

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE LA FLORA MICROBIANA EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACION  
DE *Arthrospira* sp. EN RILES PROVENIENTES DE UNA PLANTA PAENADORA  
AVICOLA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias  
Agropecuarias y Forestales de la Universidad de  
La Frontera, como parte de los requisitos para  
optar al título de Biotecnólogo.

**FERNANDO ANDRÉS LÓPEZ ALARCÓN**

**TEMUCO- CHILE**

**2012**

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**EFFECTO DE LA FLORA MICROBIANA EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACION  
DE *Arthrospira* sp. EN RILES PROVENIENTES DE UNA PLANTA FAENADORA  
AVICOLA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias  
Agropecuarias y Forestales de la Universidad de  
La Frontera, como parte de los requisitos para  
optar al título de Biotecnólogo.

**FERNANDO ANDRÉS LÓPEZ ALARCÓN**

**PROFESOR GUÍA: DRA. MARIBEL EUGENIA PARADA IBÁÑEZ**  
**TEMUCO- CHILE**

**2012**

“EFECTO DE LA FLORA MICROBIANA EN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN  
DE *Arthrospira* sp. EN RILES PROVENIENTES DE UNA PLANTA FAENADORA  
AVICOLA”

PROFESOR GUIA

: \_\_\_\_\_

Dra. Maribel Eugenia Parada Ibáñez  
Laboratorio de Microbiología y Rizobiología  
Facultad Ciencias Agropecuarias y Forestales  
Universidad de La Frontera.

PROFESORES CONSEJEROS

: \_\_\_\_\_

Dr. Diego Andrés Villagra Gil  
Laboratorio de Química Ecológica y Bioprocesos  
Centro de Recursos Naturales y Medio Ambiente  
Universidad de Tarapacá

CALIFICACION PROMEDIO TESIS

: \_\_\_\_\_

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer el financiamiento del programa Innova CORFO (Proyecto **11IDL2-10673**), de igual forma agradezco el apoyo financiero del gobierno regional de Arica y Parinacota a través de los Fondos de Innovación para la Competitividad (proyecto **FIC-p51**, Código **BIP 30110579-0**) y a la Universidad de Tarapacá.

Quiero agradecer el apoyo de mis tutores, Dra. Maribel Parada y el Dr. Diego Villagra, por guiarme en este proceso de aprendizaje y aplicación, al Dr. Villagra por haber confiado en mis capacidades y haberme aceptado en el Laboratorio de Química Ecológica y Bioprocesos, Universidad de Tarapacá. Doctora Maribel Parada, mis agradecimientos hacia usted son infinitos por haber sido un pilar fundamental en mi formación personal como profesional, cada consejo y sugerencia fue de gran ayuda para cada situación que me ha tocado vivir, puedo decir que me siento orgulloso de haber conocido a una persona con grandes valores y que para mí es considerada una referente digno de seguir.

Quiero destacar el apoyo que me brindaron mis compañeros de trabajo del Laboratorio de Química Ecológica y Bioprocesos, Lidia Vargas, Yaresly Manqui, Fanny Roman, Katy Alejandro y Gheraldine Ynga. Su apoyo fue fundamental en mi trabajo de título, para poder desempeñarme de gran forma en el laboratorio. Destaco la personalidad única de cada una de ellas, esforzadas y perseverantes en cada uno de sus objetivos.

Sin duda el apoyo familiar ha sido el más grande de todos, sino fuera por mi padre Heriberto, mi madre Eliana y mi hermano Marco, no hubiese llegado a donde estoy, el apoyo permanente de mis padres me convierten en la persona que soy, uno de sus grandes sueños se ve culminado y es que sus hijos fueran profesionales, me siento feliz de haberles cumplido y que ellos se sientan orgullosos de los hijos que tienen. Quiero expresar mi

admiración al trabajo duro realizado por mi padre Heriberto, cada día de trabajo realizado es una semilla que sembró en el camino de la vida y hoy está cosechando todo ese fuerza, reflejado en los logros de sus hijos y la felicidad de su familia. Mi madre Eliana, ella es y será la mujer más importante de mi vida, desde que me trajo al mundo hasta el día que me muera, una mujer esforzada en el trabajo más complicado de la vida que es llevar un hogar y la crianza de sus hijos, me siento feliz de tenerla como madre y le agradezco infinitamente lo que me ha enseñado, porque no existe lugar del mundo que me pueda enseñar todo lo que se aprende en la escuela del hogar. Mi hermano Marco, un ejemplo a seguir de perseverancia, todo lo que un día se propuso hoy lo está viviendo, es un gran apoyo para mí y me siento feliz de tenerlo a mi lado como hermano y como amigo.

Agradezco a mis amigos por el apoyo brindado en todas las etapas de mi vida, ya que contribuyeron de gran forma en mi felicidad, ya que sin esa felicidad nada de todo esto tendría sentido. Y por último quiero agradecer a mi mejor amiga y compañera, Camila tu apoyo ha sido fundamental en cada momento que lo he necesitado, gracias por compartir tu vida conmigo y gracias a ti mis momentos de soledad desaparecen, el esfuerzo es algo que te caracteriza y quiero destacar tu perseverancia en la vida.

## INDICE GENERAL

| Capítulo |                                             | Página |
|----------|---------------------------------------------|--------|
| 1        | INTRODUCCION                                | 1      |
| 2        | REVISION BIBLIOGRAFICA                      | 4      |
| 2.1      | Residuos Industriales Líquidos              | 4      |
| 2.1.1    | Características Físicas                     | 4      |
| 2.1.1.1  | Sólidos Totales                             | 4      |
| 2.1.1.2  | Olores                                      | 5      |
| 2.1.1.3  | Temperatura                                 | 5      |
| 2.1.1.4  | Color                                       | 5      |
| 2.1.1.5  | Turbiedad                                   | 6      |
| 2.1.2    | Características Químicas                    | 6      |
| 2.1.2.1  | Materia Orgánica                            | 6      |
| 2.1.2.2  | Demanda Bioquímica de Oxígeno               | 7      |
| 2.1.2.3  | Materia Inorgánica                          | 7      |
| 2.1.3    | Características Biológicas                  | 8      |
| 2.2      | Tipos de Riles y su Toxicidad               | 9      |
| 2.3      | Efectos de los Riles                        | 10     |
| 2.4      | Tratamiento de Riles                        | 11     |
| 2.4.1    | Tratamientos Primarios y/o Pre-Tratamientos | 11     |
| 2.4.1.1  | Tratamiento Mecánico                        | 11     |
| 2.4.1.2  | Ecualización                                | 11     |
| 2.4.1.3  | Adsorción de partículas (Floculación)       | 11     |
| 2.4.1.4  | Flotación                                   | 12     |
| 2.4.1.5  | Coagulación                                 | 12     |
| 2.4.2    | Tratamientos Secundarios o Biológicos       | 12     |
| 2.4.2.1  | Biofiltración                               | 13     |
| 2.4.2.2  | Discos Rotatorios                           | 13     |
| 2.4.2.3  | Lagunas Aireadas                            | 13     |

