



Universidad Científica del Perú - UCP

*Registrado en el Asiento N° A00010 de la Partida N° 11000318, Personas Jurídicas de Iquitos,
Superintendencia de los Registros Públicos - SUNARP*

**FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
PROGRAMA ACADÉMICO DE ECOLOGÍA**

TESIS

**“USO DE TRES ESPECIES DE MICROALGAS EN LA REMOCIÓN
DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES PRESENTES EN
LIXIVIADOS”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
ECOLOGÍA**

AUTOR : DIEGO A. FLORES GÁTICA

ASESORA : MARIANELA COBOS RUIZ

SAN JUAN BAUTISTA – MAYNAS – LORETO - 2019

DEDICATORIA

AL CREADOR

*Sea cual fuese su origen y los distintos modos en que obra y manifiesta, le
agradezco por mi mera existencia*

AGRADECIMIENTO

Al Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú, lugar en el cual aprendí mucho y que me permitió descubrir una de mis pasiones, en el que me desempeñare para seguir realizándome profesionalmente.

Al personal del Relleno Sanitario Manual de Nauta, por permitirme la toma de muestra de lixiviado.

A mi asesora, la Dra. Marianela Cobos, por brindarme su apoyo, valiosa asesoría, consejos, paciencia, sugerencias y enseñanzas. Al Dr. Juan Carlos también por su asesoría y a todos mis amigos que de alguna manera me ayudaron, y a la universidad, por ser la casa de estudios que me permitió desenvolverme plenamente como profesional.

El autor



FACULTAD
CIENCIAS E
INGENIERÍA

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA
PROGRAMA ACADÉMICO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Con Resolución Decanal N°198-2016-UCP-FCEI del 27 de junio de 2016, la FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP designa como Jurado Evaluador y Dictaminador de la Sustentación de Tesis a los Señores:

- Dr. Álvaro Tresierra Ayala Presidente
- Blgo. Javier Del Águila Chavez, M.Sc. Miembro
- Dra. Marjorie Donayre Ramírez Miembro

En la ciudad de Iquitos, siendo las 10:00 horas del día lunes 17 de junio de 2019, en las instalaciones de la UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ - UCP, se constituyó el Jurado para escuchar la sustentación y defensa de la Tesis: "Uso de tres especies de microalgas en la remoción de coliformes totales y fecales presentes en lixiviado"

Presentada por el sustentante:

DIEGO ANDRÉ FLORES GATICA

Asesor (es): Dra. Marianela Cobos Ruiz

Como requisito para optar al título profesional de: **Licenciado en Ecología**

Luego de escuchar la Sustentación y formuladas las preguntas las que fueron: *absueltas*

El jurado después de la deliberación en privado llegó a la siguiente conclusión:

La Sustentación es: *Aprobada*

En fe de lo cual los miembros del jurado firman el acta.

Presidente

Miembro

Miembro

CALIFICACIÓN:	Aprobado (a) Suma Cum Laude	18 - 20
	Aprobado (a) Magna Cum Laude	17 - 18
	Aprobado (a) Cum Laude	15 - 16
	Aprobado (a)	13 - 14
	Desaprobado (a)	00 - 12

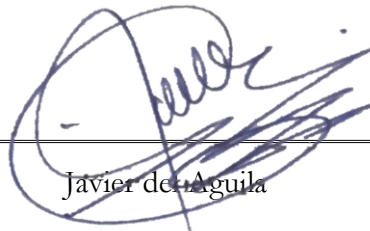
APROBACIÓN

Tesis sustentada en acto público el día 10 de junio las 10:00 horas de 2019



Alvaro Tresierra Ayala

PRESIDENTE



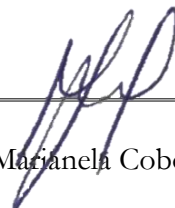
Javier de la Aguila

MIEMBRO



Marjorie Donayre

MIEMBRO



Dra. Marianela Cobos Ruiz

ASESOR

ÍNDICE

	Pág.
➤ PORTADA (CARÁTULA)	1
➤ DEDICATORIA	2
➤ AGRADECIMIENTO	3
➤ ACTA DE SUSTENTACIÓN	4
➤ APROBACIÓN	5
➤ ÍNDICE DE CONTENIDOS	6
➤ ÍNDICE DE TABLAS	8
➤ ÍNDICE DE FIGURAS	9
➤ RESÚMEN. PALABRAS CLAVE	10
➤ ABSTRACT	11
CAPÍTULO I: INTRODUCCION	12
CAPÍTULO II: MATERIALES Y METODOS	15
2.1. Lugar y desarrollo de la investigación	15
2.2. Recursos utilizados	15
2.2.1. Materiales	15
2.2.2. Equipos	16
2.2.3. Reactivos	16
2.2.4. Programas	17
3.1. Tipo y Diseño de investigación	17
3.2. Población y Muestra	17
3.2.1. Población	17
3.2.2. Muestra	17
3.3. Técnicas, Instrumentos y Procedimientos de Recolección de Datos	18
2.3.1. Técnicas de Recolección de Datos.	18
3.3.2. Instrumentos de Recolección de Datos.	18

3.3.3. Procedimiento experimental	18
3.3.3.1 Cultivo y cosecha microalgal.	18
3.3.3.2 Evaluación de los ensayos de remoción de <i>coliformes</i> en lixiviado.	19
3.3.3.3 Cosecha de la biomasa microalgal.	20
3.3.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.	20
3.4 Procesamiento de los datos.	21
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSION	22
3.1. Resultados.	22
3.2. Discusión.	31
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	35
4.1. Conclusiones.	35
4.2. Recomendaciones.	36
CAPÍTULO V: REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.	37
CAPÍTULO VI: ANEXOS	39

ÍNDICE DE TABLAS

N°	TÍTULO	Pág.
0.1	Porcentaje de remoción de <i>coliformes totales</i> y <i>fecales</i> en lixiviado al 50% diluido.	23
0.2	Porcentaje de remoción de <i>coliformes totales</i> y <i>fecales</i> en lixiviado al 100% concentrado.	23
0.3	Promedio de la producción de biomasa microalgal.	28
0.4	Producción de lípidos totales en las microalgas evaluadas.	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	TÍTULO	Pág.
0.1	Remoción de Bacterias expresadas en NMP (Numero más probable) en el Día 0 y 15 con respecto al T1 de las tres especies de microalgas.	24
0.2	Remoción de Bacterias en NMP (número más probable) en el Día 0 y 15 con respecto al T2 de las tres especies de microalgas.	25
0.3	Perfil de crecimiento de la microalga <i>Ankistrodesmus nannosele</i> (A), <i>Chlorella sp</i> (B), <i>Scenedesmus quadricauda</i> (C).	27
0.4	Producción de lípidos totales de la microalga <i>Ankistrodesmus nannosele</i> , <i>Chlorella sp</i> , <i>Scenedesmus quadricauda</i> .	29
0.5	Procedimiento experimental.	39

RESÚMEN

La remoción de contaminantes en sistemas biológicos es posible mediante la aplicación del cultivo de microalgas, ya que éstas presentan diversas adaptaciones y ciertos mecanismos de tolerancia. Las microalgas son capaces de remover microorganismos patógenos, metales pesados, y compuestos orgánicos tóxicos mediante procesos aún en vías de estudio. El objetivo fue evaluar la remoción de contaminantes biológicos en lixiviado empleando las microalgas *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda* y *Ankistrodesmus nannosele*. Estas microalgas se cultivaron en medio CHU10 por tres semanas. Luego fueron expuestas a dos concentraciones de lixiviado (1v/1v y 1v/2v) por triplicado. Se evaluó el porcentaje de remoción de *coliformes totales* y *fecales* entre el día 0 y el día 15. Se realizó la extracción de lípidos totales con cloroformo: metanol (2:1). Los resultados indican que *Ankistrodesmus nannosele* mostró un mayor crecimiento a los 14 días con una densidad óptica de 0.391. *Scenedesmus quadricauda* fue la microalga que reportó mayor producción de biomasa en los dos tratamientos (0.4 ± 0.06). *Ankistrodesmus nannosele* presentó el mayor porcentaje de lípidos totales (40%). Respecto al porcentaje de remoción; *Ankistrodesmus nannosele* mostró un mayor porcentaje de remoción de *coliformes fecales* con (99.2% con T2; y 99.9% con T1). En conclusión, el tiempo de exposición al lixiviado solo indujo a la producción significativa de biomasa microalgal y acumulación lipídica en *Ankistrodesmus nannosele*. Se evidenció remoción en todos los tratamientos.

