

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA**

**ESCUELA DE POSTGRADO**

**MAESTRÍA EN GESTIÓN AMBIENTAL**



EFFECTO DEL CULTIVO DE LA MICROALGA *Scenedesmus acutus* EN LA  
REMOCIÓN DE NUTRIENTES Y CARGA BACTERIANA A DIFERENTES  
DILUCIONES DE AGUAS RESIDUALES MUNICIPALES DEL DISTRITO DE  
CHIMBOTE – ANCASH

Tesis para optar el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS EN GESTIÓN AMBIENTAL**

**AUTOR:** Bach. José Antonio MONZÓN MENDOZA

**ASESOR:** Dr. Walter Eduardo REYES AVALOS

Nuevo Chimbote – Perú

2016

## DEDICATORIA

La concepción de este proyecto está dedicada a mi madre Pilar fundamental en mi vida. Sin ella, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ella el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para mis hermanos y familia en general. También dedico este proyecto a mi esposa, Mi Naranjita, compañera inseparable de cada jornada y lucha diaria. Ella representó y representa el gran esfuerzo y tesón en momentos de decline y cansancio. A ellos este proyecto, que, sin ellos, no hubiese podido ser.

## **AGRADECIMIENTO**

En primer lugar, a Dios por haberme guiado por el camino de la felicidad, porque ha estado y está conmigo en cada paso que doy, cuidándome y dándome salud, fortaleza y pundonor para continuar en este mundo de lucha diaria, llamada vida; en segundo lugar, a mi madre y a cada uno de los que son parte de mi familia, a mis hermanos, a mi esposa y a mis hijos que fueron y son el motor de mi vida; a todos ellos, por siempre haberme dado su fuerza y apoyo incondicional que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

Por último, a mis profesores a quienes les debo gran parte de mis conocimientos, gracias a su paciencia y enseñanza y, finalmente un eterno agradecimiento a esta prestigiosa Universidad por la oportunidad de prepararme para un futuro competitivo y formándome como persona de bien; a mi asesor de tesis quién me guio y ayudó en todo momento.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
CAPÍTULO I.....	10
1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	10
1.1. Planteamiento y fundamentación del problema de investigación.....	10
1.2 Antecedentes de la Investigación.....	12
1.3 Formulación del problema de investigación.....	19
1.4 Delimitación del estudio.....	19
1.5 Justificación e importancia de la investigación.....	19
1.6 Objetivos de la investigación.....	21
CAPÍTULO II.....	23
2. MARCO TEÓRICO.....	23
2.1.Fundamentos teóricos de la investigación.....	23
2.2. Marco conceptual.....	27

CAPÍTULO III.....	29
3 MARCO METODOLÓGICO.....	29
3.1 Hipotesis central de la investigación.....	29
3.2 Variables e indicadores de la investigación.....	29
3.2.1 Variables.....	29
3.2.2 Indicadores.....	29
3.3 Metodo de la investigación.....	29
3.4 Diseño o esquema de investigación.....	30
3.5 Población y muestra.....	30
3.6 Actividades del proceso investigativo.....	30
3.7 Tecnicas e instrumentos de la investigación.....	31
3.7.1 Medio de cultivo HM.....	31
3.7.2 Efluentes municipales.....	31
3.7.3 Inóculo.....	34
3.7.4 Sistemas de cultivo de <i>Sc. acutus</i> en laboratorio.....	34
3.8 Procedimientos para la recolección de datos.....	35
3.8.1 Registro de los parametros ambientales del cultivo.....	35
3.8.2 Determinación del crecimiento poblacional.....	35
3.8.3 Determinación de los nutrientes N, P y DBO <sub>5</sub> .....	36
3.8.4 Determinación de la carga bacteriana (coliformes totales y fecales).....	36
3.8.5 Determinación de la tasa de remoción N, P y coliformes totales y fecales.	37

3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	37
CAPÍTULO IV.....	38
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1 Resultados.....	38
4.2 Discusión.....	45
CAPÍTULO V.....	56
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1 Conclusiones.....	56
5.2 Recomendaciones.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXOS.....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio HM.	31
Tabla 2. Composición química y microbiológica del efluente municipal utilizado en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> .	33
Tabla 3. Distribución de los componentes utilizados en el cultivo de <i>Sc acutus</i> con diferentes diluciones de aguas residuales municipales tratadas.	35
Tabla 4. Valores promedios del crecimiento poblacional ( $\times 10^4$ cel mL <sup>-1</sup> ) de <i>Sc. acutus</i> dosificados con aguas residuales municipales.	38
Tabla 5. Valores porcentuales de la incidencia de cenobios de 4 y 8 células de <i>Sc. acutus</i> cultivadas con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales.	40
Tabla 6. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) del cultivo de <i>Sc. acutus</i> en el día 6.	41
Tabla 7. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) del cultivo de <i>Sc. acutus</i> en el día 7.	41
Tabla 8. Valores promedios diarios del pH de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> en agua residual municipal.	43
Tabla 9. Concentraciones de N y P de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> utilizando efluente municipal.	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Zona de recolección de aguas residuales de la desembocadura frente a Miramar bajo, distrito de Chimbote.	32
Figura 2. Desembocadura de aguas residuales frente a Miramar bajo, distrito de Chimbote.	32
Figura 3. Análisis físico-químico (temperatura y pH) de las aguas residuales municipales <i>in situ</i> frente a Miramar bajo, distrito de Chimbote.	33
Figura 4. Sistema de cultivo de la microalga <i>Sc. acutus</i> .	34
Figura 5. Crecimiento poblacional de <i>Sc. acutus</i> cultivados con diferentes diluciones de aguas residuales municipales de Chimbote.	39
Figura 6. Variación de la temperatura de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> dosificados con aguas residuales municipales.	42
Figura 7. Variaciones del pH de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> dosificados con aguas residuales municipales.	43



## Resumen

Se evaluó el efecto de efluentes municipales en el crecimiento de la microalga *Scenedesmus acutus* así como la capacidad de asimilar nutrientes (N y P), la generación de oxígeno y la reducción de la carga bacteriana presente en dicho efluente. Las tasas de crecimiento más altas fueron determinadas en diluciones de 60% en el día seis y 80% en el día siete con valores de 0,5074 y 0,4349, respectivamente, en comparación con los controles que alcanzaron valores de 0,2696 el día siete. La generación de oxígeno fotosintético elimina o reduce en gran medida la población bacteriana, especialmente los coliformes fecales de 130 000 a menos de 1,8 MPN mL<sup>-1</sup> estimado en 99,99% de tasa de eliminación. En cuanto a los altos valores iniciales de la DBO (60 mg L<sup>-1</sup>) y COD (36 mg L<sup>-1</sup>), debido a procesos de degradación de materia orgánica presentes en el efluente municipal, llagan a ser insignificantes debido al oxígeno fotosintético producido (9,5 mg L<sup>-1</sup>) durante el crecimiento de *Sc. acutus*. También, pese a las bajas concentraciones de nitrógeno y fósforo en el efluente, los mayores crecimientos observados pueden deberse al uso de las sustancias químicas liberados por bacterias muertas y que las algas las utilizan como fuentes de nitrógeno y carbono orgánicos, considerándose a los cultivos *Sc. acutus* como un excelente método para tratar aguas residuales municipales.

Palabras clave: *Scenedesmus acutus*, cenobios, crecimiento algal, efluentes municipales.

## Abstract

The effect of municipal effluents growth microalga *Scenedesmus acutus* well as the ability to remove nutrient, oxygen generation and reducing the bacterial load present in such effluent was evaluated. The highest rates of growth were determined in dilutions of 60% on day 6 and 80% in the seven days with values of 0,5074 and 0,4349, respectively, compared to the controls reached values of 0,2696 on day 7. The generation of photosynthetic oxygen removed and or greatly reduces the bacterial population, especially fecal coliforms of 130 000 to less than 1,8 MPN/mL estimated at 99,99% removal rate. Regarding high BOD ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) and COD ( $36 \text{ mg L}^{-1}$ ) due to degradation processes of organic matter present in municipal effluent, are negligible for the photosynthetic oxygen produced ( $9,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) during growth of *Sc. Acutus*. Also, despite the low concentrations of nitrogen and phosphate in the effluent, the highest growth observed may be due to use of the chemicals released by dead bacteria and algae used as sources of nitrogen and organic carbon, by what arises crops *Sc. acutus* as an excellent method to treat municipal wastewater.

Keywords: *Scenedesmus acutus*, cenobio, algal growth, municipal effluents.

## CAPÍTULO I

### PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1. Planteamiento y fundamentación del problema de investigación

La Organización Mundial de la Salud considera que en América Latina sólo el 10 % de las aguas residuales colectadas en alcantarillados reciben algún tratamiento antes de ser dispuestas en los cuerpos de agua, tales como ríos y mares, representando alrededor de  $400 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  de desagües contaminantes que constituye importante vector en la transmisión de parásitos, bacterias y virus patógenos (WHO/EMRO, 1987). Asimismo, como consecuencia de la escasez de agua, Bartone (1990), menciona el uso de aguas residuales en la agricultura, estimado en cerca de 500 000 ha, ocasionan problemas de salud y de contaminación ambiental, requiriéndose incrementar el tratamiento y tecnificar su reúso, mediante protocolos sanitarios, con fines agrícolas que permitiría ampliar la frontera agrícola, especialmente en zonas desérticas (Moscoso & Flórez, 1991), con los beneficios de producción de biomasa algal destinado a la obtención de sustancias químicas de interés económico (proteínas, lípidos, pigmentos, etc.) y creación de puestos de trabajo.

En el Perú, especialmente en Lima, existen 41 plantas de tratamiento de aguas residuales que procesan alrededor de  $3,18 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ , que representa el 17 % del total de emisiones de efluentes, cuyo total estimado es de  $18,85 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  y que se dejan de tratar aproximadamente  $15,67 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  que representa importante fuente de contaminación del ambiente acuático (Moscoso, 2011).

En Chimbote, se estima que 37% de las aguas residuales son tratadas en las denominadas “lagunas de oxidación” (Las Gaviotas, Villa María y Laguna Centro Sur A) que obviamente no es suficiente, por eso son vertidas, sin tratamiento alguno a la bahía “El Ferrol”, cuyas emisiones han aumentado desde  $0,17 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  en 1981 a  $0,45 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  en 1998, y en mayo del 2005 se reportó  $0,50 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ , (IGA-EPS, 2006). Esta situación amerita la aplicación de alguna medida de control o remediación por las implicancias negativas en la salubridad del ambiente acuático y la salud de la población.

En agua residuales de lagunas de estabilización, Moscoso (1999), refiere que la presencia de una gran biomasa de algas azul verdes o cianobacterias conforman entre el 90 % y 95 % de las algas existentes, lo que podría explicar la reducción de las algas verdes y flageladas que normalmente conforman el fitoplancton que al concentrarse en la superficie, limitan la penetración de luz al resto de la columna de agua; sin embargo, las algas verdes (*Scenedesmus*, *Chlorella* y *Ankistrodesmus*) y las flageladas (*Chlamydomonas*) son las especies dominantes.

La presencia de diferentes microalgas en aguas contaminadas es un indicador biológico que refleja el estado en el que se encuentra dicho ambiente, ya que la presencia de diferentes elementos químicos permite su establecimiento y crecimiento poblacional; en tal sentido la presencia y desarrollo de *Scenedesmus* sp con agua residual filtrada sugiere la expresión de una estrategia fisiológica, aun en presencia de otros microorganismos asociados, por lo que se les puede utilizar eficientemente en la remoción de nutrientes de aguas residuales a aire libre (Bich *et al.*, 1999). El tratamiento de aguas residuales mediante el uso de microalgas implica la generación de biomasa algal y la obtención de efluentes de adecuada calidad para fines agrícolas, adicionalmente, la generación de oxígeno fotosintético favorecerá la regeneración de otros sustratos elementales en el agua.

La principal ventaja de las microalgas, especialmente *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, utilizadas en el tratamiento de aguas residuales urbanas es su gran capacidad de asimilación de elementos contaminantes, llegando a remover nitrógeno y fosfato, entre 44,0 % y 48,7 %; y con una DQO entre 54,8 % y 55,8 % en condiciones al aire libre (Chacón *et al.*, 2006).

Las aguas residuales contienen una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos que permiten sostener el metabolismo de microalgas y que la producción de oxígeno fotosintético incorpora compuestos residuales de oxidación al medio acuático, con lo que se genera un proceso depurativo eficaz (Khowaja, 2000; Riquelme & Avendaño, 2003).

## **1.2. Antecedentes de la investigación**

Las aguas residuales domésticas, por su volumen y contenido de compuestos de nitrógeno y fósforo, organismos patógenos (parásitos, bacterias y virus) y otras sustancias, afectan la calidad de los cuerpos receptores (ríos, lagos, acuíferos, aguas costeras y otros) y por ende la salud de la vida acuática y terrestre. El tratamiento de estas aguas depende de las condiciones locales y necesidades de cada población, donde se aplica conocimientos científicos y legales (Metcalf & Eddy, 1995), de tal manera que se logre proteger a los cuerpos de agua receptores y su ecosistema, y que mitiguen el impacto negativo al medio ambiente (Mara, 2004).

En las grandes ciudades donde coexisten viviendas, fábricas, oficinas y diversos servicios, se aplican tratamientos a las aguas del sistema de alcantarillado, aguas residuales industriales y agua de lluvia, mediante la aplicación de lodos activados (proceso biológico) en la mayoría de las plantas de tratamiento de agua residual doméstica, y en pozas de oxidación, como alternativa a pequeña escala (Crites & Tchobanoglous, 2000).

La contaminación del agua es más dramática debido a la predominancia de sistemas de alcantarillado combinados (aguas residuales domésticas con aguas lluvias) y la potencial mezcla con aguas residuales industriales aportadores de constituyentes no convencionales (orgánicos refractarios, orgánicos volátiles, tensoactivos, metales, sólidos disueltos) o emergentes (medicinas, detergentes sintéticos, antibióticos veterinarios y humanos, hormonas y esteroides, etc.), en la que los riesgos asociados con estas últimas sustancias constituyen la mayor amenaza para la salud pública a largo plazo y de más difícil manejo que el riesgo causado por los agentes patógenos (Mara & Carnicross, 1990; Metcalf & Eddy, 2003). Esta situación es más complicada por cuanto las descargas de las aguas residuales directamente, sin considerar las condiciones del medio donde se vierten (suelo, ríos, lagos y mares), es el método de evacuación más común en la mayoría de ciudades de los países pobres sin respetar las regulaciones municipales o los estándares de calidad para el agua de riego, constituyendo problemas ambientales y riesgos para la salud (Von Sperling, 1996).

Las aguas residuales son ricas en una amplia gama de compuestos orgánicos e inorgánicos, que permiten sostener el metabolismo de ciertos microorganismos fotosintéticos y donde la digestión aerobia de la materia orgánica, mediada por bacterias se mantienen gracias al oxígeno producido por la microalgas, las cuales incorporan los compuestos residuales de oxidación y generan un proceso depurativo eficaz (Khowaja, 2000; Riquelme & Avendaño, 2003).

Las microalgas tienen la capacidad de biotransformar cantidades apreciables de nitrógeno y fósforo durante su crecimiento (Kwang-Yong & Choul-Gyun, 2002), eliminan y/o reducen microorganismos patógenos, metales pesados y compuestos orgánicos tóxicos mediante procesos aerobios y anaerobios (Choonawala & Swalaha, 2002; Hanuk & Choul-Gyun, 2002). El uso de microalgas, como biosistema alternativo, en el tratamiento de las aguas residuales, se debe a que absorben metales y aceleran la inactivación de bacterias patógenas durante su crecimiento (Abalde *et al.*, 1995; Lau *et al.*, 1995; Tam & Wong, 2001).