|         |                                                       |    |
|---------|-------------------------------------------------------|----|
| 2.4.3   | Tratamientos Terciarios                               | 14 |
| 2.5     | Leyes y disposiciones de parámetros                   | 14 |
| 2.6     | Biorremediación                                       | 17 |
| 2.6.1   | Fundamento                                            | 17 |
| 2.6.2   | Organismos Participantes                              | 17 |
| 2.6.3   | Tipos de contaminantes eliminados por Biorremediación | 17 |
| 2.6.4   | Tipos de Biorremediación                              | 18 |
| 2.6.4.1 | Biorremediación In Situ                               | 18 |
| 2.6.4.2 | Biorremediación Ex Situ                               | 18 |
| 2.6.5   | Aplicación                                            | 19 |
| 2.6.5.1 | Ventajas                                              | 19 |
| 2.6.5.2 | Desventajas                                           | 19 |
| 2.7     | Microalgas                                            | 19 |
| 2.7.1   | Antecedentes                                          | 20 |
| 2.7.2   | Clasificación                                         | 21 |
| 2.7.3   | Fases de Crecimiento                                  | 21 |
| 2.7.4   | Aplicaciones                                          | 22 |
| 2.7.5   | Tipos de sistemas de tratamiento con microalgas       | 23 |
| 2.7.5.1 | Ventajas del tratamiento                              | 24 |
| 2.7.5.2 | Eficiencia                                            | 25 |
| 2.8     | Generalidades de las Cianobacterias                   | 25 |
| 2.9     | Cianobacteria <i>Arthrospira</i> sp.                  | 27 |
| 2.9.1   | Características Generales                             | 27 |
| 2.9.2   | Antecedentes                                          | 28 |
| 2.9.3   | Clasificación                                         | 29 |
| 2.9.4   | Reproducción                                          | 29 |
| 2.9.5   | Cultivo                                               | 29 |
| 2.10    | Separación y post-tratamiento de las algas producidas | 30 |
| 2.10.1  | Separación                                            | 30 |
| 2.10.2  | Post-tratamiento                                      | 30 |
| 2.11    | Control Microbiológico                                | 31 |

|          |                                          |    |
|----------|------------------------------------------|----|
| 2.11.1   | Criterios microbiológicos                | 31 |
| 2.11.1.1 | Tipos de Criterios                       | 32 |
| 3        | MATERIALES Y MÉTODOS                     | 33 |
| 3.1      | Material de Laboratorio                  | 33 |
| 3.2      | Medio de Crecimiento                     | 35 |
| 3.3      | Residuos Líquido Industrial              | 35 |
| 3.4      | Ensayo de Biorremediación                | 35 |
| 3.5      | Recuento de bacterias mesófilas aerobias | 38 |
| 3.6      | Recuento de coliformes totales y fecales | 39 |
| 4        | PRESENTACIÓN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN   | 40 |
| 5        | CONCLUSIONES                             | 51 |
| 6        | RESUMEN                                  | 52 |
| 7        | ABSTRACT                                 | 53 |
| 8        | LITERATURA CITADA                        | 54 |
| 9        | ANEXOS                                   | 58 |

**INDICE DE CUADROS**

| <b>Cuadro</b> | <b>Descripción</b>                                                                              | <b>Página</b> |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1             | Tipos de Riles y su toxicidad                                                                   | 9             |
| 2             | Normativa Internacional suscritas por Chile                                                     | 15            |
| 3             | Ensayos de Biorremediación                                                                      | 35            |
| 4             | Cuadro resumen en porcentajes del aumento de Oxígeno Disuelto y disminución Demanda Bioquímica. | 41            |
| 5             | Componentes del Medio de Cultivo para <i>Arthrospira</i> sp.                                    | 60            |
| 6             | Solución traza de metales                                                                       | 61            |
| 7             | Índice del NMP                                                                                  | 69            |

**INDICE DE FIGURAS**

| <b>Figura</b> |                                                                                                      | <b>Página</b> |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 1             | Conos Imhoff                                                                                         | 5             |
| 2             | Proceso de Coagulación en tratamiento de aguas                                                       | 12            |
| 3             | Esquema de la simbiosis algas/bacterias que tiene lugar en las lagunas de alta carga                 | 14            |
| 4             | Ensayo de Biorremediación en Ambiente No Controlado                                                  | 36            |
| 5             | Monitoreo de la Intensidad Lumínica                                                                  | 37            |
| 6             | Preparación de diluciones decimales y procedimiento para el recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias | 39            |
| 7             | Resultados de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno                                       | 40            |
| 8             | Proceso químico de la Fotosíntesis                                                                   | 41            |
| 9             | Recuento de Mesófilos Aerobios en ensayo de biorremediación                                          | 42            |
| 10            | Recuento de Coliformes Totales en ensayo de biorremediación                                          | 44            |
| 11            | Recuento de Coliformes Fecales en ensayo de biorremediación                                          | 44            |
| 12            | Recuento de Coliformes Totales y Fecales en biomasa en polvo                                         | 46            |
| 13            | Comportamiento del pH en ensayo de biorremediación                                                   | 48            |
| 14            | Comportamiento de la Intensidad lumínica en ensayo de biorremediación                                | 49            |

**INDICE DE ANEXOS**

| <b>Anexo</b> |                                                           | <b>Página</b> |
|--------------|-----------------------------------------------------------|---------------|
| 1            | Leyes que rigen el vertido de aguas a los curso naturales | 58            |
| 2            | Medio de Cultivo para <i>Arthrospira sp.</i>              | 59            |
| 3            | Recuento de Bacterias Mesófilas                           | 62            |
| 4            | Recuento de Coliformes Totales y Fecales                  | 64            |

## **1. INTRODUCCION**

Las aguas residuales son un valioso recurso que deberían emplearse siempre que fuera posible, con las debidas medidas de protección sanitaria (OMS, 1989).

El agua ha sido considerada hasta no hace muchos años como inagotable. Sin embargo, debido a factores tales como su irregular distribución geográfica, la alarmante escasez de recursos hídricos en áreas de clima árido o semiárido, la cada vez mayor demanda de agua por parte de una población creciente, la presión ejercida por la agricultura y la actividad industrial sobre las reservas de agua, etc., ha provocado que el agua no sólo haya dejado de ser considerada como un recurso natural inagotable, sino que en muchas ocasiones se haya convertido en un factor limitante al crecimiento socioeconómico (Rodríguez, 2005).

En todo el Norte Chileno, donde confluyen muchos de los factores expuestos anteriormente, los recursos hídricos son altamente escasos, por lo que el uso racional del agua es de vital importancia. En estas zonas geográficas de escasa disponibilidad de agua es donde la optimización y racionalización en la gestión de los recursos hídricos tiene una repercusión especialmente positiva en el avance económico de dichas zonas, debido en muchas ocasiones al carácter limitante del agua, como factor de desarrollo socioeconómico, en este sentido la reutilización de las aguas residuales depuradas se perfila como un gran recurso para ser utilizado en riego.

En Chile la calidad del agua para diferentes usos está regida por la norma Nch 1333, la cual fija un criterio de calidad de agua de acuerdo a requerimientos científicos referidos a aspectos físicos, químicos y biológicos, según el uso determinado (Nch1333, 1978).

La biorremediación no es más que el empleo de sistemas biológicos (bacteria, algas, hongos, levaduras y plantas superiores) para eliminar los contaminantes del suelo, agua o gases. El uso de cianobacterias, también llamadas algas verde azules son una gran alternativa en la remoción de materia orgánica de residuos industriales líquidos, ya que pueden ser cultivadas en lagunas, con pequeños requerimientos de nutrientes para su mantenimiento y desarrollo.

El uso de *Arthrospira* sp., radica en la gran cantidad de nutrientes (macros y micros) que contiene, algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano, así como también por algunas de sus propiedades, tales como el hecho de aumentar los niveles de energía, reducir el estrés premenstrual, incrementar el rendimiento en los atletas, mejorar el apetito y ofrecer protección como antioxidante.

Varias de las propiedades que posee *Arthrospira* sp. se deben a algunos de sus constituyentes, en especial, los ácidos grasos omega 3 y 6, el beta-caroteno, el alfa-tocoferol, la ficocianina, compuestos fenólicos y un compuesto últimamente descubierto, denominado Ca-Spirulan (Ca-SP) que posee actividad antiviral (Chamorro *et al.*, 2002).

La utilización de la biomasa microalgal, debe cumplir distintos criterios de inocuidad microbiológica, dependiendo del uso que se le vaya a dar, ya sea para nutrición animal, humana o extracción de colorantes. Pero es indispensable que esté libre de contaminación por presencia del grupo coliformes.

