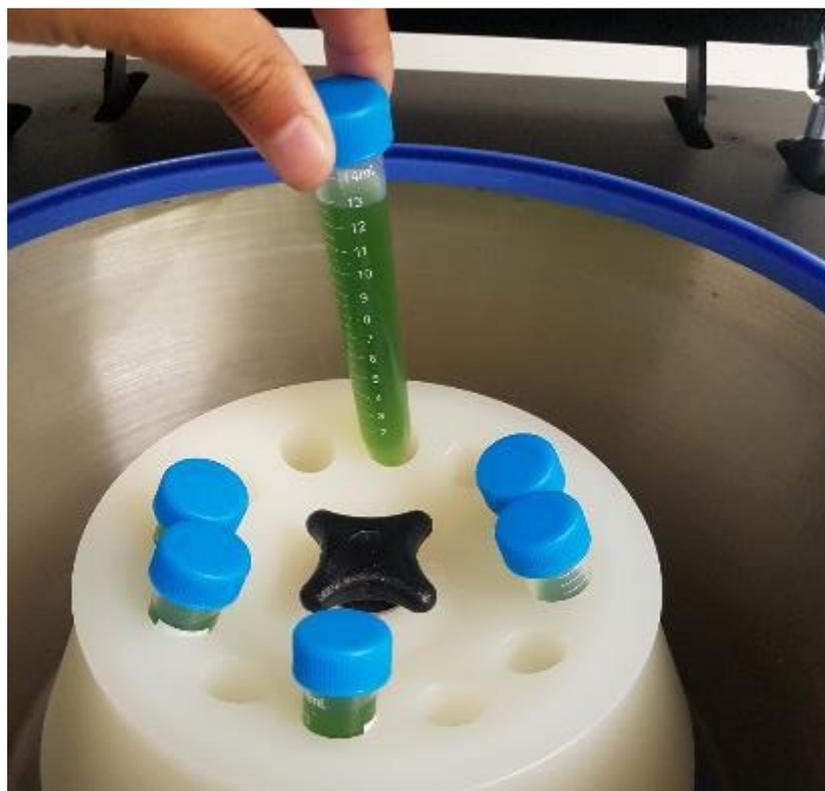


Figura N° 45: Centrifugación de muestras

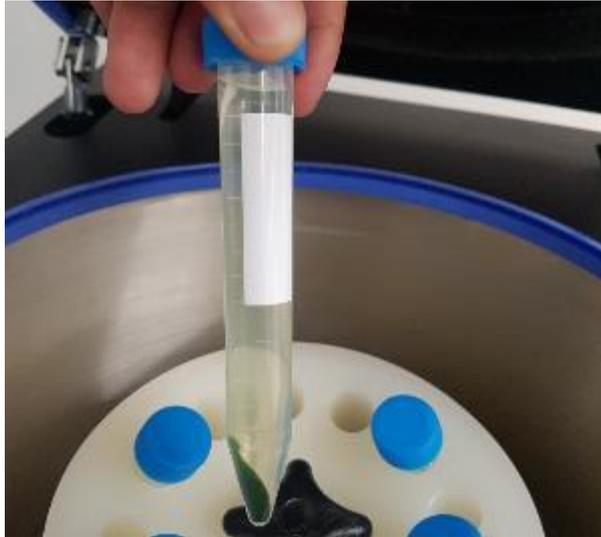
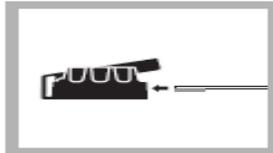
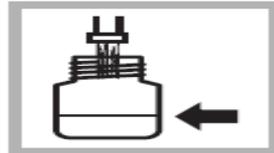


Figura N° 46: Separación de cultivo y efluente

Procedimiento de análisis de 0 a 500 ppb (0, 10, 25, 50, 100, 250, 500 ppb)



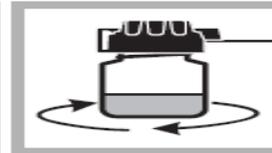
1. Introducir una tira de análisis en la tapa de manera que la almohadilla cubra el orificio pequeño por completo. Cerrar la parte superior de la tapa y presionar para que quede bien cerrada.