Palabras clave: Remoción, lixiviado, microalgas, coliformes

ABSTRACT

The removal of contaminants in biological systems is possible through the application of microalgae culture, since these present diverse adaptations and certain tolerance mechanisms. Microalgae are capable of removing pathogenic microorganisms, heavy metals, and toxic organic compounds through processes still under study. The objective was to evaluate the removal of biological contaminants in leachate using *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda* and *Ankistrodesmus nannosele* microalgae. These microalgae were grown in CHU10 medium for three weeks. They were then exposed to two concentrations of leachate (1v/1v and 1v/2v) in triplicate. The percentage of *total* and *faecal coliform* removal between day 0 and day 15 was evaluated. Total lipid extraction was performed with chloroform: methanol (2:1). The results indicate that *Ankistrodesmus nannosele* showed a greater growth at 14 days with an optical density of 0.391. *Scenedesmus quadricauda* was the microalgae that reported the highest biomass production in the two treatments (0.4 ± 0.06). *Ankistrodesmus nannosele* had the highest percentage of total lipids (40%). Regarding the percentage of removal; *Ankistrodesmus nannosele* showed a higher percentage of *faecal coliform* removal with (92.2% with T2, and 99.2% with T1). In conclusion, the time of exposure to the leachate only induced the significant production of microalgal biomass and lipid accumulation in *Ankistrodesmus nannosele*. Removal was evident in all treatments.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el manejo de los residuos sólidos ha representado un problema, debido, entre otras cosas, a la continua y elevada emanación de residuos sólidos generados por los ciudadanos. Cuando el manejo de éstos no es el adecuado, puede afectar la salud de los ciudadanos y al medio ambiente. Siendo lo más característico de este escenario la producción de grandes volúmenes de lixiviados, más aun en climas tropicales, por el aumento de lluvias por periodos prolongados. Estos líquidos contaminados con sustancias muy tóxicas, brotan a la superficie o se infiltran hacia la napa freática por efecto de la gravedad desde el terreno donde hay instalado un relleno sanitario o un vertedero, alterando la composición tanto del suelo como de las aguas que se ven involucradas (1).

Entendiéndose que estos sitios permiten el desarrollo de organismos vectores, como moscas, mosquitos, ratas y cucarachas, que, además de alimento, encuentran en los residuos sólidos un ambiente favorable para su reproducción, lo que se convierte en un medio apto para la transmisión de patologías, desde simples diarreas hasta cuadros intensos de tifoidea de gravedad considerable (2).

Desde el enfoque ecológico, la lixiviación es el desplazamiento hacia los ríos y mares de los desechos y excrementos, además de otros contaminantes como pueden ser los fertilizantes; considerándose el fenómeno de desplazamiento de nutrientes arrastrados por el agua. Y este proceso tiene lugar cuando el agua de lluvia incide sobre el depósito de basura, extrae y arrastra una gran cantidad de sustancias constituyentes de los residuos sólidos. El extracto resultante tiene un alto contenido de materia orgánica, nitrógeno, fósforo y microorganismos patógenos (3).

Por lo que, los mayores efectos contaminantes generados por la basura en los vertederos están asociados con la contaminación edáfica (deterioro estético, desvalorización), atmosférica (malos olores, transporte de organismos) e hídrica (contaminación de aguas, eutrofización), siendo en este último donde los lixiviados toman mayor relevancia en relación a perjuicios en la salud pública (4).

Teniendo en cuenta que se puede propiciar la presencia continua de *coliformes totales* y *fecales* debido a la gran cantidad de nutrientes provenientes de residuos sólidos de constitución orgánica, como residuos vegetales, de construcción, cadáveres animales e incluso restos de heces humanas, así como por descargas continuas de materia fecal procedente de animales de sangre caliente que viven en estos lugares, mantienen numerosa la población bacteriana (4).

Manifestándose así una gran problemática en torno a las variadas infecciones oportunistas sobre la piel, tracto respiratorio e intestinal hacia las personas por manipulación y consumo de agua contaminada, para lo cual, siempre que haya ausencia o a lo mucho la cantidad máxima de *coliformes* establecida en las normativas de cada país para aguas de consumo, ya sea que provengan estas de fuentes subterráneas o superficiales, es sumamente importante desde el punto de vista sanitario (7).

En tal sentido, las microalgas debido a su gran potencial de remoción biológica reportada, representan una excelente alternativa de manejo y tratamiento a escala industrial para remediar en parte los daños ecológicos mencionados, antes de que estas sustancias lleguen a los cuerpos de aguas con la menor carga bacteriana posible y parámetros físicos-químicos

significativamente estabilizados (5). Por lo que en la presente tesis se plantearon los siguientes objetivos.

Objetivos

General.

- Evaluar el uso de tres especies de microalgas en la remoción de *coliformes totales* y *fecales* presentes en lixiviados.

Específicos.

- Determinar el porcentaje de remoción de *coliformes totales* y *fecales* en lixiviado usando tres especies de microalgas (*Chlorella* sp, *Scenedesmus quadricauda* y *Ankistrodesmus nannosele*)
- Evaluar el perfil de crecimiento, producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de tres especies de microalgas expuestas al lixiviado.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Lugar y desarrollo de la investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP), ubicada en la Av. José Abelardo Quiñones km 2,5, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, Departamento de Loreto.

La colecta de lixiviado se realizó al interior de las instalaciones del Relleno Sanitario Manual de Nauta, específicamente en el Pozo N° 2, estando ubicado en las coordenadas geográficas UTM N 0656319 E 9506970. Los análisis microbiológicos se desarrollaron en la planta piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.

2.2. Recursos utilizados

2.2.1. Materiales

- Placas Petri (15x 100 mm, Duran)
- Mandil y guantes de laboratorio
- Laminas portaobjetos y cubreobjetos
- Mascarilla
- Gorro
- Papel de aluminio
- Pipetas de 20 hasta 1000 μ l
- Probetas
- Tips de 100, 200 y 1000 μ l
- Alcohol (70 % y 96%)
- Microtubos
- Tubos de 15 ml.