Teniendo en cuenta lo planteado anteriormente, la utilización de *Arthrospira* sp. para la biorremediación de residuos industriales líquidos (Riles), nace como la alternativa ideal para reutilizar el agua con el fin de ser usada en riego y de igual forma recuperar la biomasa

de *Arthrospira* sp. para ser utilizada en nutrición o bien para la extracción de colorantes naturales.

Por todo lo anteriormente expuesto se ha propuesto como hipótesis de trabajo que “El proceso de biorremediación llevado a cabo por *Arthrospira* sp. en Riles tratados, provenientes de una planta faenadora avícola, disminuye las poblaciones microbianas contaminantes presentes en el ril y no afecta la recuperación de la biomasa de *Arthrospira* sp.

Para comprobar dicha hipótesis se ha planteado el siguiente objetivo general: “Evaluar la calidad microbiológica de Riles tratados provenientes de una planta faenadora avícola desde la inoculación de la microalga hasta la cosecha de la biomasa microalgal producida durante el proceso de biorremediación”.

Los objetivos específicos fueron:

Determinar la capacidad biorremediadora de *Arthrospira* sp. en RILES tratados provenientes de una planta faenadora avícola, analizando oxígeno disuelto y demanda bioquímica de oxígeno.

Cuantificar la cantidad de organismos mesófilos aerobios presentes en el proceso de biorremediación con *Arthrospira* sp.

Determinar el Número Más Probable de coliformes totales y fecales presentes en el proceso de biorremediación con *Arthrospira* sp.

Determinar el Número Más Probable de coliformes totales y fecales presentes en la recuperación de la biomasa de *Arthrospira* sp.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

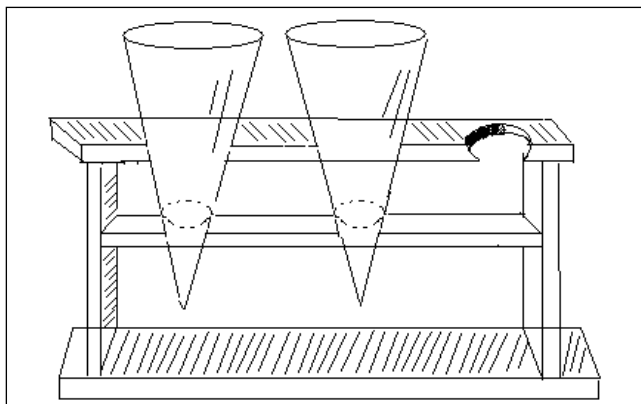
### 2.1 Residuos industriales líquidos (Riles).

Son aquellas descargas líquidas producidas por un establecimiento que prepara algún material o artículo para el mercado. También podríamos definirlos como aguas de desecho generadas por establecimientos industriales como resultado de algún proceso, actividad o servicio. Sin embargo, la calidad de estos residuos no siempre es contaminante; por ejemplo, el agua que se utiliza en los enfriadores de agua, al ser integrada a su fuente de origen a una temperatura similar a la ambiental, es un ril, pero no se considera contaminante.

Un Ril es contaminante cuando es un efluente industrial que contiene compuestos químicos o biológicos o especies biológicas, que produzcan en el curso de agua receptor condiciones inadecuadas para los usos definidos para el recurso hídrico, o en su defecto contenga materia orgánica, que reduzca el contenido de oxígeno disuelto en el agua hasta impedir la vida acuática (Vargas, 2004).

**2.1.1 Características Físicas.** La característica física más importante del agua residual es el contenido total de sólidos, término que engloba la materia en suspensión, la materia sedimentable, la materia coloidal y la materia disuelta. Otras características físicas importantes son el olor, la temperatura, la densidad, el color y la turbiedad.

**2.1.1.1 Sólidos Totales.** Los sólidos sedimentables se definen como aquellos que sedimentan en el fondo de un recipiente de forma cónica, el más conocido el cono de Imhoff (Figura 1) en el transcurso de un periodo de 1 hora a 3 horas. Los sólidos sedimentables se expresan en mL/L y constituyen una medida aproximada de la cantidad de fango que se obtendrá en la decantación primaria del agua residual. Los sólidos totales pueden clasificarse en filtrables o no filtrables (sólidos en suspensión) haciendo pasar un volumen conocido de líquido por un filtro.



**Figura 1.** Conos Imhoff (Tchobanoglous, 2000).

**2.1.1.2 Olores.** Normalmente, los olores son debidos a los gases liberados durante el proceso de descomposición de la materia orgánica. El agua residual reciente tiene un olor algo desagradable, que resulta más tolerable que el del agua residual séptica, cuyo olor más característico se debe a la presencia del sulfuro de hidrógeno (huevo podrido) que se produce al reducirse los sulfatos a sulfitos por acción de los microorganismos anaerobios presentes. La problemática de los olores está considerada como la principal causa de rechazo a la instalación de plantas de tratamiento de aguas residuales (Tchobanoglous, 2000).

**2.1.1.3 Temperatura.** La temperatura del agua residual suele ser siempre más elevada que la del agua de suministro, hecho principalmente debido a la incorporación de agua caliente procedente de las casas y los diferentes usos industriales.

La temperatura del agua es un parámetro muy importante dada su influencia, tanto sobre el desarrollo de la vida acuática como sobre las reacciones químicas y velocidades de reacción, así como sobre la aptitud del agua para ciertos usos útiles.

**2.1.1.4 Color.** El agua residual suele tener un color grisáceo. Sin embargo, al aumentar el tiempo de transporte en las redes de alcantarillado y al desarrollarse condiciones más próximas a las anaerobias, el color del agua residual cambia gradualmente de gris a gris oscuro, para finalmente adquirir un color negro. Cuando llega a este punto, suele

clasificarse como séptica. El color gris, gris oscuro o negro del agua residual es debido a la formación de sulfuros metálicos por reacción del sulfuro liberado en condiciones anaerobias con los metales presentes en el agua residual (Tchobanoglous, 2000).

**2.1.1.5 Turbiedad.** La turbiedad, como medida de transmisión de la luz en el agua, es otro parámetro que se emplea para indicar la calidad de las aguas vertidas o de las aguas naturales en relación con la materia coloidal y residual en suspensión. Su medición se lleva a cabo mediante la comparación entre la intensidad de la luz dispersa en la muestra y la intensidad registrada en una suspensión de referencia en las mismas condiciones (Tchobanoglous, 2000).

**2.1.2 Características Químicas.** Las características químicas de las aguas residuales son principalmente el contenido de materia orgánica e inorgánica, y los gases presentes en el agua residual. La medición del contenido de la materia orgánica se realiza por separado por su importancia en la gestión de la calidad del agua y en el diseño de las instalaciones de tratamiento de aguas.

**2.1.2.1 Materia Orgánica.** Cerca del 75% de los sólidos en suspensión y del 40% de los sólidos filtrables de una agua residual de concentración media son de naturaleza orgánica. Son sólidos de origen animal y vegetal, así como de las actividades humanas relacionadas con la síntesis de compuestos orgánicos.

Los compuestos orgánicos están formados por combinaciones de carbono, hidrógeno y oxígeno, con la presencia, en algunos casos, de nitrógeno. También pueden estar presentes otros elementos como azufre, fósforo o hierro. Los principales grupos de sustancias orgánicas presentes en el agua residual son las proteínas (40-60%), hidratos de carbono (25-50%) y grasas y aceites (10%). Otro compuesto orgánico muy importante en el agua residual es la urea, principal constituyente de la orina (Vargas, 2004). No obstante, debido a la velocidad del proceso de descomposición de la urea, raramente está presente en aguas

residuales que no sean muy recientes. Junto con todos estos grupos de sustancias orgánicas, el agua residual también contiene pequeñas cantidades de un gran número de moléculas orgánicas sintéticas cuya estructura puede ser desde muy simple a extremadamente compleja, por ejemplo, los agentes tensoactivos, los contaminantes orgánicos prioritarios, los compuestos orgánicos volátiles y los pesticidas de uso agrícola (Vargas, 2004).

