

**UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS**

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**BIODEPURACION DE GRASAS Y ACEITES DE EFLUENTES DE
INDUSTRIA CHOCOLATERA, CON LA MICROALGA *Chlorella vulgaris*
EMPACADA EN UN SISTEMA DE FLUJO CONTINUO, AREQUIPA - 2015**

**TESIS PRESENTADA POR LA BACHILLER EN INGENIERÍA
BIOTECNOLÓGICA:**

ORTIZ AGUILAR, ANGIE EDITH

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
BIOTECNÓLOGO**

ASESOR: Ing. JAVIER ROQUE RODRÍGUEZ.

AREQUIPA – PERÚ

2015

DEDICATORIA

A Dios, el creador de todas las cosas, el que me ha dado fortaleza para continuar cuando estuve a punto de caer, por ello con toda humildad y amor le dedico primeramente mi trabajo.

Dedico mi tesis a mis queridos padres que han sabido formarme con buenos hábitos, sentimientos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante ante cualquier circunstancia; guiándome y cuidándome siempre.

A mi hermana, que siempre ha estado junto a mi brindándome su apoyo, muchas veces poniéndose en el papel de madre, a mi sobrina Luanita quien ha sido fuente de inspiración y de energía en mi vida.

A mi enamorado, Ernesto que gracias a su apoyo, amor, paciencia y conocimientos hicieron de esta experiencia una de las más especiales en mi vida, logrando una meta más juntos.

A mi familia en general y mis amigas, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

AGRADECIMIENTO

A Dios por protegerme todos los días de mi vida y por haberme permitido llegar hasta donde he llegado.

A mi asesor el Ingeniero Javier Roque que me apoyo y guio durante la elaboración de mi tesis, desde su concepción hasta su culminación.

Agradezco a las Ingenieras Verónica Villegas por darme las facilidades para el muestro del agua y por su apoyo.

A mis profesores de la Universidad por su paciencia, dedicación y gran parte de mi formación como profesional.

A todos aquellas personas, que de alguna manera han colaborado con el desarrollo de esta tesis.

A mi Alma Mater, Universidad Católica de Santa María por los años invertidos en mi formación profesional y que en esta oportunidad lo retribuyo con este estudio.

RESUMEN

Las aguas residuales de la industria del chocolate contienen grandes cantidades de sólidos totales (ST), alta demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO), por ello la producción y la eliminación de sus efluentes siguen siendo una cuestión problemática. En la presente investigación se evaluó la biodepuración de aceites y grasas de efluentes líquidos de la industria chocolatera, mediante bioabsorción de la microalga *Chlorella vulgaris*. Para lo cual se diseñó e implementó un sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* que consistió de un contenedor de efluente, sedimentador y un bioreactor tubular. *Chlorella vulgaris* demostró alta resistencia y capacidad de bioabsorción de aceites y grasas de efluentes de la industria chocolatera, promoviendo su transformación a formas menos tóxicas. La eficiencia de depuración para efluentes de industria chocolatera fue de 94% de aceites y grasas, también presentó 96% de reducción en la demanda química de oxígeno (DQO), una reducción del 93% en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), 87% de reducción en sólidos suspendidos totales (SST) y 83% de reducción en sólidos totales disueltos (STD). Los resultados muestran que *Chlorella vulgaris* presenta un gran potencial para la biodepuración de grasas y aceites en efluentes.

Palabras Claves: Aguas residuales, biodepuración, bioabsorción, *Chlorella vulgaris*, bioreactor tubular.

ABSTRACT

Wastewater from the chocolate industry contain large amounts of total solids (TS), high biochemical oxygen demand (BOD) and chemical oxygen demand (COD), so the production and disposal of effluents are still a problematic issue . In this research the oils and fats biodepuration liquid effluent of the chocolate industry was assessed by bio-absorption of the microalgae *Chlorella vulgaris*. For which it is designed and implemented a continuous flow system packed with *Chlorella vulgaris* which consisted of a container effluent settler and a tubular bioreactor. *Chlorella vulgaris* showed high resilience and bio-absorption of oils and fats from effluent of the chocolate industry, promoting its transformation into less toxic forms. The purification efficiency for effluents chocolate industry was 94% of oils and fats, also presented 96% reduction in chemical oxygen demand (COD), a reduction of 93% in the biochemical oxygen demand (BOD), 87 % reduction in total suspended solids (TSS) and 83% reduction in total dissolved solids (TDS). The results show that *Chlorella vulgaris* has great potential for biodepuration of fats and oils in effluents.

Keywords: Wastewater, biodepuration, biosorption, *Chlorella vulgaris*. tubular photobioreactor.

Índice de contenido

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTO	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
CAPITULO I	
INTRODUCCION	1
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
HIPÓTESIS	6
DEFINICIÓN OPERACIONAL Y CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES.....	7
CAPITULO II	
MARCO TEORICO	8
2.1. Las aguas residuales.....	8
2.2 Tratamiento de Agua Residual	9
2.2.1 Tratamiento preliminar o pre tratamiento.	10
2.2.2 Tratamiento primario.	10
2.2.3 Tratamiento secundari).	10
2.2.4 Tratamiento terciario o avanzado.	10

2.3	Sistemas de tratamiento de aguas residuales	11
2.3.1	Tratamiento de aguas residuales mediante algas.	11
2.4.	Biología de las algas	12
2.5	Crecimiento de microalgas	13
2.5.1	Tasa de crecimiento.	14
2.5.2	Tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento.....	15
2.5.3	Parámetros que influyen en el crecimiento de las algas.	15
2.6.	Diversidad de las algas	18
2.6.1	Características de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	18
2.6.2	Taxonomía de <i>Chlorella vulgaris</i>	19
2.6.3	Usos potenciales de <i>Chlorella vulgaris</i>	19
2.6.4	Parámetros del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	20
2.6.5	Procedimiento para la evaluación de la tasa de crecimiento mediante recuento celular:.....	21
2.7.	Determinación de los parámetros físico-químicos de calidad de las aguas	24
2.7.1	Parámetros físico-químicos	25
2.8	Las aguas residuales de la industria de los alimentos.....	30
2.9	La industria de fabricación del chocolate	30
 CAPITULO III		
	MATERIALES Y METODOS	33
3.1	TIPO DE INVESTIGACIÓN	33
3.2	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	33
3.3	MATERIALES	33
3.3.1	Equipos:	34
3.4	MÉTODOS	36
3.4.1	Obtención de muestras de <i>Chlorella vulgaris</i>	36

3.4.2 Muestreo y obtención de aguas residuales de industria chocolatera.	36
3.4.3 Mantenimiento del cultivo y evaluación del crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> en condiciones controladas de fotobioreactor tipo panel.	36
3.4.4 Diseño del sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i> a escala de laboratorio para la depuración de aceites y grasas de la industria chocolatera.	37
3.4.5 Evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> empacada en el sistema de flujo continuo para la depuración de aceites y grasas de la industria chocolatera.	38
3.4.6 Determinación de la concentración residual de grasas y aceites, DBO, DQO, STD, SST, NO_3^- , $\text{SO}_4^{=}$ y turbidez, de efluentes de industria chocolatera tratados en el sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	39
3.4.6.1 Determinación de aceites y grasas.	39
3.4.6.2 Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO).	41
3.4.6.3 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).	41
3.4.6.4 Determinación de nitratos (NO_3^-)	42
3.4.6.5 Determinación de sulfatos ($\text{SO}_4^{=}$)	42
3.4.6.6 Determinación de la turbidez	43
3.4.6.7 Determinación del pH.	43
3.4.6.8 Determinación de los sólidos suspendidos totales (SST).	43
3.4.6.9 Determinación de los sólidos totales disueltos (STD).	44
3.4.7 Determinación de la eficiencia de biodepuración de aceites y grasas del efluente de industria chocolatera por el sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	44
3.5 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS	44
3.6 FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.	45

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
4.1 Muestreo y obtención de aguas residuales de industria chocolatera.	46
4.2 Caracterización fisicoquímica de los efluentes líquidos residuales de industria chocolatera antes del tratamiento.....	46
4.3 Mantenimiento del cultivo y evaluación del crecimiento <i>Chlorella vulgaris</i> en condiciones controladas de fotobioreactor tipo panel.....	48
4.4. Caracterización y operación del sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i> a escala de laboratorio para la biodepuración de aceites y grasas de la industria chocolatera.	49
4.5. Evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> empacada en el sistema de flujo continuo.....	50
4.6. Evaluación de la concentración residual de grasas y aceites en los efluentes tratados en sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	55
4.7 Evaluación de la concentración residual de NO_3^- , $\text{SO}_4^{=}$, STD, SST, turbidez, DQO Y DBO, en los efluentes tratados en sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	59
CONCLUSIONES	67
PRIMERA: EL SISTEMA DE FLUJO CONTINUO FUE ÓPTIMO PARA EL CRECIMIENTO Y BIOABSORCIÓN DE GRASAS Y ACEITES EN EFLUENTES DE LA INDUSTRIA CHOCOLATERA.	67
RECOMENDACIONES	68
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	69
ANEXOS.....	79

ANEXO 1	80
PANEL FOTOGRAFICO	80
ANEXO 2	85
ANALISIS DE LABORATORIO	85
ANEXO 3	96
RECUENTOS Y EVALUACIONES	96



Índice de figuras

Figura 1. Curva de crecimiento de un cultivo de microalgas.....	14
Figura 2. Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	19
Figura 3. Preparación de la muestra.....	22
Figura 4. Cámara de Neubauer.....	22
Figura 5. Recuento celular.....	23
Figura 6. Recuento.....	24
Figura 7. Sólidos disueltos y suspendidos en sus diferentes formas.....	26
Figura 8. Esquema de fotobioreactor para la obtención de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i>	37
Figura 9. Esquema del sistema de Flujo continuo.....	38
Figura 10. Muestreo y obtención de aguas residuales de industria chocolatera.....	46
Figura 11. Mantenimiento del cultivo y evaluación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en condiciones controladas de fotobioreactor tipo panel.....	48
Figura 12. Sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	49
Figura 13. pH del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.....	51
Figura 14. Temperatura del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.....	51
Figura 15. Crecimiento del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.....	52
Figura 16. Recuento de <i>Chlorella vulgaris</i> en cámara de Neubauer.....	53
Figura 17. Comparación de la concentración residual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación del efluente en el sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	56
Figura 18. Comparación de la concentración residual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación del efluente.....	57
Figura 19. Concentración de NO ₃ ⁻ según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	59
Figura 20. Concentración de SO ₄ ⁼ según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	61
Figura 21. Concentración de STD según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	62
Figura 22. Concentración de SST según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	63

Figura 23. Concentración de la DQO y DBO según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*. 64



Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de Variables Independientes y Dependientes	7
Tabla 2. Composición del Cacao por cada 100g (Collazos, 1996).	30
Tabla 3. Caracterización de las aguas residuales de la industria del chocolate	32
Tabla 4. Concentración de parámetros físico-químicos y microbiológicos del efluente de industria chocolatera.....	47
Tabla 5. Parámetros del cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.....	50
Tabla 6. Concentración residual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación del efluente en el sistema de flujo continuo empacado con <i>Chlorella vulgaris</i>	55



CAPITULO I

INTRODUCCION

El rápido crecimiento de las industrias no sólo ha mejorado la productividad, sino que también da lugar a la liberación de sustancias tóxicas en el medio ambiente, creando riesgos para la salud y afecta seriamente la función normal de los ecosistemas, la flora y la fauna. En los últimos años, se ha prestado considerable atención a los residuos industriales, que suelen ser dados de alta en el suelo o en diferentes cuerpos de agua. Esto es probable que resulte en la degradación del ambiente (Chhonkar, Datta, Joshi y Pathak, 2000).

Los materiales de desecho asociados con la industria de los alimentos, como los residuos generados por la industria del chocolate contienen materia orgánica pesada, es decir grasas, aceites, ácidos grasos y compuestos nitrogenados (Healy, Bustos, Solomon, Devine y Healy 1995). De todas las actividades industriales, el sector alimentario tiene uno de los más altos consumos de agua y es uno de los mayores productores de efluentes por unidad de producción.

Las aguas residuales de la industria del chocolate, causan serios problemas ambientales debido a que descargan alto contenido de de grasas sin tratamiento o parcialmente tratadas (Ganapathy, Baskaran y Mohan, 2011). Los nutrientes como el nitrógeno presente en el efluente conducen a la eutrofización de las aguas receptoras (Kushwaha, Srivastava y Mall, 2011).

Las aguas residuales de la industria del chocolate merece una atención especial, ya que sus niveles de contaminantes potenciales suelen superar los niveles permisibles para el agua residual doméstica (Meul, Nevens y Reheul, 2009). Este sector genera gran volumen de agua residual y su contaminación es principalmente orgánica. Numerosos intentos se han hecho para resolver este problema por el proceso de lodos activados, donde aguas residuales que contienen materia orgánica se airea con microorganismos para metabolizar la materia orgánica en suspensión y soluble.

Los nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo de aguas residuales podrían ser reutilizados para el balance de nutrientes en tales procesos de tratamiento (Briao y Tavares, 2007). Las aguas residuales de la industria del chocolate contienen grandes cantidades de sólidos totales y alta DBO y DQO (Beal & Raman, 2000; Diwani et al., 2000). El reciclaje de estos componentes requiere el uso de cultivos capaces de utilizar estos nutrientes. Efluentes de la industria del chocolate que contienen azúcares disueltos, proteínas, y grasas son los principales contribuyentes a la carga orgánica de estas aguas residuales (Beal & Raman, 2000; Diwani et al., 2000).

Debido a la presencia de alta carga orgánica, efluentes de industria del chocolate se degradan rápidamente y agotan la DO (oxígeno disuelto) de los cauces receptores y se convierten en un lugar de propagación de insectos que pueden transmitir el paludismo y otras enfermedades peligrosas como el dengue, y la fiebre amarilla (Kumar y Desai, 2011). Los residuos también se caracterizan por un fuerte olor a ácido butírico y masas pesadas negras de lodos floculados (Briao y Tavares, 2007).

Las industrias del chocolate producen efluentes ricos en aceites y grasas que pueden tener impactos negativos en los sistemas de tratamiento de aguas residuales, que con frecuencia causan malos olores, obstrucción de tuberías y líneas de alcantarillado (Becker, Koster, Popov, Markossian, Antranikian y Markl, 1991). La presencia de nitrógeno en el efluente de productos de la industria de los alimentos es otro problema importante que una vez convertido puede contaminar el agua subterránea con nitrato (Ulery, Flynn y Parra, 2004).

Varias técnicas fisicoquímicas han sido estudiadas por su aplicabilidad en el tratamiento de las aguas residuales (Rodrigues, Xavier y Bernardes, 2007). Estos incluyen principalmente la sedimentación, aireación, filtración, flotación, desgasificación, cloración, ozonización, neutralización, coagulación e intercambio iónico, etc. Varias limitaciones de los métodos fisicoquímicos que incluyen mayor costo, tratamiento parcial, generación de contaminantes secundarios, cantidad de sólidos más altos y el uso de agentes químicos, hacen que los métodos biológicos sea una alternativa favorable para la eliminación de contaminantes.

Para remediar los efluentes de la industria del chocolate y contribuir en la conservación del agua, tiene que ser desarrollada una tecnología de tratamiento eficiente y rentable. Las aguas residuales son generalmente tratados mediante métodos biológicos tales como proceso de lodos activados, lagunas aireadas, filtros percoladores, reactor discontinuo secuencial (SBR), reactor UASB y filtros anaerobios (Demirel, Yenigun, y Onay,2005). Muchas fábricas de productos alimenticios en varios países emplean sistemas de tratamiento biológico continuo con el fin de tratar las aguas residuales pero en Perú aún son inexistentes.

El proceso de inoculación de microorganismos para degradar los materiales de desecho en estanques de tratamiento ha aumentado rápidamente la práctica en muchos países porque es económico (Zamora, y Lit, 1995).

La bioremediación es cualquier proceso que utiliza microorganismos vivos o sus enzimas, para devolver un ambiente contaminado a su condición original. Como tal, su utilización es de bajo costo, de poca tecnología, como el uso de microorganismos aislados del mismo efluente que generalmente tienen una alta aceptación del público y pueden ser utilizados *in situ* (Ojo, 2006). Constituye el uso de biota natural y sus procesos para la reducción de la contaminación y los productos finales no son peligrosos (Ahmedna, Marshall, Hussein, Rao, y Goktepe, 2004).

El proceso de biodegradación es una técnica bien establecida y de gran alcance para el tratamiento de efluentes domésticos e industriales (E. Collern, 2003). El rendimiento de un proceso biológico es a menudo mayor a través de la bioaugmentación de una o más especies de microorganismos especializados con

poblaciones microbianas que tienen una sorprendente capacidad para degradar compuestos orgánicos como las grasas.

Para combatir las cargas ambientales en exceso, se necesitan tecnologías de tratamiento de residuos orgánicos eficaces y seguros para el medio ambiente (Kelly y Zhen, 2014). En Arequipa las diversas industrias generan residuos líquidos y sólidos, que son vertidos al medio ambiente con tratamientos deficientes y mayormente sin ningún tratamiento, originando un gran impacto por contaminación en el agua, y suelo, cuyos productos están contaminados con concentraciones elevadas de materia orgánica.

Es por ello que la presente investigación se llevó a cabo la biodepuración de grasas de efluentes de la industria del chocolate usando *Chlorella vulgaris*.



OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Biodepurar grasas y aceites de efluentes de industria chocolatera, con la microalga *Chlorella vulgaris* empacada en un sistema de flujo continuo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar fisicoquímicamente los efluentes líquidos residuales de industria chocolatera.
- Diseñar un sistema de flujo continuo empacado con la microalga *Chlorella vulgaris* y evaluar su crecimiento para la depuración de aceites y grasas de industria chocolatera.
- Evaluar la concentración residual de grasas y aceites, NO_3^- , SO_4^- , STD, SST, turbidez, DQO y DBO, en los efluentes tratados en sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y determinar la eficiencia de depuración del sistema.

HIPÓTESIS

Dado que la microalga *Chlorella vulgaris* posee nutrición heterotrófica en presencia de materia orgánica disponible, es probable que presente alta capacidad de biodepuración de grasas en efluentes industriales de la industria del chocolate, por tanto pudiera ser utilizada empacada en un sistema continuo para la biodepuración de grasas y aceites en efluentes de la industria del chocolate.



DEFINICIÓN OPERACIONAL Y CONCEPTUAL DE LAS VARIABLES

La siguiente tabla muestra las variables e indicadores que se evaluaron en la presente investigación:

Tabla 1 Descripción de Variables Independientes y Dependientes

VARIABLES	INDICADOR	UNIDAD	TIPO DE VARIABLE/ ESCALA
Sistema de Agitación Continua Empacado con la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> (v. independiente)	Recuento inicial de la microalga	Cel/ml	Cuantitativa Discreta/ Razón
Crecimiento de la microalga del efluente de industria chocolatera tratado en el sistema de flujo continuo. (v. dependiente)	Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i>	Cel./mL	Cuantitativa discreta/ Razón
Parámetros fisicoquímicos del efluente de industria chocolatera tratado en el sistema de flujo continuo. (v. dependiente)	pH	Unidades de pH	Cuantitativa continua/ Intervalo
	Temperatura	°C	Cuantitativa continua/ Intervalo
	Turbidez	Unidades Nefelométricas (NTU)	Cuantitativa Continua/ Razón
	Sólidos totales disueltos	mg/L	Cuantitativa Continua/ Razón
	Sólidos suspendidos	mg/L	Cuantitativa Continua/ Razón
	Demanda química de oxígeno (DBO)	mg/L	Cuantitativa Continua/ Razón
	Concentración de grasas y aceites	mg/L	Cuantitativa Continua/ Razón

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1. Las aguas residuales

Conforme los asentamientos humanos crecen y se desarrollan, aumenta la generación de desechos, estos pueden ser sólidos, gaseosos y líquidos. Dentro de los desechos líquidos tenemos principalmente aguas residuales domésticas y aguas residuales industriales, generadas a partir de los diferentes usos del agua proveniente del agua de abastecimiento (Metcalf and Eddy, 1995).

Las aguas residuales contienen una alta cantidad de materia orgánica que está compuesta de microorganismos patógenos, sustancias peligrosas causantes de enfermedades y que su descomposición genera malos olores, contienen también compuestos tóxicos, además de nutrientes que sirve de alimento para la proliferación de plantas acuáticas (Metcalf and Eddy, 1995). Debido a esto surge la necesidad de eliminar los agentes causantes de la contaminación presentes en las aguas residuales mediante un tratamiento adecuado, mejorando así el nivel de saneamiento de una comunidad.

La organización mundial de la salud (OMS) dentro de los objetivos de desarrollo del milenio busca reducir para el 2015, a la mitad el porcentaje de personas que carecen de acceso al agua potable y al saneamiento básico. Según la OMS el saneamiento básico es la tecnología de más bajo costo que permite eliminar el agua residual, además de tener un medio ambiente limpio y sano tanto en la vivienda como en las proximidades de los usuarios, como por ejemplo: Descarga (automática o manual) a cualquier lugar, Letrina de pozo sin losa/pozo abierto, Letrina de balde, Retrete colgante/letrina colgante, Instalaciones públicas y compartidas. Según el programa de monitoreo de agua y saneamiento de la OMS y de la UNICEF en Latinoamérica el

acceso al agua y al saneamiento todavía es insuficiente, solo el 77% de la población cuenta con un saneamiento adecuado, alrededor del 51% tiene cobertura al sistema de alcantarillado pero únicamente el 10% del agua residual recolectada es dirigida a una planta de tratamiento, del cual menos del 5% del aguas recibe tratamiento ya que en muchos de los casos las plantas de tratamiento no funcionan adecuadamente.

2.2 Tratamiento de Agua Residual

Las aguas residuales generadas por las actividades de los asentamientos poblacionales son recolectadas por diferentes sistemas de alcantarillado y en última instancia son descargadas en cuerpos acuáticos receptores. La complejidad sobre la cantidad y calidad de los contaminantes que deben ser removidos para proteger el medio ambiente y hasta qué grado, debe ser analizada en cada caso particular. Una resolución óptima para esta situación debe hacerse en base de las diferentes condiciones locales y las necesidades de cada población, aplicando conocimientos científicos y consideraciones legales existentes (Metcalf and Eddy, 1995).

Lo que se busca con el tratamiento de aguas residuales es acelerar los procesos que se generan en la autodepuración de una masa de agua en la naturaleza, con el objetivo de producir agua limpia o reutilizable en el ambiente y un residuo sólido beneficioso para su disposición final o reutilización (Piedrola, 2000).