Las microalgas son generalmente organismos autótrofos, es decir, que obtienen la energía de la luz solar y se desarrollan a partir de materia orgánica; sin embargo, algunas especies son capaces de crecer en compuestos orgánicos como fuente de energía o de carbono (Basurto, 1994; Merino, 1999; Sheets *et al.*, 2014) y son susceptibles de ser cultivadas masivamente al aire libre. Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como algunas especies del grupo de las cianobacterias, se usan en el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, donde destacan las provenientes de plantas de tratamiento convencionales (Lavoie & De la Noüe, 1985; Tam & Wong, 1989), de origen industrial (González *et al.*, 1997), y las derivadas de excretas animales (Baumgarten *et al.*, 1999). Las microalgas, ofrecen información sobre la calidad del agua y son indicadores ecológicos que destacan por su sensibilidad a los efluentes industriales (Gómez & Ramírez, 2004) y la capacidad de degradar contaminantes orgánicos, así como oxidar estos compuestos a CO<sub>2</sub> (Pieper & Reineke, 2000).

También se han desarrollado sistemas de tratamientos de aguas con microalgas para la producción de biomasa y metano (Ugwu & Aoyagi, 2008); sin embargo, este

sistema no ha prosperado debido a la gran superficie de terreno que necesita y a la utilización de otros sistemas de tratamiento como el de lodos activados (MALGAS, 2014). Asimismo, Moscoso & Flórez (1991), consideran que el tratamiento de las aguas residuales municipales para su aprovechamiento en actividades agropecuarias está contribuyendo a elevar la cobertura del tratamiento de las aguas residuales en América Latina, por medio de tecnologías apropiadas para la remoción de organismos patógenos y de materia orgánica.

Hutchins *et al.* (1986), sostienen que los métodos biológicos son más eficientes, rápidos y económicos que los métodos químicos y pueden aplicarse a aguas residuales con bajas concentraciones de iones metálicos; asimismo, los métodos biológicos minimizan la generación de desechos tóxicos y permiten la recuperación del metal, lo que significa un ahorro económico (Wase & Foster, 1997). Estos métodos se realizan en el sitio de contaminación y causan el mínimo de alteración alrededor del área tratada, a diferencia de los métodos químicos que provocan gran cantidad de residuos después del tratamiento (Volesky, 1999).

En los problemas de contaminación ambiental y reciclaje de residuos, se comprueba que las microalgas desempeñan un papel importante en la transformación de la materia orgánica e inorgánica de las aguas residuales en biomasa y agua tratada que se utiliza para riego (Shelef *et al.*, 1978).

Además, las microalgas son cultivadas bajo condiciones de iluminación solar o artificial en el caso de microalgas autótrofas y en la oscuridad en especies de metabolismo heterótrofo, aunque la mayoría de las producciones en masa son bajo condiciones fotosintéticas. Especies con metabolismo heterótrofo en completa oscuridad, utilizan el carbono orgánico como fuente energética (Vera & González, 2001; Brennan & Owende, 2010; Singh *et al.* (2011).

Desde el punto de vista de la nutrición heterotrófica de las microalgas, Andrade *et al.* (2009), evaluaron el crecimiento, remoción de nutrientes y materia orgánica, por la microalga *Scenedesmus* sp en aguas residuales provenientes de restos del procesamiento de pescados, y reportan eficiencias de remoción de 94,44 % para amoníaco, de 77,54 % para fosfatos y de 35,59 % para materia orgánica; y la

biomasa seca microalgal presentó 24,41 % de proteína y niveles de grasa de 2,47 %, la que podría ser complemento de la nutrición animal. De igual manera, Méndez *et al.* (2010), evaluaron el crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales diluidos al 25 %, 50 % y 75% y demostraron disminución de amoníaco, fósforo, fósforo total, DBO<sub>5</sub> y DQO, lo que confirma la efectividad de la microalga en la remoción de nutrientes en aguas residuales de naturaleza orgánica.

Asimismo, Romero (2011), demostró que los cultivos de *Chlorella* sp en residuos orgánicos pesqueros bajo adecuadas condiciones de luz y temperatura disminuye la DBO de 95 % a 85 %. Zhang *et al.* (2012) logró la eliminación completa del nitrógeno amoniacal y de fósforo procedente de efluentes domésticos secundarios, mediante el cultivo de *Chlorella* sp aislada de las aguas residuales municipales e inmovilizado en alginato de calcio.

Sáenz *et al.* (2003) demostraron la reducción del impacto en el sistema acuático receptor al evaluar la fitotoxicidad de efluentes industriales sobre las clorofitas *Sc. quadricauda* y *Raphidocelis subcapitata*. Asimismo, *Sc. acutus* acumula más lípidos cuando es cultivada en agua residual contaminada y la biomasa se incrementa en relación directa con la concentración de nutrientes (Sacristán *et al.*, 2014).

Los cultivos masivos de microalgas se realizan en zonas no aptas para los cultivos tradicionales y alcanzan altas tasas de crecimiento (0,5 a 1,2 d<sup>-1</sup>) (Chisti, 2007; Flynn *et al.*, 2010); sin embargo, sus altos costos debido al uso de agua no contaminada, fertilizantes e inyección de CO<sub>2</sub> reducen su atractivo como tecnología (Chen *et al.*, 2011), por lo que el uso de aguas residuales municipales, agrícolas y ganaderos son alternativas de cultivo para minimizar estos inconvenientes. La integración de los efluentes industriales y/o municipales y los cultivos de microalgas posibilita la obtención de un efluente de alta calidad y lo más importante es generar biomasa algal útil para producir biodiesel o biogás (Sydney *et al.*, 2011).

El cultivo de *Scenedesmus* sp como una alternativa para tratar biológicamente aguas negras con alto contenido de materia orgánica y efluentes cloacales (Chacón *et al.*, 2006), posibilita la obtención de subproductos con un costo de producción bajo. (Romero *et al.*, 2001; Romero *et al.*, 2000; Suárez & Romero, 1990; Suárez *et*



*al.*, 1992; Olvera *et al.*, 2000). Las microalgas crecen en aguas residuales municipales porque utilizan los elementos químicos que contienen y reducen la carga bacteriana anaeróbica, lo que permite reducir los impactos ambientales negativos que actualmente ocasionan estos efluentes.

La presencia y persistencia de la flora bacteriana propia de los efluentes municipales muestran rápida reacción a los cambios de pH y de oxígeno; en tal sentido, el bajo oxígeno disuelto (0,50 mg/L de O<sub>2</sub>) encontrado en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, y el pH disminuido (7,87) influyen en la proliferación de bacterias productoras de sulfuro. A través de un ensayo se obtuvo una baja del 99% en los valores del sulfuro en los cultivos con la microalga *Scenedesmus quadricauda* respecto al valor inicial del agua residual (1,645 mg/L sulfuro) (Méndez *et al.*, 2010); demostrando que la inoculación microalgal resultó ser efectiva en la generación del oxígeno necesario para la presencia de bacterias aeróbicas que degradan la materia orgánica (Oswald, 1988).

Algunas especies de algas, tales como los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Spirulina*, tienen aspectos beneficiosos para los animales, mejoran la respuesta inmune, la infertilidad, el control de peso, producen una piel más sana y un pelo brillante (Spolaore *et al.*, 2006; Brennan & Owende 2010; Mendoza *et al.*, 2011).

Los géneros *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium*, *Golenkinia*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Spirulina*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium* han sido registrados en aguas residuales desde distintas procedencias (Borowitzka 1999; Rawat *et al.*, 2011; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Varias de éstas son comercialmente interesantes para la alimentación humana y/o animal, la obtención de biocombustibles, aceites esenciales, pigmentos, entre otros usos (Borowitzka 1999, Harun *et al.*, (2010).

Park *et al.* (2011), mencionan que, las microalgas en un cultivo para fitorremediación deben cumplir con 3 condiciones: alta tasa de crecimiento; alta tolerancia a la variación estacional y diurna si es un sistema abierto; y buena capacidad para formar agregados para una cosecha por simple gravedad. Así mismo, Martínez (2008), Park *et al.*, (2011) y Abdel-Raouf *et al.*, (2012) aducen que

los altos niveles de componentes celulares valiosos (por ejemplo, lípidos para generación de biodiesel) también podrían ser deseables.

Sin embargo, en el caso de *Scenedesmus*, por las condiciones de cultivo pueden formar varias células en múltiplo de 2 en un proceso conocido como autoproliferación. El proceso de multiplicación, las células crecen y se dividen en función exponencial del tiempo, en este periodo ningún nutriente ni la luz son factores limitantes para la multiplicación de las células (Lee & Shen (2004); Becker (1994) y Romo (2002) manifestó que para comprender de mejor manera los sistemas de cultivo, en primera instancia se debe conocer los conceptos del ciclo de crecimiento en las microalgas, lo cual está caracterizado por presentar distintas fases como: Fase Lag o fase de adaptación, fase Log o fase exponencial, fase de declinación relativa de crecimiento y la fase estacionaria; que obviamente por razones de incrementos poblacionales o de generación de biomasa algal, la fase del crecimiento logarítmico es la más importante.

*Scenedesmus* sp puede encontrarse solitaria o en parejas formando cenobios; así mismo, tiene la capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en las aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada y capacidad de resistir variaciones ambientales lo que la hacen sobrevivir y ser un género común de aguas residuales (Andrade *et al.*, 2009).

*Scenedesmus* sp Posee de 2 a 4 cenobios, dispuestos en línea o en forma alterna (zig-zag), con las células arregladas en 1 o 2 filas. Células de color verde, de 3-5µm de ancho, 11-16µm de largo y forma de huso. Esta especie se identificó en los medios de cultivo de los ríos de la cuenca del río Grande de Térraba. Uno de los géneros más ampliamente distribuidos en todo tipo de ambiente incluyendo las zonas tropicales (Shubert 2003).

Asimismo, los cultivos algales mantenidas en apropiadas condiciones medioambientales y abastecidas con todos los nutrientes en cantidades no limitantes, el tamaño y biomasa de las células individuales aumentan con el tiempo denominado crecimiento de biomasa, y el crecimiento poblacional está referido al

aumento del número de células mientras que el tiempo de duplicación (TD) es el tiempo requerido para duplicar el número de células (Yuan-Kun & Hui (2004), en tal sentido, durante la fase de crecimiento exponencial, la tasa de crecimiento de las células es proporcional a la biomasa de las células, expresándose la tasa específica de crecimiento ( $\mu$ ) como la fracción del incremento en biomasa en unidad de tiempo.

La iluminación de los cultivos algales es de suma importancia por su activa participación en la fotosíntesis, sin embargo, altas intensidades luminosas ocasionan el evento conocido como fotoinhibición que es la inhibición del crecimiento por descenso de la capacidad fotosintética implicando la destrucción de pigmentos fotosintéticos (González, 2000) ocasionando la muerte de los cultivos. Por lo tanto, es recomendable controlar la intensidad y calidad luminosa de los cultivos algales a fin de asegurar adecuados crecimientos y aprovecharlos en el tratamiento de las aguas residuales por las siguientes ventajas: 1) mejora la calidad del efluente, 2) aprovechamiento de nutrientes, 3) generación de oxígeno, 4) remoción de nitrógeno y fósforo, 5) aumento del pH que incrementa la precipitación de sales diversas, 6) disminución de la demanda biológica de oxígeno que favorece la oxidación de la materia orgánica y su efecto bactericida, 7) recuperación del CO<sub>2</sub> liberado y 8) alto rendimiento en la bioconversión de la energía solar (4 y 8%) respecto a la caña de azúcar y sorgo (Kojima & Lee, 2001).

Los efluentes o aguas residuales industriales y municipales requieren ser tratadas según la actividad industrial por la variabilidad de sus efluentes, en tal sentido, las características de los efluentes municipales varían en función al tiempo y la distancia recorrida antes de ser depositadas en las lagunas de oxidación o en el litoral marino costero local, destacando el color gris o negro malolientes por la formación y liberación del ácido sulfhídrico, conteniendo, además, sólidos suspendidos, compuestos orgánicos biodegradables y microorganismos patógenos (Valdez & Vázquez, 2003).

### **1.3. Formulación del problema de investigación**

¿Cuál es el efecto del cultivo de la microalga *Scenedesmus acutus* en la remoción de nutrientes y de carga bacteriana a diferentes diluciones de aguas residuales municipales del distrito de Chimbote - Ancash?

### **1.4. Delimitación del estudio**

La creciente contaminación de los ambientes acuáticos, especialmente del litoral marino de Ancash, como consecuencia de los vertidos directamente, sin tratamiento alguno de las industrias (pesqueras, agrícolas, siderúrgica, etc.) y principalmente de los efluentes municipales, requiere desarrollar metodologías o sistemas de tratamientos (físico, químicos, biológicos) de remediación.

Indudablemente, las microalgas han demostrado gran habilidad en la solución de los problemas derivados de la contaminación ambiental y reciclaje de residuos, debido a su facilidad para biotransformar la materia orgánica e inorgánica, contenido en los efluentes municipales, para producir biomasas algal y con las ventajas de generar efluentes limpios o libres de contaminantes para riego o consumo humano, previa potabilización, eliminación de la carga bacteriana anaeróbica, responsable de enfermedades, y las posibilidades de producir lípidos para la obtención de biocombustible a bajo costo; es decir, caben las posibilidades de obtener beneficios medioambientales y económicos mediante el uso de las aguas residuales.

En el presente estudio de la microalga clorofita *Scenedesmus acutus* es empleada en el tratamiento solo de efluentes municipales que desembocan en la zona costera del distrito de Chimbote (Ancash).

### **1.5. Justificación e importancia de la investigación**

La falta de plantas para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales, o el tratamiento previo de ellas, ha conllevado a la alta contaminación de la bahía "El Ferrol", esta falta de interés en el tratamiento de las aguas residuales ha generado el malestar socio-económico de la población chimbotana permitiendo que diferentes actividades económicas que favorecieron el crecimiento y desarrollo de Chimbote, hayan decaído enormemente. El tratamiento de las aguas residuales

es una cuestión prioritaria ya que es importante disponer de agua de calidad y en cantidad suficiente, para permitir mejora del ambiente, la salud y la calidad de vida (Romero *et al.*, 2009).

Experiencias relacionadas con el tratamiento de las aguas polucionadas por las actividades antrópicas (industriales, agrícola, pesqueras, etc.) cobran especial importancia por la necesidad cada vez mayor de preservar los recursos hídricos. Los altos niveles de agresión sobre el medio ambiente terrestre y marino, por los vertidos de la industria pesquera (Jarez, 2009) y, el incremento de las aguas residuales municipales por el aumento poblacional, hacen urgente la implementación de mecanismos que permitan su reutilización (Salazar, 2009).

La capacidad de las microalgas de asimilar diferentes contaminantes de los cuerpos de aguas polucionados es una alternativa de tratamiento, para una eficiente bioconversión en la utilización y eliminación de materia orgánica, que se traduce normalmente en generación de biomasa, mejorando la calidad del efluente y aumentando la concentración de oxígeno (Gonzales, 2006). Además, el tratamiento de las aguas residuales es prioritaria a nivel mundial, por la necesidad de disponer de suficiente cantidad de agua de buena calidad y mejorar las condiciones ambientales, la salud y la calidad de vida (Romero *et al.*, 2009), al remover la materia orgánica y sólidos suspendidos que influye directamente sobre la estructura de algunos compuestos, como nitrógeno en forma de proteínas (Silva *et al.*, 2008).

Según las características nutricionales, las microalgas se pueden cultivar de manera fotoautótrofa, fotoheterótrofa, heterótrofa o en condiciones de mixotrofia. Brennan & Owende (2010) consideran que la producción fotoautótrofa es el mejor método de producción rentable y económica de microalgas a gran escala; sin embargo, las microalgas utilizadas para el tratamiento de aguas residuales recurren a la nutrición heterotrófica por su habilidad de metabolizar eficientemente sustratos orgánicos, de tal manera que la eliminación del nitrógeno y fosforo entre otros, las convierte en una posibilidad real para la eliminación de estos nutrientes de las aguas residuales, demostrándose que en la eliminación del fosforo pueden ser tan eficientes como en el tratamiento químico convencional (MALGAS, 2014).