**2.1.2.2 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO).** El parámetro de contaminación orgánica más empleado, que es aplicable tanto a aguas residuales como a aguas superficiales, es la DBO a 5 días. La determinación de este parámetro está relacionada con la medición del oxígeno disuelto que consumen los microorganismos en el proceso de oxidación bioquímica de la materia orgánica. Los resultados de los ensayos de DBO se emplean para:

- Determinar la cantidad aproximada de oxígeno que se requerirá para estabilizar biológicamente la materia orgánica presente.
- Dimensionar las instalaciones de tratamiento de aguas residuales.
- Medir la eficacia de algunos procesos de tratamiento y controlar el cumplimiento de las limitaciones a que están sujetos los vertidos.

El periodo de incubación es normalmente de 5 días a 20°C. La oxidación bioquímica es un proceso lento, cuya duración en teoría es infinita. En un periodo de 20 días se completa la oxidación del 95 al 99 % de la materia carbonosa, y en los 5 días que dura el ensayo de la DBO se llega a oxidar entre el 60 y 70%. Se asume la temperatura de 20°C como un valor medio representativo de temperatura que se da en los cursos de agua que circulan a baja velocidad en climas suaves, y es fácilmente duplicada en un incubador. Los resultados obtenidos a diferentes temperaturas serán distintos, debido a que las velocidades de las reacciones bioquímicas son función de la temperatura.

**2.1.2.3 Materia Inorgánica.** Las concentraciones de las sustancias inorgánicas en el agua aumentan tanto por el contacto del agua con las diferentes formaciones geológicas, como por las aguas residuales, tratadas o sin tratar, que a ella se descargan. Las aguas naturales

disuelven parte de las rocas y minerales con los que entran en contacto. Las aguas residuales, salvo el caso de determinados residuos industriales, no se suelen tratar con el objetivo específico de eliminar los constituyentes inorgánicos que se incorporan durante el ciclo de uso. Las concentraciones de los diferentes constituyentes inorgánicos pueden afectar mucho a los usos del agua, como por ejemplo cloruros, alcalinidad, nitrógeno, azufre, algunos otros compuestos tóxicos inorgánicos y algunos metales pesados como níquel, manganeso, plomo, cromo, cadmio, cinc, cobre, hierro y mercurio.

Dentro de la materia inorgánica es de suma importancia también hablar de la concentración del ión hidrógeno (pH), ya que es un parámetro de calidad de gran importancia tanto para el caso de aguas naturales como residuales. El agua residual con concentraciones de ión hidrógeno inadecuadas presenta dificultades de tratamiento con procesos biológicos, y el efluente puede modificar dicha concentración de ión hidrógeno en las aguas naturales si ésta no se modifica antes de la evacuación de las aguas (Vargas, 2004).

**2.1.3 Características Biológicas.** Para el tratamiento biológico se deben de tomar en cuenta las siguientes características del agua residual: principales grupos de microorganismos presentes, tanto en aguas superficiales como en residuales, así como aquellos que intervienen en los tratamientos biológicos; organismos patógenos presentes en las aguas residuales; organismos utilizados como indicadores de contaminación y su importancia; métodos empleados para determinar los organismos indicadores, y métodos empleados para determinar la toxicidad de las aguas tratadas.

## 2.2 Tipos de RILES y su Toxicidad

**Cuadro1.** Tipos de riles y su toxicidad (Vargas, 2004).

| <b>Tipos de Riles</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>Actividades Industriales Responsables</b>                                                                                              |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Con constituyentes minerales:</b> Efluentes que contienen metales, complejos, compuesto halogenado y una serie de sustancias inorgánicas que presentan un elevado índice de toxicidad y peligrosidad.                                                                                                                                                                                                                                             | Industria metalúrgica y siderúrgica, minería, determinados procesos de la industria petroquímica y también los procesos galvanoplasticos. |
| <b>Con constituyentes orgánicos:</b> La carga orgánica de un efluente puede ser muy variada dependiendo de la actividad industrial que lo haya generado. Existen determinadas sustancias orgánicas como la celulosa, los taninos, los compuestos azufrados y clorados, que resultan particularmente difíciles de biodegradar y por tanto se hace necesario un control estricto que asegure su correcto tratamiento antes de ser vertidos al receptor | Industria farmacéutica y alimentaria, entre otros.                                                                                        |
| <b>Con constituyentes minerales y orgánicos:</b> Combinación de las dos anteriores. Requieren sistemas de tratamiento mixto.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                           |
| <b>Con constituyentes de naturaleza radiactiva:</b> Presentan problemas graves por una parte a causa de su elevada peligrosidad, tanto para el hombre como para las demás formas de vida, y por otra por su persistencia, pues la vida media de la mayoría de compuestos radiactivos es muy elevada.                                                                                                                                                 | Procesos en los que se emplean materiales radiactivos tales como reactores nucleares, laboratorios de investigación, entre otras.         |
| <b>Riles que producen contaminación térmica:</b> Vertidos que una vez incorporados al receptor provocan un cambio de temperatura en éste, con el consiguiente peligro para la flora y fauna acuática, a causa de la alteración de las condiciones térmicas del ecosistema.                                                                                                                                                                           | Amplio espectro. Cualquier emisión de vapor o de líquidos enfriados es suficiente para desencadenar efectos perniciosos.                  |

La toxicidad de los Riles va a depender mucho de las cantidades y peligrosidad de sus contaminantes asociados.

Los riles generalmente provenientes de una industria avícola va a presentar una alta carga de toxicidad biológica por la cantidad de materia orgánica que presenta.

### **2.3 Efectos de los RILES**

A pesar de que los residuos industriales pueden ser de variados tipos, en general se pueden especificar algunos efectos de la eventual descarga de éstos hacia los cursos de agua, por citar:

La descarga de Riles al sistema de alcantarillado puede provocar:

- La corrosión, incrustación y obstrucción de las redes de alcantarillado. Esta situación, podría provocar serios problemas ambientales derivados del mal funcionamiento de la red de recolección.
- Las condiciones para la conformación de gases tóxicos o inflamables en las redes de alcantarillado. La emanación o explosión de éstos podría causar graves daños a la población o a las empresas que trabajan en el mantenimiento de redes.
- Serias interferencias en el proceso biológico de las plantas de tratamiento de aguas servidas y en los subproductos generados.

La descarga de Riles a los cuerpos de aguas superficiales puede provocar:

- Graves efectos en el medio ambiente y en la flora y fauna acuática de los ríos, lagos y cauces naturales.
- Trastornos en la agricultura como consecuencia del riego con aguas contaminadas. Estos efectos podrían afectar al ser humano a partir del consumo de productos regados con elementos nocivos, además existe un proceso de bioacumulación a través de la cadena trófica (Vargas, 2004).

## 2.4 Tratamiento de RILES

Así como existen diversos tipos de Riles, también hay variadas y múltiples formas de tratarlos, definiendo el concepto de tratamiento de Riles como la manera en la cual reducir la carga orgánica u otra que posean, hasta valores razonables para ser vertidos en los cursos de agua, no afecten las condiciones ambientales y biológicas que se encuentren en aquel efluente natural (este hecho es la base de la normativa acerca de estos residuos y se verá más adelante).

Un aspecto importante de estos procesos de tratamiento es que deben cumplir la condición de ser tecnologías lo suficientemente limpias para que sea conveniente el tratamiento de estos residuos y así no provocar otro desecho de difícil disposición final y no crear un círculo vicioso de contaminación.

**2.4.1 Tratamientos Primarios y/o Pre-Tratamientos.** Estos procesos se denominan así porque son los que se realizan cuando el Ril ingresa para su tratamiento (Tchobanoglous, 2000), entre las operaciones unitarias que se incluyen en esta etapa son:

**2.4.1.1 Tratamiento Mecánico.** En esta zona se realizan operaciones de tamizado y de cribas no muy finas, que retiran la mayor parte de los sólidos flotantes, basura y restos orgánicos de mayor tamaño, que se encuentran en las descargas de Riles.