2.2.2 equipos

- Autoclave (Yamato, SM 510)
- Balanza analítica Sartorius (Sartorius, ED 124S)
- Bombas de aireación
- Cabina de flujo laminar
- Cámara fotográfica
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c
- Centrifuga (Kert Lab, 0412-1)
- Computadoras
- Cocina eléctrica
- Agitador Vortex
- Microscopio óptico (Zeiss, Axio Lab.A1)

2.2.3 Reactivos

- Alcohol Isopropílico
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de Calcio dihidratado)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de magnesio heptahidratado)
- NaHCO_3 (Bicarbonato de sodio)
- K_2HPO_4 (Fosfato dipotásico)
- NaNO_3 (Nitrato de sodio)
- $\text{NaSiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Metasilicato de sodio)
- Solución de Citrato férrico ($\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Solución de micronutrientes
- $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Ácido Etilendiaminotetraacético, sal disódica dihidratado)
- H_3BO_3 (Ácido bórico)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Cobre (II) pentahidratado)
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Zinc heptahidratado)
- $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de calcio hexahidratado)
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Cloruro de manganeso tetrahidratado)
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Molibdato de sodio dihidratado)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Cloroformo
- Metanol

2.2.4 programas

- IBM SPSS Statistics 20 (ANOVA - HSD de Tukey)
- Excel de Microsoft Office

3.1. Tipo y Diseño de la investigación

El diseño de investigación fue de tipo experimental, que consistió en el cultivo de tres especies de microalgas, empleándose recipientes de 5L, iniciándose con 2L (Medio + Microalgas con medio), añadiéndose continuamente medio Chu 10, hasta llegar a los 5L esperados, todo esto al concluir la cuarta semana, luego se cosecharon cada una de las tres especies mediante centrifugación en tubos de 15 mL. Se utilizó 3 mL del total de la biomasa microalgal obtenida y se colocaron en matraces de 500 mL (por triplicado), que contenían dos concentraciones de lixiviado (T1: 50% de lixiviado diluido con 50% de medio de cultivo y T2: 100% de lixiviado concentrado). Se utilizaron dos grupos control (positivo: cultivo con microalgas y negativo: concentración de lixiviado). La evaluación se realizó por triplicado por un periodo de 15 días. Durante este período se evaluó el crecimiento microalgal con ayuda del espectrofotómetro. Posteriormente, se cosecharon las microalgas por centrifugación para obtener la biomasa y a partir de allí realizar la extracción de lípidos totales.

3.2. Población y muestra

3.2.1 Población

Estuvo constituida por todas las especies de microalgas presentes en la Amazonia peruana.

3.2.2. Muestra

La muestra fue representada por tres especies de microalgas (*Ankistrodesmus nannoselene*, *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella sp.*) que fueron proporcionadas por el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología y bioenergética de la Universidad Científica del Perú (UCP).

3.3 Técnicas, instrumentos y procedimientos de recolección de datos

2.3.1 Técnica de recolección de datos.

Los equipos, técnica y materiales que se utilizaron en el laboratorio, fueron de acuerdo a Cobos & Castro (6). Procediéndose a recopilar los datos de la siguiente manera:

Para la evaluación del crecimiento microalgal se realizó la medición de absorbancias utilizando el Espectrofotómetro NanoDrop 2000/2000c, registrándose estos datos diariamente en el cuaderno de registro y en el programa Excel. Además, se registró la información de los resultados del análisis de remoción de *coliformes* presentes en lixiviado con cada una de las especies microalgales y los controles negativos al 50% y 100%.

3.3.2 Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos para la recolección de datos que se utilizaron fueron los siguientes:

- a) Cuaderno de registro: Se usaron para el registro de la información obtenida de la tasa diaria de crecimiento microalgal, producción de biomasa, producción de lípidos y los cálculos porcentuales de remoción bacteriana.

- b) Los equipos que se utilizaron para obtener registros inmediatos de datos fueron, el Microscopio óptico compuesto y el espectrofotómetro NanoDrop.

3.3.3 Procedimiento experimental

3.3.3.1 Cultivo y cosecha microalgal

Se contó con cultivos de tres especies de microalgas en medio CHU. Se realizó en recipientes de 5L, añadiendo inicialmente un 1L de medio CHU y 1L de microalgas con medio, siendo estas inicialmente cultivadas en matraces. Las cepas fueron proporcionadas por el Banco de cepas de la UCP, y el volumen de cultivo incremento hasta alcanzar los 5L

planeados por la adición constante de medio, todo por un periodo de cuatro semanas. El cultivo fue agitado con aireación constante, a 26°C y un fotoperiodo de (12h:12h) luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E. m}^2. \text{S}^{-1}$. Todo lo mencionado por el periodo de 1 mes.

Una vez alcanzada la saturación, los 5L de cultivo fueron cosechados utilizando 12 tubos de 15 ml para centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante en vasos de precipitado de 1L e inmediatamente se realizó el mismo proceso en los mismos tubos y se centrifugó bajo las condiciones indicadas hasta agotar los 5L cultivo. Estos pasos se repitieron hasta obtener todo el precipitado microalgal, luego el inóculo fue transferido a matraces de 500 ml para la evaluación de capacidad de remoción. Los análisis microbiológicos inicial y final, se realizaron en las instalaciones de la Planta Piloto UNAP (Iquitos) utilizando el método microbiológico del NMP (número más probable).

3.3.3.2 Evaluación de los ensayos de remoción de *coliformes* en lixiviado

Para la evaluación de la capacidad de remoción de *coliformes totales* y *fecales* se usó 3ml de biomasa (inóculo) obtenida de la cosecha de cada especie de microalga, los cuales fueron distribuidas en matraces de 500 ml que contenían dos concentraciones de lixiviado (1:1 v/v – concentrado) y (1:2 v/v – diluido).

Se contaron con dos grupos experimentales (Grupo control: positivo y negativo / Grupo problema: T1 y T2). Estos ensayos se realizaron por triplicado y fueron sometidas a condiciones de aireación constante, 26 °C y un fotoperiodo de (12:12) luz/oscuridad con una intensidad lumínica de 100 $\mu\text{E. m}$. En esta fase se evaluó el perfil de crecimiento microalgal por 15 días con lecturas diarias utilizando el NanoDrop, con el cual se obtuvieron las absorbancias.

3.3.3.3 Cosecha de la biomasa microalgal.

Transcurrido los 15 días de evaluación se procedió a cosechar la biomasa microalgal mediante centrifugación. La biomasa obtenida se secó en la cocina eléctrica a 50 °C por 15 minutos. La producción de biomasa se midió por diferencia de peso de la placa Petri con biomasa fresca y con biomasa seca.

3.3.3.4. Extracción y análisis de lípidos totales.

La extracción de lípidos totales se realizó según Bligh & Dyer (8), que consistió en transferir la biomasa seca a morteros para su trituración con 8 mL de una mezcla de cloroformo: metanol (2:1). La solución obtenida se transfirió a microtubos de 2 mL. La solución se homogenizó en el agitador vortex por 30 segundos y se centrifugó a 10000 r.p.m. a 4°C por 5 min. El extracto clorofórmico (acuoso – lipídico) se transfirió a placas Petri de peso conocido. Los restos celulares y otros componentes fueron retenidos en la fase intermedia (entra fases acuosa y clorofórmica) y fueron tratados varias veces con la solución extractora de lípidos (cloroformo: metanol) después de su homogenización en el agitador Vortex y centrifugación. Todos los extractos con solventes orgánicos fueron transferidos a la misma placa Petri del tratamiento y número del mismo al que correspondía.

Los solventes orgánicos se evaporaron de las placas Petri, siendo estas cubiertas y dejadas a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se determinó el peso de las placas por diferencia de peso de la placa Petri con y sin los lípidos. Finalmente se determinó la cantidad de lípidos totales obtenidos con la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de lípidos (\%)} = \frac{P_L}{P_M} \times 100$$

Donde **PL** es el peso seco de los lípidos totales y **PM** es el peso seco de las microalgas.