La producción masiva de microalgas se desarrolló en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial, para la producción de lípidos (MALGAS, 2014); y su uso en la depuración de aguas residuales se realiza en Estados Unidos de Norteamérica, desde los años cincuenta (Oswald, 1957), donde se utiliza cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y producción de biomasa (Lau *et al.*, 1995) y metano (Ugwu & Aoyagi, 2008).

También Moscoso & Flórez (1991), mencionan que el tratamiento de las aguas residuales municipales son aprovechadas en actividades agropecuarias desde hace 20 años con la finalidad de optimizar el uso de estos tratamientos mediante tecnologías apropiadas que permitan la remoción de organismos patógenos y de materia orgánica. En consecuencia, a través de la presente investigación se utiliza la microalga *Sc. acutus* para disminuir la carga microbiológica y de nutrientes (N, P) que de hecho presenta el agua de la bahía “El Ferrol” como único receptor de las aguas emitidas por la población del distrito de Nuevo Chimbote.

## **1.6. Objetivos de la investigación**

### **Objetivo general**

Evaluar el efecto del cultivo de la microalga *Sc. acutus* en la remoción de nutrientes y de carga bacteriana a diferentes diluciones de aguas residuales municipales del distrito de Chimbote – Ancash.

### **Objetivos específicos**

- Determinar la densidad poblacional, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación diaria de *Sc. acutus* cultivada a diferentes diluciones de las aguas residuales municipales de Chimbote, Ancash.
- Determinar la DBO y DQO del efluente municipal del distrito de Chimbote, Ancash.
- Determinar el efecto del cultivo de la microalga *Sc. acutus* en la remoción de nutrientes (N y P) a diferentes diluciones de aguas residuales municipales del distrito de Chimbote, Ancash.

- Determinar el efecto del cultivo de la microalga *Sc. acutus* en la remoción de carga bacteriana a diferentes diluciones de aguas residuales municipales del distrito de Chimbote, Ancash.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Fundamentos teóricos de la investigación

La preocupación por el medio ambiente no debe basarse en la utilización de recursos naturales ni en la generación de residuos. Eso es algo natural e inevitable, y común a cualquier especie de ser vivo. Los problemas ambientales surgen, en cualquier caso, de una contradicción entre el ritmo de los ciclos biogeoquímicos, y el ritmo de los ciclos de la producción humana, para un nivel determinado del desarrollo de las fuerzas productivas (Tommasino *et al.*, 2005).

La alteración de la tierra por el hombre es consubstancial con su crecimiento. Entre un tercio y la mitad de la superficie del suelo ha sido transformada por la acción humana, la concentración del dióxido de carbono en la atmósfera se ha incrementado en aproximadamente 30% desde el comienzo de la revolución industrial; mas nitrógeno atmosférico es fijado por la humanidad que por cualquier otra fuente natural combinada; más de la mitad del agua fresca accesible en la superficie es usada por la humanidad; y cerca de un cuarto de las especies de aves de la tierra han sido conducidos a la extinción. Mediante estos y otros indicadores, está claro que vivimos en un planeta dominado por el ser humano (Vitousek *et al.*, 1997).

La sostenibilidad es un paradigma para pensar en un futuro en el cual las consideraciones ambientales, sociales y económicas se equilibran en la búsqueda del desarrollo y de una mejor calidad de vida. Estos tres ámbitos –la sociedad, el medio ambiente y la economía– están entrelazados. Por ejemplo, una sociedad próspera depende de un medio ambiente sano que provea de alimentos y recursos, agua potable y aire limpio a sus ciudadanos (UNESCO, 2012).

Históricamente, el desarrollo de los pueblos ha transitado por varios escenarios o paradigmas, desde aquellos desarrollistas basados en la generación de bienes y riquezas hasta las actuales que consideran las propuestas holísticas que incluyen



la protección del medio ambiente. En tal sentido; según la UNESCO (2012), el paradigma de la sostenibilidad constituye un cambio importante desde el paradigma anterior del desarrollo económico con sus nefastas consecuencias sociales y ambientales, que hasta hace poco tiempo eran consideradas como inevitables y aceptables. Sin embargo, ahora comprendemos que estos graves daños y amenazas al bienestar de las personas y del medio ambiente como consecuencia de la búsqueda del desarrollo económico, no tienen cabida dentro del paradigma de la sostenibilidad. Actualmente, la galopante crisis ecológica conducentes a la alteración notoria de las naturales condiciones del hábitat de animales, vegetales y humanos pone en serio riesgo el futuro de nuestra propia existencia.

El concepto de desarrollo sustentable como objetivo presume dos cosas: primero, implica que también hay objetivos y caminos de desarrollo-por supuesto, se suponen aquellos puestos en práctica, que no pueden perdurar por largo plazo por amenazar tarde o temprano las bases ecológicas de la tierra y; segundo, el “desarrollo” bajo ningún criterio se abandona como objetivo, y para que el concepto no sea contradictorio consigo mismo, un desarrollo diferente al que hemos tenido hasta ahora, un desarrollo sustentable ecológica y socialmente, es concebible y practicable (Harborth,1991). Lo anterior nos remite a una dimensión más sutil, aquella relacionada con la visión cultural y política. Esto se sustenta en la necesidad de realizar cambios profundos relacionados con aspectos ambientales, sociales, políticos y culturales que posibiliten la convivencia armónica del hombre y el medio ambiente integrando aspectos económicos, ecológicos y sociales, en tal sentido, considerando las necesidades de desarrollar condiciones de recuperación del medio ambiente, la sustentabilidad considera como eje importante impulsar sistemas productivos basados en tecnologías que no degraden el ambiente biofísico ni agoten los recursos naturales.

La sustentabilidad deviene en una equidad ecológica, económica y social procurando que las utilizaciones de los recursos deben mantener relación con su regeneración, así como la generación de residuos no deben exceder la capacidad de asimilación de los ecosistemas. En tal sentido las energías renovables son

aquellas que se producen de forma continua y son inagotables a escala humana; se renuevan continuamente, a diferencia de los combustibles fósiles, de los que existen unas determinadas cantidades o reservas, agotables en un plazo más o menos determinado. Existe una creciente concienciación a nivel mundial en lo que se refiere a la problemática energética, debido fundamentalmente a: la gran dependencia energética del exterior de los países industrializados, el agotamiento y encarecimiento de los recursos energéticos fósiles y, los recientes descubrimientos sobre el origen antropogénico (causado por el hombre) del cambio climático. Ante ello, Europa representa el 15% del consumo energético mundial y, si no se fomentan políticas de promoción de las energías renovables, la dependencia específicamente de las importaciones de petróleo podría llegar al 90% en el 2020 (Schallenberg *et al.*, 2008).

El carácter desigual de las prácticas sociales, políticas, económicas y culturales entre Norte-Sur, Centro-Periferia y/o Occidente-Oriente, han venido influenciando históricamente el proceso de modernización que emprendió occidente para establecer el sistema hegemónico que hoy impera y que ha llevado al tercer mundo a un modelo jerarquizador de las diferencias, en el que se ha pretendido subsumir la multiplicidad para adecuarse al modelo occidental de los países del primer mundo (Agudo, 2001).

Según la UNESCO (2012), el desarrollo sostenible es el desarrollo que satisface las necesidades actuales sin comprometer la capacidad de las futuras generaciones de satisfacer sus propias necesidades, asimismo, considera a la sostenibilidad como un paradigma para pensar en un futuro en el cual las consideraciones ambientales, sociales y económicas se equilibran en la búsqueda del desarrollo y de una mejor calidad de vida.

El desarrollo tecnológico y el crecimiento poblacional trae consigo contaminación de variada procedencia y efectos en las naturales condiciones medioambientales, por la introducción de sustancias que alteran el natural equilibrio de los ambientes aéreos, terrestres y/o acuáticos, en los que los problemas de contaminación ocurren cuando se excede el natural equilibrio, siendo aquellos

generados por las actividades humanas las más perjudiciales. La atenuación de tales problemas requiere el uso de metodologías de biorremediación utilizando vegetales, en tal sentido, Andrade *et al.* (2009), consideran que las microalgas son una alternativa para el tratamiento de aguas residuales por su capacidad de remoción de nutrientes y pueden ser utilizadas como indicadores ecológicos de la calidad del agua y su sensibilidad a los efluentes industriales (Gómez & Ramírez, 2004); también por la gran capacidad que tienen para remover activamente el nitrógeno, fósforo y carbono orgánicos responsables de la eutrofización marina, así como disminuir notoriamente las bacteria coliformes totales y fecales presentes en las aguas residuales (Méndez *et al.*, 2010), adicionalmente, tienen la ventaja de producir agua limpia para consumo humano o agrícola y la obtención de biomasa algal para alimento de animales menores (Shelef *et al.*, 1978).

Obviamente, la atenuación de los impactos negativos de las aguas residuales y/o efluentes de diversa procedencia requiere ser encarada prioritariamente en el contexto de la sustentabilidad de las actividades antrópicas (minería, pesca, acuicultura, agricultura, etc.) y evitar los riesgos sobre la salud humana que implican los vertidos directos de las aguas residuales, especialmente, los efluentes municipales. En tal sentido, se considera a las microalgas como interesante alternativa para el tratamiento de efluentes municipales, como lo ha demostrado por Méndez *et al.*, (2010), cultivando *Scenedesmus quadricauda* en aguas residuales procedentes de lagunas de estabilización en la ciudad de Trelew, Argentina, por lo que se considera que *Sc. acutus* es excelente candidata para tales fines por su facilidad de crecer en aguas residuales conteniendo nutrientes orgánicos e inorgánicos y eliminación de bacterias anaeróbicas por la constante producción de oxígeno fotosintético, posibilitando el establecimiento de una buena gestión sustentable de tales efluentes.

## 2.2 Marco conceptual

Las aguas residuales son aguas que llevan elementos extraños, por causas naturales, provocadas de forma directa o indirecta por la actividad humana, estando compuestas por una combinación de líquidos de desagüe de viviendas, comercios, edificios de oficinas e instituciones; líquidos efluentes de establecimientos industriales; líquidos efluentes de instalaciones agrícolas y ganaderas.

El tratamiento de aguas residuales es el conjunto de operaciones que tienen por finalidad la eliminación o reducción de los niveles de contaminación de las aguas residuales municipales.

Un cultivo es la forma en la que se hacen crecer los microorganismos en una superficie sólida (agar) o en medio líquido (caldo) e incluso en células (línea celular), de tal manera que se logre acumular biomasa entendida como la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía.

Las microalgas son microorganismos de pequeñas formas de vida, donde no está implícita la división entre animal y planta, que pueden cultivarse en diferentes condiciones de luz. Los fotoautótrofos usan la luz como fuente de energía y el dióxido de carbono como fuente de carbono. Los fotoheterótrofos usan la luz como fuente de energía y los compuestos orgánicos como fuente de carbono. Las heterótrofas son organismos que se alimentan de materia orgánica previamente elaborada, a partir de la que obtiene sus propios componentes estructurales y la energía que necesita (al descomponer parte de esos nutrientes orgánicos). Y la mixotrofia es un proceso por el cual un organismo puede doblarse como un autótrofo (produce su propio alimento) o heterótrofo (come alimentos producidos por otros organismos).

La demanda de oxígeno de un agua residual es la cantidad de oxígeno que es consumido por las sustancias contaminantes que están en esa agua durante un cierto tiempo, ya sean sustancias contaminantes orgánicas o inorgánicas. Las técnicas basadas en el consumo de oxígeno son la demanda química de oxígeno, DQO, la demanda bioquímica del oxígeno (DBO) y el carbono orgánico total, COT

o TOC.

Demanda bioquímica de oxígeno en cinco días ( $DBO_5$ ) permite determinar la concentración de la materia orgánica de aguas residuales. Esencialmente, la DBO es una medida de la cantidad de oxígeno en mg/L utilizado por los microorganismos en la estabilización de la materia orgánica biodegradable, en condiciones aeróbicas, en un periodo de cinco días a 20 °C. En aguas residuales domésticas, el valor de la DBO a cinco días representa en promedio un 65 a 70% del total de la materia orgánica oxidable.

Demanda química de oxígeno (DQO) es la cantidad de oxígeno en mg/l consumido en la oxidación de las sustancias reductoras que están en un agua.

La tasa de remoción se entiende como la cantidad removida de un componente o sustancia en el medio de cultivo respecto a la concentración inicial y expresada como porcentaje, por lo que puede considerarse como tasa de remoción de nitrógeno y de carga bacteriana se expresa como el número de bacterias medidas como número más probable (NMP) por 100 mL, en el cultivo de *Sc. acutus*.

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Hipótesis central de la investigación

Si, utilizamos diluciones de las aguas residuales municipales (20, 40, 60, 80 y 90 %) del distrito de Chimbote, y lo empleamos en el cultivo de *Scenedesmus acutus*, se obtuvo mayor crecimiento poblacional, mayor remoción de nutrientes y de bacterias anaeróbicas (*E. coli*) con la dilución del 80%.

#### 3.2 Variables e indicadores de la investigación

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	
		Dimensiones	Indicadores
<b><u>V. Independiente</u></b>			T1: Medio de cultivo HM (control)
Cultivo de microalga <i>Sc. acutus</i> en aguas residuales municipales	Un cultivo de microalgas es la forma de hacer crecer la población	Diluciones de agua residuales municipales	T2: 20 %
			T3: 40 %
			T4: 60 %
			T5: 80 %
			T6: 90 %
<b><u>V. Dependiente</u></b>		Crecimiento de microalgas	Densidad poblacional (cel mL <sup>-1</sup> ) Tasa de crecimiento poblacional
crecimiento poblacional de microalgas, remoción de nutrientes y de carga bacteriana		Remoción de nutrientes	NH <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
			NO <sub>3</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
			PO <sub>4</sub> (mg L <sup>-1</sup> )
		Carga bacteriana	NMP/100 mL

$$TR(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

$$TR(\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

#### 3.3 Método de la investigación

Experimental

### **3.4 Diseño o esquema de la investigación**

En la investigación se empleó el diseño estímulo creciente con cinco tratamientos y un grupo control, y tres repeticiones cada uno.

T<sub>1</sub>: Medio de cultivo HM (control)

T<sub>2</sub>: 20 % de dilución de aguas residuales municipales

T<sub>3</sub>: 40 % de dilución de aguas residuales municipales

T<sub>4</sub>: 60 % de dilución de aguas residuales municipales

T<sub>5</sub>: 80 % de dilución de aguas residuales municipales

T<sub>6</sub>: 90 % de dilución de aguas residuales municipales

### **3.5 Población y muestra**

La microalga *Sc. acutus* se obtuvo del Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, los que se mantuvieron en medio HM (Merino, 1999) en tubos de ensayo de 20 mL e iluminados con un fluorescente de 40 W, con agitación manual diaria. Las muestras para los ensayos se hicieron con un volumen cultivo efectivo de 1000 mL de efluente crudo y el inóculo algal fue de  $32 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>.

### **3.6. Actividades del proceso investigativo**

Las actividades realizadas durante el proceso de investigación fueron las siguientes:

- ) Reconocimiento del lugar de colección de muestras
- ) Recolección de agua residual municipal
- ) Análisis físico y químico in situ del agua residual municipal
- ) Procesamiento del agua residual en laboratorio de la Universidad Nacional del Santa.
- ) Preparación del inóculo de la microalga

- ) Análisis físico y químico de nitrógeno, fósforo y DBO del cultivo con microalgas
- ) Análisis microbiológico del agua del cultivo con microalgas

### 3.7 Técnicas e instrumentos de la investigación

**3.7.1 Medio de cultivo HM:** El medio de cultivo HM propuesto por Merino (1999) (Tabla 1) se utilizó para *Sc acutus* en el tratamiento control.

Tabla 1. Composición química del medio HM.