El tratamiento de agua residual consiste básicamente en un conjunto de operaciones físicas, y procesos químicos y biológicos, denominados también operaciones y procesos unitarios respectivamente (Metcalf and Eddy, 1995) que tienen como finalidad la eliminación de los contaminantes presentes en el agua residual, con el objetivo de preservar la salud pública, evitando enfermedades como diarrea, fiebre tifoidea, paratifoidea, cólera, hepatitis viral, amebiasis, giardiasis, entre otras, las cuales están directamente relacionadas con la presencia de microorganismos patógenos como bacterias, virus y parásitos en el agua residual (Rengel, 2000). Además se logra proteger a los cuerpos de agua receptores y su ecosistema, logrando disminuir el impacto negativo al medio ambiente (Mara, 2004).

Conforme los niveles de tratamiento aumentan, la calidad del agua tratada mejora (Crites and Tchobanoglous, 2000). Básicamente se identifican cuatro niveles para el

tratamiento del agua residual, estos son: preliminar, primario, secundario y terciario (von Sperling, 2007).

2.2.1 Tratamiento preliminar o pre tratamiento: busca disminuir los sólidos más gruesos como arenas, gravas, plásticos y otros materiales flotantes, con la finalidad de proteger las instalaciones y funcionamiento de las mismas; y reducir condiciones indeseables relacionadas con la apariencia estética de las plantas (Rengel, 2000).

2.2.2 Tratamiento primario: remueve, mediante operaciones físicas tales como tamizado y sedimentación, los sólidos suspendidos y un pequeño porcentaje de materia orgánica (von Sperling, 2007).

2.2.3 Tratamiento secundario: elimina materia orgánica biodegradable y sólidos suspendidos mediante procesos químicos y biológicos, además reduce la concentración de compuestos nitrogenados y uniformiza las cargas orgánicas para tratamientos posteriores (Rengel, 2000).

2.2.4 Tratamiento terciario o avanzado: remueven nutrientes como nitrógeno y fósforo mediante una combinación de procesos y operaciones unitarias (Metcalf and Eddy, 1995). Si bien con el tratamiento del agua residual se logra disminuir la capacidad infecciosa de ésta y se mejora efectivamente la calidad del efluente antes de que sea vertido al cuerpo receptor; existen ciertos problemas que en una planta de tratamiento se pueden generar, entre los más frecuentes tenemos los impactos ambientales relacionados con los malos olores que afectan a la población aledaña a la planta depuradora y la disposición final de los lodos provenientes de las unidades de tratamiento (Metcalf and Eddy, 1995). Por lo que es necesaria la correcta disposición y de ser necesario la reutilización tanto de los lodos como del efluente, analizando previamente su calidad y los requerimientos para que puedan ser reutilizadas.

En la actualidad se dispone de varias tecnologías para el tratamiento del agua residual, dentro de ellas cabe destacar: los sistemas de lodos activados convencionales, zanjas de oxidación, biofiltros, humedales artificiales, lagunas de estabilización (*Waste Stabilisation Ponds*) (WSP), lagunas de algas de alta tasa (*High Rate Algal Pond*) (HRAP), entre otras. De estas tecnologías se destacarán los sistemas de tratamiento WSP y HRAP, ya que en estos se genera una alta producción de microalgas que son aprovechadas para la remoción de nutrientes.

2.3 Sistemas de tratamiento de aguas residuales

Las investigaciones sobre los sistemas para el tratamiento de aguas residuales, realizadas en la década de 1940 han permitido su desarrollo como una alternativa de tratamiento de bajo costo (Crites and Tchobanoglous, 2000), por lo que actualmente es una de las tecnologías más utilizadas por industrias, pueblos y ciudades de países en vías de desarrollo (Shilton, 2005). Además estos sistemas pueden funcionar de forma independiente o en combinación con otros sistemas de tratamiento (Crites and Tchobanoglous, 2000).

Los sistemas lagunares poseen una profundidad variable, en donde se incluye la eliminación de sólidos mediante sedimentación, además de procesos de desinfección, reducción de compuestos orgánicos (Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO y Demanda Química de Oxígeno DQO) y en algunos casos, en donde se requiera un tratamiento terciario, se remueven nutrientes y metales pesados (Shilton, 2005).

2.3.1 Tratamiento de aguas residuales mediante algas: el tratamiento de aguas residuales mediante algas fue por primera vez propuesto en la década de 1960 por el profesor William Oswald en la Universidad de California en Berkeley. Estas fueron originalmente diseñadas para maximizar la producción de algas en un ambiente totalmente aeróbico (von Sperling, 2007; Mara, 2004). Sin embargo en los últimos años se han aprovechado para el tratamiento de aguas residuales ya que eliminan nutrientes debido a la asimilación de las microalgas, amoníaco por la volatilización y fosfato mediante sedimentación (Park et al., 2010; Craggs et al., 2003).

La microbiología de los sistemas de tratamiento de agua residual es compleja y muy variada. Los procesos microbiológicos que se llevan a cabo en estos sistemas son de mucha importancia ya que juegan un papel importante para la desinfección del agua residual.

Es importante conocer sobre la microbiología existente en el agua residual, ya que esta contiene microorganismos que pueden causar enfermedades, además en la mayoría de tratamientos de agua residual intervienen procesos microbiológicos (Mara, 2004).

En los sistemas lagunares existen condiciones adecuadas para el desarrollo de microalgas, debido a la alta presencia de luz, Nitrógeno inorgánico (amonio y nitratos) y fósforo, además de metales pesados, que pueden causar eutrofización en

los cuerpos receptores. Por lo que los cultivos de microalgas constituyen un tratamiento que ofrece remover de manera altamente eficiente los nutrientes y metales pesados, además de producir biomasa con alto contenido de lípidos que posteriormente se puede utilizar para numerosos propósitos (Abdel-Raouf et al., 2012) aparte de la depuración de aguas residuales como:

- Obtención de sustancias de interés químico-farmacéutico,
- Utilización en alimentos tanto animal como humano,
- Utilización como fertilizantes
- Producción de biocombustible

2.4. Biología de las algas

Las microalgas se encuentran presentes en todos los ecosistemas, tanto acuáticos como terrestres, lo que implica una gran variedad de especies que viven en diferentes condiciones ambientales (Richmond, 2004). Estas representan una de las formas de vida más antigua que se conoce, son plantas primitivas que no poseen raíces, tallo ni hojas (Brennan and Owende, 2010) . Las algas pueden ser células procariotas o eucariotas.

Las procariotas o cyanobacterias no presentan un núcleo definido, sino que su material celular se concentra en una región del citoplasma denominada nucleoide, además carecen de mitocondrias, aparato de Golgi, flagelos y son más parecidos a bacterias que a algas. Las eucariotas a diferencia de las procariotas son células que tienen un núcleo definido, en donde se localiza el material genético. Estas deben su color a la clorofila, carotenoides y xantofilas presentes en su estructura;

las más importantes son las algas verdes o Chlorophyta, algas rojas o Rhodophyta y diatomeas o Bacillariophyta (Ruiz Martínez, 2011; Brennan and Owende, 2010)

Las algas por su forma de sintetizar los compuestos pueden ser autótrofas o heterótrofas. Las autótrofas requieren únicamente de compuestos inorgánicos como CO₂, sales y luz para su crecimiento; en cambio las heterótrofas no son fotosintéticas por lo que requieren de una fuente externa de compuestos orgánicos, nutrientes y una fuente de energía; sin embargo existen ciertos géneros que pueden ser mixotróficos, es decir que tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis y adquirir nutrientes orgánicos exógenos (Brennan and Owende, 2010).

2.5 Crecimiento de microalgas

El crecimiento microbiano está influenciado por condiciones físicas y químicas, como la concentración de sustrato o de otros factores limitantes que pueden reducir la tasa de crecimiento. Cada especie y subespecie de microalgas tienen sus características propias con respecto a ciertas condiciones de crecimiento, así como productividades máximas alcanzadas en diferentes configuraciones de cultivos (Ruiz Martínez, 2011; Richmond, 2004).

Según Lee and Shen (2004) las fases de crecimiento (ver Figura 1) que se desarrollan en un cultivo de microalgas son:

- a) **Fase de latencia o adaptación:** esta se observa en la fase inicial del crecimiento, con frecuencia ocurre un retardo en el desarrollo de las células, debido al ajuste fisiológico por los cambios en las condiciones de nutrientes o del medio de cultivo.
- b) **Fase Exponencial:** llamada también fase de crecimiento acelerado, en la cual las células se han adaptado a su nuevo entorno, comienzan a multiplicarse y crecen de forma exponencial.
- c) **Fase de crecimiento lineal:** conforme el cultivo va creciendo se produce una disminución de nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores como consecuencia del incremento de la población (Romo Piñera, 2002). La biomasa empieza a acumularse a una tasa constante, el crecimiento se hace lineal y la energía ya no se produce para la sobrevivencia de las células.

d) **Fase estacionaria:** en esta ya no se observa una división celular neta, es decir que el número de células alcanzado se mantiene constante por cierto período de tiempo debido al balance entra la natalidad y la mortalidad que presenta el cultivo.

e) **Fase de muerte:** en esta fase las células empiezan a morir, aunque pueden durar en la fase estacionaria semanas e incluso meses (Romo Piñera, 2002).

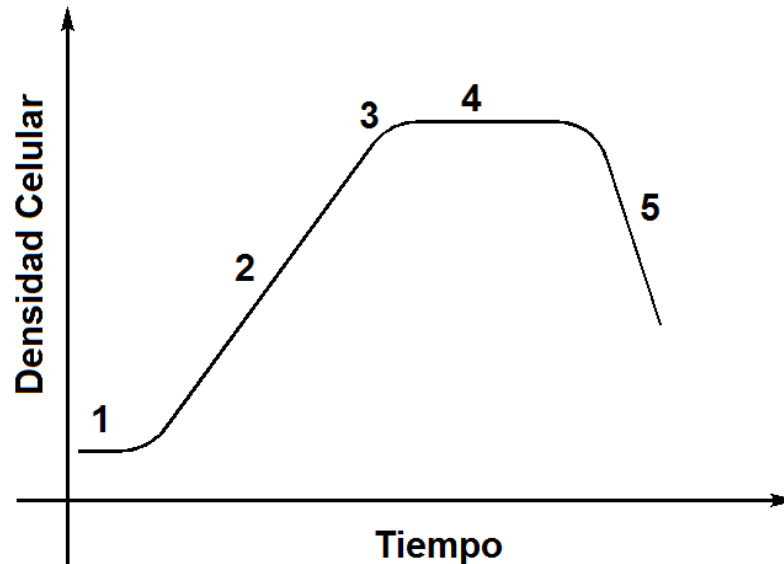


Figura 1. Curva de crecimiento de un cultivo de microalgas. 1) Fase de latencia; 2) Fase exponencial; 3) Fase de crecimiento lineal; 4) Fase estacionaria; 5) Fase de muerte (Fogg and Thake, 1987).

2.5.1 Tasa de crecimiento: el crecimiento de microalgas depende del factor limitante del crecimiento, este es aquel que está presente en cantidades más próximas al mínimo crítico necesario para estos microorganismos. Debido a esto es importante conocer las condiciones óptimas y los límites de tolerancia de las microalgas para todos o el mayor número de parámetros. Sin embargo, estas condiciones o límites para un parámetro, generalmente cambian cuando un segundo parámetro fluctúa, por lo que la influencia de un conjunto de parámetros crea una determinada respuesta en el crecimiento de las microalgas (Romo Piñera, 2002).

Teóricamente la máxima tasa de crecimiento de un cultivo de microalgas debe ser igual a la tasa máxima de fotosíntesis. Sin embargo la productividad de microalgas se ve limitada por factores como: la concentración de nutrientes, intensidad de luz, pH y temperatura (Richmond, 2004).

2.5.2 Tiempo de duplicación y tasa específica de crecimiento: cuando el ambiente del cultivo es favorable y todos los nutrientes necesarios para el crecimiento de las células están presentes en una cantidad suficiente para el crecimiento, es decir, a concentraciones suficientemente altas de modo que cambios menores no afectan significativamente la velocidad de reacción, la mayoría de las algas unicelulares se reproducen asexualmente (Richmond, 2004).

El tiempo requerido para que las algas consigan duplicarse se denomina tiempo de duplicación (td). También se denomina tiempo de generación, ya que es el tiempo necesario para crecer y producir una generación de células, matemáticamente se describe en la Ec.2.2 (Richmond, 2004).

$$2^0 N_0 \rightarrow 2^1 N_0 \rightarrow 2^2 N_0 \rightarrow 2^3 N_0 \rightarrow 2^n N_0$$

En donde:

N_0 = Número inicial de células

n = Número de duplicaciones

2.5.3 Parámetros que influyen en el crecimiento de las algas: como todo organismo vivo, las condiciones físicas tienen gran influencia en el crecimiento de las microalgas. Cada especie tiene un particular intervalo de temperatura, intensidad de luz, salinidad, pH, nutrientes, dióxido de carbono y oxígeno para la producción de un máximo crecimiento (Romo Piñera, 2002).

2.5.3.1 Luz

La luz es uno de los parámetros que mayor incidencia tiene en el crecimiento y productividad de microalgas, debido a que el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos es proporcional a la intensidad de la luz recibida, en donde se puede observar que a intensidades de luz baja se obtiene bajas tasas de crecimiento (Alcántara et al.); mientras que este se acelera con el aumento de la luz pudiendo llegar a la saturación, alcanzando así la tasa de crecimiento máxima (I_s); si se incrementa la intensidad de la luz por encima de este punto (I_h) provocará una disminución en la tasa de crecimiento, ocasionando la muerte celular debido a la fotoinhibición. Aunque se han encontrado diversos estudios que sostienen que a altas

intensidades de luz la producción de polisacáridos en las células tiende a aumentar (Ruiz Martínez, 2011; Richmond, 2004).

Las algas son microorganismos que convierten la energía lumínica en metabólica mediante la fotosíntesis, esta energía lumínica puede ser recibida de forma natural en ciclos de día y noche; o artificial, que a su vez puede ser de forma continua o discontinua en ciclos alternados de luz y oscuridad (Romo Piñera, 2002).

2.5.3.2 Agitación

La agitación asegura la distribución de los gases y de la luz, además esta facilita el transporte de las células, evita la sedimentación y la adherencia de las microalgas en la base o paredes del reactor, así como ayuda a homogenizar el pH. Sin embargo existen especies que no toleran una agitación fuerte debido a que son sensibles al estrés hidrodinámico (Ruiz Martínez, 2011).

2.5.3.3 Temperatura

La productividad de las algas se acelera cuando la temperatura del medio en el que se encuentran aumenta, aunque lo recomendable sería llegar a una temperatura óptima, ya que por encima de esta, la producción celular disminuye debido al incremento de la respiración y fotorespiración de las algas (Park et al., 2010). El rango de temperaturas en el que las microalgas pueden desarrollarse es muy amplio, además difiere entre las distintas especies, la *Chlorella* por ejemplo puede crecer en un rango de 5 y 42°C (Ruiz Martínez, 2011). Las bajas temperaturas inducen a la acumulación celular de polioles y aminoácidos o derivados de aminoácidos que podrían contribuir a la sensibilidad o tolerancia de microalgas a la refrigeración (Richmond, 2004).

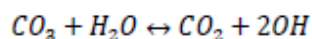
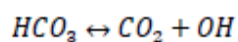
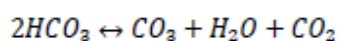
2.5.3.4 pH

El pH puede afectar muchos de los procesos bioquímicos asociados con el crecimiento y metabolismo de las algas, incluso la disponibilidad de los iones de Nitrógeno como nutrientes. El rango de pH generalmente varía entre 8 y 10, aunque para la producción en masa el pH recomendable está alrededor de 8.2 y 8.7, valores de pH excesivamente bajos o altos disminuye la productividad (Ruiz Martínez, 2011; Park et al., 2010).

2.5.3.5 Nutrientes

- **Carbono:** A diferencia de las plantas terrestres, el CO₂ presente en la atmósfera no resulta suficiente para cultivos de producción de alto rendimiento. En los sistemas de tratamiento de agua residual la presencia de CO₂ depende de la oxidación de compuestos orgánicos como las bacterias. Sin embargo el contenido de CO₂ en el agua residual doméstica no es suficiente para una óptima producción de algas. Por lo que la adición de CO₂ es una técnica altamente eficiente, además el control de pH a través de burbujeo directo de CO₂ en el medio de cultivo es el mejor y más conveniente método para control de pH y al mismo tiempo el suministro de CO₂ para cultivos en masa de alto rendimiento (Park et al., 2010; Richmond, 2004).

El bicarbonato o carbonato también es una fuente de carbono, su comportamiento se detalla en la siguiente reacción:



Sin embargo en esta reacción se acumula el radical hidroxilo, lo que provoca un aumento gradual de pH (Richmond, 2004).

- **Nitrógeno:** El nitrógeno es el nutriente más importante que contribuye a la producción de biomasa, después del carbono. Además es un factor crítico para la regulación del contenido lipídico celular de las microalgas. Sin embargo en exceso puede disminuir el crecimiento celular (Park et al., 2010).

El contenido de nitrógeno en las células de las microalgas generalmente oscila entre 1-10% de biomasa, puede variar según la especie y de la disponibilidad de este. La fuente nitrógeno puede ser suministrada como nitrato (NO₃), amonio (NH₄) o urea (Richmond, 2004).

- **Fósforo:** El fósforo es esencial para el crecimiento de las algas, así como para varios procesos como la transferencia de energía, biosíntesis de ácidos nucleicos, etc. El contenido de fósforo en las células está alrededor del 1% de la biomasa; además es uno de los factores más importantes para el crecimiento de las algas en biotecnología y puede ser suministrado como orto-fosfato (PO₄). El suministro de fósforo influencia a la composición de la biomasa producida, especialmente en el contenido de lípidos y carbohidratos (Richmond, 2004).

2.6. Diversidad de las algas

Existe una amplia diversidad de especies de algas y cianobacterias en sistemas de tratamiento lagunar. Comúnmente su concentración está por debajo de los 200 mg/l en términos de sólidos suspendidos secos y pueden estar en un rango de 10^4 a 10^6 células por ml (Alvarado, 2013). Los géneros y las especies que predominan en las lagunas de tratamiento se desarrollan en función de la carga orgánica que estas reciben, sin embargo una alta carga orgánica provoca que la diversidad de especies disminuya.

Los principales tipos de algas encontradas en los sistemas lagunares son:

- **Algas verdes (Chlorophyta)** Este tipo de algas le dan el característico color verde a la laguna, predominando los géneros: *Chlorella* y *Chlamydomonas*. Las *Chlamydomonas* son usualmente las primeras en desarrollarse, predominan en periodos fríos y poseen flagelos, lo que ayuda a su movilidad optimizando su posición con relación a la incidencia de la luz (von Sperling, 2007a).

2.6.1 Características de la microalga *Chlorella vulgaris*: *Chlorella* apareció en la Tierra hace aproximadamente 1.5 o 2 mil millones de años. Es un alga verde unicelular de agua dulce; de forma esférica, cerca de 2-10 micras de diámetro que es extensamente encontrada en lagos y pantanos por todo el mundo. El nombre *Chlorella* proviene del griego *Chloros*, que significa verde, y del latín *ella*, que significa cosa pequeña (M.W. Beyerinck, 1890).

Es un alga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que es entre 100 y 1.000 veces menor a 1 mm (Figura 2), posee un cloroplasto delgado parietal con o sin pirenoides. Los únicos elementos reproductores que se les conocen son las autoesporas. El color verde lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis. Gracias a la fotosíntesis, que es el proceso por el que adquiere carbono de la atmósfera (como elemento vital para su crecimiento y desarrollo) forma parte de la base de la cadena alimenticia (Madigan, M., 2002).

Se reproduce muy rápidamente y de forma asexual. Para eso precisa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y pequeñas cantidades de minerales. Debido a su rápido crecimiento, se estudia la posibilidad de que sea utilizada para producir biodiesel. Contiene grandes cantidades de proteínas, vitamina C, betacaroteno y vitaminas B (B1, B2, B6 y B12). Es utilizada para fabricar suplementos alimenticios,

productos cosméticos contra el envejecimiento, para estimular el sistema inmune y para la desintoxicación de metales pesados (Madigan, M., 2002).

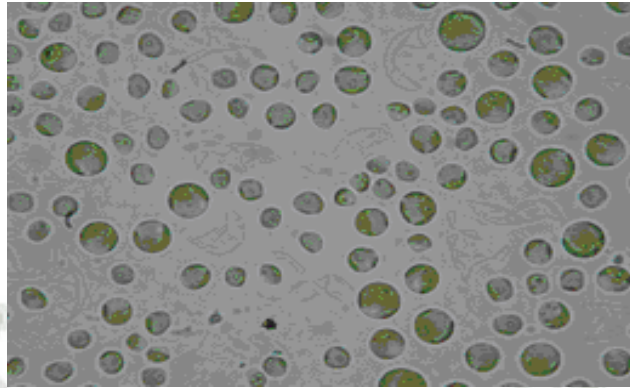


Figura 2. Cultivo de *Chlorella vulgaris* (100X). Fuente: Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* (Montes J., 2012).

2.6.2 Taxonomía de *Chlorella vulgaris*: la microalga *Chlorella vulgaris* taxonómicamente (M.W. Beijerinck, 1890) se encuentra clasificada de la siguiente manera:

Reino: Protista

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlorococcales

Familia: Oocystaceae

Género: *Chlorella*

Especie: *Chlorella vulgaris*

2.6.3 Usos potenciales de *Chlorella vulgaris*: comparada con otras plantas, la microalga *Chlorella* tiene una alta concentración de clorofila, así que su capacidad de fotosíntesis es muchas veces mayor que la de otras plantas. *Chlorella vulgaris* puede dividirse en cuatro células cada 20 horas (Kanno y Kazie, 2005).

En el curso del tiempo, el uso continuo del alga bajo condiciones controladas ha sido importante, con diversas posibilidades económicas. La investigación con la microalga ha demostrado que la biomasa puede ser usada para aplicaciones, como

son: alimento para animales, biofertilizantes, condicionador del suelo, alimento de los acuarios o puede ayudar a resolver problemas de salud pública, por medio de la purificación biológica de las aguas negras de las ciudades (Kanno, oshihiro. Uyamay Kazie, 2005).

Chlorella está siendo investigada como un nuevo recurso alimenticio (ya que una célula de *Chlorella* contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos) para utilizarse en las poblaciones humanas pobres de todo el mundo y para proveer comida y oxígeno en viajes al espacio y en submarinos (Lee, 1995). Según se ha documentado, posee beneficios terapéuticos, como la capacidad de desintoxicar al organismo de metales pesados como el Hg, el Cd y el Pb entre otros químicos, que son contaminantes agregados a insecticidas o plásticos. Además se piensa que posee la capacidad de prevenir el cáncer (Konishi *et al.*, 1996).