3.4 Procesamiento de los datos

Los datos fueron procesados utilizando la estadística descriptiva e inferencial mediante el programa IBM SPSS Statistics 20, el cual nos permitió emplear el análisis de varianza (ANOVA), así como aplicar la prueba de HSD de Tukey, para determinar si existen o no diferencias estadísticas significativas entre la capacidad de remoción de coliformes totales y fecales, así como en el perfil de crecimiento microalgal, la producción de biomasa y la producción de lípidos totales.

Para calcular el promedio, desviación estándar y barras de error, se utilizó el programa Excel de Microsoft Office.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. RESULTADOS

3.1.1 Porcentaje de remoción de *coliformes totales* y *fecales* en lixiviado usando tres especies de microalgas (*Chlorella* sp, *Scenedesmus quadricauda* y *Ankistrodesmus nannoselene*)

En la tabla 01 y 02 se observa que la especie que mostró mayor índice de remoción en coliformes totales fue *Ankistrodesmus nannoselene*, con 67.4% en el tratamiento 1 (T1) y 100% en el tratamiento 2 (T2), respectivamente, a diferencia de *Chlorella* sp., que mostró 40.2% en el T1 y 86.7% en el T2. Por otro lado, resultados diferentes se obtuvieron en *Scenedesmus quadricauda* que mostró 41.4% en el T1 y 0% en el T2, respectivamente. Del mismo modo, en *coliformes fecales* el mayor porcentaje de remoción se evidenció en *Ankistrodesmus nannoselene* con 99.2 y 99.9% para el T1 y T2, seguido por *Chlorella* sp., y *Scenedesmus quadricauda* con 80.6% y 60.6% para el T2 y T1 respectivamente. Los controles negativos usados en cada uno de los tratamientos evidenciaron los mayores porcentajes con 100% de remoción bacteriana. La especie que presentó menor porcentaje de remoción fue *Scenedesmus quadricauda* con 0 y 33.2 % en el T2. Cabe mencionar que todos estos porcentajes se alcanzaron durante una evaluación de 15 días.

Tabla 01. Porcentaje de remoción de *coliformes totales* y *fecales* en lixiviado diluido al 50%.

Especie	<i>Coliformes totales</i>			<i>coliformes fecales</i>		
	Día 0	Día 15	Remoción(%)	Día 0	Día 15	Remoción(%)
<i>Chlorella</i> <i>sp</i>	5.4x10 ⁴	3.23x10 ⁴	40.19	5.6667 x10 ⁴	3.1333x10 ⁴	44.71
<i>Ankistrodesmus</i> <i>nannoselene</i>	5.4x10 ⁴	1.7633x10 ⁴	67.35	5.6667 x10 ⁴	4.67x10 ²	99.18
<i>Scenedesmus</i> <i>quadricauda</i>	5.4x10 ⁴	3.1667x10 ⁴	41.36	5.6667 x10 ⁴	2.2333x10 ⁴	60.59
Control negativo Lixiviado 1	5.4x10 ⁴	2.3x10 ¹	100	5.6667 x10 ⁴	10 ¹	100

Tabla 02. Porcentaje de remoción de *coliformes totales* y *fecales* en lixiviado al 100% concentrado.

Especie	<i>Coliformes totales</i>			<i>coliformes fecales</i>		
	Día 0	Día 15	Remoción(%)	Día 0	Día 15	Remoción(%)
<i>Chlorella</i> <i>sp</i>	1.6x10 ⁶	2.13333x10 ⁵	86.67	1.6x10 ⁶	3.1x10 ⁵	80.62
<i>Ankistrodesmus</i> <i>nannoselene</i>	1.6x10 ⁶	9.5x10 ¹	100	1.6x10 ⁶	1.8x10 ¹	99.99
<i>Scenedesmus</i> <i>quadricauda</i>	1.6x10 ⁶	1.6x10 ⁶	0.00	1.6x10 ⁶	1.0693x10 ⁶	33.17
Control negativo Lixiviado 2	1.6x10 ⁶	2x10 ⁰	100	1.6x10 ⁶	2x10 ⁰	100

Para el tratamiento 1 en *coliformes totales* los controles en el día 0 no mostraron diferencias significativas ($F=1,524$; $p=0,229$) ($p>0,05$). Asimismo, se observa que no existen diferencias significativas hasta el día 15 en los mismos controles. Así también, *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda* y *Ankistrodesmus nannosele* no mostraron diferencias significativas ($p=0,857$, $p=0,868$ y $p=0,994$) ($p>0,05$) con respecto al control el día 15. Sin embargo, se evidencia claramente una disminución de *coliformes* desde el primer día hasta el final de la evaluación. Por otro lado, la remoción en *Coliformes fecales* muestra diferencias estadísticamente significativas ($F=3.037$; $p=0,031$) ($p<0,05$) ya que se observó un gran descenso en el número de bacterias, especialmente en los controles y en *Ankistrodesmus nannosele*, mas no existe diferencias significativas entre las especies evaluadas.

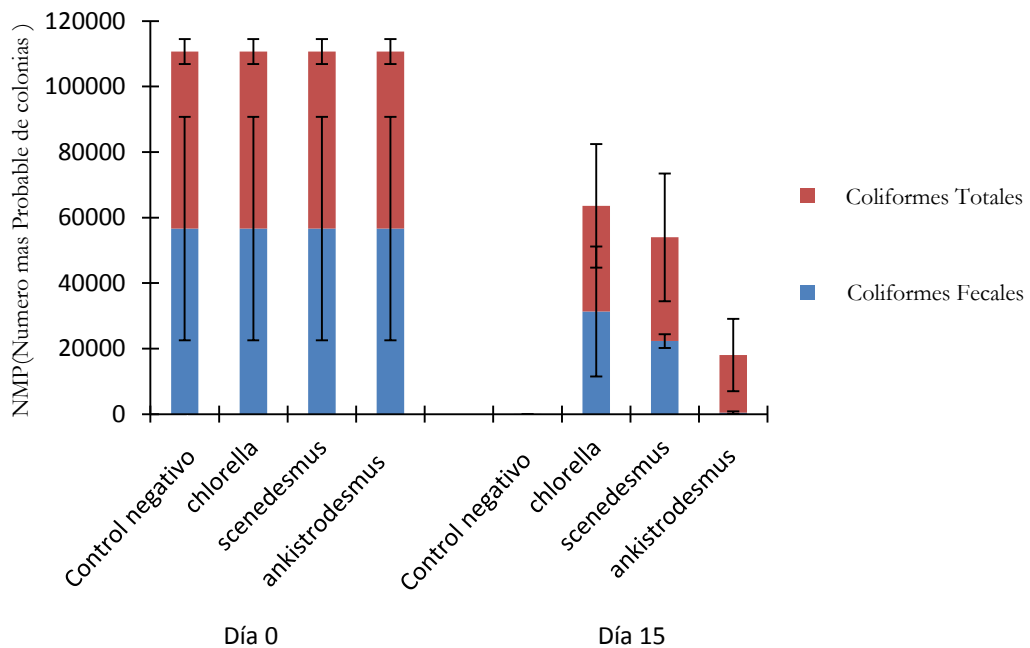


Figura 1. Remoción de Bacterias expresadas en NMP (Numero más probable) en el Día 0 y 15 con respecto al T1 (diluido) de las tres especies de microalgas.