Insumos	Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	
	Componente	Elemento químico
Urea	206	N=100
Ácido fosfórico	30,0	P= 6,14
Cloruro de potasio	19,0	K=12,0
Patrón fierro*	2,5	Fe= 2,5

\* Clavos diluidos en una solución de ácido clorhídrico.

**3.7.2 Efluentes municipales:** Los efluentes municipales se colectaron de las tuberías de desagüe que desembocan en la zona de Miramar Bajo (distrito de Chimbote, Ancash, Perú) (Figs. 1 y 2), registrándose *in situ* la temperatura del aire (20,3°C), del agua (22,0°C), pH (6,0), olor (ligeramente pútrido), color aparente (marrón claro) y densidad (1,006 g mL<sup>-1</sup>) de dichos efluentes. Para la recolección de las muestras se utilizó guantes y mascarilla, y las aguas se recolectaron con una jarra de plástico de 1 L y depositados en dos baldes plásticos de 20 L con tapa hermética hasta completar 10 L cada uno (Fig. 3), luego se transportaron al Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, según la metodología y recomendaciones de seguridad del Protocolo de monitoreo de plantas de tratamiento de aguas residuales y domésticas del Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento del Perú (MVCS, 2013), y protocolo de monitoreo de efluentes y cuerpo marino receptor del Instituto del Mar del Perú (PRODUCE,



2002). La duración del transporte desde el lugar de colecta y el laboratorio fue de 1 h.



Figura 1. Zona de recolección de aguas residuales de la desembocadura frente a Miramar bajo, distrito de Chimbote.



Figura 2. Desembocadura de aguas residuales Miramar bajo, distrito de Chimbote.



Figura 3. Análisis físico-químico (temperatura y pH) de las aguas residuales municipales *in situ*, Miramar bajo, distrito de Chimbote.

En el laboratorio, los efluentes se filtraron con tamiz de 100  $\mu\text{m}$  para retener material particulado. Los análisis se realizaron en el Laboratorio COLECBI (Tabla 2) y se utilizó como medio de cultivo base para las diferentes diluciones de los cultivos de *Sc. acutus* ensayados.

Tabla 2. Composición química y microbiológica del efluente municipal utilizado en los cultivos de *Sc. acutus*.

Parámetro	Concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Nitratos	0,089
Nitritos	0,028
Nitrógeno amoniacal	2,82
Fosfato	0,131
Sulfuros	0,132
Detergentes	0,17
Fosforo	0,062
DBO	60
DQO	36
Coliformes totales (NMP/100 mL)	$24 \times 10^4$
Coliformes fecales (NMP/100 mL)	$13 \times 10^4$

**3.7.3 Inóculo:** Para la generación de inóculo de *Sc. acutus* se usaron dos matraces de 250 ml con 100 mL de volumen efectivo cada uno, y luego de alcanzar la fase logarítmica, se inocularon en botellas de 500 mL con agua potable fertilizada con medio HM (Merino, 1999). Estos recipientes se cultivaron durante 4 días con iluminación constante (2000 lux) y agitados manualmente dos veces al día. Luego fueron llevados a dos botellas de 3000 mL con un volumen efectivo de 2000 mL, iluminación (2000 lux) y aireación constante ( $1000 \text{ mL min}^{-1}$ ) durante 4 días.

**3.7.4 Sistema de cultivo de *Sc. acutus*:** Se utilizaron 18 botellas plásticas de 3000 mL de volumen total, con 2000 mL de volumen efectivo de cultivo según dilución del efluente (Tabla 3). Los cultivos microalgales se iniciaron con un promedio de  $2 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ . El suministro de aire al sistema procedió de motores aireadores. El aire a cada botella plástica de cultivo fue mediante mangueras plásticas de 0,5 mm de diámetro. La luz procedió de un fluorescente de 40 W. El flujo de aireación fue de  $5 \text{ L min}^{-1}$  para cada botella de cultivo (Fig. 4).



Figura 4. Sistema de cultivo de la microalga *Sc. acutus*

Tabla 3. Distribución de los componentes utilizados en el cultivo de *Sc acutus* con diferentes diluciones de aguas residuales municipales tratadas.

Componentes	Dilución (%) de agua residual municipal					
	0	20	40	60	80	90
Efluente (mL)	0	400	800	1200	1600	1800
Agua potable (mL)	1800	1400	1000	600	200	0
<i>Sc acutus</i> (mL)	200	200	200	200	200	200
Total (mL)	2000	2000	2000	2000	2000	2000

### 3.8 Procedimiento para la recolección de datos

**3.8.1 Registro de los Parámetros ambientales del cultivo:** Diariamente se registró el pH (pH-metro Oakton;  $\pm 0,01$ ) y la temperatura (termómetro digital Oakton;  $\pm 0,1$  °C). La aireación de los cultivos fue constante y provista por cuatro (04) aireadores marca ELITE 800, con un flujo de  $500 \text{ mL min}^{-1}$  por cada unidad experimental y medidos con un flujómetro Cole Parmer ( $\pm 10 \text{ mL min}^{-1}$ ). La iluminación fue durante 24 h con dos fluorescentes de luz blanca de 40 W colocados a 10 cm de las botellas de los cultivos microalgales y la intensidad luminosa fue de 2000 lux registradas con un luxómetro marca Hanna ( $\pm 0,1$  lux).

**3.8.2 Determinación del Crecimiento poblacional:** El crecimiento poblacional se determinó durante siete días por conteos diarios el número de células en  $0,5 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$ , tomando 1 mL del medio de cultivo de *Sc acutus* por cada unidad experimental, colocándose dos muestras del cultivo en la cámara Neubauer con una micropipeta Pasteur y se observó en un microscopio binocular marca Olympus a 40 X.

La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación diaria (TD) al quinto día de cultivo se determinaron según Guillard (1975):

$$\mu = \frac{\ln(N_f/N_c)}{T_f - T_c} \qquad \text{TD} = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Dónde  $N_0$  y  $N_f$  corresponden al número de células por mL a los tiempos  $T_0$  y  $T_f$ , respectivamente.

**3.8.3 Determinación de los Nutrientes N, P y la DBO<sub>5</sub>:** La concentración de N y P se determinó en el laboratorio COLECBI (distrito de Nuevo Chimbote) utilizando muestras de 500 mL y los métodos y fórmulas propuestos por APHA-AWWA-WEF (2005) para N en forma de nitratos (colorimétrico, reducción por cadmio), nitritos (colorimétrico) y amoníaco (nitrógeno amoniacal; colorimétrico) y el P en forma de fosfatos (colorimétrico). Asimismo, la demanda bioquímica de oxígeno (DBO<sub>5</sub>) fue determinada de acuerdo a lo descrito en la metodología del protocolo de monitoreo de efluentes (PRODUCE, 2002).

**3.8.4 Determinación de la Carga bacteriana (coliformes totales y fecales):** La carga bacteriana, al inicio y final del experimento, medida como el número más probable (NMP) de coliformes totales y fecales fueron determinadas en el laboratorio COLECBI con la técnica de tubos múltiples de fermentación según APHA-AWWA-WEF (2005):

**Coliformes totales:** SMEWW-APHAWWA.WEF Part 9221-B. 22nd Ed. 2012. Pag. 9-60 a 9-67, 9221-C 22nd Ed. 2012. Pag. 9-69 a 9-73.

**Coliformes fecales:** SMEWW-APHAWWA.WEF Part 9221-C 22nd Ed. 2012. Pag. 9-74 a 9-75, 9221-C 22nd Ed. 2012. Pag. 9-69 a 9-73.

De cada unidad experimental se inoculó en tubos de ensayo con medio de cultivo descrito en APHA-AWWA-WEF (2005). Así, se colocaron tubos de fermentación en filas de 5 cada uno en una gradilla con diluciones seriadas con muestras de 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 y 0,001 ml, y se homogenizaron vigorosamente unas 25 veces. Luego se inocularon de cada tubo en un grupo de 5 con volúmenes de muestra duplicadas y se llevaron a incubación según el grupo coliformes totales o fecales. En algunos tubos presentaron formación de gas, para ellos se procedió a reincubarlos por 24 h. La producción de gas en los tubos se consideró como reacción positiva para la presencia de Coliformes totales y fecales, expresado como el NMP/100ml, cuyo cálculo en base al número de tubos

positivos se realizó como se describe en la sección 9221 del APHA-AWWA-WEF (2005).

**3.8.5 Determinación de la Tasa de remoción de nutrientes, de coliformes totales y fecales:** En la determinación de la Tasa de Remoción (TR) de los nutrientes N (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>3</sub> en mg L<sup>-1</sup>) y P (PO<sub>4</sub> en mg L<sup>-1</sup>), y coliformes totales (NMP/100mL) y coliformes fecales (NMP/100mL), se tomaron los valores al inicio y final del experimento (7 días) de cada unidad experimental, cuyos valores fueron expresados como porcentajes de remoción según propuesta modificada de Valdez & Vázquez (2003):

$$TR (\%) = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Donde C<sub>i</sub>: Contenido inicial del nutriente (mg L<sup>-1</sup>) o carga bacteriana (NMP/100ml). C<sub>f</sub>: Contenido final del nutriente (mg L<sup>-1</sup>) o carga bacteriana (NMP/100mL).

### **3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de los datos**

Se empleó el diseño completamente al azar. Para los datos obtenidos de contenido de nutrientes y tasa de remoción de N y P, carga bacteriana (coliformes totales y fecales); densidad poblacional, tasa de crecimiento y tiempo de duplicación, se empleó análisis de varianza simple para establecer diferencias entre promedios y la prueba de Tukey HSD para establecer el mejor promedio; en todos los casos se aplicó un nivel de significancia de 0,05. Para el tratamiento de los datos experimentales se recurrió al programa estadístico SPSS, versión 20.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. RESULTADOS

**Demanda bioquímica de oxígeno del efluente:** La presencia de altos valores de bacterias *E. coli* ( $13 \times 10^4$  NMP/100 mL) denota las condiciones anaeróbicas del efluente municipal, así mismo, los valores hallados en el laboratorio COLECBI relativamente bajos de Demanda Bioquímica de Oxígeno ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) y Demanda Química de Oxígeno ( $36 \text{ mg L}^{-1}$ ) serían consecuencia de la turbulencia de las aguas residuales con que desembocan en la zona costera marina.

**Crecimiento poblacional de *Sc. acutus*:** Todos los cultivos de *Sc. acutus* fueron iniciados con densidades poblacionales similares ( $p > 0,05$ ) de  $32 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$  en los tratamientos, incrementándose con diferentes tendencias en cada uno de los tratamientos, destacando la disminución observada los días 1 y 2 en los controles ( $19 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) y su posterior incremento ( $211,3 \times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ). Asimismo, los cultivos dosificados con efluentes municipales mostraron mayores crecimientos poblacionales diarios promedio hasta el día 6 y 7 (Tabla 4, Fig.5).

Tabla 4. Valores promedios del crecimiento poblacional ( $\times 10^4$  cel  $\text{mL}^{-1}$ ) de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales.

Día	Dilución (%)					
	0	20	40	60	80	90
0	32	32	32	32	32	32
1	19	137.3	187.3	131	154.7	22.3
2	19	250.7	293.3	444	253.3	83.7
3	92	408	414.7	517.3	316	320.7
4	132.7	429.3	428	589.3	506.7	307
5	119.3	552	586.7	592	549.3	404
6	155.7	528	476.7	672	604	507
7	211.3	576	530.7	646	672	638

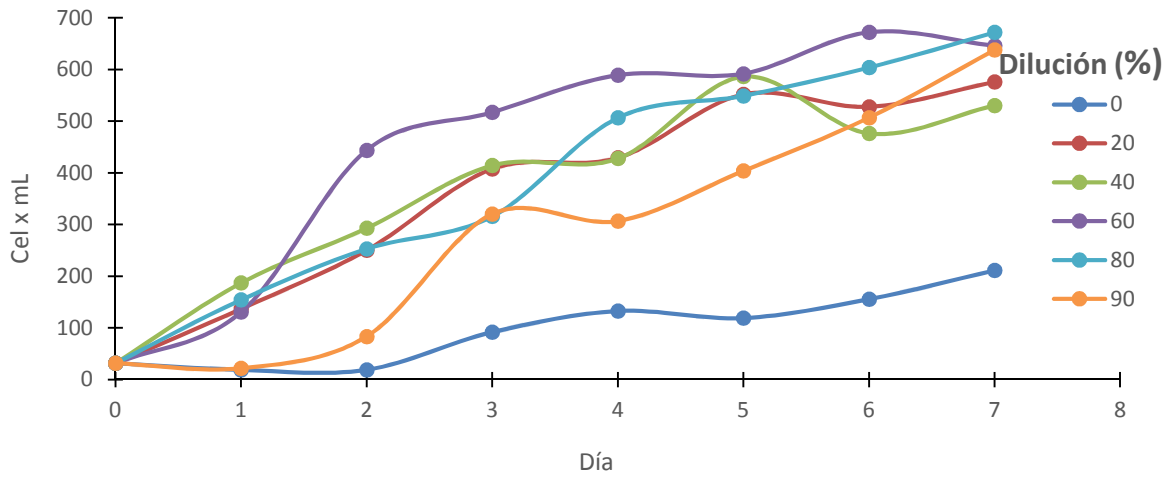


Figura 5. Crecimiento poblacional de *Sc. acutus* cultivados con diferentes diluciones de aguas residuales municipales de Chimbote.

También se ha observado la presencia de cenobios de 4 células en los cultivos dosificados con efluente municipal en un 96% llegando a ser más altos que los controles con 61.4% al final de las experiencias, así como la presencia de cenobios de 8 células en todos los cultivos (Tabla 5).



Tabla 5. Valores porcentuales de la incidencia de cenobios de 4 y 8 células de *Sc. acutus* cultivadas con diferentes concentraciones de aguas residuales municipales.

Día	Dilución (%)												
	0		20		40		60		80		90		
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
0	4	24	75,0	24	75,0	24	75,0	24	75,0	24	75,0	24	75,0
	8	8	25,0	8	25,0	8	25,0	8	25,0	8	25,0	8	25,0
1	4	28	63,6	300	72,8	468	84,2	352	91,7	412	89,6	144	80,0
	8	16	36,4	112	27,2	88	15,8	32	8,3	48	10,4	36	20,0
2	4	48	85,7	680	90,4	800	90,9	1196	89,8	728	95,8	222	62,0
	8	8	14,3	72	9,6	80	9,1	136	10,2	32	4,2	136	38,0
3	4	192	72,7	1136	92,8	1148	92,3	1368	88,1	884	93,2	680	71,4
	8	72	27,3	88	7,2	96	7,7	184	11,9	64	6,8	272	28,6
4	4	268	67,7	1200	93,2	1228	95,6	1672	94,6	1488	97,9	652	72,4
	8	128	32,3	88	6,8	56	4,4	96	5,4	32	2,1	248	27,6
5	4	260	74,7	1536	92,8	1548	93,2	1712	96,4	1560	94,7	1060	81,0
	8	88	25,3	120	7,2	112	6,8	64	3,6	88	5,3	248	19,0
6	4	280	61,4	1528	96,5	1324	92,7	1936	96,0	1748	96,5	1324	87,3
	8	176	38,6	56	3,5	104	7,3	80	4,0	64	3,5	192	12,7
7	4	384	62,3	1592	92,1	1472	92,5	1820	93,8	1968	97,6	1564	72,3
	8	232	37,7	136	7,9	120	7,5	120	6,2	48	2,4	336	17,7
x	4	1484	67,1	7996	90,2	8012	92,3	10080	93,3	8812	95,8	5670	79,3
	8	728	32,9	680	9,8	664	7,7	720	6,7	384	4,2	1476	20,7

N= número total de células aportados por los cenobios de 4 u 8 células.

**Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional:** En el día 6 (Tabla 6), los cultivos dosificados con 60% y 80% de efluente municipal fueron similares ( $p > 0,05$ ), con valores de  $\mu$  de 0,5074 y 0,4896 div/día, respectivamente; seguido por el de 90% y 20% con 0,4605 y 0,4672 div/día, respectivamente, mientras que las menores fueron con 40% y los controles con 0,4499 y 0,2637 div/día, respectivamente. Por otro lado, los valores de  $u$  correspondientes al séptimo día (Tabla 7), pese a mostrar similares tendencias, son ligeramente menores.

Tabla 6. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) del cultivo de *Sc. acutus* en el día 6.

Día	Dilución (%) de agua residual municipal					
	0	20	40	60	80	90
N1	32	32	32	32	32	32
N2	155,7	528,0	476,0	672,0	604,0	507,0
Día	6	6	6	6	6	6
$\mu$	0,2637	0,4672	0,4499	0,5074	0,4896	0,4605
TD	2,629	1,484	1,541	1,366	1,416	1,505

N1: primer día; N2: segundo día;  $\mu$ : tasa de crecimiento; TD: tiempo de duplicación

Tabla 7. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación (TD) del cultivo de *Sc. acutus* en el día 7.

Día	Dilución (%) de agua residual municipal					
	0	20	40	60	80	90
N1	32	32	32	32	32	32
N2	211,3	576,0	530,7	646,0	672,0	638,0
Día	7	7	7	7	7	7
$\mu$	0,2696	0,4129	0,4012	0,4293	0,4349	0,4275
TD	2,571	1,679	1,728	1,615	1,594	1,621

N1: primer día; N2: segundo día;  $\mu$ : tasa de crecimiento; TD: tiempo de duplicación

En relación al TD, por estar relacionada inversamente con  $\mu$ , los mayores valores fueron determinados en los cultivos dosificados con 60% de efluente municipal en el día 6 (1,366) y con 80% (1,594) en el día 7, mientras que los cultivos controles mostraron, en ambos días, mayores tiempos de duplicación diaria (2,629 y 2,571 div/día en los días 6 y 7, respectivamente).

**Temperatura en el crecimiento de *Sc. acutus*:** Durante la realización de los ensayos en el crecimiento de *Sc. acutus*, la temperatura varió en el rango entre 25,1°C y 25,7°C (Fig. 6).

**Efecto del pH en el crecimiento de los cultivos de *Sc. acutus*:** Las variaciones del pH de todos los cultivos pueden considerarse dentro del rango básico (7,83 - 9,13). Una ligera elevación del pH en los tratamientos dosificados con 90% de efluentes municipales desde el inicio del experimento con 8,07 hasta el día tres con 9,16. El pH de los cultivos experimentales de *Sc. acutus* (Tabla 8), mostraron incrementos de manera similar ( $p>0,05$ ) con el control HM, siendo ligeramente mayores en aquellos cultivos con mayor contenido del efluente municipal (9,13; 9,16).

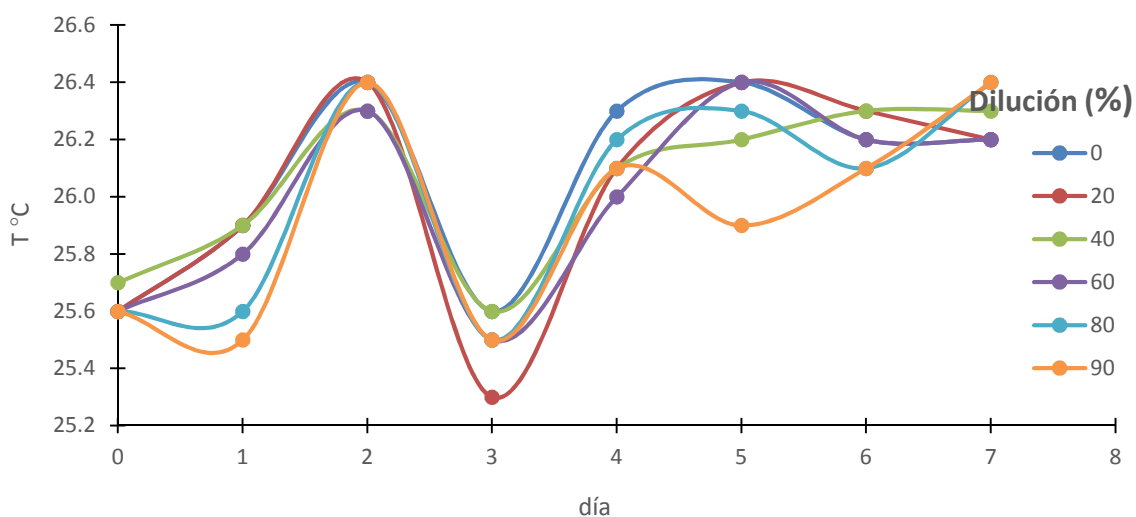


Figura 6. Variación de la temperatura de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales.

Tabla 8. Valores promedios diarios del pH de los cultivos de *Sc. acutus* en agua residual municipal.

Dia	Dilución (%)					
	0	20	40	60	80	90
0	7.83	7.83	7.80	7.83	7.80	8.07
1	7.90	8.07	8.07	8.10	8.82	8.30
2	8.10	8.34	8.50	8.43	8.47	8.53
3	8.43	8.77	8.86	8.87	8.90	9.16
4	8.67	8.77	8.77	8.77	8.87	9.13
5	8.80	8.70	8.73	8.63	8.67	9.03
6	8.73	8.67	8.80	8.80	8.73	9.07
7	8.77	8.67	8.80	9.03	9.00	9.13

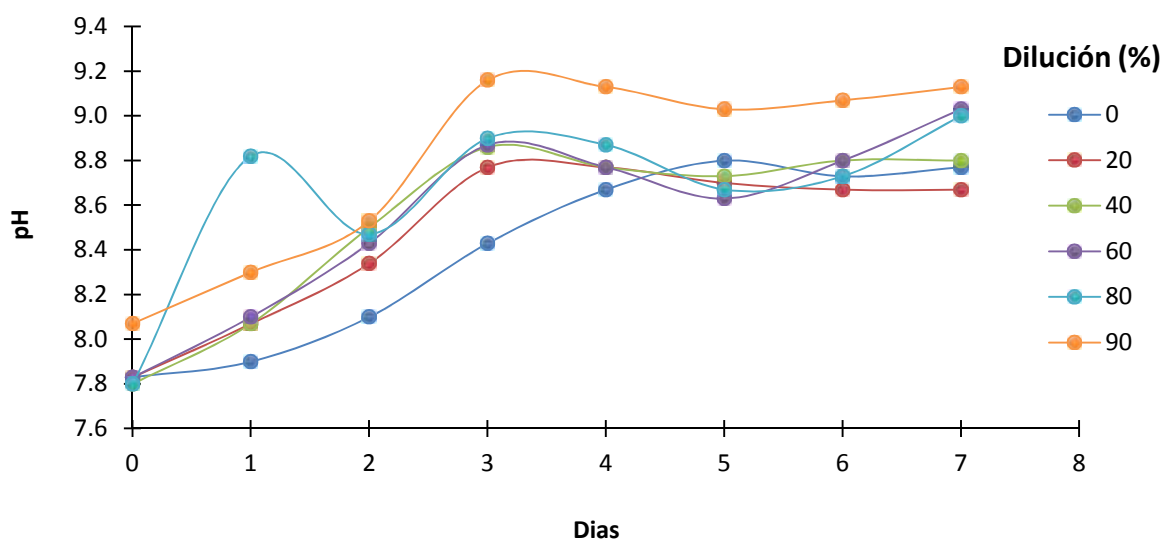


Figura 7. Variaciones del pH de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales.

**Microalga en la remoción de nutrientes:** En la tabla 9 se presentan las concentraciones del N y P de los cultivos ensayados, destacando los bajos tenores de estos importantes elementos en el crecimiento algal. Las bajas concentraciones del nitrógeno y fósforo presentes en el efluente municipal son total y rápidamente consumidas durante las fases iniciales del crecimiento algal.

Tabla 9. Concentraciones de N y P de los cultivos de *Sc. acutus* utilizando efluente municipal.

Nutriente	Dilución (%) de agua residual municipal					
	HM	20	40	60	80	90
N (mg mL <sup>-1</sup> )	100	0,444	0,888	1,333	1,777	2,221
P (mg mL <sup>-1</sup> )	6,14	0,009	0,018	0,026	0,035	0,044

**Microalga en la remoción de carga bacteriana:** Durante el crecimiento fotosintético de los cultivos de *Sc. acutus* se genera suficiente oxígeno que prácticamente elimina todas las bacterias anaeróbicas, especialmente los coliformes fecales. En nuestros ensayos se ha logrado la reducción de 130 000 NMP/100 mL a menos de 1,8 NMP/mL, estimándose su tasa de remoción en 99,99%.

## 4.2. DISCUSIÓN

Las condiciones anaeróbicas de los efluentes municipales indicaría la presencia de bacterias procedentes de la flora intestinal, destacando la presencia de *E. coli* ( $13 \times 10^4$  NMP/100 mL); así mismo, la longitud del sistema de alcantarillado y la velocidad de salida del efluente probablemente otorga cierto efecto de aireación reflejado en los valores de la DBO ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) y DQO ( $36 \text{ mg L}^{-1}$ ), que son menores a los reportados por Méndez *et al.* (2010), ( $236$  y  $312 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente) debido a las condiciones estáticas de las pozas primarias de tratamiento, mayor contenido de materia orgánica y menores cargas bacterianas ( $2, 3 \times 10^4$  NMP/100 mL).

Por otro lado, la demanda de oxígeno, está directamente relacionada a los procesos de degradación de la materia orgánica responsable del olor pútrido característico del efluente municipal, y que durante la fotosíntesis indicaría la predominancia de la generación de biomasa y de oxígeno, los valores de DBO y DQO ( $60 \text{ mg/L}$  y  $35 \text{ mg/L}$  respectivamente) en los cultivos algales son negligibles como consecuencia de la vigorosa generación del oxígeno fotosintético evidenciadas por su adherencia a las paredes de los recipientes de cultivo. La demanda de oxígeno es necesaria para la oxidación de la materia orgánica y que durante el crecimiento algal se genera oxígeno ( $9,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y biomasa, la remoción total de la materia orgánica probablemente esté asegurada, así como el crecimiento. Sin embargo, Méndez *et al.* (2010), reportaron disminución de  $236$  a  $31 \text{ mg L}^{-1}$  de la DBO que representan la remoción del  $86,8 \%$  de la materia orgánica inicial. Asimismo, Albarracín *et al.* (2005) reportaron remoción del  $80 \%$  de DBO y de  $73,7 \%$  de DQO al cabo de 12 días utilizando *C. vulgaris*.

En base a los resultados se demuestra la eficiencia de *Sc. acutus* en los procesos de depuración de agua, lo que indicaría un método para resolver el problema medio ambiental que representan las aguas residuales o efluentes municipales y obtener biomasa algal de diferentes usos como en acuicultura, alimento vivo, y en la agricultura como fertilizantes, proporcionado valor agregado al cultivo de microalgas en aguas residuales. Desde el punto de vista ambiental,

Romero *et al.* (2009), consideraron que el tratamiento de las aguas residuales es una cuestión prioritaria a nivel mundial, ya que es importante disponer de agua de calidad y cantidad suficiente para una mejora del ambiente, la salud y la calidad de vida.

El crecimiento de *Sc. acutus*, fue poco notorio la presencia de la fase inicial de adaptación es probable, al parecer a la disponibilidad para las microalgas de los nutrientes presentes en el efluente homogenizado por la mezcla y velocidad con que desembocan en la playa marina, así como el adecuado tamaño de inóculo ( $32 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup>). Cabe destacar que la cepa algal no fue aclimatada previamente al efluente crudo, lo que indicaría, la gran habilidad de *Sc. acutus* de crecer en estos efluentes de manera exponencial en la que la velocidad de crecimiento es notoria desde el inicio de los cultivos.

Los cultivos de *Sc. acutus* se iniciaron con densidades poblacionales similares ( $p > 0,05$ ) de  $32 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> en todos los tratamientos, que se incrementó con diferentes tendencias en cada uno de los tratamientos, aunque la disminución observada en los controles durante los días 1 y 2 ( $19 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>) podría explicarse por la adecuación de las células a condiciones saturadas de iluminación o deficiencias en la aireación (Borowitzka, 1999), para luego mostrar el característico crecimiento de los cultivos creciendo en adecuadas condiciones hasta valores de  $211,3 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> al final de la experiencia.

En relación a los cultivos con efluentes municipales, mostraron mayores crecimientos poblacionales diarios promedio hasta el día 6 y 7, probablemente, como consecuencia de la atenuación de la iluminación inicial de los cultivos derivados de la coloración marrón del efluente municipal dosificado, y de las condiciones heterotróficas del crecimiento de tales cultivos. Lo que indicaría, que estas condiciones son propiciadas por la muertes y desintegración de la flora bacteriana anaeróbica por las condiciones altamente aeróbicas del crecimiento algal (Tam & Wong, 2001) en la que las condiciones heterotróficas permiten adquirir su energía y requerimientos de carbono de compuestos orgánicos (Gladue, 1991), por

lo que estos cultivos tendrían mejores condiciones de crecimiento reflejados en los resultados obtenidos.

Las densidades de  $6,47$  y  $6,72 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> halladas en cultivos conteniendo 60% y 80% de aguas residuales municipales son menores a los reportados por Alam *et al.* (2004) que cultivó *Sc. obliquus* en medio basal Bold obteniendo densidades poblacionales de  $10,97 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> a  $19,73 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, y a los de Toyub *et al.* (2008), que utilizaron residuos de la fabricación de dulces ( $9,71 \times 10^6$  cél. mL<sup>-1</sup>). Cabe la posibilidad que los menores valores de las densidades poblacionales determinadas, sean consecuencia de los bajos tenores de nitrógeno ( $0,089$  mg L<sup>-1</sup> de nitratos,  $0,026$  mg L<sup>-1</sup> de nitritos y  $2,82$  mg L<sup>-1</sup> de nitrógeno amoniacal) y fósforo ( $0,131$  mg L<sup>-1</sup> de fosfatos) en el efluente municipal en comparación al medio basal Bold, que contiene mayores contenidos de nitrógeno ( $250$  mg L<sup>-1</sup> como NaNO<sub>3</sub>), y de fosforo ( $175$  mg L<sup>-1</sup> como KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Alam *et al.*, 2004).

No obstante, las bajas concentraciones de nitrógeno ( $2,22$  mg L<sup>-1</sup>) y fósforo ( $0,044$  mg L<sup>-1</sup>) en el efluente municipal, todos los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con dicho efluente crecen mejor que los controles pese a tener más nitrógeno ( $100$  mg L<sup>-1</sup>) y fósforo ( $6,14$  mg L<sup>-1</sup>) aportados por la urea y el H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, respectivamente, que como se ha mencionado anteriormente, sea consecuencia del eficiente aprovechamiento de las sustancias orgánicas y sales minerales liberadas por la alta carga bacteriana anaeróbicas ( $24 \times 10^4$  NMP/100 mL) muertas por las condiciones altamente aeróbicas de los cultivos en la que el nitrógeno se absorbe directamente en forma de amonio (Beevers & Hageman, 1983). Por otro lado, los bajos contenidos de N y P del efluente municipal indicarían su activo consumo por las bacterias y transformación en materia orgánica cuya desintegración servirá de fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo orgánicos promotoras del crecimiento algal observado.

La reproducción directa de *Sc. acutus* implica la formación de autosporas cuyo número se relaciona con las condiciones del crecimiento y de la fuente orgánica del carbono, en consecuencia, aquellos cultivos heterotróficos y mixotróficos presentarán diferentes composiciones de su estructura celular poblacional,



considerándose que la producción de cenobios de 4 y 8 células indicarían buenas condiciones de cultivo (Becker, 1994; Merino, 1999), en la que la presencia de carbono y nitrógeno orgánicos, procedentes de las sustancias orgánicas aportadas por la degradación bacteriana, favorecerán la reproducción y el crecimiento algal.