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas revisten gran importancia dada su amplia aplicación biotecnológica y comercial. En tal sentido, se han utilizado los cultivos discontinuos por su relativo fácil manejo, para determinar la cinética de crecimiento y los parámetros que influyen en el desarrollo poblacional de las microalgas (Abalde *et al.* 1995).

Sin embargo, el uso de los medios de cultivo sintéticos ha incrementado sustancialmente el valor económico para la producción de la biomasa de estos microorganismos (González *et al.* , 1999).

2.6.4 Parámetros del cultivo de *Chlorella vulgaris*: un cultivo tiene tres diferentes componentes: un medio de cultivo contenido en un recipiente adecuado; las algas creciendo en el medio y aire, para permitir el intercambio de dióxido de carbono entre el medio y la atmósfera.

Los parámetros más importantes que regulan el crecimiento de las algas son principalmente entre otros la luz, el pH, la turbulencia, la salinidad y la temperatura (Barsanti *et al.*, 2006).

- a) **Temperatura:** La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies (Barsanti *et al.*, 2006).
- b) **Luz:** Como en las plantas, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones fotosintéticas en las algas. Aquí, la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo deben ser considerados (Barsanti *et al.*, 2006).
- c) **pH:** El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo (Barsanti *et al.*, 2006).
- d) **Aireación:** La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, y para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (Barsanti *et al.*, 2006).

2.6.5 Procedimiento para la evaluación de la tasa de crecimiento mediante recuento celular:

- a) **Preparación de la muestra:** Con una pipeta volumétrica de 1 ml, se toma una muestra del medio de cultivo de microalgas del bioreactor, previamente agitado debido a que las células tienden a pegarse en las paredes y en el fondo de este (ver Figura 3a). Posteriormente se diluye la muestra con agua destilada en un matraz aforado hasta obtener un volumen de 10 ml, es decir una dilución de 1:10 (ver Figura 3b), con la finalidad de facilitar el recuento celular en la cámara de Neubauer la cual se especifica a continuación.



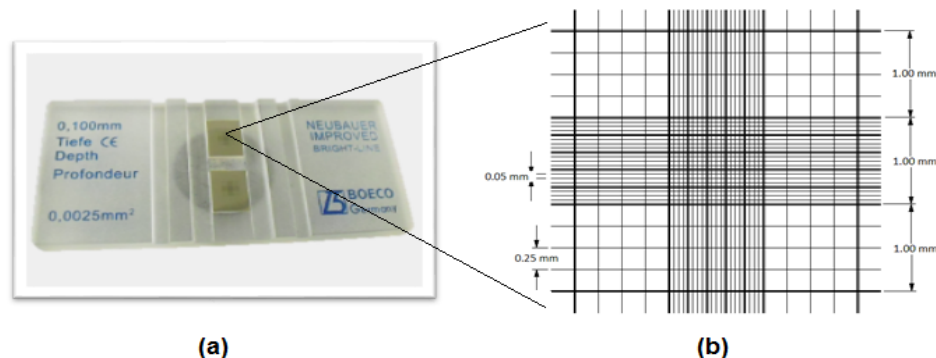
(a) Toma de muestra



(b) Muestra diluida

Figura 3. Preparación de la muestra

b) **Cámara de Neubauer:** Presenta dos cámaras las cuales están rodeadas por dos canales longitudinales y un canal transversal central, con el que forman una depresión en forma de H, Figura 4a, además de dos canales longitudinales externos. En cada cámara está grabado un cuadrado de 9 mm^2 , que se dividen en 9 cuadrículas de 1 mm^2 cada una y esta a su vez se encuentran divididas en cuadrículas más finas (Romo Piñera, 2002), como se muestra en la Figura 4b).

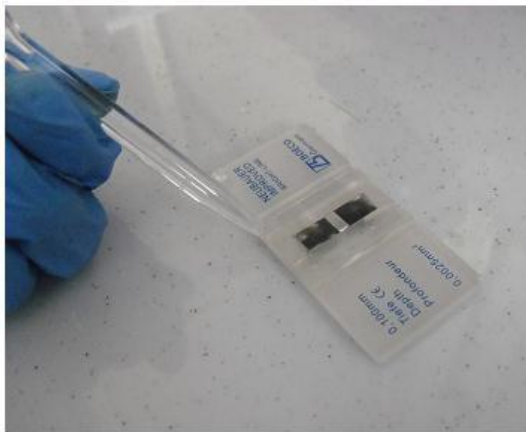


(a)

(b)

Figura 4. Cámara de Neubauer

- c) **Recuento celular:** Para realizar el recuento celular en la Cámara de Neubauer, se coloca el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, luego se introduce entre la cámara y el cubreobjetos la muestra de microalgas mediante una pipeta (ver Figura 5a), controlando que no exista aire en el interior y que el cubreobjetos no se deslice sobre la cámara, es decir que no exceda ni falte muestra líquida. Luego se coloca la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio, y se enfoca la muestra usando el lente magnificador 40x, hasta lograr una imagen nítida de las células (ver Figura 5b).



(a) Colocación de la muestra en la cámara de Neubauer



(b) Recuento celular

Figura 5. Recuento celular

Según la técnica de recuento celular con Hematocitómetro o caja de Neubauer expuestas en Bastidas (2011) se cuentan las células presentes en los cuatro extremos de una de las cámaras de Neubauer, estos son I, II, III, IV, (ver Figura 6a) siguiendo la forma de un zigzag (ver Figura 6b). Por convención si las células tocan el límite superior o el límite izquierdo de la cuadrícula, las células deben contabilizarse, por el contrario si las células tocan el límite inferior o el límite derecho, estas no deben contabilizarse. Para determinar el número de células presentes en determinada muestra, se hace un promedio de las células contabilizadas en las cuatro cuadrículas.

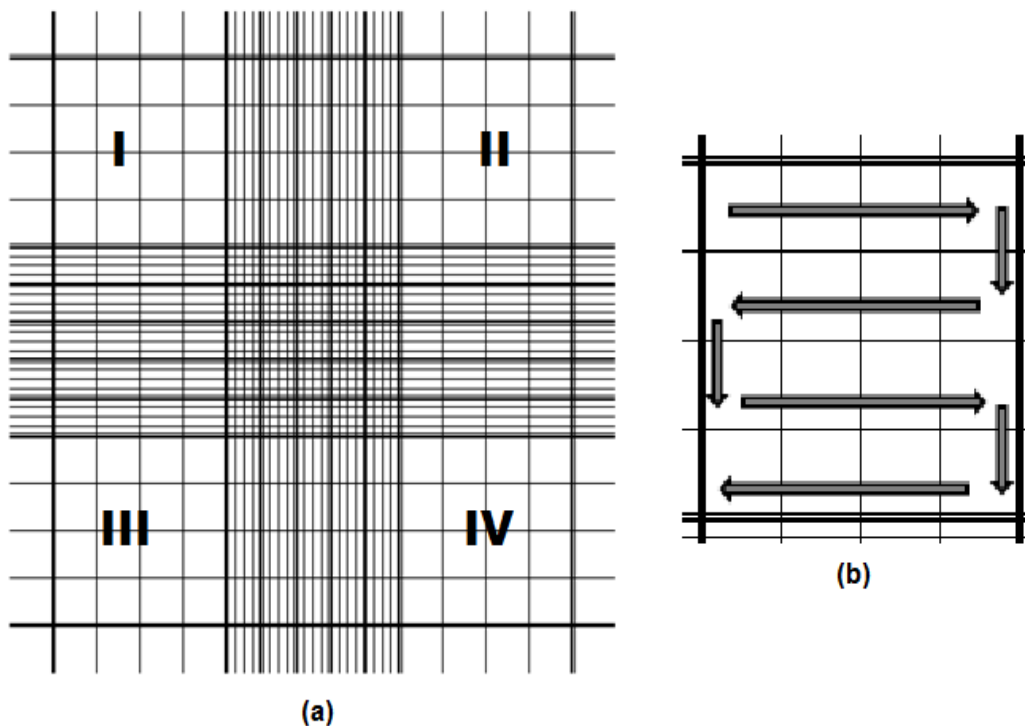


Figura 6. Recuento a) Conteo en cuatro cuadrículas; b) Recuento en zigzag

Para la determinación de la concentración de células de microalgas presentes en el bioreactor, primero se calcula el volumen de muestra que queda entre el cubreobjetos y una cuadrícula de 1 mm² de sección de la cámara de Neubauer.

d) Análisis de tasas de crecimiento: A partir de los análisis de los recuentos celulares se obtienen las tasas de crecimiento en cada fase del cultivo.

2.7. Determinación de los parámetros físico-químicos de calidad de las aguas

Al hablar de calidad de aguas sean para su vertido, tratamiento de depuración, potabilización o cualquier otro uso, es imprescindible determinar una serie de parámetros físico-químicos mediante métodos normalizados, con objeto de conocer si el valor de estos parámetros se encuentra dentro del intervalo que marca la legislación vigente. En el presente trabajo se resumen los parámetros más comúnmente estudiados, indicando la norma o normas mediante las cuales debe procederse a la determinación de los mismos.

2.7.1 Parámetros físico-químicos

2.7.1.1 Sólidos totales:

Los sólidos totales es la suma de los sólidos disueltos y en suspensión que la muestra de agua pueda contener. Se puede decir que las aguas naturales son un conjunto de agua con sólidos disueltos y suspendidos (figura14).

2.7.1.2 Sólidos disueltos:

Los sólidos disueltos lo constituyen las sales que se encuentran presentes en el agua y que no pueden ser separados del líquido por algún medio físico, tal como: sedimentación, filtración, etc. La presencia de estos sólidos no es detectable a simple vista, por lo que se puede tener un agua completamente cristalina con un alto contenido de sólidos disueltos.

La presencia de estos sólidos solo se detecta cuando el agua se evapora y quedan las sales residuales en el medio que originalmente contiene el líquido.

Analíticamente se miden pesando la cápsula con las sales residuales, una vez que el agua ha sido evaporada, y conociendo el peso neto de la cápsula es posible determinar la cantidad de sólidos disueltos por diferencia de peso. También es posible cuantificar los sólidos disueltos midiendo la conductividad del agua: los sólidos disueltos se encuentran en forma de cationes y aniones, por lo que éstos como partículas con carga pueden conducir la corriente eléctrica, y así pueden ser cuantificados indirectamente, con cierta precisión, midiendo la conductividad del agua como se describe posteriormente

2.7.1.3 Sólidos en suspensión:

Los sólidos en suspensión es el material que se encuentra en fase sólida en el agua en forma de coloides o partículas sumamente finas, y que causa en el agua la propiedad de turbidez. Cuanto mayor es el contenido de sólidos en suspensión, mayor es el grado de turbidez. A diferencia de los sólidos disueltos, estos pueden separarse con mayor o menor grado de dificultad por procesos mecánicos como son la sedimentación y la filtración. Analíticamente se determinan pasando un volumen medido de una muestra de agua a través de una cápsula la cual tiene una membrana o

filtro con poros de 0.2 micrones dónde son retenidos los sólidos suspendidos, cuando se filtra la muestra de agua.

Las partículas o sólidos suspendidos se componen de material orgánico e inorgánico. El material orgánico es principalmente algas o microorganismos y el inorgánico son: arcillas, silicatos, feldespatos, etc.

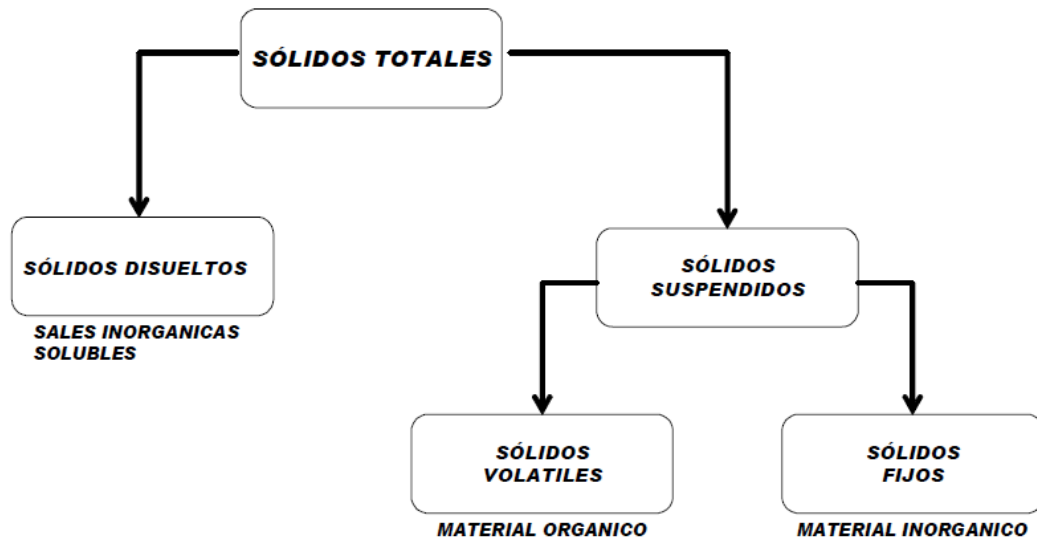


Figura 7. Sólidos disueltos y suspendidos en sus diferentes formas (Romo Piñera, 2002).

2.7.1.4 Sólidos volátiles y no volátiles:

En los sólidos suspendidos se tiene material orgánico e inorgánico. La materia orgánica es susceptible de separarse por calcinación de la muestra. Para esto, la cápsula que retiene los sólidos suspendidos se calcina a 550°C y el material orgánico se volatiliza en forma de bióxido de carbono y agua. El material inorgánico es inerte y no volátil, por lo que es retenido en la cápsula y por diferencia de peso se pueden cuantificar los sólidos volátiles y no volátiles.

2.7.1.5 Turbidez:

Es la capacidad que tiene la materia finamente dividida o en estado coloidal de dispersar la luz. La turbidez es una característica que se relaciona con el contenido de sólidos finamente divididos que se presentan en el agua. Sus unidades son NTU's (Nephelometric Turbidity Units).

Un agua turbia estéticamente es desagradable y es rechazada por el consumidor. La turbidez del agua es un parámetro de importancia no solo porque es una característica de pureza en el agua a consumir. También la turbidez interfiere en procesos de tratamiento de las aguas como es en la desinfección con agentes químicos o con radiación ultravioleta, disminuyendo la efectividad biocida de éstos lo cual representa un riesgo en el consumidor.

2.7.1.6 Temperatura:

La temperatura es un parámetro físico de suma importancia para los ecosistemas hidráulicos, aunque no es parte de las características de calidad del agua potable. Cuando la temperatura aumenta, disminuye la concentración de oxígeno disuelto y si las aguas son deficientes en oxígeno, esto puede ocasionar la muerte de especies acuáticas, especialmente peces. También, la contaminación térmica puede causar trastornos en ecosistemas acuáticos ya que en algunos casos el rango de temperatura de estos, es sumamente restringido.

2.7.1.7 Demanda bioquímica de oxígeno:

La Demanda Bioquímica de Oxígeno DBO, es una de las pruebas más importantes para medir los efectos contaminantes de un agua residual, pero también es un parámetro de importancia en aguas potables. La DBO es definida como la cantidad de oxígeno requerida por las bacterias, para estabilizar la materia orgánica biodegradable, bajo condiciones aerobias. Por materia biodegradable se entiende o se interpreta como la materia orgánica que sirve como alimento a los microorganismos y que proporciona energía como resultado de su oxidación.

La DBO es ampliamente utilizada para determinar el grado de contaminación en materia orgánica biodegradable, en aguas residuales domésticas e industriales. Esta prueba es una de las más importantes en el control de contaminación en aguas, por lo que las agencias de regulación de la contaminación le dan suprema importancia. También la DBO es imprescindible al estimar y diseñar reactores y equipo para la digestión aeróbica de las aguas residuales a depurar. Para esta prueba se mide la cantidad de oxígeno que requieren las bacterias aerobias cuando consumen la materia orgánica biodegradable presente en el agua residual que se analiza. Para esto se

inocula con bacterias aerobias la muestra de agua a analizar, y después de cinco días se mide la concentración de oxígeno residual.

La cantidad de oxígeno consumido se determina midiendo el oxígeno disuelto al inicio y al término de la prueba.

Se ha tomado como tiempo de biodegradación de la muestra un tiempo de 5 días. Generalmente este es el tiempo que se requiere para que las bacterias digieran la materia orgánica biodegradable. También, debido a la baja solubilidad del oxígeno, en muestras con altos valores de DBO es necesario tomar alícuota de la muestra para asegurar que el oxígeno disuelto inicialmente, sea suficiente para la biodegradación completa.

También para esta prueba se requiere que la temperatura se mantenga constante a 25°C durante los cinco días de incubación.

2.7.1.8 Demanda química de oxígeno:

Este otro tipo de prueba consiste en determinar la cantidad total de materia orgánica, en términos de la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar ésta a dióxido de carbono y agua. Para esto se efectúa la oxidación de dicha materia orgánica utilizando agentes fuertemente oxidantes en un medio ácido.

Debido a las condiciones tan drásticas empleadas en la oxidación, prácticamente toda la materia orgánica es oxidada a bióxido de carbono y agua. Sustancias que no son fáciles de digerir biológicamente como por ejemplo la lignina, son oxidadas completamente como resultado de los oxidantes empleados y debido a esto los valores de Demanda Química de Oxígeno DQO son siempre mayores a la DBO, en un agua residual específica.

La forma de llevar a cabo esta prueba es tomando una alícuota de la muestra y agregándole un volumen específico de solución de dicromato de potasio valorado. Bajo condiciones ácidas, a una temperatura de 150°C y en presencia de un catalizador la materia orgánica es completamente oxidada a bióxido de carbono y agua. Midiendo el dicromato de potasio consumido y de acuerdo a la relación estequiométrica, es posible determinar el oxígeno consumido por la muestra analizada, este oxígeno requerido es la DQO.

La medición de DQO y DBO en una muestra de agua, está directamente relacionado con su grado de contaminación, así como con la naturaleza de la materia que compone los desechos sólidos, ya que a través de esta prueba es posible estimar que proporción del total de la materia orgánica es biodegradable. Esto es de gran importancia en el proceso de digestión aeróbica, puesto que de antemano se conoce cuál es el mínimo residual de materia orgánica en un agua de desecho.

Al igual que la DBO, la DQO en aguas potables debe ser sumamente baja y es un parámetro a determinar cuando la calidad del agua es incierta.

2.7.1.9 pH:

El potencial hidrogeno o pH, es un parámetro de suma importancia tanto para aguas naturales como aguas residuales. El rango de pH en el cual pueden interactuar los ecosistemas y sobrevivir las especies que lo conforman, está sumamente restringido, por lo cual si este valor es alterado, los procesos biológicos que normalmente se llevan a cabo pueden ser perturbados y/o inhibidos y las consecuencias son adversas. Por definición pH es el logaritmo inverso de la concentración de ión hidrogeno

2.7.1.10 Aceites y grasas:

Los aceites y grasas en los vertidos líquidos generan dos tipos de problemas a la hora de la depuración de las aguas residuales, disminución de la mojabilidad de los sólidos en suspensión impidiendo, con ello su sedimentación, y formación de una película que recubre los microorganismos encargados de la biodegradación, impidiendo con ello la captación de oxígeno por los mismos y disminuyendo su poder depurador. El contenido de grasas y aceites es generalmente pequeño en vertidos urbanos, siendo su presencia un indicio de vertido industrial, y causando graves problemas a los sistemas de depuración.

La determinación de grasas y aceites de efluentes acuosos se efectúa por extracción en caliente o con un disolvente orgánico no miscible con el agua, a partir de un volumen conocido del agua a analizar acidulada a $\text{pH} \leq 2$, evaluando la cantidad presente por pesada, una vez eliminado el disolvente de la fase orgánica, o mediante espectroscopía infrarroja, por comparación con curvas de calibrado.

2.8 Las aguas residuales de la industria de los alimentos

La industria de alimentos, genera grandes cantidades de efluentes líquidos, sólidos y gaseosos, que emergen no sólo de las operaciones de tratamiento, sino también de su tratamiento y eliminación (por ejemplo, grasas y aceites). La composición y cantidad de residuos agroindustriales depende mucho de la fuente de materias primas, así como la naturaleza de los productos, pasos, operaciones, y procesamiento. En general, los residuos de procesamiento de alimentos consisten en grandes cantidades de material orgánico (hidratos de carbono, proteínas, grasas, aceites, etc.), con altos valores de DBO, DQO y sólidos suspendidos. Debido a su alto contenido de nutrientes, los desechos agroindustriales tienen un alto potencial de causar graves problemas de contaminación, si no se maneja o se trata adecuadamente.

En general, la contaminación del agua es el problema más grave en muchas agroindustrias, ya que los desechos sólidos tienen una oportunidad mucho mayor para la recuperación o la utilización, por ejemplo el uso de residuos para la producción de. El agua se usa comúnmente en el procesamiento de alimentos como un ingrediente, para el lavado de la materia prima, vapor de proceso, refrigeración y limpieza. El volumen de agua utilizada, los tipos y la concentración de los contaminantes son extremadamente variables, incluso en el mismo sector.

2.9 La industria de fabricación del chocolate

El Chocolate, se elabora de la fruta del árbol de cacao y se usa como un ingrediente para bebidas y diversos tipos de productos de confitería (Orhon et al. 1995). La composición nutricional de los granos de cacao orgánico se muestra en la tabla 2. El componente predominante es la manteca de cacao, la cual puede ser extraída del grano. Los granos de cacao también contienen un porcentaje bajo de agua, con la cual se puede generar la pasta de cacao. La torta de cacao se mezcla en una máquina de amasar se calienta con los otros ingredientes tales como azúcar, manteca de cacao, leche en polvo, grasas vegetales, lecitina, leche condensada y aromas (Collazos, 1996).

Tabla 2. Composición del Cacao por cada100g (Collazos, 1996).