2. Llenar el frasco de reacción con muestra hasta la marca (50-mL).



3. Añadir a la muestra un sobre del reactivo en polvo N° 1 y un sobre del reactivo en polvo N° 2.



4. Tapar inmediatamente el frasco de reacción. Agitar, con rotación, para mezclar en forma continua durante 60 segundos. No sacudir ni invertir la muestra y evitar que toque la tira.

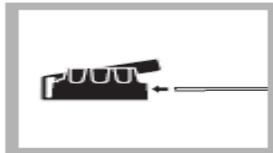


5. Esperar 20 minutos. Agitar, con rotación, para mezclar la solución 2 veces durante el período de reacción.

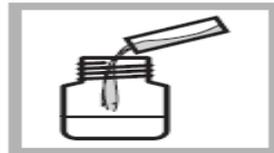


6. Retirar la tira de análisis y comparar inmediatamente el color manifestado con la tabla ubicada en el frasco de tiras de análisis (hilera de 0 a 500 ppb). Leer el resultado de las tiras a la sombra.

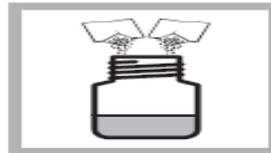
Procedimiento de análisis de 0 a 4000 ppb (0, 35, 75, 175, 500, 1500, 4000 ppb)



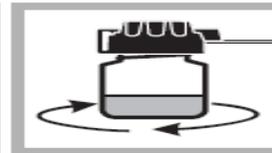
1. Introducir una tira de análisis en la tapa de manera que la almohadilla cubra el orificio pequeño por completo. Cerrar la parte superior de la tapa y presionar para que quede bien cerrada.



2. Llenar la cubeta cuadrada de medición hasta el tope con muestra (9,8-mL). Verter la muestra en el frasco de reacción.



3. Añadir a la muestra un sobre del reactivo en polvo N° 1 y un sobre del reactivo en polvo N° 2.



4. Tapar inmediatamente el frasco de reacción. Agitar, con rotación, para mezclar en forma continua durante 60 segundos. No sacudir ni invertir la muestra y evitar que toque la tira.



5. Esperar 20 minutos. Agitar, con rotación, para mezclar la solución 2 veces durante el período de reacción.



6. Retirar la tira de análisis y comparar inmediatamente el color manifestado con la tabla ubicada en el frasco de tiras de análisis (hilera de 0 a 4000 ppb). Leer el resultado de las tiras a la sombra.

Figura N° 47: Procedimiento de análisis de arsénico

Fuente: HACH Be

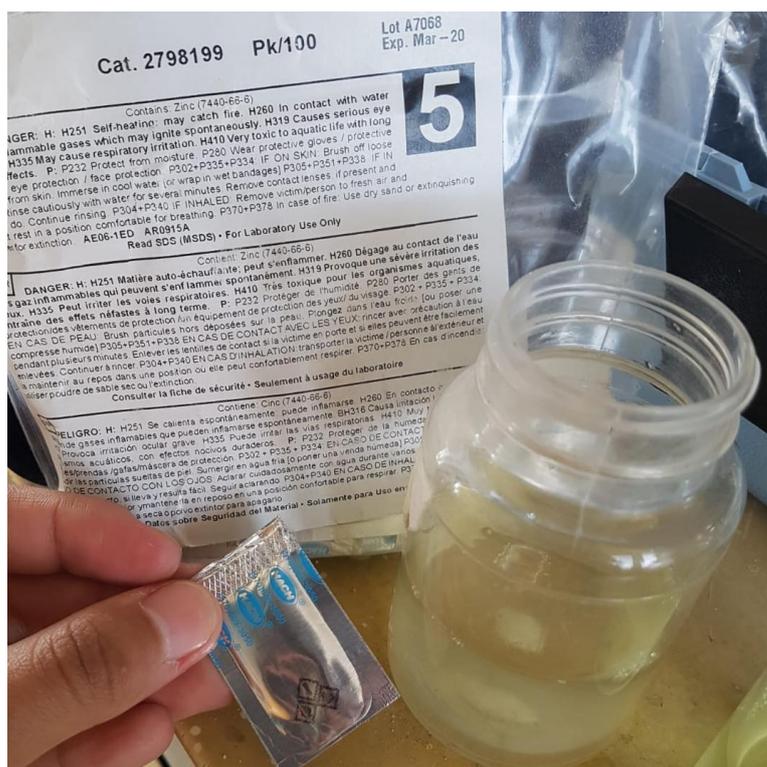


Figura N° 52: Reactivo N° 05: Etanol, Desnaturalizado.