Los cultivos dosificados con efluente municipal muestran tendencia al predominio de aquellos cenobios de 4 células, cuyos promedios acumulados al final de las experiencias son mayores que el control, denotando la utilización de N y P orgánicos como lo han demostrado Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2012), en cultivos de *Sc quadricauda* con melaza como fuente de carbono orgánico. Estos resultados ratifican el consumo de las fuentes orgánicas aportadas por las bacterias que previamente han consumido los nutrientes inorgánicos o sales minerales presentes en el efluente municipal.

Además, es posible observar ligera tendencia a incrementarse el número de células aportadas por los cenobios de 4 células con el aumento de la concentración de las aguas residuales. También es llamativa la presencia de cenobios de 8 células en todos los cultivos experimentales como consecuencia del adecuado aporte de nutrientes y de las condiciones de cultivo; sin embargo, el predominio de células de 8 células en los cultivos control proporcionaría a estos, mayor eficiencia en los procesos de sedimentación natural (Becker, 1994) y centrifugación de las suspensiones algales para la obtención de la biomasa algal durante el procesamiento de los cultivos masivos al aire libre.

La tasa de crecimiento de los cultivos algales es una medida que permite evaluar la dinámica del crecimiento y las condiciones que la influyen, destacando el aporte de nutrientes y su aprovechamiento. Es común determinar  $\mu$  y TD al final de la fase logarítmica del crecimiento que en nuestros ensayos ocurren en los días 6 y 7. Así, la tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) al sexto día de cultivo de *Sc. acutus*, presentaron mayores promedios de manera similar ( $p > 0,05$ ) en el dosificado con 60% y 80% de efluente municipal con valores de 0,5074 y 0,4896 div/día, respectivamente; seguido por el de 90% y 20% con 0,4605 y 0,4672 div/día, respectivamente, mientras que las menores fueron con 40% y los controles con

0,4499 y 0,2637 div/día, respectivamente. Los valores de  $\mu$  correspondientes al sétimo día, pese a mostrar similares tendencias, son ligeramente menores que se explica por la natural declinación de los cultivos al acercarse a la fase estacionaria del crecimiento (Capa, 2010).

Comparativamente, los valores más altos de  $\mu$  obtenido en los cultivos dosificados con 60% en el día 6 (0,5074 div/día) son menores a los reportados por Ortega-Salas & Reyes-Bustamante (2012) en cultivos de *Sc. quadricauda* utilizando medio Guillard f/2 (0,72 div/día), debido al adecuado balance de nutrientes durante la formulación química de dicho medio de cultivo (Guillard, 1975), y mayores a los de Roleda *et al.* (2013), en el cultivo de *Nannochloropsis oculata* (0,481 div/día), posiblemente a las diferentes características de su crecimiento, metabolismo y/o composición química de la biomasa de estas microalgas. Así mismo, la menor tasa de crecimiento (0,425 div/día) de *Sc. quadricauda* durante 12 días reportados por Méndez *et al.* (2010) utilizando efluentes de pozas de estabilización, demostrarían la mejor riqueza de nutrientes derivados del uso de efluentes municipales y las condiciones de cultivo de *Sc. acutus* en los ensayos.

Respecto al tiempo de duplicación poblacional (TD), estos presentan la misma tendencia y cuyos valores mantienen una relación inversa a  $\mu$  (Guillard, 1975), por cuanto a mayor número de divisiones diarias corresponde menor tiempo de duplicación; en tal sentido, los mayores valores fueron determinados en los cultivos dosificados con 60% de efluente municipal en el día 6 (1,366) y con 80% (1,594) en el día 7, mientras que los cultivos controles mostraron, en ambos días, mayores tiempos de duplicación diaria (2,629 y 2,571 div/día en los días 6 y 7, respectivamente).

Por consiguiente, los resultados demuestran que la capacidad de *Sc. acutus* de metabolizar eficientemente los nutrientes presentes en el efluente municipal posibilita su utilización con fines de biorremediación de efluentes residuales, pues estos contienen alta carga bacteriana y material orgánico (Ferrera-Cerrato, *et al.*, 2006).

En el presente trabajo, la temperatura varió entre 25,1°C y 25,7°C durante los 7 días de la experiencia; estando en el rango (25°C a 36°C), mencionado por (Abalde *et al.*, 1995; Richmond & Becker, 1986), aunque un poco menor (28°C), de lo mencionado por Garibay *et al.* (2009); así mismo, Vargas *et al.* (2014), cultivaron *Scenedesmus* sp con temperaturas entre 20°C y 35°C pero no demostraron efectos significativos. Por lo que la temperatura del cultivo de *Sc. acutus* no han ejercido influencia en la dinámica del crecimiento algal. Las variaciones de la temperatura de los cultivos algales son consecuencia de las condiciones de cultivo, en la que los recipientes plásticos y la constante iluminación y aireación no permiten fluctuaciones extremas; adicionalmente, los aireadores utilizados están situados dentro del laboratorio inyectando aire cuyas temperaturas son más estables que aquellos aireadores que inyectan aire del medio externo.

El pH del agua de los cultivos experimentales de *Sc. acutus*, mostraron incrementos de manera similar ( $p > 0,05$ ) con el control HM, siendo ligeramente mayores en aquellos cultivos con mayor contenido del efluente municipal (9,13 y 9,16), por lo que dichas variaciones reflejan el adecuado crecimiento algal; es decir, las fuentes orgánicas de nitrógeno y carbono presentes en el efluente son bien aprovechadas metabólicamente por *Sc. acutus*. En tal sentido, el pH revelaría la dinámica del consumo de los nutrientes, esperándose que en aquellos cultivos con mayor contenido de efluente presenten mejores incrementos poblacionales. Los valores del pH de los cultivos se encuentran en el rango (6,5 a 9,5 unid), mencionado por Garibay *et al.* (2009), notándose una ligera elevación en su valor, en los tratamientos dosificados con 90% de efluente municipal ensayado desde el inicio del experimento con 8,07 hasta el día tres con 9,16 de pH, explicándose porque la velocidad de crecimiento de las microalgas requiere rápido consumo del carbono disponible, siendo más evidente cuando el medio de cultivo no es tamponado (Lourenco, 2006). Las variaciones del pH de los cultivos, por estar en el rango básico (7,83 - 9,13) y por la capacidad de *Sc. acutus* de crecer en un amplio rango, los crecimientos determinados reflejarían el activo consumo de los nutrientes contenido en el efluente municipal, sin influenciar en los resultados obtenidos.

Las microalgas son eficientes en la remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales (Hammouda *et al.*, 1995; Tam & Wong, 1996; Brennan & Owende, 2010; Park *et al.*, 2011; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Esto se debe a que son nutrientes esenciales en la formación de biomasa (Markou & Georgakakis, 2011), por lo que incorporan el amonio, nitrato y fósforo por absorción directa (Tam & Wong 1996). Las principales formas en que se encuentra el nitrógeno en las aguas residuales son  $\text{NH}_4$  (amonio),  $\text{NO}_2$  (nitrito) y  $\text{NO}_3$  (nitrato), mientras que el fosfato se presenta como  $\text{PO}_3$  (ortofosfato) (Hammouda *et al.*, 1995; Abdel-Raouf *et al.*, 2012). Las bajas concentraciones del N y P en el efluente municipal no justificarían los crecimientos algales observados; sin embargo, es viable que la muerte de las bacterias proporcionarían al medio de cultivo una serie de sustancias orgánicas (enzimas, aminoácidos, amidas, etc.), fácilmente asimilados por la microalga (Moronta *et al.*, 2006), lo cual sugiere que la presencia de la carga bacteriana en el medio de cultivo es muy importante para el crecimiento algal, aun cuando se necesita la presencia de otros elementos nutritivos. El crecimiento de microalgas requiere de macronutrientes (C, N, P, S, K, Na, Fe, Mg, Ca) y micronutrientes o elementos traza (B, Cu, Mn, Zn, V, Se) necesarios en la composición elemental de las células influyendo en los coeficientes de velocidad de las reacciones biosintéticas (Richmond, 2004).

El crecimiento determinado en los cultivos experimentales, al parecer, se deben al aprovechamiento de las sustancias químicas liberadas por las bacterias anaeróbicas muertas que las algas utilizan como fuentes de nitrógeno y carbono orgánico. Así mismo, se considera que las microalgas pueden tomar nitrógeno del medio, generalmente en forma de urea, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno gas y óxidos de nitrógeno. En tal sentido, Xin & Hong-Yin, (2010), demostraron que *Scenedesmus* sp, crece más rápido con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato, en cambio, la eliminación de fósforo y nitrógeno fue más completa en el cultivo donde el nitrógeno estaba presente en forma de nitrato y urea que en el cultivo con amonio, puesto que el nitrógeno en forma de amonio, cuyo equilibrio de disociación depende de la temperatura y el pH del medio, inhibe también el crecimiento de la microalgas debido a que es normalmente toxico para los

organismos fotosintéticos, por desacoplar el transporte electrónico en el fotosistema II y compite con el agua en las reacciones de oxidación que generan el O<sub>2</sub> libre. En este sentido, las bajas concentraciones del nitrógeno aportado por el efluente municipal (0,444 a 2,221 mg L<sup>-1</sup>) son total y rápidamente consumidas durante las fases iniciales del crecimiento algal, y la liberación de sustancias orgánicas procedentes de las bacterias muertas soportarían los posteriores y vigorosos crecimiento observados en los diversos tratamientos.

Según Lourenco (2006) y Ördög *et al.* (2011), el fósforo (P) es un elemento muy importante en la composición química de las microalgas, principalmente por su participación en los procesos energéticos intracelulares que, junto al nitrógeno, son factores limitantes del crecimiento algal, requiriéndose de adecuadas concentraciones, que en nuestra experiencia estaría definida por los del medio HM utilizado como control. No obstante, las bajas concentraciones de este nutriente en los cultivos dosificados con efluente municipal (0,009 a 0,044 mg L<sup>-1</sup>), los mayores crecimientos que el control observados obedecerían, como en el caso del N, a los aportes de la degradación bacteriana y la capacidad de metabolizar eficientemente los nutrientes procedentes de las sustancias orgánicas e inorgánicas del efluente municipal y de su flora bacteriana. Andrade *et al.* (2009), determinaron que *Scenedesmus* es un género con capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en las aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada y capacidad de resistir variaciones ambientales lo que la hacen sobrevivir y ser un género común de aguas residuales.

Es interesante considerar que durante la dinámica del crecimiento algal la generación y liberación de oxígeno fotosintético elimina y/o reduce notoriamente la población bacteriana, especialmente los coliformes fecales de 130 000 NMP/100 mL a menos de 1,8 NMP/mL, estimándose en 99,99 % su tasa de remoción; en consecuencia, el crecimiento algal ocasiona la eliminación total de las bacterias anaeróbicas, de tal manera que los mayores incrementos poblacionales de *Sc. acutus* en los cultivos con las aguas residuales municipales ensayadas estarían relacionados directamente con las mayores cantidades de estas bacterias

aportadas. Estos resultados son más eficientes que los reportados por Albarracín *et al.* (2005) quienes, en aguas residuales, lograron remover hasta 80% al cabo de 12 días en cultivo de *Chlorella vulgaris*.

El mal olor que presentaron de las aguas residuales municipales del distrito de Chimbote es debido a la presencia de sulfuros ( $0,132 \text{ mg L}^{-1}$ ) y por la presencia de la carga bacteriana (*E. coli*), lo que sugiere que estas bacterias serían las que generan ácido sulfúrico. Méndez *et al.*, (2010) mencionaron que los olores desagradables en aguas residuales están determinados por la presencia de bacterias anaerobias productoras de ácido sulfhídrico; el bajo oxígeno disuelto encontrado ( $0,50 \text{ mg/L de O}_2$ ) y el pH disminuido ( $7,87$ ) influyen en la proliferación de éstas bacterias productoras de sulfuro. Al final del ensayo se obtuvo una baja del 99% en los valores del sulfuro en los cultivos con la microalga *Sc. quadricauda* respecto al valor inicial del agua residual ( $1,645 \text{ mg/L sulfuro}$ ); lo que indica que la iluminación constante e inoculación microalgal de la clorofita *Sc. acutus* permitió que durante el proceso de su cultivo aflorara la presencia de oxígeno y por ende la muerte de las bacterias anaeróbicas (*E. coli*).

Luego del cultivo microalgal con *Sc. acutus* se percibió la eliminación de los malos olores de las aguas residuales que presentaron en su etapa inicial. Una de los compuestos que contribuye en gran medida a la generación de malos olores es el sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) que es un producto natural de la descomposición anaerobia de la materia orgánica, muy frecuentemente encontrado en drenajes y en plantas de tratamiento de aguas residuales y de lodos de desecho. Así mismo, Morgan *et al.* (1999), aduce que el medio anaeróbico es el que genera olores desagradables en mayor concentración debido al metabolismo de ciertas bacterias anaerobias como las sulfatorreductoras, sobre todo si existe en las aguas residuales altas concentraciones de sulfatos y sulfuros.

El cultivo de la microalga *Sc. acutus* redujo la alta carga bacteriana de *E. coli* (Coliformes totales =  $24 \times 10^4 \text{ NMP/100 mL}$  y Coliformes fecales =  $13 \times 10^4 \text{ NMP/100 mL}$ ) del efluente municipal, a menos de  $1.8 \text{ NMP/100mL}$ , lo que demuestra que esta microalga cultivada con aguas residuales municipales, es perceptible y aceptable

en los procesos de remoción, lo que permiten relacionar directamente el contenido de estos elementos y el crecimiento bacteriano, como paso inicial de la utilización de las aguas residuales para el cultivo de *Scenedesmus*. Méndez *et al.*, (2010), determinaron que los coliformes totales y fecales presentan una disminución durante el cultivo, donde los coliformes fecales fue del 86 %; indicativo de la efectividad del proceso en la eliminación de microorganismos patógenos como: Coliformes totales (23 000 NMP/100 mL) y Coliformes fecales (7 800 NMP/100 mL). El aprovechamiento de *S. quadricauda* en procesos de depuración, resuelve un problema medio ambiental y mejora la calidad del efluente a la vez que permite obtener productos aplicables en diferentes usos como acuicultura, agricultura o fertilizantes. De esta manera este proceso permite poner un valor agregado al cultivo de microalgas en aguas residuales (Salazar, 2006).

En el presente estudio, el medio HM utilizado para el cultivo de *Sc. acutus*, tuvo cantidades extremadamente mayores de N y P que las contenidas en las dosificaciones ensayadas con el efluente municipal, cuyos valores del N están calculados en función al aporte de las diversas fuentes nitrogenadas (nitratos, nitritos y amoníaco) y el P por el de fosfatos. Pese al bajo contenido de N y P, los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con el efluente municipal mostraron mayor crecimiento algal reflejado en la eliminación de los gases de sulfuro, ya sea por su desplazamiento físico y/o el aprovechamiento por las microalgas. Méndez *et al.*, (2010), mencionaron que las concentraciones de nitrógeno inorgánico en el líquido cloacal fueron bajo nitrato (2,5 mg/L) y elevado amonio (63,7 mg/L) y en el día 12 disminuyeron las concentraciones de ambos nutrientes (1,5 y 3,5 mg/L respectivamente). Los datos obtenidos confirman su efectividad en la remoción de nutrientes y su relación con el crecimiento (Salazar, 2006). Así mismo, las tasas de disminución de amoníaco, nitrato y fósforo de 94 %, 40 % y 94 % respectivamente, por cuanto el nitrógeno y fósforo consumidos son activamente incorporados en la composición celular y por ende el crecimiento de las microalgas (Cabrera & Pulla, 2014).