COMPUESTO	PROMEDIO
Energía	456 Kcal
Agua	3.6 g
Carbohidratos	34.7 g
Grasas	46.3 g
Proteínas	12 g
Fibra	8.6 g
Calcio	106 mg
Fósforo	537 mg
Hierro	3.6 mg
Vitamina B ₁ (Tiamina)	0.17 mg
Vitamina B ₂ (Riboflavina)	0.14 mg
Vitamina C (Ácido ascórbico)	3 mg
Vitamina A (Retinol)	2 mcg

La industria de fabricación de chocolate de aguas residuales puede caracterizarse como no tóxico porque está desprovisto de compuestos peligrosos, pero con alto contenido de sólidos totales (ST) de 649mg/L, demanda bioquímica de oxígeno (DBO) de 4910 mg/L y demanda química de oxígeno (DQO) de 6220 mg/L (Beal y Raman, 2000;. Diwani et al, 2000; Orhon et al. 1995) ver tabla 3. Posiblemente, los residuos de aditivos son los principales contribuyentes a la carga orgánica de estas aguas residuales. Este sector genera grandes cantidades de agua residual que contiene altas concentraciones de materiales orgánicos fácilmente biodegradables caracterizados por grasas, aceites y sólidos en suspensión como cáscaras de cacao (M Esparza *et al*, 2013). Estos residuos no pueden almacenarse durante largos períodos de tiempo ya que generan olor si no son correctamente operados y mantenidos (Esparza *et al*, 2013).

Tabla 3. Caracterización de las aguas residuales de la industria del chocolate (Beal y Raman, 2000).

Parameter	Unit	Reference			
		(El-Gohary et al., 1999)	(Orhon et al., 1995)	(Diwani et al., 2000)	(Ozturk & Altinbas, 2008)
COD	mg/L	4475	2840-6220	5000	19900
COD _{soluble}	mg/L	-	2500-5400	-	-
BOD	mg/L	2200	1840-4910	3200	-
TKN	mg/L	100	33-55	-	-
TP	mg/L	17,2	8,6-65	-	-
TSS	mg/L	649	260-440	177	1050
VSS	mg/L	490	-	-	-
pH	-	-	4-5,1	6	-
Oil and grease	mg/L	367	-	-	-



CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo de la investigación se adquirió un cultivo axénico de la microalga *Chlorella vulgaris* de muestras aisladas de aguas provenientes de efluentes residuales del Laboratorio de Biología Acuática de la Escuela de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, para después evaluar su crecimiento en condiciones de fotobio reactor tipo panel, en función del tiempo, mediante la implementación de un sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* para evaluar la capacidad de bioabsorción de grasas en efluentes industriales de la industria chocolatera.

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

La presente investigación corresponde a una investigación de tipo experimental (causa – efecto) y longitudinal ya que se realizará evaluaciones periódicas.

3.2 LUGAR DE EJECUCIÓN

Los cultivos de la microalga *Chlorella vulgaris* se llevaron a cabo en las instalaciones del laboratorio del área de Biología Acuática de la Escuela Profesional y Académica de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín, la implementación del sistema de flujo continuo empacado con la microalga se realizó en las instalaciones del laboratorio de la Universidad Católica Santa María.

3.3 MATERIALES

Para la ejecución del trabajo se utilizó material biológico, químico, equipos, entre otros, que a continuación se detalla:

3.3.1 Equipos:

- Espectrofotómetro visible, 22PC, 340-1000 nm. (Kert Lab)
- Centrífuga, de 30 000 RPM, (Kert Lab)
- Termómetro ambiental, 0-100 °C, (Hanna)
- pHmetro, (Hanna).
- Microscopio, 042B, 10X, 20X, 40X y 100X, (Labor Tech).
- Cámara de Newbauer, (Boheco).
- Aireadores,
- Termostato, (Kyntel).
- Microscópio estéreo, ZTXE (Labor Tech).
- Autoclave, 280DH, 24 L. (Kert Lab)
- Balanza analítica de 0.1 mg - 3000 gr. (Digital Precision).
- Fluorescentes de 30 watts.

3.3.2 Material de vidrio:

- Matraces Erlenmeyer de 250ml, (Boheco).
- Pipetas de 2 y 10ml, (Kyntel).
- Vasos de precipitado de 500ml (Kyntel).
- Pipeta de 10 ml, (Kyntel).
- Pipeta de 1 ml, (Boheco).
- Tubos de ensayo, 12x75 mL borosilicato (Giardino).
- Probeta de 250 ml, (Kyntel).

- Probeta de 500 ml, (Kyntel).
- Tubos de ensayo

3.3.3 Reactivos:

- Na_2HAsO_3 q.p. (Merck).
- NaHCO_3 , q.p. (Merck).
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Sigma).
- $\text{FeSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Merck).
- KCl , q.p. (Merck).
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, q.p. (Sigma).
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck).
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Merck)
- $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, q.p. (Merck).
- Agua destilada.
- HCl 0,1 N, p.a. (Sigma)

3.4 MÉTODOS

3.4.1 Obtención de muestras de *Chlorella vulgaris*.

La microalga verde *Chlorella vulgaris*, fue proporcionada por el Dr. Antonio Lazarte Rivera, responsable del Área de Colección de Cultivos de Microalgas del Laboratorio de Biología Acuática, de la Escuela de Biología, Universidad Nacional de San Agustín. La identificación fue certificada por el Herbarium Arequipensis (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín. (Anexo 2)

3.4.2 Muestreo y obtención de aguas residuales de industria chocolatera.

La obtención de las muestras de efluente de grasas y aceites se obtuvieron de una industria chocolatera, las muestras fueron colectadas en frascos estériles de 2L, debidamente rotulados y posteriormente incubados a temperatura a 4°C para evitar cualquier cambio físico-químico en el efluente antes de su análisis de grasas y aceites, STD, SST, DBO, DQO, SO_4^- , NO_3^- .

3.4.3 Mantenimiento del cultivo y evaluación del crecimiento *Chlorella vulgaris* en condiciones controladas de fotobioreactor tipo panel.

Para la obtención de biomasa de *Chlorella vulgaris*, se tomaron 2 litros del inóculo de cultivo puro que fue transferido a un fotobioreactor de 15 L de capacidad (Fig.8) para su crecimiento utilizando el medio de cultivo BBM (Medio Basal Bold) que presenta la siguiente composición en g/L: NaNO_3 , 0,75 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g; K_2HPO_4 , 0,07 g; De NaCl , 0,02 g; KH_2PO_4 , 0,17 g; 6 ml de solución traza: ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,75 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,097 g; de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,041 g; de ZnCl_2 , 0,005 g; de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g y $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,004g). El cultivo se mantuvo a pH 7.2, temperatura promedio de 25°C, con aireación continua mediante bombas de aire y fotoperiodo de 12 horas de luz /12 horas de oscuridad mediante 2 fluorescentes de 30 watts. La concentración de algas (densidad) se determinó utilizando una cámara de Neubauer bajo un microscopio óptico.

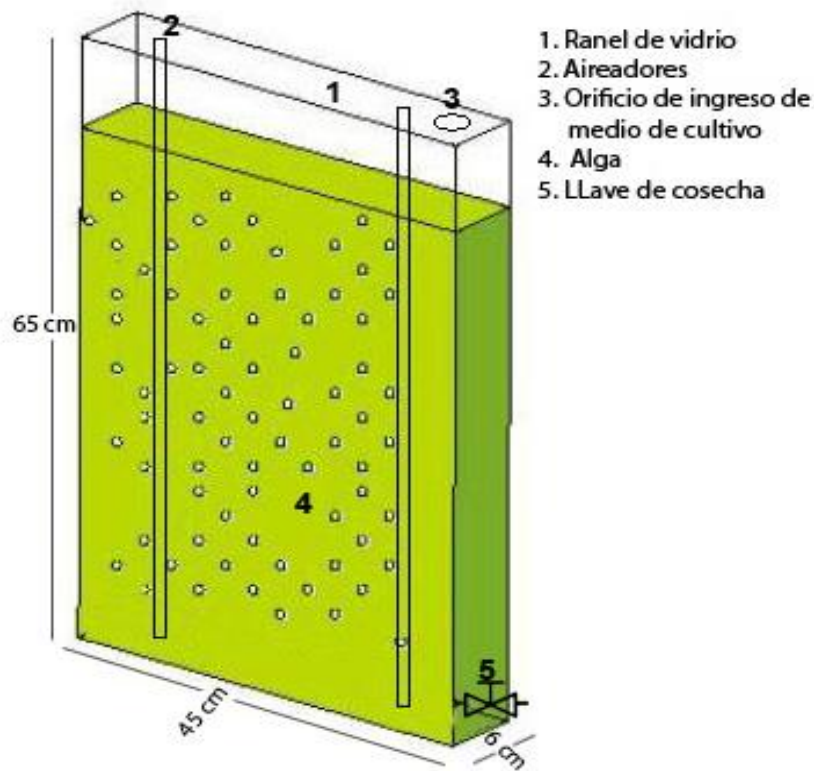


Figura 8. Esquema de fotobioreactor para la obtención de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

3.4.4 Diseño del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio para la depuración de aceites y grasas de la industria chocolatera.

Para la implementación del sistema de flujo continuo se utilizó un contenedor de efluente de material plástico transparente de capacidad de 20 L, conectado mediante una llave reguladora de flujo de 40 mL/mín a un sedimentador de sólidos de 22 cm de ancho, 10cm de alto y 30 cm de largo conteniendo 1.5 L de cultivo de microalga *Chlorella vulgaris*. El sedimentador con la microalga se mantuvo con aireación mediante una bomba de 5 watt de potencia. Cada sedimentador estuvo conectado a un bioreactor tubular de 30 cm de alto y 9 cm de diámetro, conteniendo 500 mL de cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* que fue mantenido con agitación en paletas como se muestra en la figura 9.

añadió 9 mL de agua destilada (dilución 1:10) en un tubo de ensayo, para el recuento de cada muestra se contaron 4 campos de la cámara de Newbauer, a la sumatoria de los campos se multiplicó por 16 (total de campos) y por 10 por ser la dilución utilizada, la evaluación del crecimiento se realizó periódicamente cada 7 días hasta 28 días de evaluación.

3.4.6 Determinación de la concentración residual de grasas y aceites, DBO, DQO, STD, SST, NO_3^- , SO_4^- y turbidez, de efluentes de industria chocolatera tratados en el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*.

La evaluación de grasas y aceites, DBO, DQO, STD SST, NO_3^- , SO_4^- y turbidez, se realizó a partir de muestras del efluente de la industria chocolatera después de sometido a tratamiento en un sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*, las evaluaciones se realizaron periódicamente mediante los siguientes protocolos:

3.4.6.1 Determinación de aceites y grasas.

Se recolecto 250 mL de muestra de la superficie del efluente en un frasco de vidrio de boca ancha y tapa de cubierta de politetrafluoroetileno. La muestra se preservó por acidificación con ácido clorhídrico 1:1 a un valor de pH menor a dos y refrigeración a 4°C. La determinación de aceites y grasas se realizó según el método 5520 de Soxhlet (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34). El procedimiento es el siguiente.

- a) Se mide el pH de las muestras, el cual debe ser menor de 2, se utiliza ácido clorhídrico 1:1 generalmente para muestras de un pH menor a 8 es suficiente adicionar unos 5ml de HCl 1:1 o 2ml de H₂SO₄ 1:1.1
- b) Preparar los matraces (250ml) del equipo soxhlet introduciéndolos a la estufa a una temperatura de 103°C - 105°C, enfriar en desecador y pesarlos, repetir el procedimiento hasta obtener el peso constante de cada uno de los matraces.
- c) Preparar el material filtrante colocando un papel filtro en el embudo Büchner, colocar el embudo en un matraz Kitazato y agregar 100 mL de la suspensión

- de tierra de diatomeas-sílice sobre el filtro, aplicar vacío y lavar con 100 mL de agua.
- d) Transferir el total de la muestra acidificada al embudo Büchner preparado aplicando vacío hasta que cese el paso de agua. Medir el volumen de la muestra.
 - e) Con ayuda de unas pinzas, transferir el material filtrante a un cartucho de extracción. Limpiar las paredes internas del embudo y el frasco contenedor de la muestra, así como la parte interna de la tapa del frasco con trozos de papel filtro previamente impregnados de disolvente (hexano) tener cuidado en remover la película de grasa y los sólidos impregnados sobre las paredes; colocar los trozos de papel en el mismo cartucho. Secar el cartucho en una estufa a 103°C -105°C por un período de 30 min. Transcurrido este período colocar en el equipo Soxhlet.
 - f) Adicionar el volumen adecuado de hexano al matraz de bola previamente puesto a peso constante y preparar el equipo Soxhlet. Evitar tocar con las manos el cartucho y el matraz de extracción, para ello usar pinzas o guantes de látex. Colocar el equipo de extracción sobre la parrilla de calentamiento, conectar los seis extractores en serie compartiendo el agua de enfriamiento. Encienda cada parrilla a distintos tiempos (para evitar una baja de voltaje)
 - g) Controlar la temperatura del reflujo y extraer a una velocidad de 20 ciclos / hora durante un periodo de 4 horas. Una vez terminada la extracción, y en el último ciclo deje que el solvente quede en el cuerpo de extracción y un poco (15ml) con la grasa en el matraz de bola, suspenda el calentamiento y eleve el equipo de extracción para que no esté en contacto con la parrilla. Deje enfriar por 15 minutos y evapore el disolvente en la campana extractora o recupérela en el mismo extractor.
 - h) Una vez que el matraz de bola este con la grasa libre de disolvente se coloca en el desecador hasta que alcance la temperatura ambiente
 - i) Pesar el matraz y determinar la concentración de grasas y aceites recuperables mediante:

$$\text{GRASAS Y ACEITES (mg/L)} = (B-A) / V$$

Dónde:

A = es el peso inicial del matraz de extracción (mg)

B = es el peso final l del matraz de extracción (mg)

V = es el volumen de la muestra, en litros

3.4.6.2 Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO).

La demanda bioquímica de oxígeno (DBO) corresponde a la cantidad de oxígeno consumido para la degradación bioquímica de la materia orgánica contenida en la muestra, durante un intervalo de tiempo específico y temperatura determinada.

La determinación se realizó según (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34).

La muestra se recolecto en envases de plástico. Se tomó la muestra y se llenó el frasco evitando airear, hasta el borde superior sin cámara de aire. Luego se realizó el análisis inmediatamente antes de 24 horas de la recolección.

La muestra o una dilución adecuada de la misma, se incubo por 5 días a 20°C en la oscuridad. Se midió la concentración de oxígeno disuelto antes y después de la incubación. El consumo de oxígeno correspondiente a la demanda bioquímica de oxígeno se calculó mediante la ecuación.

$$DBO_5, \text{ mg/L} = (OD_i - OD_f) \times V/T$$

Dónde:

OD_i = concentración de oxígeno disuelto inicial (medido luego de la dilución)

OD_f = concentración de oxígeno disuelto final

V = capacidad de la botella de DBO, (300 mL)

T = mL de muestra tomados para la dilución

Los resultados se expresaron en mg de oxígeno consumido/L

La evaluación de la DBO se realizó 2 veces al inicio del experimento y a los 21 días de evaluación.

3.4.6.3 Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).

La demanda química de oxígeno (DQO) es la medida de oxígeno equivalente a la materia orgánica que es susceptible a ser oxidada por un oxidante químico fuerte, en condiciones específicas de temperatura y tiempo. La determinación se realizó según

(Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34). La muestra fue oxidada con una cantidad conocida de dicromato de potasio en exceso, en medio ácido y con catalizadores. El dicromato de potasio remanente fue determinado espectrofotométricamente a 600 nm y se calculó según la ecuación:

$$\text{DQO, mg O}_2/\text{L} = C \times 10/T$$

Dónde:

C = mg O₂/L de la muestra leídos de la curva de calibración

T = mL de muestra tomada para el ensayo

Los resultados se expresan en mg de oxígeno consumido/L.

La evaluación de la DQO se realizó 2 veces al inicio del experimento y a los 21 días de evaluación.

3.4.6.4 Determinación de nitratos (NO₃⁻)

La determinación se realizó según (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34). Se recolecto 200 mL de la muestra en envases de plástico sin cámara de aire y se cerró herméticamente. La concentración de nitrato se determinó mediante una curva de calibración. Se prepararon soluciones estándares de nitrato en un rango entre 0 y 7 mg N/L por dilución de la solución intermedia de nitrato. Se midió la absorbancia de los estándares a 220 y 275 nm contra un blanco de agua. Se graficó la Absorbancia corregida vs concentración de nitrato. La absorbancia corregida se calculó mediante:

$$\text{Abs. nitratos} = (\text{Abs}_{220} - \text{Abs}_{275})$$

La evaluación de (NO₃⁻) se realizó 2 veces al inicio del experimento y a los 21 días de evaluación.

3.4.6.5 Determinación de sulfatos (SO₄⁼)

La determinación se realizó según (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34), se colocó 10 ml de la muestra de efluente tratado en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se añadió 1 ml de la solución ácida acondicionadora, se mezcló bien y se agregó 0.5 g de BaCl₂ · 2H₂O para después agitar durante 1 minuto. Se Transfirió la muestra a una celda de 1 cm

del espectrofotómetro, para después leer la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm dentro de los 2 minutos siguientes. Se obtuvo las ppm de $\text{SO}_4^{=}$, de acuerdo con la lectura de absorbancia de la muestra. La evaluación de ($\text{SO}_4^{=}$) se realizó 2 veces al inicio del experimento y a los 21 días de evaluación.

3.4.6.6 Determinación de la turbidez

La turbidez es una medida de la propiedad óptica que causa dispersión y absorción de la luz con disminución de la transmisión en línea recta. La determinación se realizó según en unidades de turbidez nefelométrica, (NTU) (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34). Se realizó la calibración del equipo de acuerdo al manual de instrucciones. Una vez calibrado con la solución de 40 NTU, se procedió a las lecturas de turbidez de las diferentes muestras. La turbidez se registró en NTU (Unidades Nefelométricas de Turbidez). La evaluación de la turbidez se realizó 2 veces al inicio del experimento y a los 21 días de evaluación.

3.4.6.7 Determinación del pH.

Fue determinado directamente cada dos días mediante un pH metro digital Hanna, la evaluación del pH se realizó cada siete 7 días hasta los 21 días de evaluación.

3.4.6.8 Determinación de los sólidos suspendidos totales (SST).

La determinación se realizó por gravimetría. Se midió con una probeta, un volumen adecuado de la cantidad seleccionada de la muestra previamente homogeneizada. Se filtró la muestra a través del crisol Gooch preparado anteriormente aplicando vacío, se lavó el disco tres veces con 10 mL de agua, dejando que el agua drene totalmente en cada lavado. Se suspendió al vacío y se dejó secar el crisol en la estufa a una temperatura de 103°C a 105°C durante 1 h. Se secó el crisol, se dejó enfriar en un desecador a temperatura ambiente y se determinó su peso hasta alcanzar peso constante. La evaluación de los (SST) se realizó 2 veces al inicio del experimento y a los 21 días de evaluación.

3.4.6.9 Determinación de los sólidos totales disueltos (STD).

Se determinó por diferencia de pesos mediante la ecuación: $STD = ST - SST$

3.4.7 Determinación de la eficiencia de biodepuración de aceites y grasas del efluente de industria chocolatera por el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*.

La eficiencia fue medida en porcentaje a partir de la concentración residual de aceites y grasas del efluente de industria chocolatera después de sometido al sistema de flujo continuo empacada con *Chlorella vulgaris* mediante:

$$\text{Grasas y aceites (\%)} = \frac{[GAR] \text{ (mg/L)} \times 100}{[GARI] \text{ (mg/L)}}$$

$$\text{Eficiencia (\%)} = 100\% - \text{GAR (\%)}$$

Dónde:

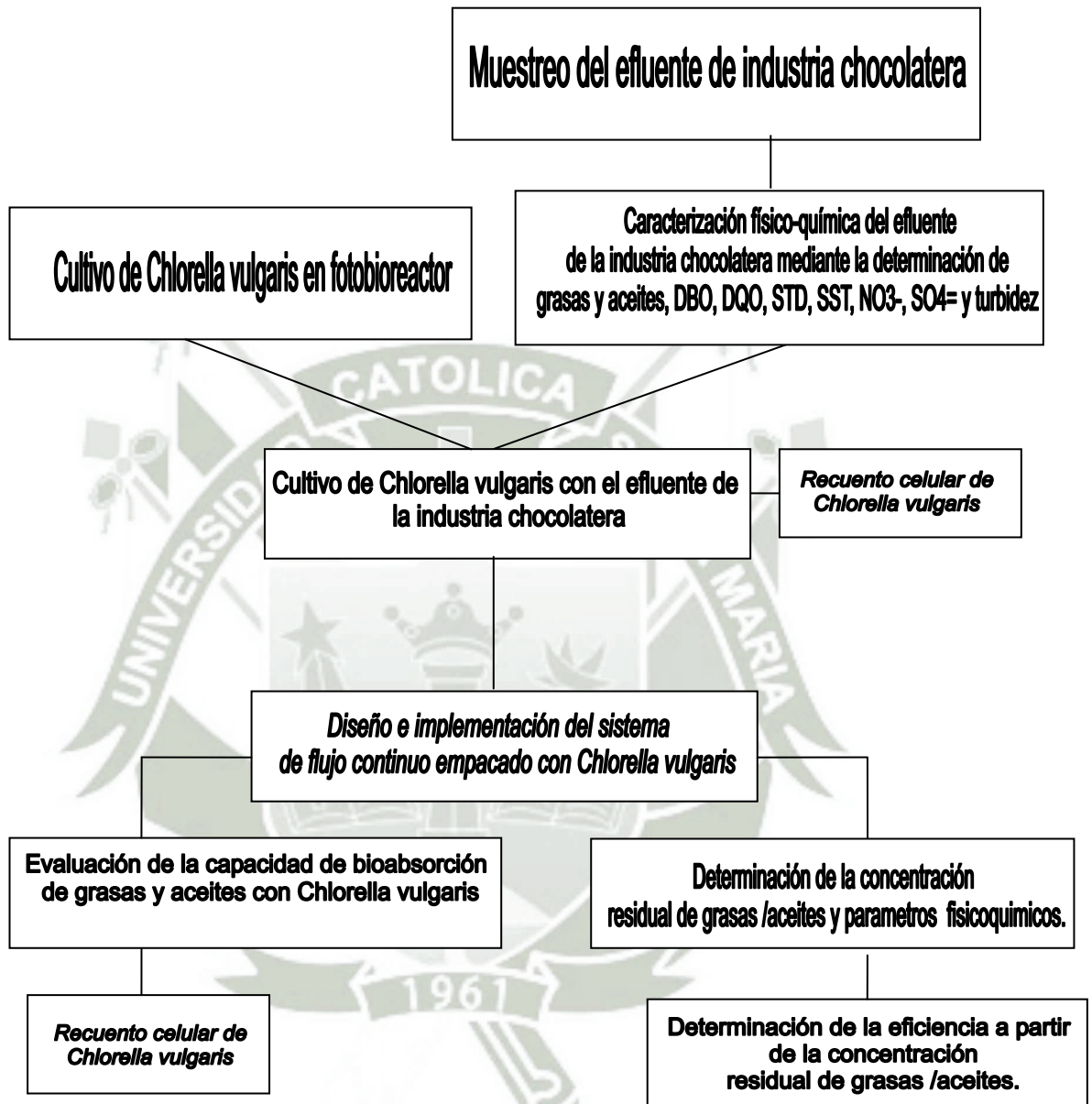
GAR= Grasas y aceites residual

GARI= Grasas y aceites inicial

3.5 ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS

El análisis y procesamiento de datos se realizó mediante el cálculo de promedios y desviaciones estándar, para observar las diferencias entre evaluaciones se aplicó la prueba estadística de comparación de ANOVA y la prueba de especificidad múltiple de Tukey para determinar la diferencias entre evaluaciones, también se efectuaron gráficos de barras y de tendencia según el tiempo para las variables evaluadas.