**2.4.1.2 Ecualización.** Proceso realizado para lograr homogeneizar el Ril, en cuanto a concentraciones de descarga, temperatura y de flujo, ya que la mayoría de los procesos de tratamientos posteriores requieren de una configuración estable de flujo y de concentración para lograr los resultados deseados.

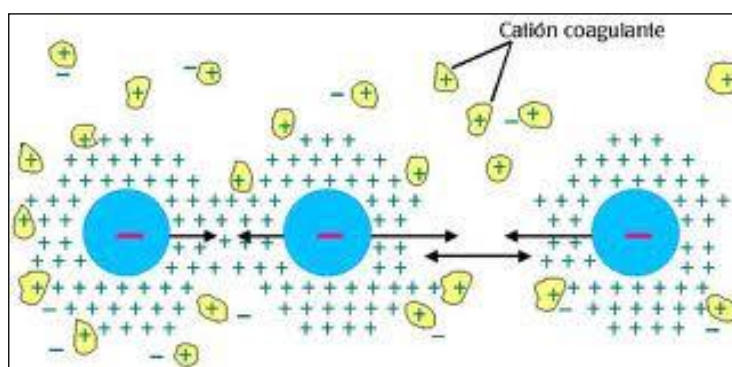
**2.4.1.3 Adsorción de partículas (Floculación).** Se refiere a la aglomeración de partículas coaguladas en partículas floculentas; es el proceso por el cual, una vez desestabilizados los

coloides, se provee una mezcla suave de las partículas para incrementar la tasa de encuentros o colisiones entre ellas sin romper o disturbar los agregados preformados.

**2.4.1.4 Flotación.** Este fenómeno superficial permite, mediante la inyección de burbujas de aire, oxígeno o cualquier gas inerte, atrapar las partículas de tamaño coloidal presentes en el Ril. Generalmente va acompañado por otras operaciones, como son la flotación o la filtración.

**2.4.1.5 Coagulación.** La coagulación química puede definirse como un proceso unitario usado para causar la coalescencia o agregación de material suspendido no sedimentable y partículas coloidales del agua; es el proceso por el cual se reducen las fuerzas repelentes existentes entre partículas coloidales para formar partículas mayores de buena sedimentación.

La coagulación de aguas generalmente suele incluir la adición de productos químicos del tipo electrolitos hidrolizantes o poliméricos (Figura 2).



**Figura 2.** Proceso de Coagulación en tratamiento de aguas (Tchobanoglous, 2000).

**2.4.2 Tratamientos Secundarios o Biológicos.** Estos tratamientos consisten en tratar químicamente y/o biológicamente el Ril de manera de reducir la cantidad de sustancias tóxicas o de materia biodegradable presentes en el Ril y que no fueron retiradas por los procesos anteriores (tratamientos primarios).

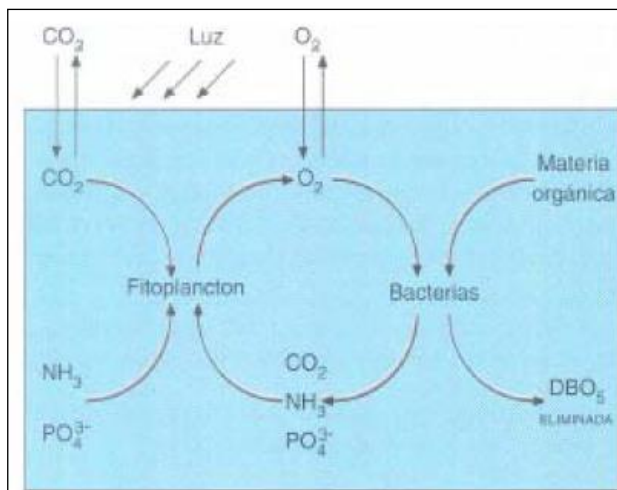
**2.4.2.1 Biofiltración.** Es un proceso relativamente nuevo y consiste en depositar el Ril en una piscina o en un estanque donde las bacterias, hongos, levaduras, gusanos, etc. consumen las partículas orgánicas presentes en él y logran con ello desarrollarse y formar colonias, que viven de los residuos. Esta operación permite un descenso muy alto de la carga orgánica asociada al agua residual.

**2.4.2.2 Discos Rotatorios.** Son discos inoculados con colonias de microorganismos que controlan la tasa de cultivos y los tipos que se desarrollan en éstos, como una forma de que estos microorganismos no se multipliquen demasiado y que puedan aparecer en el agua tratada.

**2.4.2.3 Lagunas Aireadas.** Estas lagunas permiten que el Ril pueda tener una gran penetración de luz. El lagunaje natural es uno de los sistemas alternativos de tratamiento mejor conocidos y representa una opción eficaz para la eliminación de la materia orgánica, los nutrientes y los microorganismos patógenos del agua residual (Pearson, 1996). Su diseño y su construcción son sencillos, y sus costos de explotación y mantenimiento son bajos.

Las lagunas de alta carga son un sistema eficaz de aprovechamiento de la energía solar que puede combinar a la vez el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa algal. En la práctica de los sistemas de lagunaje, la laguna de alta carga sustituye a la laguna facultativa o bien la sigue en serie. La función fundamental de la laguna de alta carga es el tratamiento secundario del agua residual, que consiste en convertir la materia orgánica disuelta en materia orgánica particulada, y microorganismos que después pueden ser separados en instalaciones apropiadas.

La eliminación de la materia orgánica afluyente a una laguna de alta carga tiene lugar mediante la simbiosis algas/bacterias o protocooperación fotosíntesis/respiración (Figura 3) (Abeliovich, 1986, Fallowfield, 1985).



**Figura 3.** Esquema de la simbiosis algas/bacterias que tiene lugar en las lagunas de alta carga (Fallowfield, 1985).

**2.4.3 Tratamientos Terciarios.** Estos tratamientos corresponden a la parte final del proceso, es decir, cuando se produce la descarga del Ril tratado en el lugar de recepción final, se conocen como tratamientos complementarios (Tchobanoglous, 2000).

## 2.5 Leyes y disposiciones de parámetros

En Chile, existen diversas leyes y decretos supremos que describen las condiciones que deben cumplir las empresas para el vertido de sus Riles a cursos de aguas naturales ya sea ríos, lagos y mar (Anexo 1).

Además existe la Norma Chilena Oficial Nch1333, que corresponde a los requisitos de calidad del agua para diferentes usos, en la cual se da gran importancia a la disposición del uso de agua en riego. De esta norma se resalta los requisitos bacteriológicos, el cual detalla que “El contenido de coliformes fecales en aguas de riego destinados al cultivo de verduras y frutas que se desarrollan a ras de suelo y que habitualmente se consumen en estado crudo, debe ser menor o igual a 1000 coliformes/100ml”(Nch1333, 1978).