En la figura 1. Se muestra la remoción bacteriana del control y los tratamientos de las tres especies de microalgas. En el tratamiento 2 para *coliformes totales*, los resultados mostraron diferencias altamente significativas ($F=7092.198$; $p=0,000$) ($p<00,05$), estas diferencias

radican exclusivamente en las especies *Chlorella* sp. y *Scenedesmus quadricauda* ($p=0,000$ y $p=0,000$) ($p<0,05$) con el grupo control respectivamente. Sin embargo, resultados diferentes se obtuvo con *Ankistrodesmus nanoselene* ya que no mostró diferencias significativas ($p=1$) ($p>0,05$). Estos resultados nos permite interpretar que tanto el control como *Ankistrodesmus nanoselene* expresaron valores similares, como se observa en la tabla 2. Un porcentaje de remoción del 100%, mientras que las demás especies expresaron valores menores. Del mismo modo, los resultados muestran diferencias altamente significativas en la remoción de *coliformes fecales* ($f=15.152$; $p=0,000$) ($p<0,05$) estas diferencias radican exclusivamente en *Scenedesmus quadricauda* ($p=0,020$) ($p<0,05$) con respecto al control.

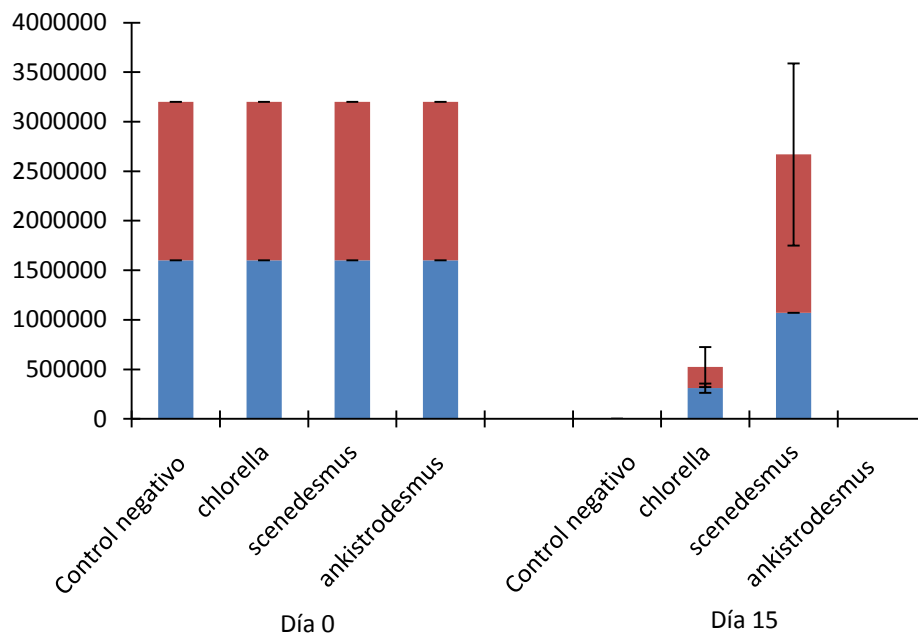


Figura 2. Remoción de Bacterias expresadas en NMP (Numero más probable) en el Día 0 y 15 con respecto al T2 (concentrado) de las tres especies de microalgas.

3.1.2. Perfil de crecimiento de las microalgas evaluadas

Por lo general, las microalgas evaluadas muestran un perfil de crecimiento gradual diferenciándose entre los tratamientos y el control. *Chlorella sp* mostró diferencias significativas ($F=10.313$; $p=0,011$) ($p<0,05$), entre el control y el tratamiento 1 ($p= 0,18$) ($p<0,05$), asimismo, se presentan diferencias significativas en los tratamientos entre sí ($p= 0,18$) ($p<0,05$).

Ankistrodesmus nannoselene también mostró diferencias significativas ($F= 12.433$; $p=0,007$) ($p<0,05$) entre el control y el tratamiento 2 mostraron ($p= 0.007$). Además, se presentaron diferencias significativas en los tratamientos entre sí ($p=0,033$) ($p<0,05$), el cual muestra que el crecimiento en los últimos días no siguió un patrón similar sino que varió de acuerdo a la concentración del lixiviado.

El perfil de crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en el T1 muestra un comportamiento diferente al cultivado en T2 respecto al control. Por lo que, no muestran diferencias significativas ($F=1, 863$; $p=0,235$) ($p>0,05$) entre los tratamientos.

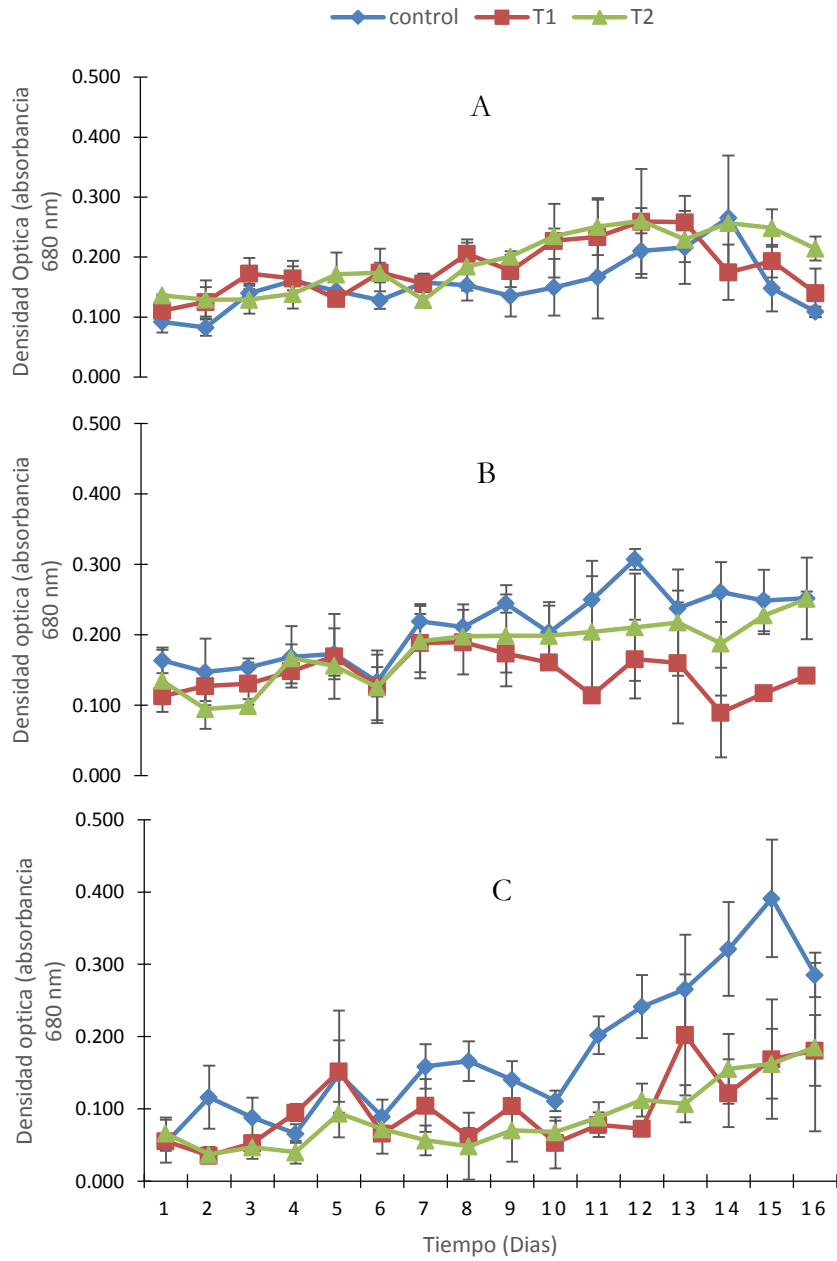


Figura 03. Perfil de crecimiento de la microalga *Ankistrodesmus nannosele* (A), *Chlorella sp* (B), *Scenedesmus quadricauda* (C).