Figura N° 53: Test Kit de Hach, tira de coloración



Figura N° 54: Fase final del proceso de analisis de arsénico



Figura N° 55: Resultados de coloración en las distintas concentraciones de arsénico en parte por billón.

Tabla 9: Densidad del promedio de células contadas en la cámara de Neubauer en la muestra control.

Código / Porcentaje	DENSIDAD
	MUESTRA 1.0
Día 1	0.8
Día 2	3.1
Día 3	5.4
Día 4	8.2
Día 5	12.1
Día 6	15.6
Día 7	20.32

Tabla 10: Densidad del promedio de células contadas en la cámara de Neubauer en la concentración de 20%

Código / Porcentaje	DENSIDAD		
	A1 - 20	A2 - 20	A3 - 20
Día 1	0.95×10^6	1.15×10^6	1.05×10^6
Día 2	2.7×10^6	2.9×10^6	1.25×10^6
Día 3	1.25×10^6	4.9×10^6	3.15×10^6
Día 4	9.9×10^6	8.4×10^6	5.7×10^6
Día 5	13.45×10^6	13.05×10^6	9.4×10^6
Día 6	16.95×10^6	16.9×10^6	14.2×10^6
Día 7	19.95×10^6	19.45×10^6	17×10^6
Día 8	28.7×10^6	30.75×10^6	27.6×10^6

Tabla 11: Densidad del promedio de células contadas en la cámara de Neubauer en la concentración de 40%

Código / Porcentaje	DENSIDAD		
	B1 - 40	B2 - 40	B3 - 40
Día 1	1.5×10^6	1.7×10^6	1.7×10^6
Día 2	2.5×10^6	3.45×10^6	2.85×10^6
Día 3	5×10^6	4.05×10^6	5.3×10^6
Día 4	7.6×10^6	7.45×10^6	8.25×10^6
Día 5	12.65×10^6	13.9×10^6	13.9×10^6
Día 6	16.4×10^6	17.1×10^6	16.9×10^6
Día 7	20.3×10^6	20.3×10^6	20.2×10^6
Día 8	26.9×10^6	28.55×10^6	28.9×10^6

Tabla 12: Densidad del promedio de células contadas en la cámara de Neubauer en la concentración de 60%

Código / Porcentaje	DENSIDAD		
	C1 - 60	C2 - 60	C3 - 60
Día 1	0.6×10^6	0.9×10^6	0.55×10^6
Día 2	2.55×10^6	4.2×10^6	2.45×10^6
Día 3	5.1×10^6	5.65×10^6	5.05×10^6
Día 4	7.7×10^6	8.15×10^6	7.6×10^6
Día 5	12.9×10^6	13.3×10^6	14.5×10^6
Día 6	16.9×10^6	16.15×10^6	16.7×10^6
Día 7	20.45×10^6	20.2×10^6	20.6×10^6
Día 8	30.1×10^6	27.15×10^6	30.2×10^6

Tabla 13: Densidad del promedio de células contadas en la cámara de Neubauer en la concentración de 80%

Código / Porcentaje	DENSIDAD		
	D1 - 80	D2 - 80	D3 - 80
Día 1	1.6×10^6	0.95×10^6	1.35×10^6
Día 2	2.65×10^6	2.75×10^6	4×10^6
Día 3	5.1×10^6	5.45×10^6	6.05×10^6
Día 4	7.35×10^6	7.85×10^6	8×10^6
Día 5	14.05×10^6	13.95×10^6	13.85×10^6
Día 6	16.6×10^6	16.8×10^6	15.9×10^6
Día 7	20.15×10^6	20.4×10^6	19.8×10^6
Día 8	26.3×10^6	29.6×10^6	28.7×10^6

Tabla 14: Densidad del promedio de células contadas en la cámara de Neubauer en la concentración de 100%