Además, existen variadas normas internacionales que Chile ha suscrito, relacionadas con los Riles y que se describen a continuación (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Normativa Internacional suscritas por Chile.

| INSTRUMENTO LEGAL<br>INSTITUCIONES INVOLUCRADAS                                                                                 | TEMÁTICAS                                                                                                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IL: Decreto Supremo N°476/77 del Ministerio de Relaciones Exteriores.</b><br><b>II: Ministerio de Relaciones Exteriores.</b> | Convenio sobre prevención de la contaminación del mar por vertimiento de desechos y otras materias.                                                                    |
| <b>IL: Decreto Supremo N°474/77 del Ministerio de Relaciones Exteriores.</b><br><b>II: Ministerio de Relaciones Exteriores</b>  | Convenio internacional para prevenir la contaminación de las aguas del mar por hidrocarburos.                                                                          |
| <b>IL: Decreto Supremo N°475/77 del Ministerio de Relaciones Exteriores.</b><br><b>II: Ministerio de Relaciones Exteriores.</b> | Convenio Internacional sobre responsabilidad civil por daños causados por la contaminación de las aguas del mar por hidrocarburos.                                     |
| <b>Decreto Supremo N°425/86 del ministerio de Relaciones Exteriores.</b><br><b>II: Ministerio de Relaciones Exteriores</b>      | Acuerdo sobre cooperación regional para el combate contra la contaminación del Pacífico Sudeste, por hidrocarburos y otras sustancias nocivas, en casos de emergencia. |
| <b>IL: Decreto Supremo N°295/86 del Ministerio de Relaciones Exteriores.</b><br><b>II: Ministerio de Relaciones Exteriores.</b> | Protocolo para la Protección del Pacífico Sudeste contra la contaminación proveniente de fuentes terrestres.                                                           |

|                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IL: Decreto Supremo N°656/86 del Ministerio de Relaciones Exteriores.</b><br><b>II: Ministerio de Relaciones Exteriores.</b>                                                         | Protocolo complementario del acuerdo sobre la cooperación regional para el combate contra la contaminación del Pacífico Sudeste por hidrocarburos y otras sustancias nocivas en casos de emergencia. |
| <b>IL: Decreto N°867/78 del Ministerio de Obras Públicas. Norma Chilena Oficial NCh 1333 Of 78.</b><br><b>II: Ministerio de Salud. Ministerio de Obras Públicas.</b>                    | Establece los requisitos de calidad del agua para diferentes usos (potable, bebida, animales, riego, recreación y estética, y vida acuática).                                                        |
| <b>IL: Decreto Supremo N°735/69 del Ministerio de Salud. Reglamento de los Servicios de Agua destinados al Consumo Humano.</b><br><b>II: Servicios de Salud.</b>                        | Establecer las concentraciones máximas aceptables de sustancias o elementos químicos que puede contener el agua para consumo humano.                                                                 |
| <b>IL: Decreto N°11/84 del Ministerio de Salud. Norma Chilena NCh 409/1. Of.84.</b><br><b>II: Ministerio de Salud.</b>                                                                  | Determina los requisitos de orden fisicoquímico, radioactivo y bacteriológico que debe cumplir el agua para la bebida de seres humanos.                                                              |
| <b>IL: Decreto supremo N°745/92 del Ministerio de Salud. Reglamento sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Mínimas en los lugares de trabajo.</b><br><b>II: Servicios de Salud.</b> | Establece límites permisibles para las concentraciones ambientales en lugares de trabajo.                                                                                                            |

Estas últimas disposiciones son normas internacionales que están en vigencia en Chile, y que en el mundo se visualizan como Normas de internación de productos.

## 2.6 Biorremediación

**2.6.1 Fundamento.** El término biorremediación o biorrecuperación se utiliza para denominar una variedad de sistemas de recuperación que degradan, transforman, eliminan o disminuyen la toxicidad de contaminantes orgánicos o inorgánicos a través de la actividad biológica natural de organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.), principalmente microorganismos. También se emplean los términos biocorrección y biorrestauración. En contraste con esta definición amplia, es frecuente que por biorremediación sólo se entiendan los procesos llevados a cabo por microorganismos, y que si hay participación de plantas en el proceso se hable de fitorremediación (Eweis, 1999).

**2.6.2 Organismos participantes.** Entre los microorganismos destacan especialmente las bacterias, los seres vivos con mayor capacidad metabólica del planeta. Las bacterias pueden degradar prácticamente cualquier sustancia orgánica. Si la sustancia se degrada completamente se habla de mineralización; este es el proceso ideal, pero no siempre ocurre. Algunas sustancias no son degradadas sino transformadas en otras lo que se conoce como biotransformación (Matlakowska *et al.*, 2010), la cual puede ser peligrosa, ya que la nueva sustancia formada puede ser tanto o más nociva que la inicial. Finalmente hay sustancias que no son degradadas y se las denomina recalcitrantes. Éstas se acumulan durante mucho tiempo en el medio ambiente, especialmente si además son resistentes a procesos físico/químicos como la radiación ultravioleta o la oxidación. Las bacterias además, pueden eliminar los contaminantes en ambientes donde hay oxígeno (llamados aeróbicos), pero también en ambientes sin oxígeno (llamados anaeróbicos), ya que pueden respirar otras sustancias diferentes al oxígeno (aceptores de electrones), como por ejemplo nitrato, sulfato, hierro (III), manganeso, selenio, entre otras (Ben Othman *et al.*, 2008).

**2.6.3 Tipos de contaminantes eliminados por Biorremediación.** Los compuestos orgánicos suelen ser degradados total o parcialmente y eliminados por completo del ecosistema. Por ejemplo, compuestos contaminantes tales como tolueno, fenol o polibifenilos clorados (PCBs) los que pueden ser utilizados como fuente de carbono por

bacterias, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas. Bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia* o *Mycobacterium* pueden eliminar hidrocarburos aromáticos como tolueno o naftaleno, pesticidas como atrazinas, aditivos de la gasolina como tricloruro de etilo o sustancias venenosas como el cianuro potásico, tanto de ambientes sólidos (suelos) como líquidos (ríos y mares).

Pero, además muchas bacterias son capaces de modificar sustancias químicas peligrosas, transformándolas en otras menos tóxicas. Así, algunas bacterias pueden reducir la biodisponibilidad (hacerla menos accesible y por tanto menos tóxica) de metales pesados tales como mercurio, arsénico, cromo, cadmio, zinc o cobre (Mahro, 2000).

**2.6.4 Tipos de Biorremediación.** Existen dos tipos de Biorremediación bien definidos:

**2.6.4.1 Biorremediación In Situ.** Consiste en tratar las aguas, suelos o arenas contaminadas sin sacarlas del lugar en el que se encuentran. Para ello, tanto en métodos de bioestimulación como en bioaumentación, se puede disponer una red de bombeo de nutrientes o un sistema de inoculación o bien una simple aireación del terreno con bombeo (“bioventing” y “air sparging”) o con arado (“landfarming” in situ).

**2.6.4.2 Biorremediación Ex Situ.** Los procesos de tratamiento se llevan a cabo tras la excavación del medio contaminado, ya sea en simples biorreactores (técnicas de “bioslurry” para suelos), en plantas de tratamiento (técnicas “pump & treat”), en biopilas, o sobre láminas impermeables (“landfarming” ex situ), etc. Las ventajas de estos procedimientos frente a los primeros radican en la posibilidad de optimizar mejor los parámetros microbiológicos, así como el control del proceso; a cambio, lógicamente, de un mayor costo (Blackburn, 1993).

**2.6.5 Aplicación.** La Biorremediación es aplicada hacia cualquier ambiente contaminado que se desee revertir, puede tratarse de diversas matrices ya sea agua, suelo ó aire. La aplicación depende de la estrategia de recuperación de las actividades catabólicas de los organismos y, por tanto, de su capacidad para usar los contaminantes como alimento (fuente de Carbono y energía). El proceso de Biorremediación incluye, además de la biodegradación de los contaminantes, de reacciones de oxido-reducción, procesos de adsorción e intercambio iónico, e incluso de reacciones de quelación que provocan la inmovilización de metales.

**2.6.5.1 Ventajas.** La biorremediación es un proceso amigable con el medio ambiente ya que la intrusión y modificación ambiental es reducida (para algunos la principal ventaja radica en que la calidad de la matriz a biorremediar no se ve alterada durante el proceso, no se perjudican ni la estructura ni las características biológicas); son efectivos (los contaminantes son destruidos eficazmente) y eficientes (el costo es comparativamente bajo, salvo para los sistemas más complejos); no requiere en general componentes estructurales o mecánicos complejos; pueden combinarse con otras tecnologías en un tren de tratamientos.

**2.6.5.2 Desventajas.** Los inconvenientes de la biorremediación son la dificultad o imposibilidad de degradar contaminantes inorgánicos (y algunos orgánicos); la imposibilidad de emplearla si las condiciones no son suficientemente favorables para el crecimiento microbiano (LaGrega, 2001).