3.1.3. Producción de biomasa y acumulación de lípidos totales de tres especies de microalgas expuestas al lixiviado.

3.1.3.1 Producción de Biomasa

En general, en las tres especies de microalgas evaluadas en los tratamientos con lixiviado, se observó que la mayor producción de biomasa fue obtenida por *Scenedesmus quadricauda* con 0.43 mg/L, 0.4 mg/L y 0.43 mg/L para control, T1 y T2 respectivamente. Sin embargo, al realizarse las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey no mostraron ser significativos ($F=1,333$; $p=0,332$) ($p<0,05$) ni en los tratamientos entre sí. *Ankistrodesmus nannosele* también mostró una producción elevada de biomasa superando a *Chlorella sp.* además éste muestra diferencias altamente significativas ($F=21.500$; $p=0,002$) ($p<0,05$). Asimismo, se observó diferencias del T2 con respecto al control ($p=0,002$) y diferencias entre los tratamientos ($p=0,005$) ($p<0,05$). Finalmente, se observa que la menor producción de biomasa fue en *Chlorella sp.* con 0.2 mg/L para el control, los T1 y T2 no mostraron diferencias significativas ($F=1,750$; $p=0,252$) ($p>0,05$) (Tabla 3)

Tabla 3. Promedio de la producción de biomasa microalgal

Especie microalgal	Producción de biomasa		
	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2
<i>Ankistrodesmus nannosele</i>	0.2±0.00	0.23±0.06	0.43±0.06
<i>Chlorella sp.</i>	0.3±0.00	0.2±0.00	0.27±0.00
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	0.43±0.06	0.4±0.06	0.43±0.06

Leyenda:

Control=control positivo (cultivo de microalgas en medio chu10)

Tratamiento 1: lixiviado al 50%, Tratamiento 2: lixiviado al 100%

3.1.3.2. Producción de lípidos

Las tres especies mostraron producción de lípidos totales. *Ankistrodesmus nannoselene* fue la especie que mostró mayor producción con un 40% en el T1 y 26.67% para el T2, respecto al control (40%). por lo que, no se muestra diferencias significativas ($F=1,000$; $p=0,422$) ($p>0,05$) entre el T1 y el control, ya que los porcentajes son homogéneos entre sí. De igual forma *Chlorella sp.*, presentó porcentajes lipídicos que van entre 26.67% (T1) y 20% (T2) con respecto al control (33.33%). Sin embargo, no son estadísticamente significativos ($F=1,500$; $p=0,296$) ($p>0,05$). Por último, *Scenedesmus quadricauda* fue la microalga que tuvo menor producción de lípidos con 20% en T1 y 20% en T2 con respecto al control (26.67%) (figura 04) (Tabla 04).

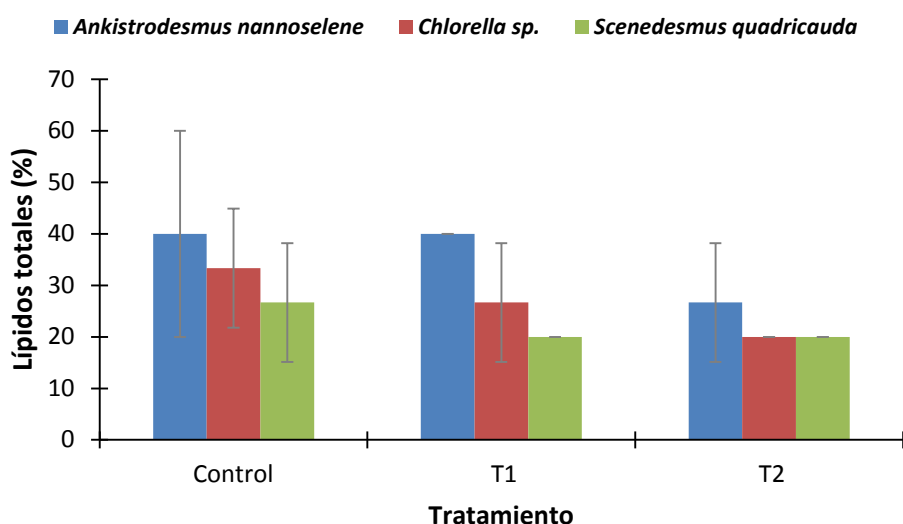


Figura 04. Producción de lípidos totales de la microalga *Ankistrodesmus nannoselene*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quadricauda*.

Tabla4. Producción de lípidos totales en las microalgas evaluadas.

Especie microalgal	Producción de lípidos totales (%)		
	Control	Tratamiento 1	Tratamiento 2
<i>Ankistrodesmus nannosele</i>	40.00±20.00	40.00±0.00	26.67±11.55
<i>Chlorella sp.</i>	33.33±11.55	26.67±11.55	20.00±0.00
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	26.67±11.55	20.00±0.00	20.00±0.00

Leyenda:

Control=control positivo (cultivo de microalgas en medio chu10)

Tratamiento 1: lixiviado al 50%, Tratamiento 2: lixiviado al 100%

3.2. DISCUSION

Las tres especies de microalgas utilizadas en este estudio presentaron remoción de estas bacterias, esto se ve reflejado en los porcentajes de remoción obtenidos para cada una de las microalgas en los dos tratamientos (T1 y T2) de lixiviados. *Ankistrodesmus nanoselene* fue el que reportó mayor porcentaje de remoción con 100 % tanto para *C. totales* y *fecales* en el T2, lo que indica que presenta gran capacidad depuradora de contaminantes bacterianos, del cual no se reportan trabajos similares en esta especie.

Por otro lado, *Chlorella* sp. evidenció un alto porcentaje de remoción en el T2 con más de 80% en *C. totales* y *fecales*, para esto se reportaron estudios tales como los de Parhad & Rao (9), Medina & Gutzeit (10), Leon & Chavez (20), Merino (22), quienes mencionaron una frecuente remoción de 90,0 a 99,9 %. Del mismo modo, *Scenedesmus quadricauda* mostró porcentajes de remoción de 30 y 0 % para *C. totales* y *fecales* en el T2 respectivamente. Por el contrario en el T1 se presentaron porcentajes de remoción por encima de 40% tanto para *C. totales* y *fecales*. Estos resultados no concuerdan con lo obtenido por Parhad & Rao (9), Swati & Nair (13) quienes lograron obtener porcentajes por encima del 90% concordando con Méndez & Albarracín (12), Ruiz (17), Monzón (21) sin embargo reconocen que estas bacterias nunca se eliminan por completo.

Muchos informes de la literatura, tales como los de Cadwell (11) y Oswald (15), mencionan que los conteos bacterianos fueron reducidos a menos del 1 por ciento en estanques de estabilización y atribuyeron esta reducción de *coliformes* a la presencia de sustancias tóxicas formadas por algas y otros factores como la escases de nutrientes mas no necesariamente a los altos valores de pH. Sin embargo, no realizaron experimentos para apoyar esta conclusión referida a la importancia del pH, solo reportaron los niveles que obtuvieron.