El cultivo de la microalga *Sc acutus* en medios que contienen efluentes municipales domésticas son eficientes para la remoción de nutrientes que contienen los ecosistemas y principalmente eliminar la carga bacteriana; consecuentemente este sistema sería adecuado para promover un mecanismo de desarrollo limpio para la bahía “el Ferrol”. Además, el agua residual depurada yacería favorable para el desarrollo de riego en la agricultura y por ende el mejoramiento de la calidad del agua y la salud pública. El tratamiento de aguas residuales domésticas junto a la producción de biomasa de microalgas es un proceso tecnológicamente simple, que aportaría beneficios ambientales directos para la zona e ingresos por la venta de biocombustible y aplicación de biofertilizante en la agricultura local, ayudando al desarrollo de la zona y a mejorar sus condiciones de vida.



## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

1. Las mayores tasas de crecimiento poblacional ( $\mu = 0,5074$ ) de *Sc. acutus* fueron obtenidos con la dilución del efluente municipal entre el 60 y 80%; asimismo, en estas diluciones se obtuvieron los mejores TD (1,366). En cambio, los valores menores valores de  $\mu$  y TD fueron obtenidos en los cultivos controles (0,2637 y 2,629, respectivamente).
2. Los valores iniciales de DBO ( $60 \text{ mg L}^{-1}$ ) y DQO ( $35 \text{ mg L}^{-1}$ ) del efluente municipal utilizado en los cultivos de *Sc. acutus* llegan a ser negligibles por la generación continua de oxígeno fotosintético ( $9,5 \text{ mg L}^{-1}$ ) por el crecimiento vigoroso de los cultivos.
3. Las bajas concentraciones del N ( $2,221 \text{ mg L}^{-1}$ ) y P ( $0,062 \text{ mg L}^{-1}$ ) en el efluente en comparación al medio control N ( $96,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) y P ( $6,14 \text{ mg L}^{-1}$ ) son consumidas durante el crecimiento de *Sc. acutus*.
4. El cultivo de *Sc. acutus* eliminó totalmente (99,99%) la carga bacteriana anaeróbica especialmente *E. coli*.

## 5.2 RECOMENDACIONES

1. Realizar ensayos de cultivo de *Sc. acutus* a mayor escala y al aire libre (uso de piletas y/o biorreactores) con efluentes municipales, donde se optimice temperatura, iluminación, fotoperiodo natural, y se estandarice la calidad de la biomasa algal producida.
2. Realizar ensayos biológicos y químicos de la biomasa producida bajo estas condiciones conducentes a su masiva utilización con fines industriales, agrícolas o alimentarias, para la apertura de nuevas líneas de investigación productiva para determinar la factibilidad técnica y económica.
3. Realizar estudios con especial énfasis en sistemas de cosechas más eficientes y evaluaciones económicas para los distintos usos de la biomasa que se pueda producir con el cultivo de *Sc. acutus* en aguas residuales municipales.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero (1995). Microalgas: Cultivos y aplicaciones. Monografía N° 26. Laboratorio de microbiología, facultad de ciencias, Universidad de Coruña, España. 210pp.
- Abdel-Raouf N, AA Al-Homaidan & IBM Ibraheem (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.
- Agudo X. (2001). Tiempo, espacio y Poder: Las claves metadiscursivas del desarrollo sustentable. *Tóp. Educ. Amb.* 3: 7-27.
- Alam S.L, J. Sun, M. Payne, B. D. Welch, B. K. Blake, D. R. Davis, H. H. Meyer, S. D. Emr, W. I. Sundquist (2004). Ubiquitin interactions of NZF zinc fingers. *EMBO J* 23(7):1411-21
- Albarracín I.; M. Cravero & T. Romero (2005). Observaciones preliminares sobre crecimiento de *Chlorella vulgaris* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. *Revista Agua*, 155: 63-70.
- Andrade C.; A. Vera; C. Cárdenas & E. Morales (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 32(2):126-134.
- APHA-AWWA-WEF (2005). Métodos estándares para el análisis de agua potable y agua residuales. Standard Methods for the examination of wastewater. 21 edit. American Public Health Association (APHA) - American Water Works Association (AWWA) - Water Environment Federation (WEF). 1082p.
- Bartone C. (1990). International perspective on water management and wastewater reuse- appropriate technologies. IAWPRC. Biennial International Conference and Water Reuse. Seminar, Kyoto, 29 July – 3 August.
- Basurto E. (1994). Bioabono líquido como medio de cultivo para microalgas. Ciencias biológicas y de la salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, México. 31p.
- Baumgarten E.; M. Nagel & R. Tischnel (1999). Reduction of the nitrogen and carbon content in a swine waste with algae and bacteria. *Environmental Geology*. 52(2):281-284.
- Beevers L., & R.H. Hageman (1983). Uptake and reduction of nitrate: Bacteria and higher plants. Pp. 351 -375 in A. Lauchli and R.L. Bielek (eds.), *Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. Vol. 15 A.* Springer – Verlag, Berlin.
- Becker E.W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and microbiology.* Cambridge University Press. 293 págs.

- Bermúdez J. & E. Morales (2002). Fracción soluble de gallinaza como fuente de nutrientes para el cultivo de la microalga marina *Chroomonas* sp. III Convención anual de la ASOVAC. Universidad centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto. Venezuela.
- Bich N.; M. Aziz & A. Kadir (1999). Combination of *Chlorella vulgaris* and *Eichhornia crassipes* for wastewater nitrogen removal. *Water Research*. 33:2357-2362.
- Borowitzka MA. (1999). Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology* 70: 313-332
- Brennan M. & P. Owende. 2010. Biofuels from microalgae- a review of technologies for production, processing and extraction of biofuels and co-products. *Renewable and sustainable energy reviews*. 14:557-557.
- Cabrera M. & Pulla M. (2014). "Línea base para el aprovechamiento de microalgas de sistemas de tratamiento de agua residual". Tesis pregrado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Cuenca-Ecuador.
- Capa W. (2010). Biología y Biotecnología de Microalgas. Primera Edic. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC). Lima, Perú. 181p.
- Chacón C., C. Andrade, C. Cárdenas & E. Morales (2006). Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *SciELO*, 38: 1-13.
- Chen I.-C., Hill, J.K., Ohlemüller, R., Roy, D.B. & Thomas, C.D. (2011). Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science*, 333, 1024-1026.
- Chisti Y. (2007). Biodiesel from microalgae. Institute of Technology and Engineering, Massey University, Palmerston North, New Zealand. *Biotechnology Advances* 25 (2007) 294–306.
- Choonawala B. B. & F. M. Swalaha (2002). Characterisation of the effects of pretreatments on the marine alga, *Anthophycus longifolius* to enhance lead and cadmium biosorption. Book of Abstracts of the 1st Congress of the International Society for applied Phycology/9th International Conference on Applied Algology. Rosquetas de Mar, Almería, España, p. 183
- Crites R & G. Tchobanoglous (2000). *Sistemas de manejo de aguas residuales para núcleos pequeños y descentralizados*, tomo 1, Santafé de Bogotá: McGraw-Hill Interamericana.
- Ferrera-Cerrato R., N. Rojas-Avelizapa, H. Poggi-Varaldo, A. Alarcón & R. Cañizares-Villanueva (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista latinoamericana de microbiología*. Vol. 48, No. pp. 179 - 187pp.

- Flynn K. J., J. A. Raven, T. Alwyn, V. Rees, Z. Finkel, A. Quigg, & J. Beardall (2010). Is the growth rate hypothesis applicable to microalgae? *J. Phycol.* 46: 1-12.
- Garibay A., R. Vázquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez (2009). Biodiesel a partir de microalgas. *BioTecnología.* 13(3):38-61.
- Gladue R. (1991). Heterotrophic microalgae production potential for application to aquaculture feeds En Rotifer and Microalgae CuHure Systems The Oceanic Inst Hawaii 275286 pp
- Gómez L. & Z. Ramírez (2004). Microalgas como biomonitores de contaminación. *Revista Cubana de Química.* 15(2):34-48.
- González L.; R. Cañizares & S. Baena (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Technol.* 60:259-262.
- Gonzales A. (2000). Alternativas en el cultivo de microalgas. Escuela superior Politécnica del Litoral. Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Guayaquil- Ecuador.
- Gonzales M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos.* 59:64-70.
- Guillard RRL. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Smith WL, Chanley MH, editors. Culture of marine invertebrate animals. New York: Plenum Press. pp. 26–60.
- Hammouda O, A Gaber & N Abdel-Raouf (1995). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31: 205-210.
- Hanuk K. & L. Choul-Gyun (2002). Eutrophic compounds by microalgae from wastewater. Book of Abstracts of the 1st Congress of the International Society for applied Phycology/9th International Conference on Applied Algology. Rosquetas de Mar, Almería, España, p. 209.
- Harborth J. (1991). The debate about sustainable development: starting point for an environment-oriented international development policy. *Economics*, 44:7-31.
- Harun R., M. Singh, G. M. Forde & M. K. Danquah (2010). Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14: 1037-1047.
- Hutchins S. R., Davidson, M. S., Brierley, 1. A. & Brierley, C. L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Almual Reviews o/Microbiology*, 40, 311-336.

- IGA-EPS (2006). Informe de la gestión ambiental a la empresa portadora de servicio de agua potable y alcantarillado del Santa, Casma y Huarmey – Recuperando el sistema marino. Informe de la contraloría general de la república, gerencia de medio ambiente y patrimonio cultural. Lima, Perú. 112p.
- Jares J. (2009). Instalación de planta procesadora de harina residual de productos hidrobiológicos. Lima, Perú.
- Jonte L., L. Gaubeca, C. Cárdenas, I. Araujo, J. Ortega y E. Morales (2002). Agua residual urbana de un sistema de lagunas de estabilización para el cultivo de la cianobacteria *Synechocystis* sp. III Convención anual de la ASOVAC. Universidad centro occidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto. Venezuela.
- Kojima H. & Lee Y- K. (2001). Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology. Springer-Verlag. Hong-Kong. 310p
- Kwang-Yong L & L. Choul-Gyun (2002). Nitrogen Removal from Wastewaters by Microalgae Without Consuming Organic Carbon Sources. I Stitute of Industrial Biotechnology, Departament of Biotechnology, Inha University, Korea. J. Microbiol. Biotechnol, 12(16), pp. 979-985
- Khowaja M. (2000). Waste stabilization ponds-design guidelines for southern Pakistan. *In: 26 th WEDC Conference: water, sanitation and hygiene: challenges of the millennium.* Dhaka, Bangladesh. 282-286pp.
- Lau P.S.; N.F. Tam & Y.S. Wong (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental pollution.* 89:59-66.
- Lavoie A. y J. De La Noüe (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: A New approach for wastewater biological tertiary treatment. *Wat. Res.* 19: 1437-1442.
- Lee Y.-K. & Shen, H. (2004). Basic culturing techniques. In Handbook of microalgal culture: Biotechnology and Applied Phycology. (Ed. Amos Richmond) Blackwell Publishing Ltd. 40-56 págs.
- Lourenço S.O. (2006). Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações. Editora Rima, São Carlos – Brazil.
- MALGAS (2014). Oportunidades de negocio alrededor de las microalgas. Edición, AST ingeniería S.L. Parque científico y tecnológico de Gijón. Asturias, España. 90 p.
- Mara D. & S. Carnicross (1990). Directrices para el uso sin riesgos de aguas residuales y excretas en agricultura y acuicultura. Organizacion Mundial de la Salud (OMS), Ginebra.

- Mara D. (2004). Domestic wastewater treatment in developing countries Earthscan London.
- Markou G. & D. Georgakakis (2011). Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88: 3389-3401.
- Martínez L. (2008). Eliminación de CO<sub>2</sub> con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León, 226 pp.
- Méndez L.; I. Albarracín; M. Cavero & R. Salomón (2010). Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. 9p. <<http://hdl.handle.net/1834/3639>>. Accesado: 18 de setiembre del 2014.
- Mendoza H, A. de la Jara & E Portillo (2011). Planta piloto de cultivo de microalgas: Desarrollo potencial de nuevas actividades económicas asociadas a la biotecnología en Canarias, 60 pp. Instituto Tecnológico de Canarias, Santa Cruz de Tenerife.
- Metcalf E. & HP. Eddy (1995). Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y reutilización, McGraw-Hill, Madrid.
- Metcalf E. & HP. Eddy (2003). Waste engineering: treatment and reuse. 4th ed. McGraw-Hill, Nueva York. 1819 p.
- Merino, F. (1999). Efecto del ácido acético con sustrato limitante en el crecimiento de *Scenedesmus acutus* usando cultivos batch. Informe de Investigación. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote, Perú.
- Moronta R, Mora R, Morales E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía*; 23 (1): 27-41.
- Morgan J. M., S. Revah & A. Noyola (1999). Malos Olores en Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales: su control a través de procesos biotecnológicos. Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, UNAM, Apdo.Postal 70-472; 04510, Ciudad Universitaria, Coyoacan, México D.F., México.
- Moscoso, J. & Flórez A. (1991). Reuso en acuicultura de las aguas residuales tratadas en las lagunas de estabilización de San Juan, Sección I: Resumen ejecutivo. Lima: CEPIS
- Moscoso, J. A. (1999). Acuicultura con aguas residuales tratadas en las lagunas de estabilización de San Juan, Lima, Perú. Centro panamericano de ingeniería sanitaria y ciencias del ambiente (CEPIS). Lima, Perú. 21p.

- Moscoso, J. (2011). Estudio de opciones de tratamiento y reuso de aguas residuales en Lima metropolitana. University of Stuttgart – LIWA, para el proyecto de gestión sostenible del agua y las aguas residuales en centros de crecimiento urbano afrontando al cambio climático. Lima, Perú. 90p.
- MVCS (2013). Protocolo de Monitoreo de la calidad de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas o municipales. Ministerio de Vivienda, Construcción y Saneamiento (MVCS), Oficina de Medio Ambiente, RM N° 273-2013-Vivienda. Lima, Perú. 31p.
- Olvera-Ramírez, R.; Cañizares-Villanueva, R. O.; Ríos-Leal, E. (2000). Extracción de pigmentos naturales a partir de microalgas y cianobacterias y su posible aplicación industrial. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 46 (1).
- Ördög, V., W.A. Stirk, P. Balint, J. Van Staden & C. Lovasz (2011). Changes in lipid, protein and pigment concentrations in nitrogen stressed *Chlorella minutissima* cultures. J. Appl. Phycol., 24, 907-914.
- Oswald, W. J. (1988). The role of microalgae in liquid waste treatment and reclamation. In: Lembi, C. A. & Waaland, JR. (eds.): Algae and Human affairs. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 255-281.
- Oswald, W. J. (1957). Light Conversion efficiency in photosynthetic. Oxygenation. IER, serie 44. Sanitary Engr. Res. Lab. Univ. Calif. Berkeley. Pp. 127.
- Oswald, B & H. Gotaas (1957). Photosynthesis in sewage treatment. Trans. Am. Soc. Civ. Eng., 122: 73-105.
- Park J, R. Craggs & A. Shilton (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. Water Research 45: 6637-6649.
- Pieper, D. H. & Reineke, W. (2000). Engineering bacteria for bioremediation. Curr. Opin. Biotechnol, núm. 11, pp. 262-270.
- PRODUCE (2002). Protocolo para el monitoreo de efluentes y cuerpo marino receptor. Separata especial - Diario oficial el peruano. Resolución ministerial N° 003-2002-PE. Ministerio de la producción (PRODUCE), Perú. 20p.
- Richmond A. (ED) (2004). *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*. Ed. Blackwell Science Ltd. UK. 588p.
- Richmond A & E. W Becker (1986). Technological aspects of mass cultivation: a general outline. In A. Richmond, A (Ed.). CRC Handbook of Microalgal Mass Culture: 245-263. CRC Press Inc., Boca Ratón (Florida).