3.6 FLUJOGRAMA DE ACTIVIDADES.



CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Muestreo y obtención de aguas residuales de industria chocolatera.

Las muestras de efluente de grasas y aceites se obtuvo de una industria chocolatera, las muestras fueron colectadas en frascos estériles de 2L, debidamente rotulados y posteriormente incubados a temperatura a 4°C para evitar cualquier cambio físico-químico en el efluente antes de su análisis de grasas y aceites, STD, SST, DBO, DQO, SO_4^- , NO_3^- como se muestra a continuación:

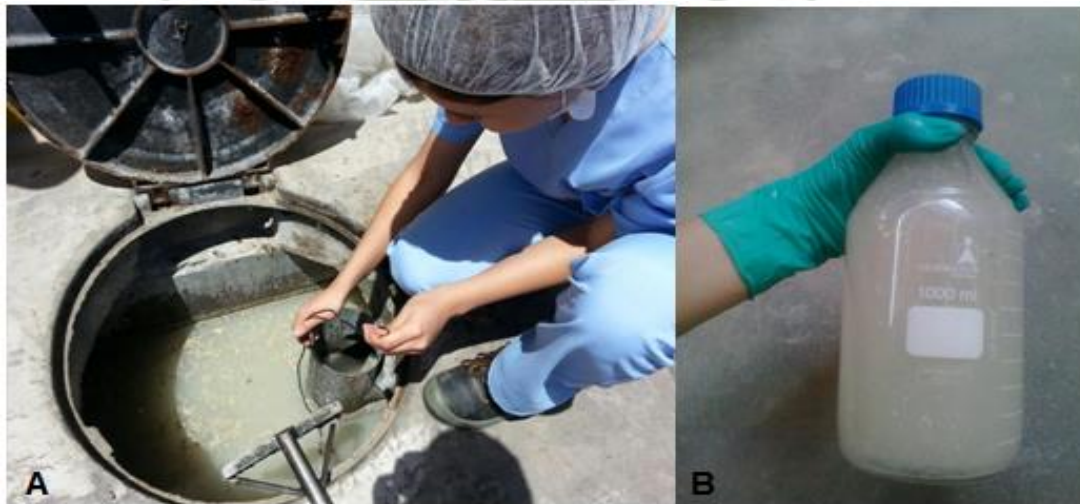


Figura 10. Muestreo y obtención de aguas residuales de industria chocolatera. A) Toma de muestra del colector principal de una industria procesadora de chocolate, B) muestra del efluente de industria chocolatera colectada, de consistencia lechosa color crema, sin presencia de olor desagradable

4.2 Caracterización fisicoquímica de los efluentes líquidos residuales de industria chocolatera antes del tratamiento.

Del efluente de la industria chocolatera se determinó la concentración de aceites y grasas, NO_3^- , SO_4^- , DQO, STD, SST, turbidez y DBO cuyos valores se muestran a continuación:

Tabla 4. Concentración de parámetros físico-químicos del efluente de industria chocolatera.

PARÁMETROS	VALOR
ACEITES Y GRASAS (mg/L)	2634.00
DEMANDA QUÍMICA DE OXÍGENO (DQO mg/L)	7001.67
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO (DBO5 mg/L)	3184.00
TURBIDEZ (NTU)	>461
NO ₃ ⁻ (mg/L)	5.28
STD (mg/L)	10058
SST (mg/L)	4168
SO ₄ ⁼ (mg/L)	36

El análisis de grasas y aceites, DBO, DQO y SST de agua residual de la industria de chocolate sobrepasan los límites máximos permisibles de efluentes para vertidos a cuerpos de agua, ya que los límites máximos de DBO, DQO y SST son 100, 200, 150 mg/L respectivamente (MINAN 2010). Por los datos obtenidos de la muestra de agua residual de la industria de chocolate, esta tiene muchas materia orgánica susceptible de ser oxidada por los microorganismos (Grady *et al.*, 1994).

Por lo tanto se infiere que las muestras de agua residual de la industria de chocolate contienen fuentes de carbono orgánico en cantidades capaces de sustentar el cultivo heterotrófico de *Chlorella vulgaris* (Grady *et al.*, 1994).

4.3 Mantenimiento del cultivo y evaluación del crecimiento *Chlorella vulgaris* en condiciones controladas de fotobioreactor tipo panel.

La obtención de biomasa que se utilizó para el tratamiento de grasas y aceites se inició con 2 litros de inóculo de cultivo puro. El inóculo junto con 13L de medio de cultivo BBM (Medio Basal Bold) fue transferido a condiciones de fotobioreactor tipo panel de 15L (Figura 11). Los parámetros del cultivo fueron pH 7 y temperatura de 25°C. El crecimiento del cultivo de *Chlorella vulgaris* en fotobioreactor se realizó durante 15 días periodo en el cual se alcanzó la fase de crecimiento lineal. La cosecha del cultivo de *Chlorella vulgaris* se realizó durante esta fase y no en la fase estacionaria con el fin de permitir una continuidad en el crecimiento durante el tratamiento de grasas y aceites. La densidad de *Chlorella vulgaris* en el día 15 (fase de crecimiento lineal) fue de 3125000 cel /ml.



Figura 11. Mantenimiento del cultivo y evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en condiciones controladas de fotobioreactor tipo panel

Se muestra en la figura el cultivo axénico de *Chlorella vulgaris* a temperatura de 25 °C y pH 7.6 el cual se mantuvo en un fotobioreactor con aireación continua usando bombas de aire durante 15 días con fotoperíodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad mediante 2 fluorescentes de 30 watts, donde se obtuvo un crecimiento de 3125000 cel./mL

4.4. Caracterización y operación del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio para la biodepuración de aceites y grasas de la industria chocolatera.

El sistema flujo continuo consistió de un contenedor de efluente de material plástico transparente con capacidad de 20 L en el cual se depositó el efluente de la industria de chocolate (Figura 12a). El contenedor con el efluente se conectó mediante una llave de paso a un sedimentador de 6 L de volumen que presenta 2 rejillas de acero (Figura 12b y 12c) y este a su vez se conectó a un reactor tubular de 2 L mediante otra llave de paso (Figura 12d).

Cada sedimentador se cargó con inóculo de 1.5 L de cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* con densidad de 3125000 cel /ml, mientras que cada bioreactor tubular se cargó con 500 mL de cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* con densidad de 3125000 cel /ml. La velocidad de flujo que se obtuvo fue de 40 mL/min y la velocidad del agitador de paletas fue de 35 rpm. El sistema estuvo provisto de un termómetro ambiental y pHmetro, registrándose periódicamente la temperatura, pH, funcionamiento óptimo de la circulación del fluido y condiciones del cultivo, la capacidad total del sistema de flujo continuo fue de 16 L.

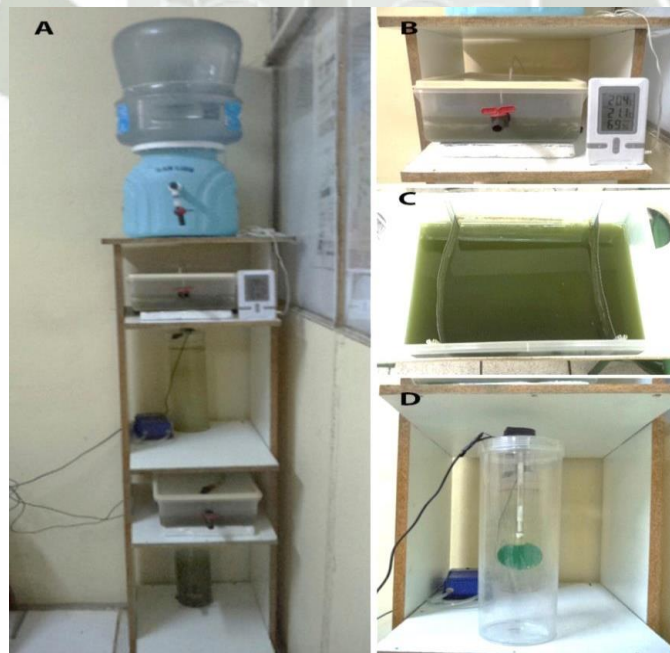


Figura 12. Sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*. a) Sistema de flujo continuo de *Chlorella vulgaris* en funcionamiento. b) Sedimentador cargado con efluente. c) Sedimentador cargado con efluente y biomasa de *Chlorella vulgaris* d) Fotobioreactor antes de ser cargado con efluente y biomasa de *Chlorella vulgaris*.

4.5. Evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo.

La evaluación de temperatura, pH y crecimiento del cultivo en el sistema de flujo continuo durante los 28 días de evaluación, se muestran a continuación:

Tabla 5. Parámetros del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.

TIEMPO DE EVALUACIÓN (días)	PARÁMETROS DEL CULTIVO DE <i>Chlorella vulgaris</i>		Crecimiento (Cel/ml)
	pH	Temperatura (°C)	
0 DÍAS (inoculo)	7.6	25	3125000
7 DÍAS	8.2	24	2100000
14 DÍAS	8.8	24	3300000
21 DÍAS	9.2	25	4362500
28 DÍAS	9.2	25	5425000

La tabla 5 muestra los parámetros del cultivo de *Chlorella vulgaris* hasta los 28 días de evaluación. El pH de la muestra antes de tratar fue de 7.6. Después de iniciado el tratamiento con el cultivo mediante el uso de *Chlorella vulgaris* se observó un aumento del pH (ligeramente alcalino) y fue aumentando progresivamente después del tratamiento hasta alcanzar un pH de 9.2 a los 28 días que duro el estudio (tabla 5 y figura 13).

El efluente que se utilizó para el cultivo del alga fue sin ningún ajuste de pH o de acondicionamiento, ya que *C. vulgaris* podría adaptarse al efluente y producir biomasa mediante nutrición heterotrófica en este medio. En cultivos con microalgas utilizadas en el tratamiento primario de aguas residuales también se ha descrito un incremento del pH desde 7 a valores superiores a 9 (Lau y col. 1995).

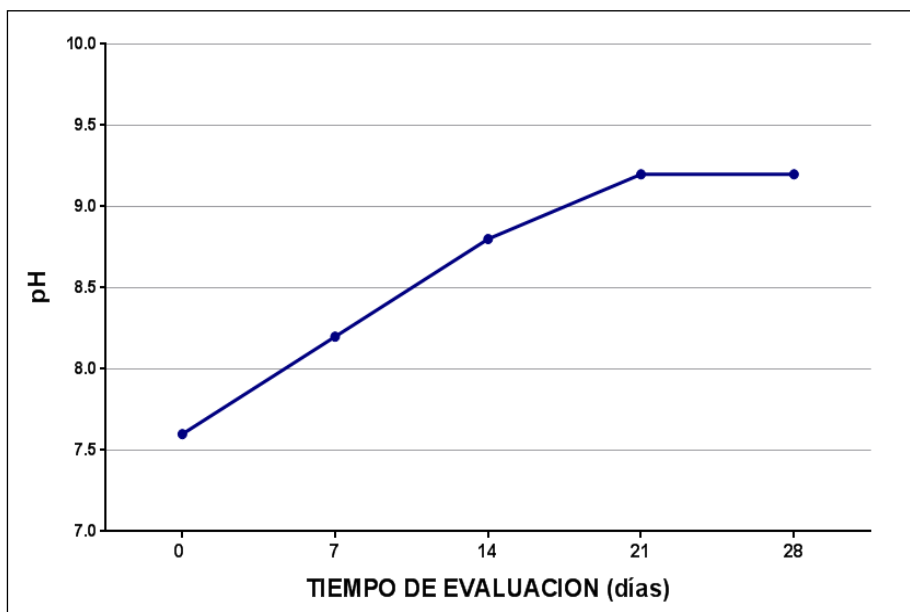


Figura 13. pH del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.

El pH de aguas residuales de las industrias alimentarias depende de la naturaleza del producto final y puede variar de 6,6-12,2 (Alvarez-Manteos et al., 2000) y según (Passeggi, Lopez y Borzacconi, 2009) de 4,7 a 11. El efluente que indica condiciones ácidas podría tener un efecto adverso sobre la microflora del suelo (Bako, Chukwunonso y Adamu, 2008).

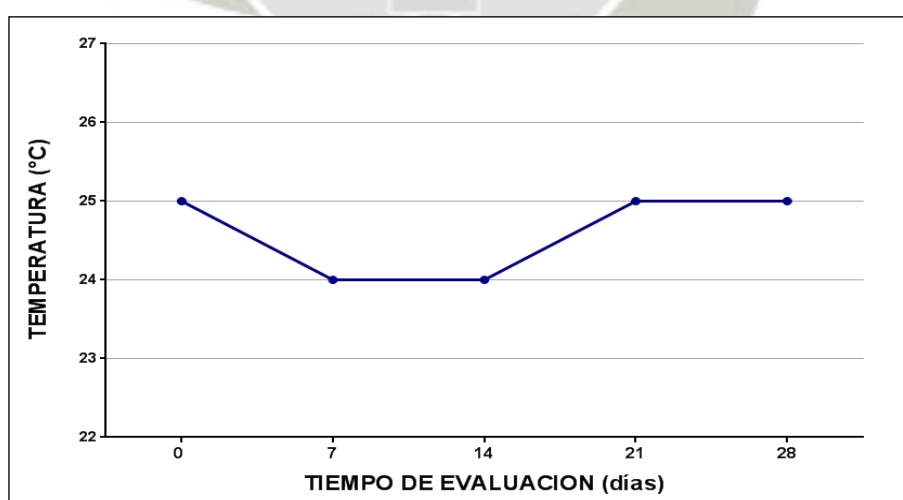


Figura 14. Temperatura del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.

Se muestra una disminución de la temperatura del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo, desde los 7 a 14 días con 24°C en relación a la temperatura inicial de 25°C del inóculo, para después registrar un aumento a los 21 días y mantenerse a los 28 días de evaluación en 25°C (figura 14). La temperatura promedio fue de 25°C y este parámetro solo depende de las condiciones ambientales durante el desarrollo de la investigación.

En cuanto a la temperatura De Bashan, (2008) registró un valor de 36.6°C durante el verano (agosto) del 2003 en el agua residual de industria láctea, lo cual supera en la temperatura media registrada en el presente trabajo. Posiblemente el crecimiento de *C. vulgaris* se vea afectado en los extremos más altos de temperatura de este rango ya que este organismo es una especie nativa de aguas templadas con temperaturas de 19.7 a 28°C (Gonzalez *et al.*, 1997). Otras especies del genero *Chlorella* como *C. sorokiniana* podrían ser utilizadas en el tratamiento de aguas en condiciones altas del rango de temperatura (De Bashan, 2008).

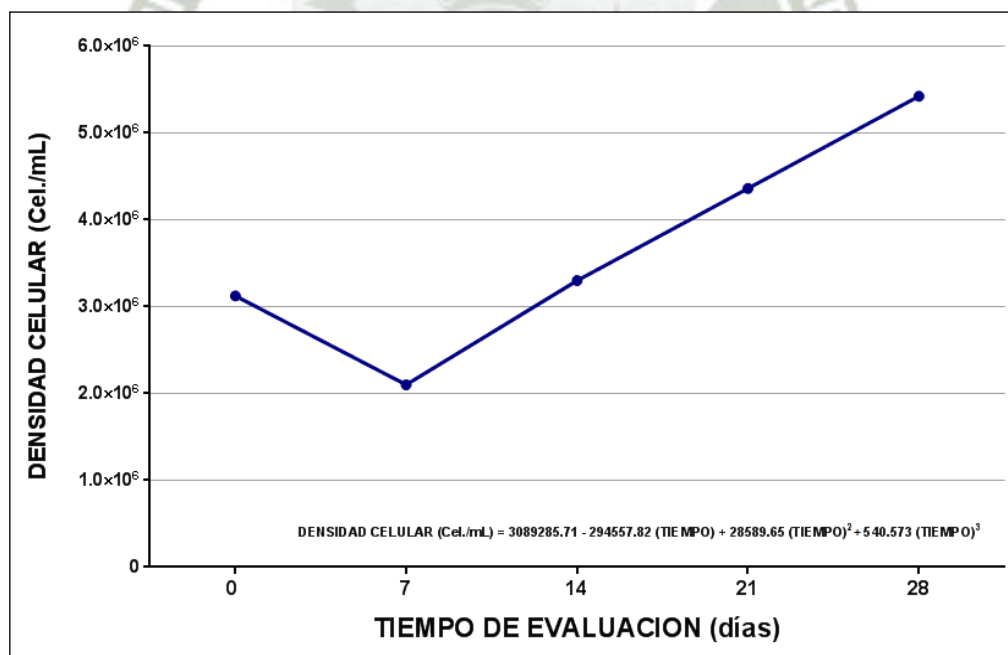


Figura 15. Crecimiento del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo según tiempo de evaluación.

Se muestra una disminución de la densidad celular del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo, a los 7 días con 2100000 cel./mL en relación a la densidad inicial de 3125000 cel./mL del inóculo, para después registrar un aumento hasta los 28 días de evaluación alcanzando una densidad de 5425000 cel./mL. (Figura 15 y Figura16). La densidad celular del cultivo de *Chlorella vulgaris* empacada en el sistema de flujo continuo en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático cúbico donde la Densidad Celular = $3089285.71 - 294557.82(\text{tiempo}) + 28589.65(\text{tiempo})^2 + 540.57(\text{tiempo})^3$, del que se interpreta que por cada día de tratamiento, inicialmente se presenta una disminución en la densidad de 294557 (cel/mL), para luego aumentar en un doble del tiempo inicial en 28589 (cel/mL) y finalmente en tres veces tiempo inicial alcanzar un aumento de 540 (cel/mL).

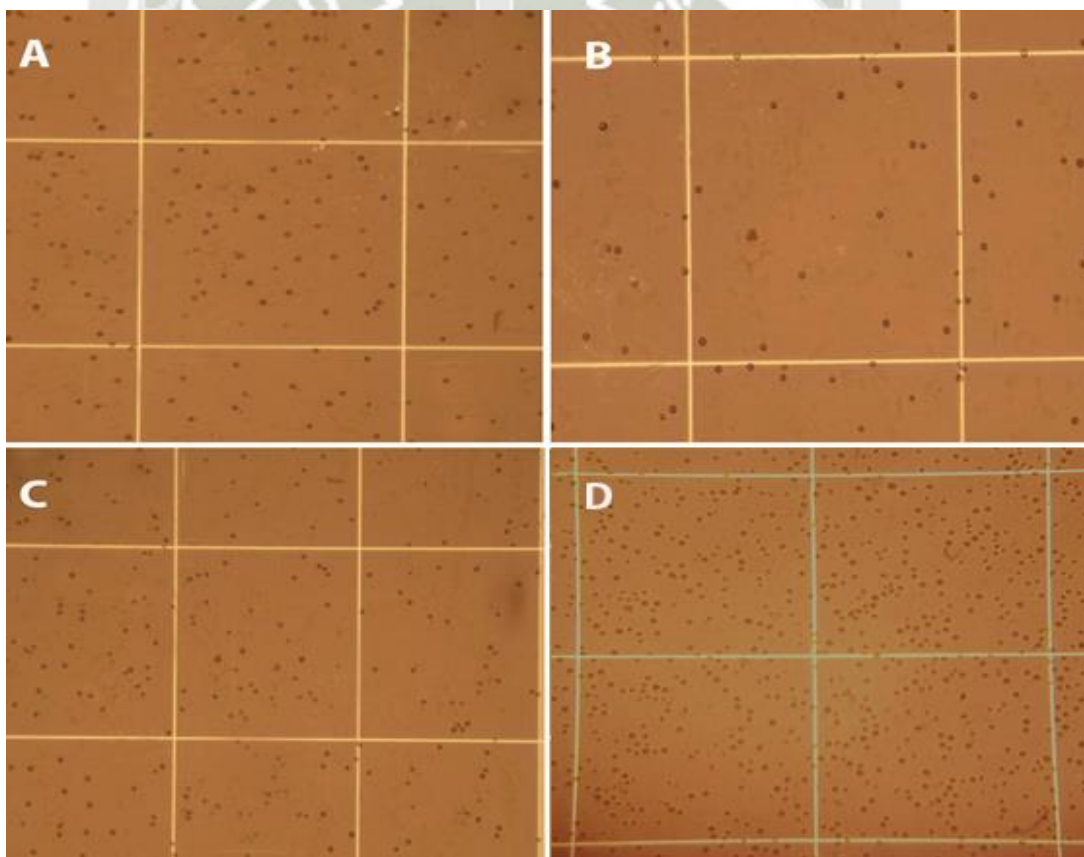


Figura 16. Recuento de *Chlorella vulgaris* en cámara de Neubauer a 10X. a) Recuento de *Chlorella vulgaris* del grupo control. b) Recuento de *Chlorella vulgaris* a los 7 días de exposición al efluente. c) Recuento de *Chlorella vulgaris* a los 14 días de exposición al efluente. d) Recuento de *Chlorella vulgaris* a los 21 días de exposición al efluente.

La disminución en la densidad inicial y su repentino incremento después del día 7, podría deberse al mecanismo de adaptación de *C. vulgaris* al efluente con materia orgánica, ya que supone un cambio de nutrición autótrofa (condiciones de fotobioreactor con medio de cultivo inorgánico) a nutrición heterótrofa (presencia de compuestos orgánicos, como grasas y aceites).

Los resultados mostraron que el cultivo de *C. vulgaris* aumento su biomasa en condiciones heterotróficas durante la evolución del tratamiento. Se obtuvieron resultados similares para los productos lácteos de tratamiento de aguas residuales por la microalga *Botryococcus* (Shen et al., 2008) y *Chlamydomonas polyphyrenoidum* (Kothari et al., 2013). En un estudio por Ummalyima y Rajeev, (2014) sobre el cultivo del alga *Chlorococcum sp.* en residuos lácteos esta microalga creció mejor y acumuló más lípidos bajo cultivo heterótrofos (residuos lácteos) en comparación con cultivo mixotrófico. Mientras que la producción de biomasa fue de 0,8 g / l para cultivo mixotrófico, se incrementó a 1,94 g / L en cultivo heterotrófico.