A diferencia de Parhad & Rao (9), quienes sí presentaron evidencia experimental, en condiciones de laboratorio demostraron que un tiempo de contacto de 24 h a un pH de 9,5 es suficiente para la eliminación total de *E. coli*, lo cual concuerda con los resultados de Swati & Nair (13) quienes mencionaron que el pH por encima de 9 es el que disminuye gran cantidad de bacterias patógenas.

Sin embargo la remoción obtenida en los dos tratamientos del presente estudio mostraron una remoción considerable, pero sin llegar a ser superior a los controles negativos (sin microalgas), obteniéndose en estos un 100% de remoción, lo que por cierto no equivale a la desaparición total de bacterias. Al respecto, los resultados concuerdan porcentualmente con el control de Parhad & Rao (9) quienes obtuvieron una reducción de 98.15% en *E. coli*, siendo el rango resultante de 1000000 (10^6) NMP/100 mL, al elevarse el pH a 8.3 en un periodo de 8 días, siendo esto también promovido posiblemente por la escasez de nutrientes disponibles.

Por lo que, autores como Saqqar & Pescod (18) mencionan que las bacterias requieren formas orgánicas de carbón y nitrógeno, lo cual implica que una escasez de substrato orgánico podría reducir el número de *coliformes*.

Por otra parte, un menor porcentaje de remoción bacteriana fue evidenciado en los tratamientos con microalgas, siendo estos en teoría los que debieron mostrar mayor remoción. Riquelme (19) puso en evidencia que la mayor densidad de bacterias ocurre solo después de la máxima producción de fitoplancton, sugiriendo que este aumento bacteriano se produce por la utilización del fitoplancton muerto y detritus. Por lo que este principio tiende a ser análogo con lo ocurrido en los matraces del estudio, ya que las bacterias tendieron a estar en un sistema cerrado en el posiblemente la única forma adicional de

obtención de nutrientes, después del medio CHU, era por la utilización del detritus generado en la fase de muerte microalgal, lo cual promovió una numerosa presencia de estos patógenos en los tratamientos algales.

Al mismo tiempo, las tres especies algales mostraron un buen perfil de crecimiento y un mismo patrón en los tratamientos. El control de *Scenedesmus quadricauda* mostró una buena densidad óptica (0.391abs-680nm) independientemente de los tratamientos, lo que nos demuestra que esta especie da un mejor uso a los nutrientes del medio CHU que los nutrientes presentes en el lixiviado, en tal sentido los resultados obtenidos por Pérez (5) quien realizó sus tratamientos con medio CHU y muestras de lixiviado provenientes del mismo Relleno Sanitario del cual también se colectó para fines de esta investigación, y empleando la misma cepa algal, mostraron el mejor crecimiento en relación al T1 ($0,346 \times 10^6$ célula/ml), y no en el control. Posiblemente por realizarse en función a un periodo de 8 días.

Asímismo, *Chlorella sp.* mostró la mayor densidad óptica en el control (0.307abs-680nm), resultados que son contrastables con los obtenidos por Ortiz (14) en donde prueban diferentes medios, como Sueoka, Guillard y lixiviado de gallinaza, en el crecimiento de *Chlorella sorokiniana.*, mostrando buenos perfiles de crecimiento, solo superados por el medio Remital ($86,5 \times 10^7$ célula/ml). Pérez (5) reportó una densidad celular máxima en *Chlorella sp* de 0.364×10^6 célula/ml en el grupo control, al igual que el del presente estudio.

Por otro lado; *Ankistrodesmus nannosele* alcanzó mayor densidad (0.261abs-680nm) en el T2 con lixiviado, concordando con Pérez (5) quien mencionó una densidad máxima de $0,371 \times 10^6$ célula/ml en el T2.

En relación a la producción de biomasa de las 3 especies mencionadas en el estudio, *Scenedesmus quadricauda* fue la especie que mostró la mayor producción de biomasa (0.43, 0.4, 0.43 mg/L). Estos resultados concuerdan con Pérez (5) quien reportó que la especie que mayor biomasa produjo fue *Scenedesmus quadricauda* en lixiviado (0.19, 0.12, 0.14 mg/L).

Sin embargo la producción lipídica que obtuvo fue directamente proporcional, ya que a mayor biomasa mayor porcentaje lipídico en esta especie, con 27,55%, 17,09%, 20,86% respectivamente. A diferencia de lo anterior, en el presente estudio la especie que mostró mayor contenido de lípidos fue *Ankistrodesmus nannosele* con 40.00%, 40.00%, 26.67% respectivamente. Siendo algunas de estas complejas y variables producciones lipídicas comprobados experimentalmente por Cobos (16), quienes mencionan que *Ankistrodesmus nannosele* al ser cultivada sin nitrógeno muestra una baja producción de biomasa seca y en contraste un mayor porcentaje de lípidos totales, ocurriendo lo opuesto con *Scenedesmus quadricauda*, también mencionado en los resultados de su estudio pero cultivado con nitrógeno.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- El mayor porcentaje de remoción bacteriana fue observado en los grupos control negativo (con lixiviado), y en los tratamientos con la especie *Ankistrodesmus nannosele*.
- La especie microalgal que mostro el mayor perfil de crecimiento fue *Scenedesmus quadricauda* con 0.391 y la especie con mayor producción de biomasa fue *Scenedesmus quadricauda*.
- La especie microalgal que reporto la mayor producción de lípidos totales fue *Ankistrodesmus nannosele*.

4.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda que a todos los tratamientos algales se les pueda realizar mediciones de pH para determinar si este fue realmente el responsable de la mayor eliminación de *coliformes* y no necesariamente por sustancias bactericidas producidas por algas.
- Se sugiere hacer los análisis microbiológicos específicos de *Escherichia coli*, esto con el fin de hacer más precisa la cuantificación de remoción del principal representante de las bacterias indicadoras
- Se recomienda, de ser posible, determinar especies de bacterias presentes en la muestra del estudio en cuestión por género y especie para verificar con mayor precisión cual es el más afectado por la presencia de microalgas u otro método de desinfección.
- Se recomienda realizar ensayos con otras especies microalgales para evaluar sus capacidades depurativas en aguas residuales y lixiviados a fin de comparar eficiencias.
- Tener en cuenta que algunos antecedentes bibliográficos mencionan que el uso de algas favorecería la reproducción de bacterias en vez de removerlas, tal como se pudo determinar en el presente estudio, por lo que deberían considerarse otros mecanismos eco-amigables como el uso de luz solar.