## **2.7 Microalgas**

Las microalgas son un conjunto de microorganismos en su mayoría fotosintéticos, unicelulares, filamentosos que forman cadenas, colonias o cenobios. Están presentes en

agua salada, agua dulce o en el suelo. Los grupos que las conforman presentan individuos con notables similitudes morfológicas, las cuales surgen como respuestas adaptativas convergentes al medio físico en el que habitan: altamente heterogéneo y caracterizado por diversos gradientes de luz, temperatura y nutrientes que son modificados por la turbulencia del agua. Su hábitat varía a diferentes profundidades de aguas dulces, salobres o marinas. Se cultivan en masa y tienen diferentes destinos como: producción de compuestos biológicos, hidrógeno, biodiésel y biofertilizantes, también se aplican al tratamiento de aguas (Valdés, 2008)

**2.7.1 Antecedentes.** La importancia y aplicación de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, tiene sus antecedentes en la época de Caldwell (1940), quien reporta los primeros estudios, sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos purificadores de aguas residuales, debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos contenidos en esta agua, que actúan como medio cultivo para favorecer el crecimiento de las microalgas.

Posteriormente (Oswald, 1957), introduce un nuevo concepto en la producción masiva de microalgas, al llevar a cabo el tratamiento de las aguas residuales, obteniendo una producción de biomasa vegetal con un alto contenido protéico, lo que finalmente se considera como una valorización del proceso de recuperación de aguas residuales mediante el cultivo de microalgas. Es en la década de los sesenta, en Richmond, California (1960), cuando se plantea el sistema de cultivo más grande de los Estados Unidos, llegándose a alcanzar una producción de 12-18 g/L de biomasa de microalgas, considerándose este valor muy alto. Es a partir de este cultivo que se desencadenó en diversos países, el desarrollo a gran escala del cultivo masivo de microalgas en sistemas cerrados y abiertos, con diferentes finalidades.

De acuerdo a lo planteado anteriormente, se presenta el cultivo de microalgas, como una de las mejores alternativas para el tratamiento de aguas residuales, como un sistema biológico de tratamiento terciario de bajo costo, debido a la remoción de nutrientes y

metales pesados, como una solución a los problemas de contaminación y eutroficación ocasionados por las descargas industriales a los afluentes naturales (González, 2005).

**2.7.2 Clasificación.** En el planeta, las algas forman una inmensa población de individuos de estructura celular simple. Se conocen aproximadamente 110 mil especies, reunidas en cuatro grandes grupos, que son: las "cianofitas" (Cyanophyceae) o algas azul-verdosas, las "clorofitas" (Chlorophyceae) o algas verdes; las "feofitas" (Phaeophyceae) o algas pardas, y las "rodofitas" (Rhodophyceae) o algas rojas.

Su tamaño es variable, algunas, como el alga azul-verdosa del género *Spirulina*, son microscópicas, es decir, forman filamentos que miden milésimas de milímetros; en cambio, existen otras, gigantes, que llegan a medir hasta 60 metros, como el alga parda llamada "sargazo gigante" (Macrocystis). También en su forma presentan gran diversidad; por ejemplo, el alga roja del género *Porphyra* tiene el aspecto de una lengüeta de bordes ondulados; Ulva, que es una clorofita, parecida a una hoja de lechuga; mientras que el "alga listón" (Nereocystis) es un alga parda que tiene el aspecto de plumero (Medina, 2005).

**2.7.3 Fases de Crecimiento.** Existen de 3 a 5 fases generalmente reconocidas del crecimiento de la población de microalgas, las cuales corresponden al estado nutricional de las células. La duración de cada fase puede alargarse dependiendo de diferentes factores como: temperatura, fuente de luz, composición del medio de cultivo, tamaño del inóculo y estado fisiológico del alga. Las fases se detallan a continuación:

- **Fase de Inducción.** Las células en el cultivo apenas empiezan a absorber los nutrientes presentes en el medio. No se registra un incremento aparente en el número de células debido a la necesidad de un ajuste bioquímico.

- **Fase Exponencial.** La reproducción celular es extremadamente rápida y constante, de tal manera que el crecimiento de la población celular es exponencial.
- **Fase de Declinación.** El crecimiento de las células continúa, pero en menor proporción, esto puede deberse a factores como: el pH del medio, agotamiento de nutrientes, reducción de la intensidad de la luz y autoinhibición debido a la producción de metabolitos tóxicos, entre otros.
- **Fase Estacionaria.** El número de células permanece constante.
- **Fase de Muerte.** Disminución progresiva de células viables, incrementándose el número de células muertas y las condiciones desfavorables como el aumento del número de bacterias, hongos y espuma, producto de la destrucción celular, genera el colapso final del cultivo (DODD, 1980).

**2.7.4 Aplicaciones.** La aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales es la utilización y transformación de los nutrientes a biomasa, con la consecuente producción de oxígeno, para mejorar la calidad del efluente así como la disponibilidad de éste para la continua oxidación bacteriana de la materia orgánica en sistemas integrales, mediante el ciclo de oxigenación fotosintética de aguas residuales.

La mayoría de las bacterias que actúan en la descomposición de los desechos orgánicos, consumen oxígeno para vivir y producen dióxido de carbono, uno de los gases del efecto invernadero más peligrosos para el calentamiento global. Las algas, por el contrario, utilizan dióxido de carbono para crecer que luego transforman en oxígeno. Esta es una ventaja que permite utilizar las microalgas para depurar las aguas residuales, ya que forman una simbiosis con las bacterias, que también son necesarias para eliminar los contaminantes orgánicos.

Las algas, requieren luz y otros nutrientes inorgánicos para la fotosíntesis, entre estos se menciona el nitrógeno y el fósforo, compuestos que también están presentes en las aguas residuales, y que es necesario eliminar. Así que un sistema simbiótico de microalgas y bacterias es el ideal para tratar residuos agrícolas e industriales, ya que tienen un costo muy bajo en instalación y mantenimiento.

Por otro lado, algunas especies de microalgas juegan un papel fundamental en la fertilidad de los suelos, por ejemplo, las cianofitas transforman el nitrógeno molecular en amonio en una forma similar a las bacterias; otras son útiles en la recuperación de los suelos salino y calcáreo; otras son aprovechadas como alimento tanto para animales como para el hombre en una diversidad de productos y suplementos alimenticios (González, 2001).

**2.7.5 Tipos de sistemas de tratamiento con microalgas.** Existen diferentes tipos de sistemas de tratamiento que utilizan cultivos microalgales, los cuales se explican a continuación:

- **Pileta no aireada:** es un sistema muy simple, de poca profundidad, el cual tiene la posibilidad de combinar dos tipos de tratamiento, como son el secundario y terciario; sin embargo presenta bajas eficiencias y es difícil la recuperación de microalgas.
- **Pileta aireada:** es un sistema más complejo de oxidación, el cual tiene un mecanismo de aireación, por lo que aumenta la oxigenación, presentando de esta manera una mayor eficiencia y recuperación de la biomasa por filtración en grava.
- **Lagunas de oxidación:** son estanques poco profundos (entre 30 y 60 cm), con mecanismos de aireación y agitación, los cuales favorecen el crecimiento de las microalgas. En este sistema se favorece el aumento de la degradación bacteriana, ocasionado por el incremento en la oxigenación, lo cual provoca la proliferación de microalgas, y por lo tanto, aumenta la eficiencia global del tratamiento de las aguas residuales.

- **Lagunas de alta tasa de oxidación:** son estanques poco profundos (entre 30 y 60 cm), con mecanismos de aireación y agitación, el cual se aplica a las aguas residuales con tratamiento secundario, siendo estas inoculadas con altas densidades microalgales. En la cual se obtiene una biomasa mixta, la cual aumenta la tasa de oxidación, la tasa de remoción y por lo tanto la eficiencia global del sistema.
- **Lagunas de oxidación de algas:** son estanques poco profundos (entre 30 y 60 cm), con mecanismos de aireación y agitación, sin embargo en este caso, está orientado hacia la producción de biomasa con fines de alimentación y/o producción de metabolitos de interés comercial (pigmentos) (Gallardo, 1990).