Recientemente, la micro alga *C. polyphyrenoidum* logro acumular el 42% de su peso celular seco como lípidos cuando se cultivan en efluentes lácteos (Kothari et al., 2013). Las microalga oleaginosa *C. vulgaris* tiene típicamente un contenido medio total de lípidos de 25% en condiciones fotótrofas normales y puede elevarse a 55% cuando se cultivan bajo condiciones de estrés o heterotrofia (Xu et al, 2006; Hu et al, 2008).

4.6. Evaluación de la concentración residual de grasas y aceites en los efluentes tratados en sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*.

Tabla 6. Concentración residual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación del efluente en el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE GRASAS ACEITES $\bar{X} \pm S$ (mg/L)	REMOCIÓN DE GRASAS Y ACEITES (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCION DE GRASAS Y ACEITES	DIFERENCIAS DE LA REMOCION DE GRASAS Y ACEITES (%)
EFLUENTE	2634.00 ± 7.21	0	-	-
7 DÍAS	404.00 ± 5.57	84	2230	85
14 DÍAS	261.00 ± 5.19	90	143	5
21 DÍAS	135.00 ± 5.29	94	126	4
ANOVA	F= 122945	(P>0.01)		

La tabla 6, muestra los promedios y desviaciones estándar de la concentración de grasas y aceites presente en el efluente de la industria chocolatera al inicio y cada 7 días de evaluación después de ser sometido a tratamiento en un sistema de flujo continuo, siendo la concentración inicial del efluente 2634.00 ± 7.21 (mg/L), y a los 21 días se presentó una concentración de 135.00 ± 5.29 (mg/L). Se muestra también el porcentaje de remoción de grasas y aceites del efluente de la industria chocolatera, alcanzándose un porcentaje de remoción del 94% a los 21 días de evaluación por efecto del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*. También se muestra la prueba estadística de comparación de ANOVA, la que presentó un estadístico de Fhiser $F=122945$ que indica que existe diferencias altamente significativas ($P<0.01$) en la concentración de grasas y aceites presente en los efluentes de una industria chocolatera en los diferentes tiempos de evaluación. Las

diferencias en la remoción de la remoción de grasas y aceites muestran que la máxima remoción se presentó a los 7 días de evaluación con 85% de remoción (2230 mg/L), mientras que a los 20 días se presentó la mínima remoción con 4% (126 mg/L). Los datos de la evaluación en los meses de enero, febrero, marzo se muestran en Anexos (pág. 85)

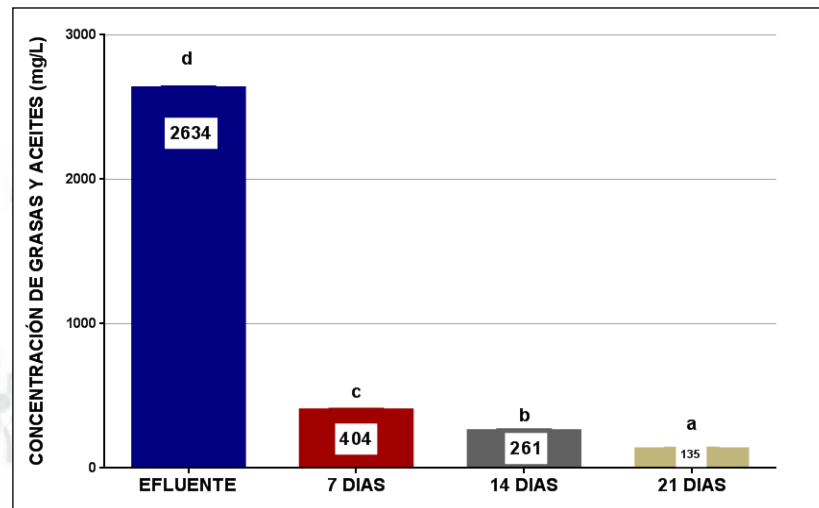


Figura 17. Comparación de la concentración residual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación del efluente en el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*.

La figura 17 muestra la prueba de comparación múltiple de TUKEY la cual muestra la presencia de cuatro grupos (a, b, c y d), siendo la concentración del efluente el que presentó mayor concentración de grasas y aceites con 2634mg/L (d), mientras que la menor concentración de grasas y aceites del efluente de la industria chocolatera se presentó a los 21 días de tratamiento en el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* con 135 mg/L (Figura 17 y Figura18).

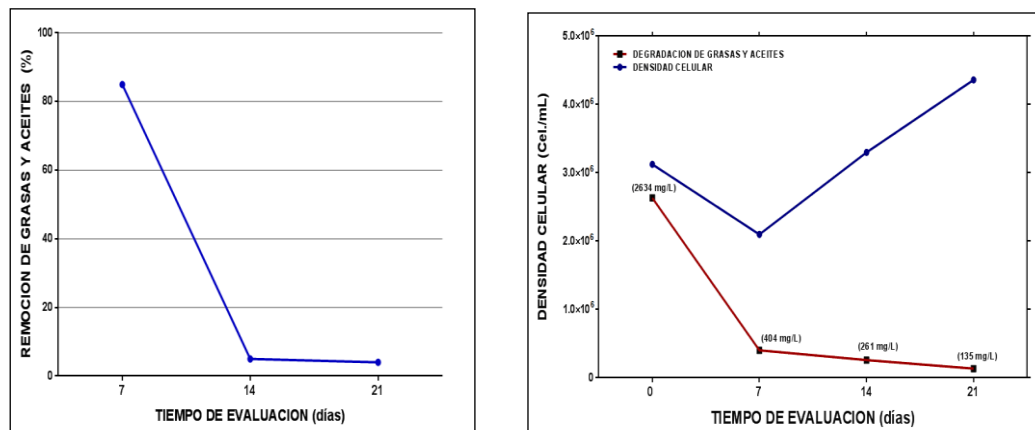


Figura 18. A) Remoción porcentual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación en el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y grafico comparativo de la degradación de grasas y densidad celular.

La figura muestra la remoción porcentual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera, presentándose la mayor remoción a los 7 días de evaluación con 85% de remoción, a los 14 días de evaluación se presentó 5% de remoción de grasas y aceites, mientras que a los 21 días de evaluación se presentó el menor porcentaje de remoción de grasas y aceites de los efluentes de la industria chocolatera con el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* con 4% de remoción. La mayor remoción se produce a los 7 días de evaluación cuando junto con una menor densidad celular de *Chlorella vulgaris* (figura18).

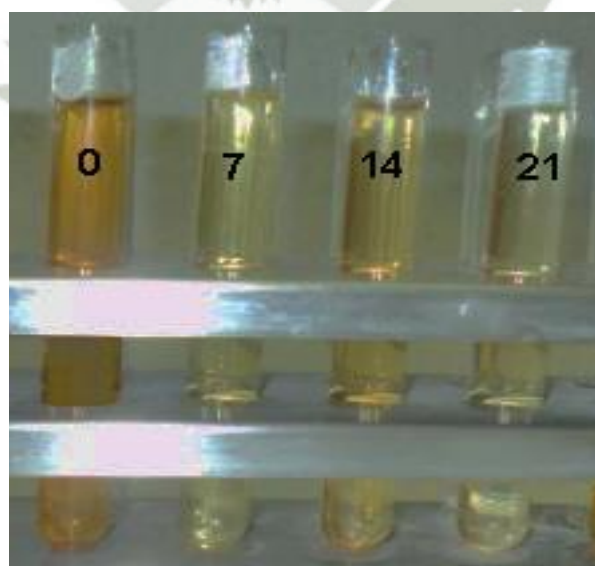


Figura 19. Comparación de la concentración residual de grasas y aceites de efluentes de la industria chocolatera según tiempo de evaluación del efluente

Las microalgas se caracterizan por soportar elevadas concentraciones de nutrientes, presentan una actividad metabólica elevada, contribuyen con la oxidación bacteriana, tienen capacidad de resistir variaciones ambientales, presentan estrategias fisiológicas para exhibir un crecimiento mixotrófico y una interacción favorable microalga-bacteria (Salazar, 2005). Entre otras estrategias fisiológicas de estos microorganismos, se encuentran la capacidad de producir enzimas degradadoras de compuestos orgánicos en las aguas residuales, a fin de generar sustratos más asimilables para su crecimiento y metabolismo. Esto significa, que la carga orgánica en estos efluentes puede ser degradada por esta maquinaria enzimática; con lo cual la DBO5 es removida en función del tiempo y actividad metabólica de bacterias y microalgas (Hosetti y Patil 1992). En un estudio de evaluación de microalgas y de bacterias productoras de exoenzimas se encontró que *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Oocystis*, producen lipasas, mostrando mayor actividad lipasa comparada a otras microalgas y cianobacterias evaluadas (Rodríguez, 2010). Las lipasas o enzimas lipolíticas son usadas para la hidrólisis de grasas, se caracterizan por intervenir la interface agua/lípido y dada su alta especificidad respecto al tipo y posición específica del residuo del ácido graso, tiene aplicaciones en el tratamiento de aguas residuales (Khan y col. 2003; Singh y col. 2006). En un estudio donde utilizaron aislados de cuatro cepas de bacterias para tratamiento de efluentes de residuos de la industria de la leche, alcanzaron reducciones de aceites y grasas de 44.70, 15.10, 37.41 y 59.13%, menor al alcanzado en la presente investigación de 94% (tabla 6), a pesar que en los trabajos previos reportados se alcanzó mayor degradación después de una filtración y aireación previa del efluente, mientras que en la filtración en el sistema de flujo continuo implementado en la presente investigación se realizó mediante sedimentadores. La remoción significativa de residuos de aceite de oliva se ha reportado en sistemas de tratamiento de residuos industriales y realizado por filtros de arena, con una concentración de 7.5 mg.L⁻¹ a la entrada y de 0.3 mg.L⁻¹, a la salida, obteniéndose una reducción del 96% con la participación de las algas *Lyngbia*, *Microcoleus chthonoplastes*, *Phormidium corium*, *Phormidium* sp., *Oscillatoria salina*, *Plectonema terebrans* y *Aphanocapsa* sp., en asociación con bacterias heterotróficas (Safonova y col. 2004). La mayor remoción de aceites y

grasas y la disminución de la densidad celular de *Chlorella vulgaris* en la primera semana posiblemente se dio porque durante los primeros días la microalga consumió rápidamente la mayor cantidad de grasas lo que condujo a un aumento rápido del pH (Figura 13) que trajo como consecuencia la muerte de muchas células de *Chlorella vulgaris* que se vio reflejado en una baja densidad celular (Figura 18).

4.7 Evaluación de la concentración residual de NO_3^- , SO_4^{2-} , STD, SST, turbidez, DQO Y DBO, en los efluentes tratados en sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*.

La evaluación de los parámetros físico-químicos, se realizaron secuencialmente cada 7 días a partir de muestras tomadas a la salida del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* en envases estériles y debidamente rotulados, la turbidez mostró valores >461 FNU hasta la última evaluación, los resultados de los demás parámetros se muestran a continuación:

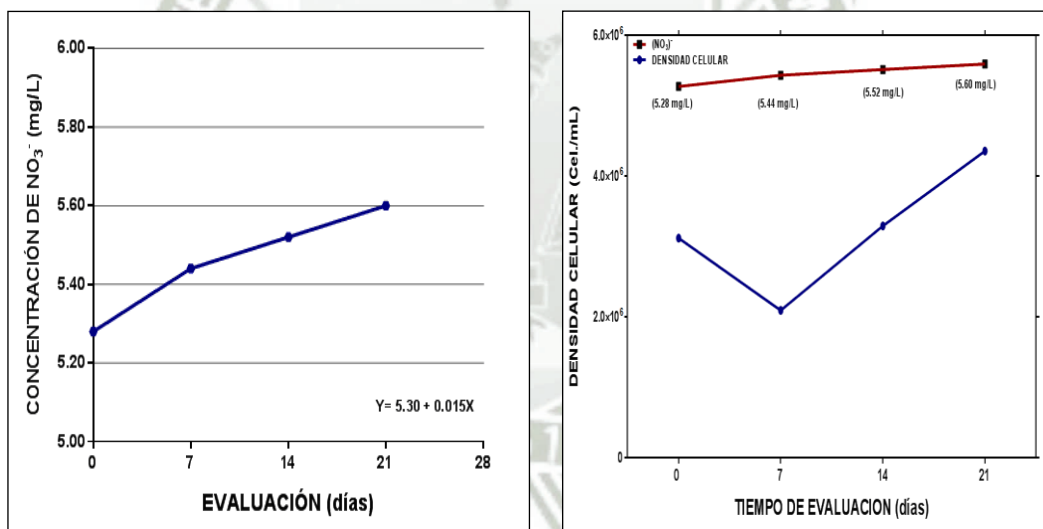


Figura 20. A) Concentración de NO_3^- según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y grafico comparativo de la concentración de NO_3^- y densidad celular.

Se muestra los valores de NO_3^- hasta los 21 días de evaluación, siendo el valor de NO_3^- del efluente de la industria chocolatera 5.28 mg/L, aumentando mínimamente hasta 5.60 mg/L a los 21 días de evaluación, el aumento de la concentración de NO_3^- en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático lineal $Y = 5.30 +$

0.015X, del que se describe que por cada día de tratamiento en el sistema de flujo continuo la concentración de NO_3^- aumenta en 0.015 mg/L. (Figura 18).

En diversos estudios se ha demostrado, altas eficiencias en la remoción de nitrógeno de aguas residuales. Así, efluentes de granjas de cerdos con alta carga de nutrientes e inoculadas con las microalgas *Microspora willeana*, *Ulothrix ozonada*, *Rhizoclonium hieroglyphicum* y *Oedogonium sp.* han reportado una remoción del 90%, equivalente a una cantidad mayor a 1000mg.l^{-1} de nitrógeno total (Kebede y col. 2006). Por otro lado, Chacón y col. (2006); encontraron remociones de nitrógeno amoniacal (100%) en aguas residuales urbanas cultivadas con *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* Entre otros trabajos, Andrade, (2007) también reporto remociones de 95,49% y de 99,78% nitrógeno amoniacal y de nitratos de aguas residuales con *Scenedesmus sp.*

En cuanto a las diferentes fuentes de nitrógeno existentes en los medios de cultivo, se ha descrito una asimilación preferencial por las algas en el siguiente orden $(\text{NH}_4^+) > (\text{NO}_2^-) > (\text{NO}_3^-) >$ Nitrógeno orgánico simple (como urea y aminoácidos). Es decir, la microalga consumirá en primer lugar el NH_4^+ en función del grado de reducción de las diferentes fuentes de nitrógeno, debido al gasto energético requerido para asimilar las fuentes más oxidadas (Lau y col. 1995; Morales, 1996). Por lo tanto la posible causa del aumento de nitrato en la presente investigación podrían deberse a que *Chlorella vulgaris* utiliza preferentemente nitrato inorgánico bajo la forma de NH_4^+ antes que nitrato orgánico originado por la degradación de la materia orgánica en aminoácidos presentes en el efluente de la industria del chocolate. El aumento de pH en los cultivos ejercen influencia en la precipitación de nutrientes, tales como el nitrato y sulfato, en consecuencia disminuyan la disponibilidad de los mismos para las microalgas, (Abalde y col. 1995). Por la tanto es posible que el aumento de pH en el cultivo con agua residual de la industria chocolatera condujo a la precipitación de del nitrato haciendo menos disponible su asimilación por *Chlorella vulgaris*). Otra causa del aumento de nitrato en el efluente del sistema de flujo continuo podría deberse a la presencia de nitrato y también fosfato en la composición del medio de cultivo BBM (Medio Basal Bold) proveniente del inoculo de *C. vulgaris*.

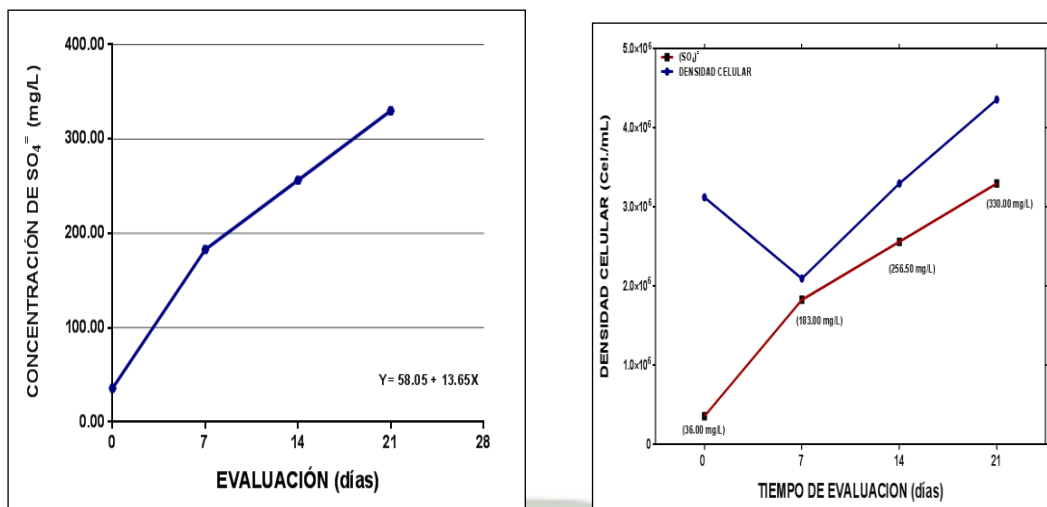


Figura 21. Concentración de SO_4^{2-} según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y grafico comparativo de la concentración de SO_4^{2-} y densidad celular.

Se muestra los valores de SO_4^{2-} hasta los 21 días de evaluación, siendo el valor de SO_4^{2-} del efluente de la industria chocolatera 36 mg/L, aumentando hasta 330 mg/L, representando un aumento de 10 veces la concentración inicial a los 21 días de evaluación, el aumento de la concentración de SO_4^{2-} en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático lineal $Y = 58.05 + 13.65X$, del que se describe que por cada día de tratamiento en el sistema de flujo continuo la concentración de SO_4^{2-} aumenta en 13.65 mg/L (Figura 20). La posible causa del aumento de sulfatos podría ser la presencia de exoenzimas y proteasas de algas y bacterias asociadas en los tratamientos de aguas residuales que degradan las grasas y proteínas liberando sulfatos al medio aumentando la concentración de este (Abalde y col. 1995). El aumento de pH en los cultivos con agua residual de la industria chocolatera, también podrían ejercer influencia en la precipitación de sulfatos, en consecuencia disminuyan la disponibilidad de los mismos para las microalgas, (Abalde y col. 1995). Al igual que el nitrato el aumento del fosfato también podría deberse al efecto del medio de cultivo BBM (Medio Basal Bold).

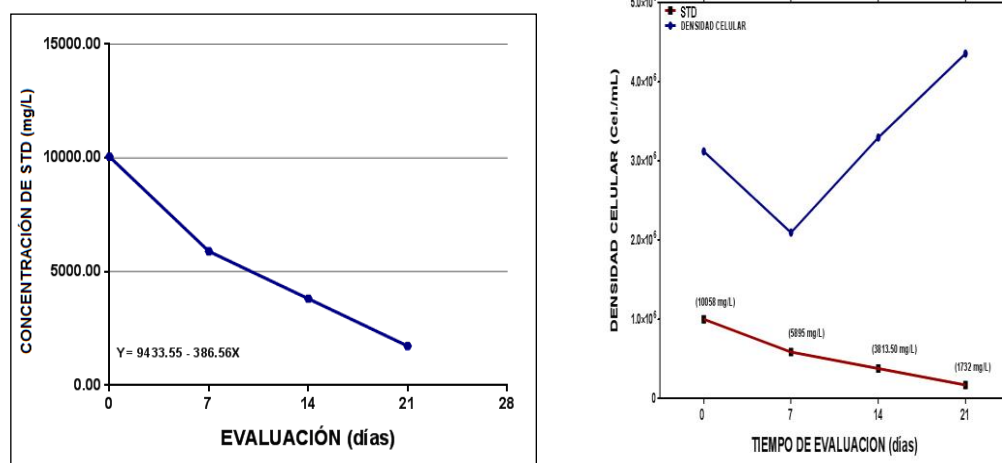


Figura 22. Concentración de STD según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y grafico comparativo de la concentración de los STD y densidad celular.

Se muestra los valores de STD hasta los 21 días de evaluación, siendo el valor de STD del efluente de la industria chocolatera 10058 mg/L, disminuyendo hasta 1732 mg/L a los 21 días de evaluación, representando una reducción del 83% (Figura 21). La disminución de la concentración de STD en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático lineal $Y = 9433.55 - 386.56X$, del que se describe que por cada día de tratamiento en el sistema de flujo continuo la concentración de STD disminuye en 386.56 mg/L.

Shruthi et al., (2012) informó una reducción de 73% en STD del efluente de procesamiento de caucho mediante el uso de *Pseudomonas* sp. Los contenidos orgánicos junto con otros iones minerales de los efluentes podrían haber sido utilizadas por los microorganismos para causar reducción global de sólidos totales que también demuestra la eficiencia en la eliminación de nutrientes.

Shruthi et al., (2012) reportó la reducción de 68,8% en STD en efluentes de transformación de caucho utilizando *Pseudomonas* sp. Gaikwad et al. También se había informado de un máximo de reducción de 74,36% en STD mediante consorcios microbianos de varias especies bacterianas *Pseudomonas*, actinomicetos, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*, menor al obtenido por la presente investigación de

83% lo que indicaría una alta reducción de la materia orgánica e inorgánica mediante el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris*, ya que la presencia de alto nivel de sólidos suspendidos totales y sólidos disueltos totales es debido a la materia orgánica e inorgánica presente en el efluente. Un gran número de sólidos se encuentra disuelto en las aguas naturales, las más comunes son el carbonato, bicarbonatos, cloruros, sulfatos, fosfatos y nitratos de calcio, magnesio, sodio, potasio, hierro, magnesio, etc. Un alto contenido de STD reduce la utilidad de agua para beber, con fines industriales y de riego.