CAPITULO V

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 Castillo E, Salcedo A, Moreno Y (2003). Evaluación de un sistema biológico a escala piloto laboratorio para la remoción de materia orgánica del lixiviado del relleno sanitario de Bucaramanga (Santander), Colombia. Universidad Industrial de Santander-Bucaramanga- Colombia.
- 2 Eguizabal R. M. (2008). GUIA DE: Diseño, construcción, operación, mantenimiento y cierre de relleno sanitario manual. MINAM. Lima. Perú.
- 3 Martínez, R. (2007). Estudio sobre la concentración de contaminantes orgánicos, inorgánicos y biológicos en lixiviados del relleno sanitario “San Nicolás” y en agua de pozos aledaños. (Tesis de Maestría) Universidad autónoma de Aguascalientes.
- 4 Secretaria de Desarrollo Social - Sedesol (1996). Manual para la rehabilitación y clausura de tiraderos a cielo abierto. México.
- 5 Pérez, S. (2014). Evaluación de la remoción de contaminantes en lixiviado usando microalgas oleaginosas amazónicas. (Tesis de Pregrado).Universidad Científica del Perú. Perú.
- 6 Cobos M, Castro J, Vargas G. (2016). Protocolos para el aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de microalgas oleaginosas. Iquitos. Perú.
- 7 León-Gómez, H. D., Cruz-Vega, C. R., Dávila-Pórcel, R. A., Velasco-Tapia, F., & Chapa-Guerrero, J. R. (2015). Impacto del lixiviado generado en el relleno sanitario municipal de Linares (Nuevo León) sobre la calidad del agua superficial y subterránea. *Revista mexicana de ciencias geológicas*, 32(3), 514-526.
- 8 Bligh, E.G., Dyer, W.J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917.
- 9 Parhad N. M & Rao N. U. (1974). Effect of pH on survival of *Escherichia coli*. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 34, 149-161.
- 10 Leon C y Chavez D. (2010). Tratamiento de residual vacuno utilizando microalgas, la lenteja de agua *Lemna aequinoctiales* y un humedal subsuperficial en Costa Rica. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 1(2):155-177.
- 11 Caldwell D. (1946). Sewage oxidation ponds-performance, operation and design. *Sewage Works Journal*, Vol. 18, No. 3, pp. 433-458.
- 12 Méndez L, Albarracín I, Cravero M y Salomón R. (2010). Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, argentina.

- 13 Swati S & Nair K. V. (1984). Total Removal of *Coliforms* and *E. coli* from Domestic Sewage by High-Rate Pond Mass Culture of *Scenedesmus obliquus*. Environmental Pollution (Series A) 34 (1984) 197-206.
- 14 Ortiz M, Cortes C, Sánchez J, Padilla J, Otero A. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas, Orinoquia, vol. 16, núm. 1, 2012, pp. 11-20.
- 15 Oswald W. J, Golueke C. G, Tyler R. W. (1967). Integrated pond systems for subdivisions. J. Water Pollut. Control Fed., 38, 1289.
- 16 Cobos M, J Paredes J, Carlos J (2015). Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo, Acta biol. Colomb. 2016;21(1):17-26.
- 17 Ruiz A, Mendoza L, Stephenson T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. Bioresource Technology 101. 58–64.
- 18 Saqqar M, Pescod M. (1991). Microbiological performance of multi - stage stabilization ponds for effluent reuse in agriculture. 23 (7-9) 1517-152.
- 19 Riquelme C. (1987). Annual Fluctuations of Phytoplankton and Bacterial Communities in Maizuru Bay and their Interrelationship. Bulletin of Japanese Society of Microbial Ecology. Vol. 2, No. 1, 29-37.
- 20 Medina M, Gutzeit G, Neis U. (2003). Biomasa bacterio-algal: una alternativa para el mejoramiento de sistemas naturales para el tratamiento de agua. Universidad de tecnología de Hamburg-Harburg, Alemania, departamento de ingeniería ambiental y sanitaria.
- 21 Monzón J. A. (2016). Efecto del cultivo de la microalga *scenedesmus acutus* en la remoción de nutrientes y carga bacteriana a diferentes diluciones de aguas residuales municipales del distrito de Chimbote – Ancash. (Tesis de Maestría). Nuevo Chimbote-Perú.
- 22 Merino N. P. (2017). Evaluación de la eficiencia de remediación de Aguas residuales grises mediante un sistema basado en microalgas. (Tesis de Pregrado). Ecuador.

CAPÍTULO: VI

ANEXOS

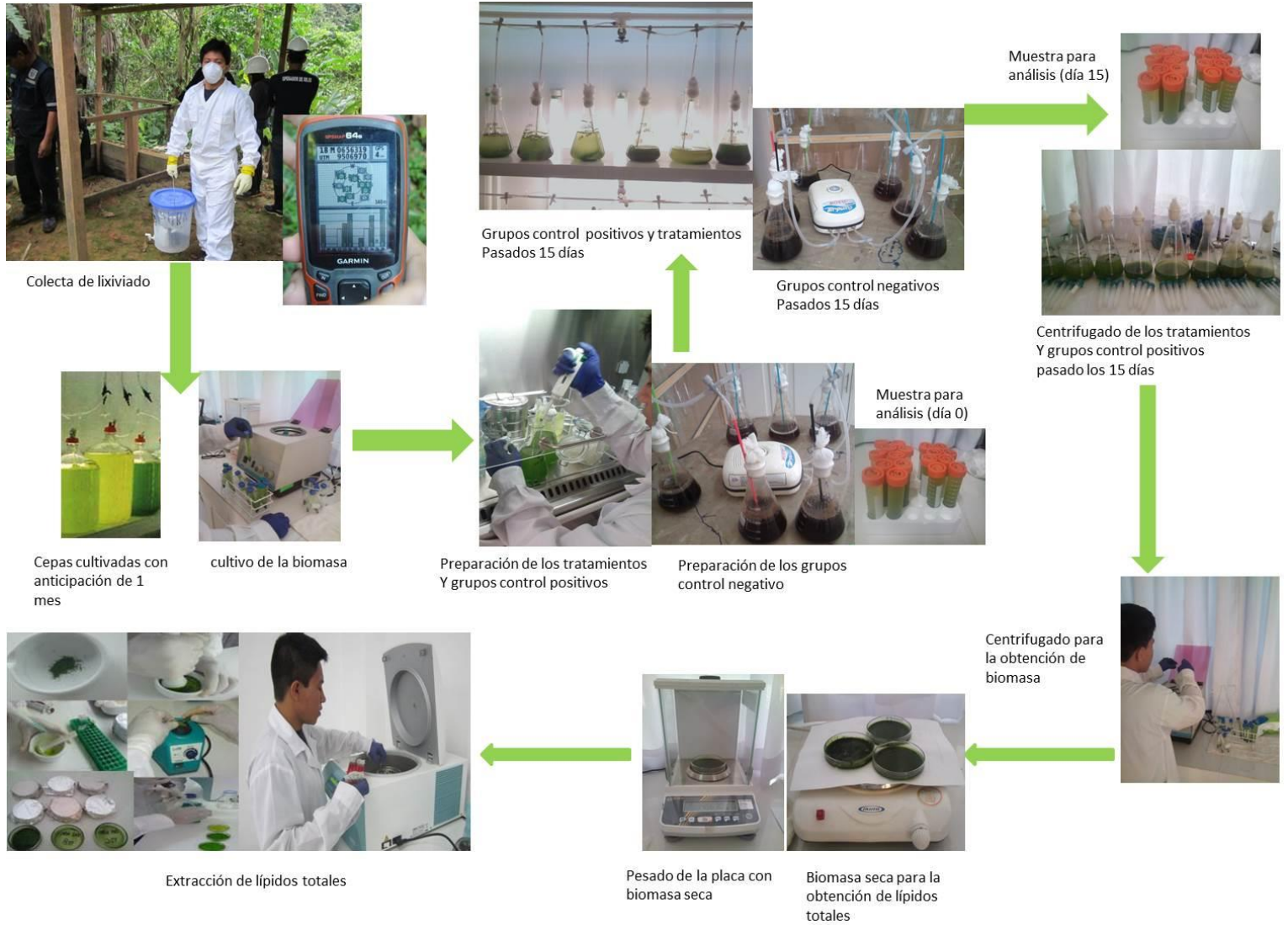


Figura 5. Procedimiento experimental