- Riquelme C. & R. Avendaño (2003). Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural*. 76:725-736.
- Roleda M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley (2013). Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*. 129:439-449.
- Romero T.; L. Fresneda & D. Hernández (2001). Cultivo semicontinuo de la microalga *Chorella* sp. para el tratamiento de residuales pesqueros. *Bol. del Centro de Inv. Biológicas*, 35: 42-51.
- Romero T.; H. Miyashita & N. Kurano (2000). Crecimiento y composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en residual pesquero. *Bol. del Centro de Inv. Biológicas*, 34: 93-110.
- Romero M; A. Colín; E. Sánchez & L. Ortiz (2009). Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: Evaluación de la remoción de la carga orgánica. *Rev. Int. Contam. ambient.* 25(3):157-167.
- Romero T. (2011). Desarrollo de *Chlorella* spp. en riles orgánicos pesqueros y su influencia en la remoción de la contaminación. *Ingeniería hidráulica y ambiental*. 32(3):32-38.
- Romo A. (2002). Manual para el cultivo de microalgas, Memoria Técnicas para un Trabajo Profesional. Universidad Autónoma de Baja California sur Área Interdisciplinaria de Ciencias del Mar. Departamento de Biología Marina. 50pp.
- Sáenz M. E., M. Tortorelli & R. Lauce (2003). Evaluación de la fitotoxicidad de efluentes industriales. Programa de Investigación en Ecotoxicología, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Luján-Argentina.
- Sacristán M., V. Luna-Pabello, E. Cadena-Martínez & A. Alva-Martínez (2014). Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivada en diferentes calidades de agua. *Bioresource Technol.* 146: 744-748.
- Salazar M. (2009). Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales mediante el uso combinado de gestión anaerobia y microalgas. *Contactos*. 73:16–22.
- Salazar M. (2006). Aplicación e importancia de la microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, 59:64-70.
- Schallenberg J. C.; G. Piernavieja; C. Hernández; P. Unamunzaga; R. García; M. Díaz *et al.* (2008). Energías Renovables y Eficiencia Energética. Instituto Tecnológico de Canarias, S.A

- Sheets J.; X. Ge; S. Park & Y. Li (2014). Effect of outdoor conditions on *Nannochloropsis salina* cultivation in artificial seawater using nutrients from anaerobic digestion effluent. *bioresource technology*. 152:154-161.
- Shelef G.; R. Moraine & G. Oron (1978). Photosynthetic biomass production from sewage. *Arch. hydrobiol. Ergebn. Limnol.* 11:3-14.
- Schubert E. (2003). Nonmotile coccoid and colonial green algae, p. 253-307. In J.D. Wehr & R. Sheath (eds.). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. California, EEUU.
- Silva J.; P. Torres & C. Madera (2008). Reúso de aguas residuales domesticas en agricultura. *Agronomía colombiana*. 26(2):347-359.
- Singh M.; D. Reynolds & K. Das (2011). Microalgal system for treatment of effluent from poultry litter anaerobic digestión. *Bioresource technology*. 102(23):10841-10848.
- Spolaore P., C. Joannis-Cassan, E. Duran & A. Isambert (2006). Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.
- Suárez G. & T. Romero (1990). Treatment and utilization of wastes from the fish processing industry. *Water Resources Management and Protection in Tropical Climates*. Stockholm: SERG. pp. 367-376.
- Suárez G.; T. Romero & E. Parra (1992). Evaluación de una planta piloto para depuración de residuales pesqueros y producción de microalgas en el CPI de Manzanillo. En: XXIII Cong. de la Asoc. Int. de Ing. San. y Amb. CUBAIDIS'92 2da. Parte, pp. 847-856.
- Sydney E. B., Silva T. E., Tokarski A., Novak A. C., Carvalho J. C., Woiciechowski A. L., Larroche C., Soccol C. R. (2011). Screenig of microalgae with potential for biodiesel production and nutrient removal from treated domestic sewage. *Appl. En.* 88, 3291 - 3294.
- Tam N. & Y. Wong (1989). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environ Pollut.* 58(1):19-34.
- Tam NFY & YS Wong (1996). Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology* 57: 45-50.
- Tam N.F.Y. & Y.S. Wong (2001). Wastewater nutrient removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental pollution*. 58:19-34.

- Tommasino H. Foladori, G. & Taks, J. (2005). La crisis ambiental contemporánea. Pp. 9-26. En: Faladori & Pierri (eds). ¿Sustentabilidad? Desacuerdos sobre el desarrollo sustentable. Universidad Autónoma de Zacatecas: México.
- Toyub M.; M. Miah; M. Habib & M. Rahman (2008). Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bang. J. Anim. Sci.* 37(1):86-93.
- Ugwu C.U. & H. Aoyagi (2008). Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource technology.* 99:4021-4028.
- UNESCO (2012). Educación para el Desarrollo Sostenible. Libro de consulta. <http://unesdoc.unesco.org/images/0021/002167/216756s.pdf>
- Valdez E. & A. Vázquez (2003). Ingeniería de los sistemas de tratamiento y disposición de aguas residuales. Fundación Ica, A.C. México D.F., México. 341p.
- Vargas J., D. Mitchell, A. Bellin & J. Ordonez (2014). The Microalgae derived hydrogen process in compact photobioreactors. *International Journal of Hydrogen Energy*, v. 39, n. 18, p. Disponible em: <<Go toISI>://WOS:000337859700003 >.
- Vera L. & A. González (2001). Cultivo da microalga *Tetraselmis chuii* prings em diferentes meios de cultura. *Ciências agron. Fortaleza.* 24(1/2):91-100.
- Vitousek P., M. H., Mooney, J. Lubchenco & J. Melillo (1997). Human Domination of Earth's Ecosystems, *Science*, 277:494-499
- Volesky B. (1999). Biosorption for the next century. El Escorial, Spain, June, pp. 20-23.
- Von Sperling, M. (1996). Introdução a qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Departamento de engenharia sanitária e ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Wase J., Foster, C. (1997). Biosorbents for Metal Ions. Taylor & Francis, London.
- WHO/EMRO (1987). Wastewater Stabilization Ponds: Principles of Planning and Practice, Tech. Pub. No.10, Alexandria, Egipto.
- Xin L. & H. Hong-Yin (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* *Bioresource technology.* 101:5494-5500.
- Yuan-Kun L. & S. Hui (2004). Basic culturing techniques. Handbook of microalgal culture. Blackwell Science Ltd., In E.A. Richmond (ed.). Iowa, EEUU. p. 40-45.

Zhang E.; B. Wang; S. Ning; H. Sun; B. Yang; M. Jin & L. Hou (2012). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *African Journal of biotechnology*. 11(4):6529-6534 pp.

## ANEXOS

Anexo 1a. Valores promedios del crecimiento poblacional ( $\times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>) de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales.

Día	DILUCIÓN (%)					
	0	20	40	60	80	90
0	32	32	32	32	32	32
1	19	137,3	187,3	131,0	154,7	22,3
2	19	250,7	293,3	444,0	253,3	83,7
3	92	408,0	414,7	517,3	316,0	320,7
4	132,7	429,3	428,0	589,3	506,7	307
5	119,3	552,0	586,7	592,0	549,3	404
6	155,7	528,0	476,0	672,0	604,0	507
7	211,3	576,0	530,7	646,	672,0	638

Anexo 1b. Crecimiento poblacional ( $\times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup>) de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales

Día	DILUCIÓN (%)																		
	0			20			40			60			80			90			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
0	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
1	20	23	14	132	108	172	174	164	224	156	120	117	132	144	188	25	23	19	
2	16	20	21	144	188	420	300	388	192	504	296	532	272	292	196	116	91	44	
3	88	86	102	396	364	464	480	460	304	676	408	468	256	424	268	464	278	220	
4	88	97	213	368	424	496	428	504	352	484	584	700	536	584	400	343	425	153	
5	86	112	160	536	380	740	552	724	484	576	536	664	632	548	468	380	524	308	
6	114	102	251	560	360	664	340	620	468	676	580	760	496	828	488	537	560	429	
7	250	147	237	672	388	668	576	668	348	780	640	520	788	668	560	567	678	669	

Anexo 2. Variaciones del pH de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales.

Día	DILUCIÓN (%)																		
	0			20			40			60			80			90			
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
0	7,9	7,8	7,8	7,8	7,9	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	7,9	7,8	7,8	7,8	7,8	7,8	8,0	8,1	8,1
1	8,0	7,9	7,8	8,1	8,1	8,0	8,0	8,1	8,1	8,0	8,1	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,2	8,4	8,3
2	8,4	8,0	7,9	8,3	8,3	8,5	8,4	8,5	8,6	8,5	8,4	8,4	8,5	8,4	8,5	8,5	8,5	8,6	8,5
3	8,7	8,3	8,3	8,8	8,9	8,6	8,8	8,9	8,9	8,9	8,8	8,9	8,8	9,0	8,9	9,1	9,2	9,2	9,2
4	8,8	8,9	8,8	8,6	8,8	8,9	8,6	8,9	8,8	8,7	8,9	8,7	8,8	8,9	8,9	9,1	9,1	9,2	9,2
5	8,8	8,8	8,9	8,8	8,6	8,7	8,8	8,6	8,8	8,6	8,6	8,7	8,8	8,6	8,6	9,0	9,0	9,1	9,1
6	8,6	8,7	8,8	8,8	8,5	8,7	8,8	8,7	8,9	8,8	8,9	8,7	8,8	8,8	8,6	8,9	9,1	9,2	9,2
7	8,7	8,8	8,6	8,6	8,7	8,7	8,7	8,8	8,9	9,0	9,1	9,0	8,9	9,1	9,0	9,1	9,1	9,2	9,2


Anexo 3. Determinaciones de la temperatura de los cultivos de *Sc. acutus* dosificados con aguas residuales municipales.

Día	DILUCIÓN (%)																	
	0			20			40			60			80			90		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	25,9	25,6	25,4	25,4	25,7	25,6	25,6	25,7	25,7	25,7	25,4	25,7	25,6	25,7	25,5	25,6	25,7	25,5
1	25,9	26,1	25,8	25,7	25,9	26,2	26,4	25,8	25,6	25,8	25,7	25,9	25,6	25,9	25,2	25,6	25,6	25,7
2	26,8	26,1	26,3	26,9	26,2	26,1	26,0	26,8	26,2	26,9	26,0	26,1	26,7	26,3	26,1	26,2	26,5	26,6
3	25,7	25,9	25,3	25,3	25,6	25,1	25,7	25,4	25,8	25,9	25,7	24,9	25,7	25,8	25,1	25,7	25,6	25,5
4	26,7	26,2	26,0	25,8	26,2	26,4	25,9	26,2	26,1	26,0	25,8	26,3	26,2	26,4	25,9	25,8	25,6	25,7
5	26,9	25,8	26,5	26,4	26,7	26,0	26,3	25,9	26,5	26,4	26,0	26,7	25,9	26,6	26,3	26,5	26,3	26,7
6	26,2	26,4	26,1	26,3	26,3	26,4	26,5	26,4	26,1	26,2	25,9	26,4	25,9	26,4	26,0	26,1	26,0	25,8
7	26,1	26,2	26,2	26,3	26,1	26,3	26,2	26,3	26,3	26,3	26,1	26,2	26,4	26,5	26,2	26,0	26,4	26,2



Anexo 4: Resultados de muestra de aguas residuales municipales llevadas y analizadas en el Laboratorio de COLECBI.

**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE - 046**



INACAL  
DA  
ACREDITACIÓN

---

**INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL N° 1372-16**

Pág. 1 de 2

**SOLICITADO POR** : JOSÉ MONZÓN MENDOZA.

**DIRECCIÓN** : Urb. Nicolás Garza Mz. 80 Lote 3 Nuevo Chimbo

**PRODUCTO DECLARADO** : AGUA RESIDUAL.

**CANTIDAD DE MUESTRA** : 07 muestras

**PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA** : Frasco de vidrio amber, frascos de plástico con tapa

**FECHA DE RECEPCIÓN** : 2016-05-26

**FECHA DE INICIO DEL ENSAYO** : 2016-05-26

**FECHA DE TÉRMINO DEL ENSAYO** : 2016-05-31

**CONDICIÓN DE LA MUESTRA** : En buen estado

**ENSAYOS REALIZADOS EN** : Laboratorio de Microbiología, Físico Químico

**CÓDIGO COLECBI** : ES 000789-15

**RESULTADOS**

**ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS**

ENSAYOS	MUESTRA
	AGUA RESIDUAL
Coliformos Totales (NMP/100mL)	24x10 <sup>3</sup>
Coliformos Fecales (NMP/100mL)	13x10 <sup>3</sup>

**ENSAYOS FÍSICO QUÍMICOS**

ENSAYOS	MUESTRA
	AGUA RESIDUAL
D.O.D. (mg/L)	60
D.Q.O. (mg/L)	26
(*) Nitratos (mg/L)	0.089
(*) Nitritos (mg/L)	0.029
(*) Nitrógeno Amomiacal (mg/L)	2.82
(*) Fosfatos (mg/L)	0.131
(*) Sulfatos (mg/L)	2.132
(*) Detergentes (mg/L)	0.17
(*) Fosforo (mg/L)	0.062



A. Guadalupe Vargas Ramos  
Gerente de Laboratorio  
C.S.A. INACAL  
COLECBI S.A.C.

**COLECBI S.A.C.**

Urb. Buenos Aires Mz. A - Lt. 7 - Etapa - Nuevo Chimbo - Telefax: 043-310752  
 Nextel: 83002693 - RPM: 902995 - Apartado 127  
 e-mail: colecbi@speedy.com.pe / medioambiente@colecbi@speedy.com.pe  
 Web: www.colecbi.com

Anexo 5: Resultados de muestras de aguas residuales municipales cultivadas con *Sc. Acutus* llevadas para su análisis de *E. coli* en el Laboratorio de COLECBI.

**LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO PERUANO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE - 046**

INACAL  
El Perú  
Credencia

Página 1 de 1

**INFORME DE ENSAYO CON VALOR OFICIAL N° 2247-16**

SOLICITADO POR	: JOSÉ MONZÓN MENDOZA
DIRECCIÓN	: Urb. Nicolas Garales Mz. 80 Lote 3 Nuevo Chimbote
PRODUCTO DECLARADO	: AGUA RESIDUAL
CANTIDAD DE MUESTRA	: 01 muestras
PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA	: Frasco de vidrio ámbar, frascos C-1 (plástico con tapa)
FECHA DE RECEPCIÓN	: 2015-07-21
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO	: 2015-07-21
FECHA DE TÉRMINO DEL ENSAYO	: 2015-07-24
CONDICIÓN DE LA MUESTRA	: En buen estado
ENSAYOS REALIZADOS EN	: Laboratorio de Microbiología
CÓDIGO COLECBI	: SS 001240-16

<b>ENSAYOS MICROBIOLÓGICOS</b>	<b>RESULTADOS</b>
--------------------------------	-------------------

ENSAYOS	MUESTRA
<i>Escherichia coli</i> (NMP/100mL)	AGUA RESIDUAL
	x 1.0

**METODOLOGÍA EMPLEADA**  
*Escherichia coli* APHA, SMEWW-APHA-AWWA-WEF Part 9221 G-2, 22nd Ed. 2012 Pág. 9-16, 9221-C 22nd Ed. 2012 Pág. 94

**NOTA**

- Informe de ensayo emitido en base a resultados realizados por COLECBI S.A.C.
- El muestreo está fuera del alcance de la acreditación otorgada por INACAL-DA a excepción de los ensayos donde la metodología incluye.
- Los resultados presentados corresponden solo a las muestras ensayadas.
- Estos resultados de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.
- No afecto al proceso de Dimensión por su perechibilidad y la muestra única.

Fecha de Emisión: Nuevo Chimbote, Julio 26 del 2015.  
 GvR/ma

A. Gustavo Vargas Ramos  
 Gerente de Laboratorio  
 C.007.175  
 COLECBI S.A.C.

LC-IMP-008  
 Rev. 04  
 Fecha: 2015-11-30

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE COLECBI S.A.C.

**COLECBI S.A.C.**  
 Urb. Baños Añes Mz. A - Lt. 7 | Etapa - Nuevo Chimbote - Telefax: 043-310752  
 Nextel: 839\*2893 - RPM # 902995 - Apartado 127  
 Email: info@colecbi.com.pe | medioambiente@colecbi@speedy.com.pe