Código / Porcentaje	DENSIDAD		
	E1 - 100	E2 - 100	E3 - 100
Día 1	2×10^6	1.2×10^6	1.55×10^6
Día 2	2.65×10^6	2.2×10^6	3.3×10^6
Día 3	5.15×10^6	4.7×10^6	5.45×10^6
Día 4	8.15×10^6	7.1×10^6	8.4×10^6
Día 5	14.3×10^6	13.05×10^6	13.65×10^6
Día 6	17.1×10^6	15.7×10^6	16.7×10^6
Día 7	20.5×10^6	19.55×10^6	21.3×10^6
Día 8	30.5×10^6	26.95×10^6	29.6×10^6

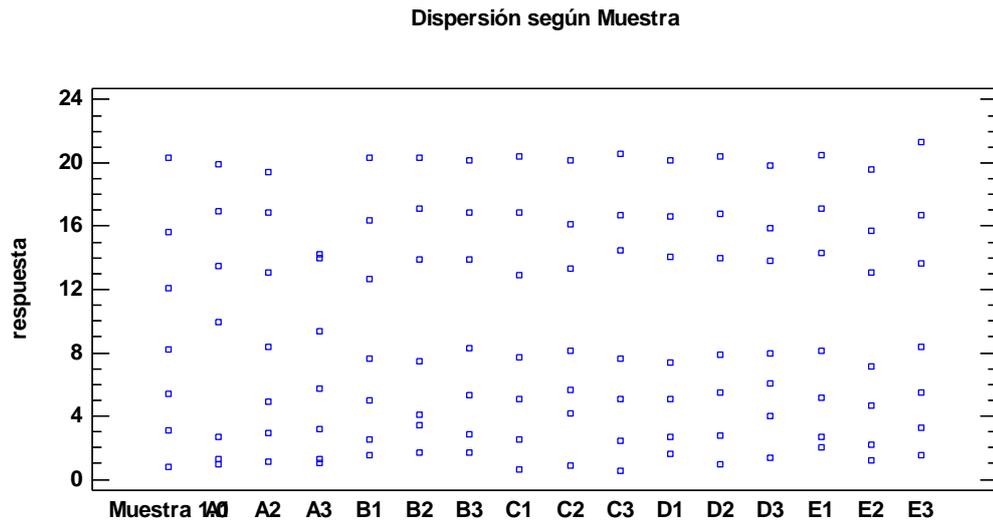


Figura 56: Dispersión de las densidades de las muestras

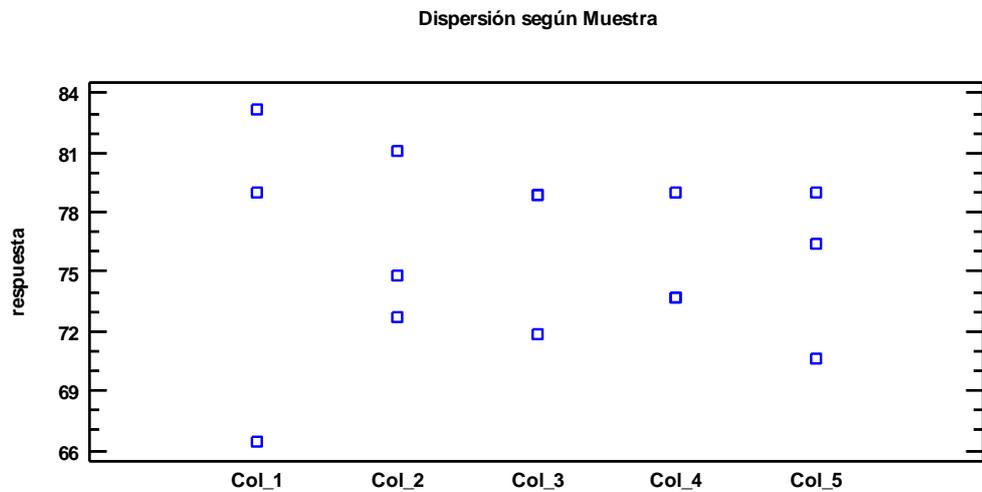


Figura 57: Dispersión de los resultados de remoción de arsénico en los 5 tratamientos.