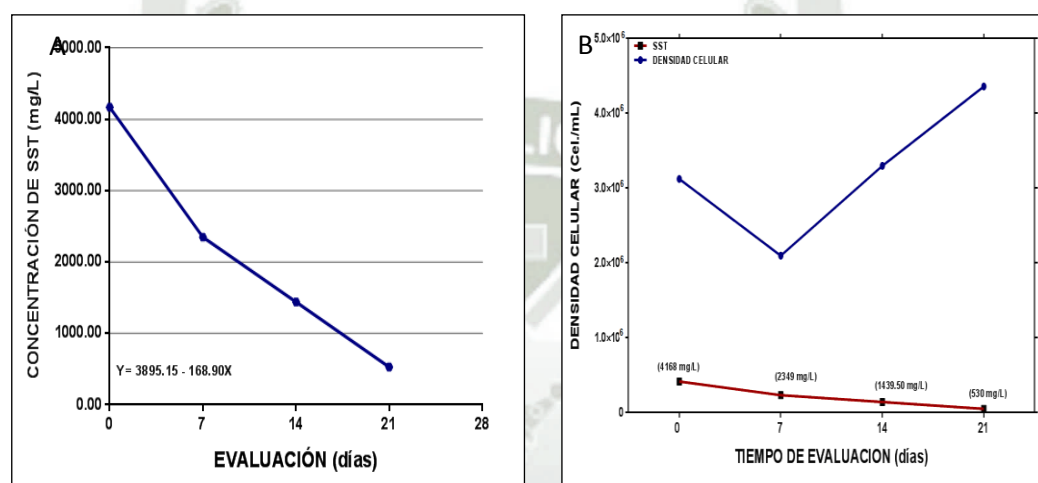


Figura 23. Concentración de SST según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y grafico comparativo de la concentración de los SST y densidad celular.

Se muestra los valores de SST hasta los 21 días de evaluación, siendo el valor de SST del efluente de la industria chocolatera 4168 mg/L, disminuyendo hasta 530 mg/L a los 21 días de evaluación, representando una reducción del 87% (Figura 22). La disminución de la concentración de SST en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático lineal $Y = 3895.15 - 168.90X$, del que se describe que por cada día de tratamiento en el sistema de flujo continuo la concentración de SST disminuye en 168.90 mg/L. Shruthi et al., (2012) informó de un 75% de reducción de SST del efluente de procesamiento de caucho utilizando *Pseudomonas* sp.. Gaikwad et al., (2014) también reportó un máximo de reducción de 79,76% en SST mediante consorcios microbianos de varias especies bacterianas a saber *Pseudomonas*, actinomicetos, *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Streptomyces*, menores en

comparación a la reportada en la presente investigación con 87% de reducción obtenido por efecto del sistema de flujo continuo, representando una reducción eficaz. Las altas concentraciones de sólidos en suspensión pueden causar muchos problemas para la vida acuática y es un parámetro importante utilizado para evaluar la intensidad de las aguas residuales domésticas y para determinar la eficiencia de la unidad de tratamiento (Renu, 1998). Los SST mediante el aumento de la turbidez reducen la penetración de la luz y también puede obstruir las branquias de los peces (Ashok, Srivastava y Renu,1998; Baruah, Sharma y Borah, 1993).

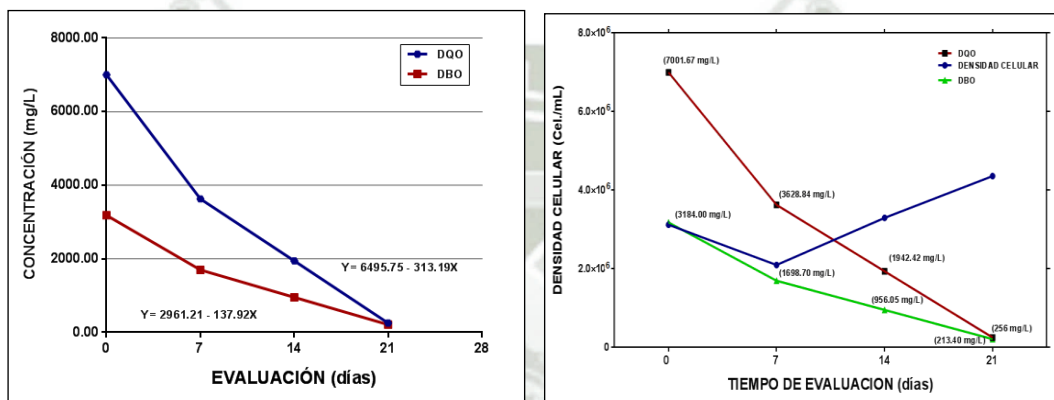


Figura 24. Concentración de la DQO y DBO según tiempo de evaluación presente en el efluente del sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* y grafico comparativo de la concentración de DQO, DBO y densidad celular.

Se muestra los valores de la DQO y la DBO hasta los 21 días de evaluación, siendo el valor de la DQO del efluente de la industria chocolatera 7001.67 mg/L, disminuyendo hasta 256 mg/L a los 21 días de evaluación, representando un 96% de reducción (Figura 23). La disminución de la concentración de la DQO en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático lineal $Y = 6495.75 - 313.19X$, del que se describe que por cada día de tratamiento en el sistema de flujo continuo la concentración de la DQO disminuye en 313.19 mg/L. También se muestra los valores de la DBO hasta los 21 días de evaluación, siendo el valor de la DBO del efluente de la industria chocolatera 3184.00 mg/L, disminuyendo hasta 213.40 mg/L a los 21 días de evaluación, representando un 93% de reducción, la disminución de la concentración de la DBO en función al tiempo se describe mediante un modelo matemático lineal $Y = 2961.21 - 137.92X$, del que se describe que por cada día de

tratamiento en el sistema de flujo continuo la concentración de la DBO disminuye en 137.92 mg/L.

La demanda bioquímica de oxígeno es ampliamente utilizado como un indicador de la calidad del agua. La disminución significativa en los valores de DBO podría estar asociado con el consumo de material orgánico por *Chlorella vulgaris* y otro microbios como una fuente de alimento de estos, la reducción considerable de la DQO y DBO también ha sido reportado por Das y Santra (2010), Gaikwad et al, (2014) de las aguas residuales mediante el uso de aislados bacterianos. Como la mayoría de las industrias del sector alimentario genera aguas residuales fuertes caracterizadas por la DQO y DBO altas que representan su contenido orgánico elevado (Orhon, Gorgun, Germirli y Artan, 1993), estos valores altos en DBO y de DQO es debido a las grasas, nutrientes, lactosa, detergentes, agentes desinfectantes, azúcares y sales inorgánicas. Se estima que alrededor del 2% del total de los productos procesados de los alimentos se desperdicia en los desagües (Munavalli y Saler, 2009; Kolhe, Ingale y Bhole, 2009). Aunque el alto crecimiento de microbios consume el oxígeno presente en el sistema de tratamiento continuo junto con una aireación constante demuestra ser una razón importante para la reducción de DBO en el tratamiento. por lo tanto la eliminación de la materia orgánica y los nutrientes de las aguas residuales es un aspecto importante del tratamiento biológico.

La DBO es un indicador de contenido biológicamente degradable. Según Ummalyma y Rajeev, (2014), en un estudio de cultivo de *Chlorococcum* sp. en residuos lácteos, la DBO se redujo gradualmente desde un valor inicial de 37 mg / L, a 7 mg /L durante el crecimiento en el efluente, después de 15 días de incubación, proporciono una reducción de 82%. Resultados similares de eficiencias de remoción con 88% y 89 % para la DQO y DBO respectivamente, desde aguas residuales industriales utilizando *Chlorella vulgaris*, fue reportado por Azeez, (2010). Aparte de la reducción de la DQO y DBO de manera significativa, *Chlorella vulgaris* también podría eliminar rápidamente el mal olor del efluente.

Porwal, Mane y Velhal (2014) encontró que después de un periodo de aireación de 48 horas la eficiencia de la reducción mayor de 52% en la DBO, mientras que el efluente filtrado causo más reducciones en los valores de DBO de hasta 85.15%,

resultado menor al obtenido mediante el sistema de flujo continuo de 93% de remoción (Figura 27), ocasionado principalmente por la aireación aplicada en cada componente del mismo. Los resultados obtenidos del estudio de cuatro aislados bacterianos por Porwal, Mane y Velhal, (2014) después de la filtración del efluente alcanzo un máximo de 85% en la DQO, menor al obtenido al cabo de 21 días de evaluación en el sistema de flujo continuo empacado con *Chlorella vulgaris* de 96% (figura 27). La reducción de los valores de DQO podría ser debido a más cantidad de nutrientes presentes en la forma de materia orgánica disuelta utilizado para el crecimiento de los cultivos (Porwal, Mane y Velhal, 2014). Nuestros resultados están de acuerdo con la reducción de la DQO visto por Guillén-Jimenez et al (2000), donde se encontró la máxima reducción de DQO de hasta el 65-70%. Similar disminución de la DQO de las aguas residuales de productos lácteos (99,9%) fue reportado por Cosa y Okoh (2014) con el consorcio de dos especies marinas que pertenecen a *Ocenobacillus* y *Halobacillus*. Chatterjee y Pugaht (2013) también reporto de 67,1% y 48,3% de reducción de DQO de las aguas residuales lácteas con el uso de dos cepas bacterianas de *Neisseria* sp. y *Citrobacter* sp. Vida et al., (2007) también informó la reducción de DQO de 70,7% y 69,5% mediante el uso de dos aislamientos bacterianos. La DQO de las aguas residuales de las industrias de los alimentos está influenciada principalmente por la leche, crema, suero y grasa (G. Wildbrett, Bewertung 1998).

La producción de biomasa en *Chlorella vulgaris* se basa en la rápida utilización de la materia orgánica en el efluente y puede debe considerarse como un medio atractivo, eficiente y respetuoso del medio ambiente para el tratamiento de estas aguas residuales, ya que además de la eliminación de materia orgánica (grasas y aceites), el cultivo de algas añade valor al proceso mediante la generación de productos de valor comercial como biogás, biocombustibles y bioetanol a partir de la biomasa algal.

CONCLUSIONES

De la presente investigación podemos concluir que:

PRIMERA: El sistema de flujo continuo fue óptimo para el crecimiento y bioabsorción de grasas y aceites en efluentes de la industria chocolatera.

SEGUNDA: *Chlorella vulgaris* demostró alta resistencia y capacidad de bioabsorción de aceites y grasas en efluentes de la industria chocolatera.

TERCERA: *Chlorella vulgaris* presentó buen crecimiento y presenta un gran potencial para la biodepuración de grasas y aceites en efluentes de la industria chocolatera, alcanzando un 96% de biodepuración a los 21 días de evaluación.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la remoción de aceites y grasas de efluentes industriales de diferente origen, como por ejemplo la industria láctea y curtiembres.
- Probar la remoción de aceites y grasas mediante biomasa de *Chlorella vulgaris* inmovilizada en diferentes materiales, empacada en el sistema de flujo continuo.
- Probar la remoción de aceites y grasas mediante un consorcio de algas en el sistema de flujo propuesto.
- Evaluar la concentración y tipo de aceites y grasas bioabsorbidos por la biomasa de *Chlorella vulgaris*.
- Ensayar la remoción de otros contaminantes en el sistema de flujo propuesto, controlando las velocidades de flujo.
- Determinar la toxicidad mediante un bioindicador de contaminación previa prueba de sensibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1) A. K. Baruah, R.N. Sharma, G. C. Borah, Impact of sugar mill and distillery effluents on water quality of river Gelabil Assam, Indian J. of Env. Health, 35 (1993) 288-293.
- 2) A. Rodrigues, S. Xavier, F. Bernardes. (2007) Application of photo electrochemical-electro-dialysis treatment for the recovery and reuse of water from tannery effluents, J. Clean. Production. 10.1-7.
- 3) M. Esparza-Soto, O. Arzate-Archundia, C. Solís-Morelos and C. Fall.(2013) Treatment of a chocolate industry wastewater in a pilot-scale low-temperature UASB reactor operated at short hydraulic and sludge retention time. IWA Publishing 2013 Water Science & Technology 67.6.
- 4) A. S. Kolhe, S. R. Ingale, R. V. Bhole, Effluents of dairy technology, Int. Res. Jr. Sodh, Samiksha and Mulyankan, 5 (2009) 459-461.
- 5) A. Z. Zamora, M. A. L. Lit, Biodegradation of effluents from dairy products processing plant, environmental biotechnology: principles and applications, Kluwer, Academic Publishers, Netherlands, (1995) 481-490.
- 6) Abalde J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres y C. Herrero. (1995). Microalgas: Cultivos y Aplicaciones. Universidad La Coruña.
- 7) Alcántara, C., García-Encina, P.A. and Muñoz, R. (2013) Evaluation of mass and energy balances in the integrated microalgae growth-anaerobic digestion process. Chemical Engineering Journal 221, 238-246.
- 8) Alvarado, A. (2013) Advanced dynamic modelling of wastewater treatment ponds. PhD thesis, Ghent University, Belgium.
- 9) Andrade C., Cárdenas C., Araujo I., Jonte L., Ortega J. y Morales E. 2002. Utilización de la Microalga *Chlorella sp.* Para el Tratamiento de Aguas Residuales Urbanas. LII Convención Anual de la Asociación Venezolana para

el Avance de la Ciencia (AsoVAC). Barquisimeto. República Bolivariana de Venezuela.

- 10) Aplicaciones. Monografía No 26. Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. Pág. 19-58, 94, 106-108, 181.
- 11) Azeez, R.A., 2010. A Study on the effect of temperature on the treatment of industrial wastewater using *Chlorella vulgaris*. *Algae J. Eng. Technol.* 28, 1–8.
- 12) B. Demirel, O. Yenigun, T.T. Onay, Anaerobic treatment of dairy wastewaters: A review, *Process Biochem.* 40 (2005) 2583-2595.
- 13) Barsanti, Laura y Gualtieri, Paolo. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis group. 301 páginas.
- 14) Beal, L. J. & Raman, D. R. (2000). Sequential Two-Stage Anaerobic Treatment of Confectionery Wastewater, *Journal of Agricultural Engineering Research*, 76, 2000, 211-217.
- 15) Beyerinck [Beijerinck], M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
- 16) Brennan, L. and Owende, P. (2010) Biofuels from microalgae—A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14(2), 557-577.
- 17) Chacón Carmen, Cárdenas Carmen, Araujo Ismenia, Jonte Lorena, Mora Roberta y Morales Ever. 2002. Crecimiento de la Microalga *Scenedesmus sp.* en Aguas Colectadas del Sistema de Lagunas de Estabilización de LUZ- Estado Zulia. LII Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la ciencia (AsoVAC). Barquisimeto. República Bolivariana de Venezuela.

- 18) Craggs, R.J., Davies-Colley, R.J., Tanner, C.C. and Sukias, J.P. (2003) Advanced pond system: performance with high rate ponds of different depths and areas. *Water Science and Technology* 48(2), 259-267.
- 19) Crites, R. and Tchobanoglous, G. (2000) Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones McGraw-Hill Interamericana, S.A.
- 20) D. Kumar, K. Desai, Pollution abatement in milk dairy industry, *Curr. Pharma Res.1* (2011) 145-152.
- 21) D. Orhon, E. Gorgun, F. Germirli, N. Artan, Biological treatability of dairy wastewaters. *Water Res.* 27 (1993) 625-633.
- 22) Diwani, G. E.; Abd, H. E.; Hawash, S.; Ibiari, N. E. & Rafei, S. E. (2000). Treatment of Confectionery and Gum Factory Wastewater Effluent. *Adsorption Science and Technology*, 18, 9, 813-821
- 23) E. Collern, *Methods in Biotechnology: 2 Bioremediation protocols*, (Ed.: D. Sheehan). Humana Press Inc., Totowa, NJ (2003).
- 24) E. Guillen-Jimenez, P. Alvarez-Mateos, F. Romero-Guzman, J. Pereda-Martin, Biomineralization of organic matter in dairy wastewater, as Affected by pH. The evolution of ammonium and phosphates, *Wat. Res.*, 34 (2000) 1215-1224.
- 25) De Bashan, L. E., Magallon, P., Antoun, H., Bashan, Y. 2008b. Role of glutamate ehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 44: 1188-1196.
- 26) Grady, C. P. L. Jr, Kirsh, E. J., Koczwara M. K., Trogovcich, B., Watts R. D. 1994. Molecular weight distributions in active sludge effluents. *Water Research* 18: 239-245.
- 27) Fogg, G.E. and Thake, B. (1987) *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*, The University of Wisconsin Press.

- 28) G. L. Gaikwad, S. R. Wate, D. S. Ramteke and K. Roychoudhury, Development of microbial consortia for the effective treatment of complex wastewater, *J. Bioremed. Biodeg.* 5(2014) 4.
- 29) G. R. Munavalli, P. S. Saler, Treatment of dairy wastewater by water hyacinth, *Water Sci. Technol.* 59 (2009) 713-722.
- 30) G. Wildbrett, Bewertung von reinigungs-und desinfektionsmitteln imabwasser, *Dtsch. Milchwirtschaft*, 39 (1998) 616-620.
- 31) González B., E. Buitargo y K. Frontado. (1999). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura.
- 32) H.J. Porwal, A.V. Mane, S.G. Velhal 2014. Biodegradation of dairy effluent by using microbial Isolates obtained from activated sludge. *Water Resources and Industry*.
- 33) Hosetti, B. B. & Patil H. S. 1992. Enzyme activity: An index of effluent quality of oxidation ponds. *Bioresource Technology* 39:215-220.
- 34) Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A., 2008. Micro algal triacylglycerols as feedstock for bio fuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54, 621–639
- 35) I. D. Schneider, Y. I. Topalova, Effect of bioaugmentation on anaerobic wastewater treatment in the dairy industry. *J. Dairy Sci.* 94 (2011) 4389-4397.
- 36) J. P. Kushwaha, V. C. Srivastava, I. D. Mall, An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 51 (2011) 442-452.
- 37) K. Ashok, A. K. Srivastava, S. Renu, Physico-chemical and biological characteristics of a sugar factory effluent. *Indian Journal of Ecology*, 15 (1988) 192-193.

- 38) Kanno, Toshihiro. Uyama, Kazie. (2005). *Chlorella vulgaris: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier*. Publicado por Woodland Publishing. 63 páginas.
- 39) Khan Achakzai A.K., Ali Kayani S., Yaqoob M. and Nabi Abdul. 2003. Effect of Fertilizer and Inoculation on Lipase and Urease Activity of Mature Soybean cv. Williams-82 Seeds. *Asian Journal of Plant Sciencies* 2 (9): 692-695.
- 40) Konishi, F. et al., Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* sp against myelo-suppression by 5-fluorouracil cancer immunol immunolother, 46:268-274. 1996.
- 41) Kothari, R., Prasad, R., Kumar, V., Singh, D.P., 2013. Production of biodiesel from micro algae *Chlamydomonas polypyrenoideum* grown on dairy industrial effluent. *Bioresour. Technol.* 144, 499–503.
- 42) L. Uma, G. Subramanian, Effective use of cyanobacteria in effluents treatment, *Proc. Natl. Symp on Cyanobacteria in nitrogen fixation*. IARI, New Delhi. (1983) 437-443.
- 43) Lau P., Tam N. y Wong Y. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution* 89, 59-66.
- 44) Lee R. E. (1995) *Phycology*. Cambridge, University Press, USA.
- 45) Lee, Y.-K. and Shen, H. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology* Richmond, A. (ed), pp. 40-56, Blackwell Publishing Ltd.
- 46) M. Ahmedna, W. F. Marshall, A. A. Husseiny, R. M. Rao, I. Goktepe, The use of nutshell carbons in drinking water filters for removal of trace metals, *Water Res.* 38 (2004) 1064-1068.
- 47) M. G. Healy, R. O. Bustos, S. E. Solomon, C. Devine, A. Healy, *Biotreatment of marine crustacean and chicken egg shell waste*, *Environmental biotechnology: Principles and applications*, Kluwer, Academic Publishers, Netherlands, (1995)302-319.

- 48) M. Meul, F. Nevens, D. Reheul, Validating sustainability indicators: Focus on ecological aspects of Flemish dairy farms, *Ecological Indicators*. 9 (2009) 284-295.
- 49) M. Passeggi, I. Lopez, L. Borzacconi, Integrated anaerobic treatment of dairy industrial wastewater and sludge, *Water Sci. Technol.* 59 (2009) 501-506.
- 50) M. Vida, S. Akbar, G. Zahra, Biodegradation of effluents from dairy plant by bacterial isolates, *Iran. J. Chem. Eng.* 26 (2007) 55-59.
- 51) Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. (2002). *Cianobacterias. Biología de los Microorganismos*. Pearson, Prentice Hall. Madrid –España pp 418-423.
- 52) Mara, D. (2004) *Domestic wastewater treatment in developing countries* Earthscan London.
- 53) Mara, D. (2009) *Waste stabilization ponds: Past, present and future. Desalination and Water Treatment*,4, 85-88.
- 54) Metcalf and Eddy (1995) *Ingeniería de Aguas Residuales: Tratamiento, vertido y reutilización*, McGraw-Hill, Madrid
- 55) Montes J.,y Pulido M. Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. *Astrolabio* vol.11.2 art. 04. 2012. Colombia
- 56) Morales E. 1996. *Productos agrícolas para el cultivo de microalgas marinas*. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.
- 57) Ojo O. A. Petroleum hydrocarbon utilization by native bacterial population from a wastewater canal southwest Nigeria, *Afr. J. Biotechnol.*5 (2006) 333-337.
- 58) P. Alvarez-Manteos, J. Pereda-Marin, F. CartaEscobar, M. M. Duran-Barrantes and E. Guillen Jimenez, Influence of inoculum and pH on dairy effluent biodegradation and mineralization, *Chem. Biochem. Eng.* 14 (2000) 101-106.

- 59) P. Becker, D. Koster, M. N. Popov, S. Markossian, G. Antranikian, H. Markl, The biodegradation of olive oil and treatment of lipid-rich wool wastewater under aerobic thermophilic condition, *Water Res.* 33 (1999) 653-660.
- 60) P. K. Chhonkar, S. P. Datta, H.C. Joshi, H. Pathak, Impact of industrial effluents on soil health and agriculture Indian experience: Part-II-Tannery and textile industrial effluents, *J. Sci. Ind. Res.* 59 (2000) 446-454.
- 61) P. T. Kelly, H. Zhen, Understanding the application niche of microbial fuel cells in a cheese wastewater treatment process, *Bioresource Technol.* 157 (2014) 154-160.
- 62) Park, J.B.K., Craggs, R.J. and Shilton, A.N. (2010) Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* (102), 35-42.
- 63) Piedrola, G. (2000) *Medicina Preventiva y Salud Pública*, Masson S.A.
- 64) R. Hesnawi, K. Dahmani, A. Al-Swayah, S. Mohamed, S. A. Mohammed, Biodegradation of municipal wastewater with local and commercial bacteria, 12th International conference on computing and control for the water industry, CCWI2013, *Procedia Engineering* 70 (2014) 810-814.
- 65) Rengel, A. (2000) *Agua para Consumo Humano: Tratamiento de Aguas Residuales* Cuenca.
- 66) Richmond, A. (2004) *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*, Blackwell Science Ltd.
- 67) Rodríguez Puerta Sandra Milena,(2010). Evaluación de microalgas y de bacterias asociadas productoras de exoenzimas para tratamiento de aguas residuales de una extractora de aceite de palma, Trabajo de Grado para optar el grado de *Magister Scientiarum* en Microbiología, República bolivariana de Venezuela Universidad del Zulia, Facultad experimental de ciencias.
- 68) Romo Piñera, A.K. (2002) *Manual para el cultivo de microalgas*, Universidad Autónoma de Baja California Sur.

- 69) Ruiz Martínez, A. (2011) Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Master, Universidad Politécnica de Valencia Valencia.
- 70) S. Chatterjee and P. Pugaht, Assessment of physico-chemical parameters of dairy wastewater and isolation and characterization of bacterial strains in terms of COD reduction, *International Journal of Science, Environment and Technology*, 2 (2013) 395-400.
- 71) S. Cosa, A. Okoh, Biofloculant production by a consortium of two bacterial species and its potential application in industrial wastewater and river water treatment. *Pol. J. Environ. Stud.*, 23 (2014) 689-696.
- 72) S. Das and S. C. Santra, Simultaneous biomass production and mixed-origin wastewater treatment by five environmental isolates of Cyanobacteria *biologija*, 56 (2010) 9-13.
- 73) S. G. Ganapathy, R. Baskaran, P.M. Mohan, Microbial diversity and bioremediation of distilleries effluent, *Journal of Research in Biology*. 3 (2011)153-162.
- 74) S. P. Bako, D. Chukwunonso, A. K. Adamu, Bioremediation of effluents by microbial strains, *App. Ecol. Env. Res.*, 6 (2008) 49-50.
- 75) S. Shruthi, M.P. Raghavendra, H.S. Swarna Smitha and K. Girish, Bioremediation of rubber processing industry effluent by *Pseudomonas* sp. *International Journal of Research in Environmental Science and Technology*. 2 (2012) 27-30.
- 76) Safonova E., Kvitko K.V., Iankevitch M.I., Surgko L.F., Afti I.A. and Reisser W. 2004. Biotreatment of industrial wastewater by selected Algal-Bacterial Consortia. *Eng. Life.Sci.* 4, No. 4. Pág. 347-353.
- 77) Salazar González Margarita. 2005. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Laboratorio de

Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales. Departamento de Biotecnología. Contactos 59, 64-70.

- 78) Serrano B., et al. Efecto del hierro en el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga colombiana *Chlorella Vulgaris* LAUN 0019. ITECKNE Vol. 8 Número 1 • ISSN 1692 - 1798 • Colombia Julio 2011 • 15 – 22.
- 79) Shilton, A. (2005) *Pond Treatment Technology*, IWA Publishing, London.
- 80) Singh Rajni, Gupta Namita and Goswani Vineet Kumar. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl. Microbiol Biotechnol* 70:679 682.
- 81) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005* 19th ed. 1995 Pp 5-34.
- 82) Ummalyma Sabeela Beevi, Rajeev K. Sukumaran Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load *Bioresource Technology* (2014)
- 83) V. B. Braio, C. R. G. Taveres, Effluent generation by the dairy industry: preventive attitude and opportunities, *Braz. J. Chem. Eng.* 24(2007) 487-497.
- 84) Valbuena, D., Díaz-Suárez, O., Botero-Ledesma, L. and Cheng-Ng, R. (2002) detección de helmintos intestinales y bacterias indicadoras de contaminación en aguas residuales, tratadas y no tratadas. *Interciencia*, 710-714.
- 85) von Sperling, M. (2007b) *Biological Wastewater Treatment Series: Wastewater Characteristics, Treatment and Disposal*, IWA Publishing, Londres.
- 86) W. Janczukowicz, M. Zielinski, M. Debowski, Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production, *Bioresource Technol.* 2007.

- 87) Xu, H., Miao, X., Wu, Q.Y., 2006. High quality biodiesel production from a micro alga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126, 499–507
- 88) Yáñez, F. (1993) *Lagunas de Estabilización: Teoría, Evaluación y Mantenimiento*, Monsalve, Cuenca.



ANEXOS



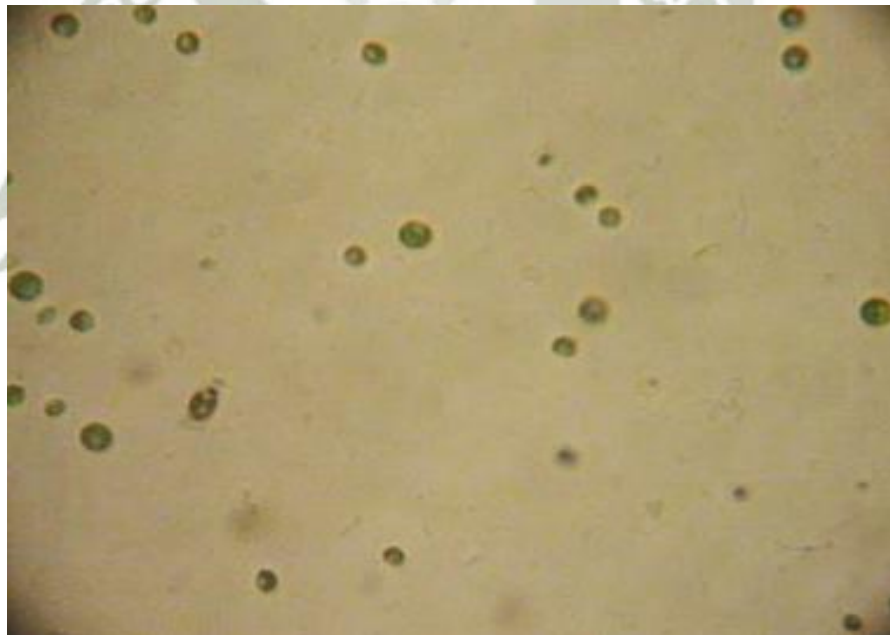
ANEXO 1
PANEL FOTOGRAFICO



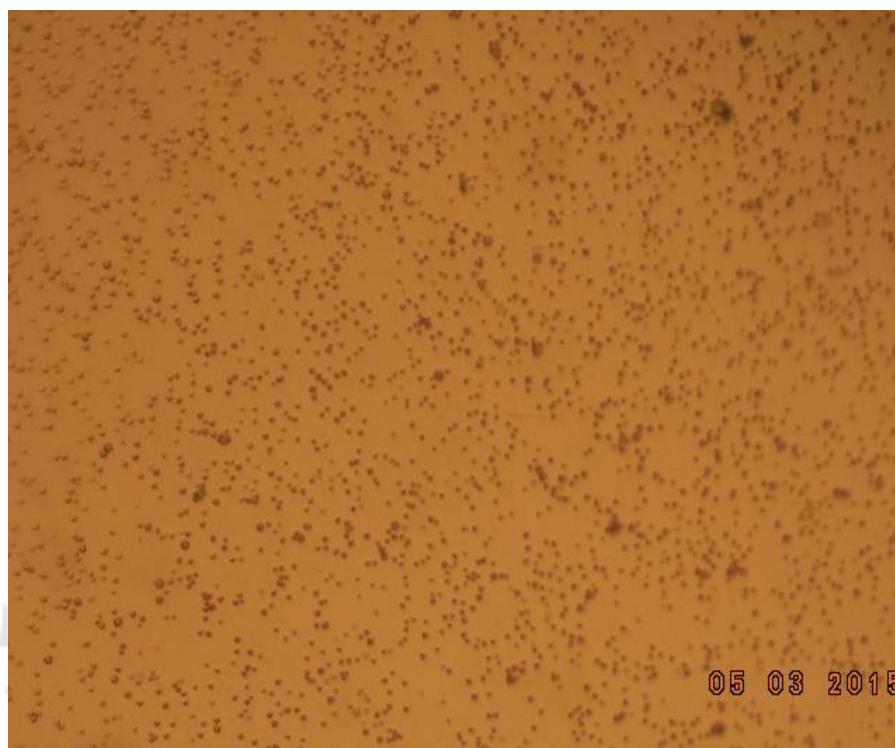
Inoculo de *Chlorella vulgaris* para su propagación



2L de inoculo de *Chlorella vulgaris* antes de su transferencia a fotobioreactor en panel.



Vista de *Chlorella vulgaris* en fase de crecimiento lineal en fotobioreactor.



Vista de *Chlorella vulgaris* en fase de crecimiento, empacada en el sistema de flujo continuo para la depuración de aceites y grasas.



Registro del pH en el sedimentador



Evaluación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* mediante recuento en cámara de Newbauer antes del inicio del tratamiento.



Registro del crecimiento de *Chlorella vulgaris* mediante recuento en cámara de Newbauer después del tratamiento con el efluente.



Muestra del efluente con la microalga antes del análisis fisicoquímico



ANEXO 2
ANÁLISIS DE LABORATORIO

TIEMPO DE EVALUACION	FISICOQUIMICOS INICIAL							
	TURBIDEZ (FTU)	NO ₃ - (mg/L)	SD (mg/L)	SST (mg/L)	SO ₄ = (mg/L)	DQO (mg/L)	DBO (mg/L)	ACEITES Y GRASAS (mg/L)
Efluente	>461	5.28	10058	4168	36	7001.67	3184.00	2634
7 días de eval.	>461	5.44	5895	2349	183	3628.84	1698.70	404
14 días de eval.	>461	5.52	3813.5	1439.5	256.5	1942.42	956.05	261
21 días de eval.	>461	5.6	1732	530	330	256.00	213.40	135

**CONCENTRACION DE GRASAS Y ACEITES SEGÚN TIEMPOS DE EVALUACION
PARA LOS MESES DE ENERO-FEBRERO-MARZO**

REPETICION	CONC. GRASAS Y ACEITES (mg/ L)			
	EFLUENTE	7 DIAS	14 DIAS	21 DIAS
1 ra	2628	399	267	133
2 da	2632	410	258	131
3 ra	2642	403	258	141



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-15-01182

Pág: 1/2

Hoja de datos

Señores: Angie Ortiz Aguilar
Dirección: Las Begonias 103 Bellapampa Socabaya Arequipa
Atención: Angie Ortiz Aguilar
Proyecto: Tesis
Nro de muestras: 1
Toma de muestra realizado por: Cliente: Angie Ortiz Aguilar
Registro de muestreo: 033-15
Fecha de recepción: 04/03/2015
Fecha de ensayo: 04/03/2015
Fecha de emisión: 05/03/2015
Condiciones de recepción de la muestra: Muestra debidamente conservada
Observaciones: Datos proporcionados por el cliente

Método de ensayo aplicado

*848 Ensayo de Sulfatos en agua SMEWW. 22 th Ed. 4500-SO4-2 Part. E. Turbidimetric Method.
*839 ASTM D 3857 - 09 Método de ensayo estándar para nitrato en agua
*845 Sólidos Disueltos en agua por gravimetría: SMEWW. 22 st Ed. Part-2540 C. Total Dissolved Solids Dried at 180 °C
*846 Determinación de Sólidos Suspendedos en aguas SMEWW. 22th Ed. Item 2540-Solids D. Total Suspended Solids Dried at 103 - 105 °C
*848 Ensayo de Sulfatos en agua SMEWW. 22 th Ed. 4500-SO4-2 Part. E. Turbidimetric Method.

Cod Int. #	Nombre de muestra	Matriz de la muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de inicio de muestreo	Hora de inicio de muestreo
AG15000074	Agua Residual Industrial Chocolatera	Agua Residual - Agua Residual Industrial	Parque Industrial / Arequipa	No proporcionado por el cliente	24/02/15	03:00 p.m


Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Sixto Vicente Juárez Neira
Gerente General
Ing. Químico CIP 19474

"<Valor numérico" = Límite de detección del método. "Valor Numérico" = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los 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. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.
Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.

Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano

ANEXO II

LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE PARÁMETROS DE
CALIDAD ORGANOLÉPTICA

Parámetros	Unidad de medida	Límite máximo permisible
1. Olor	---	Aceptable
2. Sabor	---	Aceptable
3. Color	UCV escala Pt/Co	15
4. Turbiedad	UNT	5
5. pH	Valor de pH	6,5 a 8,5
6. Conductividad (25°C)	$\mu\text{mho/cm}$	1 500
7. Sólidos totales disueltos	mg L^{-1}	1 000
8. Cloruros	$\text{mg Cl}^{-1} \text{ L}^{-1}$	250
9. Sulfatos	$\text{mg SO}_4^{2-} \text{ L}^{-1}$	250
10. Dureza total	$\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$	500
11. Amoníaco	mg N L^{-1}	1,5
12. Hierro	mg Fe L^{-1}	0,3
13. Manganeso	mg Mn L^{-1}	0,4
14. Aluminio	mg Al L^{-1}	0,2
15. Cobre	mg Cu L^{-1}	2,0
16. Zinc	mg Zn L^{-1}	3,0
17. Sodio	mg Na L^{-1}	200

UCV = Unidad de color verdadero
UNT = Unidad nefelométrica de turbiedad



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 2^a + 51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe ☎ http://www.ucsm.edu.pe ☎ Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA03C15.001576A

Nombre del Cliente : ANGIE ORTIZ AGUILAR
Dirección del Cliente : LAS BEGONIAS 103 BELLAPAMPA SOCABAYA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : AGUA RESIDUAL (1º EVALUACION)
Tamaño de muestra : 250 mL
Fecha de Recepción : 03/03/2015
Fecha de Inicio del Ensayo : 03/03/2015
Fecha de Emisión de Informe : 09/03/2015
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO - QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE ACEITES Y GRASAS (mg/L) Método 5520e Soxhlet Extraction Method Standars Methods For The Examination Of Water And Waste Water Usa Apha Wdc 2005 19th Ed 1995 Pp 5-34	404,0

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-15-01182

Hoja de resultados

05/03/2015

Pág.: 2/2

Código Interno #	Nombre de Muestra	*811 Turbidez FTU	*839 NO3- mg/L	*845 SD mg/L	*846 SST mg/L	*848 SO4= mg/L
AG15000074	Agua Residual Industrial Chocolatera	*461	5,6	1732	530	330


Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Sixto Vicente Juárez Nelra
Gerente General
Ing. Químico CIP 19474

*<Valor numérico> = Límite de detección del método, **<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.
Los resultados de los 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. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.
Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-15-00246

Pág: 1/2

Hoja de datos

Señores: Angie Ortiz Aguilár
Dirección: Las Begonias 103 Bellapampa Socabaya Arequipa
Atención: Angie Ortiz Aguilár
Proyecto: Tesis
Nro de muestras: 1
Toma de muestra realizado por: Cliente: Angie Ortiz Aguilár
Registro de muestreo: 007-15
Fecha de recepción: 13/01/2015
Fecha de ensayo: 13/01/2015
Fecha de emisión: 15/01/2015
Condiciones de recepción de la muestra: Muestra debidamente conservada a 10 C
Observaciones: Datos proporcionados por el cliente

Método de ensayo aplicado

- *211 Método de ensayo para la determinación de Turbidez en agua
- *339 ASTM D 3867 - 09 Método de ensayo estándar para nitrato en agua
- *845 Sólidos Disueltos en agua por gravimetría: SMEWW. 22th Ed. Part. 2540 C. Total Dissolved Solids Dried at 180 °C
- *846 Determinación de Sólidos Suspensos en aguas SMEWW. 22th Ed. Item 2540-Solids D. Total Suspended Solids Dried at 103 – 105 °C
- *848 Ensayo de Sulfatos en agua SMEWW. 22th Ed. 4500-SO4-2 Part. E. Turbidimetric Method.


Cod Int. #	Nombre de muestra	Matriz de la muestra	Lugar de muestreo	Punto de muestreo y/o coordenadas Coordenadas UTM Este / Norte	Fecha de inicio de muestreo	Hora de Inicio de muestreo
AG15000015	Agua Residual Industrial Chocolatera	Agua Residual - Agua Residual Industrial	Parque Industrial / Arequipa	No proporcionado por el cliente	10/01/15	10:00 a.m.



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Sixto Vicente Juárez Neira
Gerente General
log. Químico C/P-10474


*<Valor numérico> = Límite de detección del método, *<Valor Numérico> = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los 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. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.
Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
 AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA15A15.001536

Nombre del Cliente	: ANGIE ORTIZ AGUILAR
Dirección del Cliente	: LAS BEGONIAS 103 BELLAPAMPA SOCABAYA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: AGUA RESIDUAL
Tamaño de muestra	: 1000 mL
Fecha de Recepción	: 15/01/2015
Fecha de Inicio del Ensayo	: 15/01/2015
Fecha de Emisión de Informe	: 22/01/2015
Página	: 1 de 1


I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:


ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO mg/L) NMX-AA-030-SCFI-2001	7 001,67
DETERMINACION DE ACEITES Y GRASAS (mg/L) Metodo 5520e Soxhlet Extraction Method Standars Methods For The Examination Of Water And Waste Water Usa Apha Wdc 2005 19th Ed 1995 Pp 5-34	2 634,00

II. ANALISIS MICROBIOLÓGICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES (DBO5 ppm) Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA NMX-AA-028-SCFI-2001	3184,00

OBSERVACIONES:
 Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA


 Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
 Q.FDA 00624
 JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacocho CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe @ http://www.ucsm.edu.pe 📍 D. Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA03C15.001576B


Nombre del Cliente	: ANGIE ORTIZ AGUILAR
Dirección del Cliente	: LAS BEGONIAS 103 BELLAPAMPA SOCABAYA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: AGUA RESIDUAL (2º EVALUACION)
Tamaño de muestra	: 250 mL
Fecha de Recepción	: 03/03/2015
Fecha de Inicio del Ensayo	: 03/03/2015
Fecha de Emisión de Informe	: 09/03/2015
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO - QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACION DE ACEITES Y GRASAS (mg/L) Método 5520e Soxhlet Extraction Method Standars Methods For The Examination Of Water And Waste Water Usa Apha Wdc 2005 19th Ed 1995 Pp 5-34	261,0

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA.


Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



Laboratorios Analíticos del Sur

Parque Industrial Río Seco C-1 Cerro Colorado
Arequipa Perú / Apartado 2102

Telf: (054) 443294 Fax: (054) 444582

www.laboratoriosanaliticosdelsur.com

INFORME DE ENSAYO LAS-15-00246

Hoja de resultados

15/01/2015

Pág.: 2/2

Código Interno #	Nombre de Muestra	*811 Turbidez FTU	*839 NO3- mg/L	*845 SD mg/L	*846 SST mg/L	*848 SO4= mg/L
AG15000015	Agua Residual Industrial Chocolatera	*>461	5,28	10058	4168	36



Laboratorios Analíticos del Sur E.I.R.L.
Sixto Vicente Juárez Nelra
-Gerente General
Ing. Químico CIP 15474

><Valor numérico = Límite de detección del método, *><Valor Numérico* = Límite de cuantificación del método.

Los resultados de los 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. Los resultados presentados solo están relacionados a la muestra ensayada.
Está terminantemente prohibida la reproducción parcial o total de este documento sin la autorización escrita de LAS. Cualquier enmienda o corrección en el contenido del presente documento lo anula.



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD



Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe ☎ http://www.ucsm.edu.pe 📍 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA03C15.001576C

Nombre del Cliente : ANGIE ORTIZ AGUILAR
Dirección del Cliente : LAS BEGONIAS 103 BELLAPAMPA SOCABAYA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreo : POR EL CLIENTE
Descripción : AGUA RESIDUAL (3° EVALUACION)
Tamaño de muestra : 250 mL
Fecha de Recepción : 03/03/2015
Fecha de Inicio del Ensayo : 03/03/2015
Fecha de Emisión de Informe : 09/03/2015
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO - QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS (mg/L) Método 5520e Soxhlet Extraction Method Standars Methods For The Examination Of Water And Waste Water Usa Apha Wdc 2005 19th Ed 1995 Pp 5-34	135,0
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA QUIMICA DE OXIGENO (DQO mg/L) NMX-AA-030-SCFI-2001	256,0

II. ANALISIS MICROBIOLÓGICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE LA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO EN AGUAS NATURALES, RESIDUALES (DBO5 ppm) Y RESIDUALES TRATADAS - MÉTODO DE PRUEBA NMX-AA-028-SCFI-2001	213,4

OBSERVACIONES:

Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
C.Q.FDA 00624
JEFE DE LABORATORIO LECC



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
AREQUIPA - PERU



ESCUELA PROFESIONAL Y
ACADEMICA DE BIOLOGIA
TELF.: 284372
DEPARTAMENTO
ACADÉMICO DE BIOLOGÍA



ESCUELA PROFESIONAL Y
ACADEMICA CS. DE
LA NUTRICION
TELF.: 227264
DEPARTAMENTO ACADÉMICO
DE CS. DE LA NUTRICIÓN



ESCUELA PROFESIONAL Y
ACADEMICA ING. PESQUERA
TELF.: 222542
DEPARTAMENTO ACADÉMICO
DE INGENIERÍA PESQUERA
TELF.: 285930

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA N° 031-2015-HUSA

El Director del Herbarium Arequipense (HUSA) de la Universidad Nacional
de San Agustín de Arequipa.

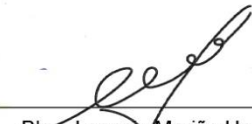
HACE CONSTAR:

Que las muestras depositadas en el laboratorio de
Biología Acuática para su determinación taxonómica
corresponde a la especie:

***Chlorella vulgaris* (M.W. Beyerinck, 1890)**

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines
que se estimen convenientes.

Arequipa 5 febrero del 2015.


Blgo. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR.
Herbarium Arequipense (HUSA)



ANEXO 3 RECuentos y Evaluaciones

Registro de parámetros del cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes tratados en sistema de flujo continuo.

Monitoreo de parámetros			
TIEMPO DE EVALUACIÓN (días)	pH	Temperatura (C)	Recuento (Cel/ml)
Día 0 (inoculo)	7.6	25	3125000
Día 1	8.4	24	
Día 4	7.9	25	
Día 6	8.2	25	
Día 7	8.2	24	2100000
Día 10	8.4	25	
Día 12	8.3	25	
Día 14	8.8	24	3300000
Día 17	8.7	23	
Día 20	9.2	23	
Día 21	9.2	25	4362500
Día 23	8.9	24	
Día 27	9.0	25	
Día 28	9.2	25	5425000