La selección del sistema de tratamiento va a depender del tipo de agua residual a tratar, así como de la extensión de superficie requerida para el estanque de cultivo, y de los microorganismos a utilizar, ya que los objetivos son el incremento de la producción de biomasa microalgal (sin limitación de nutrientes), y la optimización del proceso integral es decir, la eliminación total de nutrientes.

La aplicación de estos sistemas, pueden presentar ciertas desventajas, como son: la necesidad de grandes extensiones de superficie requeridas para los estanques de cultivo, y la recuperación de la biomasa de microalgas en cuanto a los aspectos tecnológicos y económicos. Sin embargo, se plantea en el primer caso, un adecuado manejo de parámetros de cultivo, como la disminución del área de cultivo en estanques pequeños, con altas densidades microalgales, con cepas de microalgas activadas (adaptadas al efluente) y bajos tiempos de retención hidráulica. En el segundo caso se propone aplicar procesos de sedimentación en obscuridad, el empleo de floclulantes, como el quitosán, floclulación-decantación y autofloclulación y biofloclulación presentada por algunas especies de microalgas (Gallardo, 1990).

**2.7.5.1 Ventajas del tratamiento.** El proceso integral del tratamiento terciario, presenta ventajas tan importantes como el mejoramiento de la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético, así como el aprovechamiento de los nutrientes que

están siendo desechados al ser incorporados a la biomasa, con la consecuente producción y generación de oxígeno. Esto trae como consecuencia que en un proceso global se produzca:

- La remoción de sales como amonio, nitritos, nitratos y ortofosfatos.
- El aumento del pH de los efluentes a través del proceso fotosintético, que favorece la precipitación de ortofosfatos.
- La eliminación de nitrógeno amoniacal por efecto de intercambio gaseoso.
- La disminución de la demanda biológica de oxígeno.
- La oxigenación del agua, favoreciendo la oxidación continua de materia orgánica.
- La acción bactericida, reduciendo la sobrevivencia de organismos patógenos.
- La recuperación de CO<sub>2</sub>, liberado en los procesos, mediante su empleo en el proceso fotosintético.
- Un alto rendimiento en la bioconversión de la energía solar (4 y 8%) respecto a algunas plantas agrícolas convencionales de azúcar y sorgo que tiene un rendimiento del 1.5% (Kojima, 2001).

**2.7.5.2 Eficiencia.** Finalmente la eficiencia de este proceso, depende de varios factores tales como:

- Tipo de efluente a tratar: doméstico, agrícola e industrial.
- Características de operación: carga orgánica e hidráulica.
- Contaminantes (organismos depredadores), que afectan la composición de la biomasa, restringiendo las aplicaciones.
- Profundidad de los estanques y de los mecanismos de agitación.
- Diferente temperatura e intensidad luminosa, debido a las variaciones estacionarias, así como el fotoperiodo (luz-obscuridad) o luz continua.

Algunos aspectos a considerar en la eficiencia del proceso son: la adecuada combinación de los parámetros anteriormente mencionados, así como el mantenimiento del cultivo en óptimas condiciones, favoreciendo la elevada eficiencia de remoción del proceso, con la finalidad de alcanzar las máximas densidades algales (González, 2001).

## 2.8 Generalidades de algas verde azules o cianobacterias.

Las cianobacterias son organismos procariotas, y se engloban en el reino monera, y comparten características comunes con otras bacterias fotosintéticas, así como con el resto de las bacterias. Durante mucho tiempo, se han considerado algas, *Cianophyta*, literalmente algas azules. Su nombre vulgar, algas verde azuladas o cianofitas, todavía aparece frecuentemente en la literatura no especializada (Sánchez, 2011).

Las cianobacterias son organismos desprovistos de membrana nuclear y mitocondrias; difieren de otros procariotes en la composición de sus ácidos grasos, ya que frecuentemente presentan ácidos grasos no saturados con dos o más enlaces dobles. Poseen solamente clorofila-*a* y un fotosistema II (PS-II). Este fotosistema, así como los pigmentos fotosintéticos, los pigmentos accesorios y los componentes del transporte de electrones, están incluidos en los tilacoides (sistemas membranosos fotosintéticos). Íntimamente ligados al sistema clorofílico se encuentran unos agregados llamados ficobilisomas o ficobilinas. Estos gránulos contienen en particular, un pigmento esencial para el transporte de energía hacia el PS-II, la ficocianina, proteína que posee un grupo prostético del tipo polipirrol, el cual le confiere un color azul, así como una fluorescencia roja de excepcional eficiencia. Las cianobacterias asimilan el carbono a través del ciclo de Calvin y almacenan energía y carbono en forma de glucógeno (Rheinheimer, 1987).

Las cianobacterias poseen diferentes esquemas metabólicos que tienen en común, la ausencia del ciclo de Krebs completo. Muchas de ellas, sobre todo las filamentosas, son capaces de reducir (fijar) el nitrógeno atmosférico, gracias a unas estructuras llamadas heterocistos (Abbeyes, 1989).

La mayoría de las cianobacterias son capaces de desplazarse en los líquidos, debido a vesículas gaseosas, o en el caso de las cianobacterias filamentosas, por deslizamiento de hasta 25 micras por segundo mediante microfibras. La reproducción en estos organismos se efectúa por escisión simple o múltiple, por gemación o por fragmentación. Algunas de sus especies producen células especializadas (acinetos), resistentes a la sequedad y a la

congelación, que pueden germinar cuando las condiciones se vuelven favorables (Whitton, 1992).

Las cianobacterias se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, tanto en aguas continentales como en el mar, y por lo general toleran ambientes extremos mejor que las algas; gracias a esto, desempeñan un papel importante en los fenómenos biológicos de las aguas superficiales. Existen formas libres y otras fijas. Estas últimas crecen sobre las plantas y los animales acuáticos, así como sobre algunos sustratos inertes como piedras. Algunas especies viven en simbiosis con plantas y animales inferiores (Rheinheimer, 1987).

## **2.9 Cianobacteria *Arthrospira* sp.**

**2.9.1 Características Generales.** Se trata de un alga azul, incluida dentro de la Clase de las denominadas Cianofitas o Cianobacterias, de carácter multicelular, cuyas células cilíndricas tienen un ancho de 3 a 12 milimicrones, alcanzando a veces hasta 16 milimicrones. Sus filamentos presentan un esquema en forma de hélice abierta y llegan a medir entre 100 y 200 milimicrones. Las condiciones de esta hélice y sus medidas dependerán de las condiciones ambientales y del crecimiento del alga (Tomaselli, 2000).

*Arthrospira* sp. es una cianobacteria filamentosa, autótrofa, reconocida también como alga verde-azul, y que deriva su nombre de la naturaleza helicoidal o en espiral de sus filamentos.

*Arthrospira* sp. puede cultivarse fácilmente, en biorreactores y sistemas acuosos abiertos, naturales y artificiales, en los que el medio de cultivo líquido contenga sales como bicarbonato de sodio y nitratos, que contribuyen a la alcalinidad del medio, uno de los factores más determinantes en el aumento y producción de biomasa.

La iluminación es importante para *Arthrospira* sp. por ser un organismo fotoautotrófico y para lograr una adecuada distribución de nutrientes, debe mantenerse en agitación por medio mecánico o por burbujeo.

Como producto de los análisis que se han hecho sobre la composición bioquímica de *Arthrospira* sp., se ha determinado que contiene proteínas, vitaminas, ácidos grasos, minerales, carbohidratos, ácidos nucleicos y pigmentos (Vonshak *et al.*, 2000). Componentes ideales para ser utilizada en nutrición animal o humana.

Las ficobiliproteínas son macromoléculas componentes del aparato fotosintético de las cianobacterias y consisten de proteínas unidas covalentemente a las ficobilinas. Las ficobiliproteínas se dividen en tres grupos: ficoeritrina (PE), ficocianina (PC) y aloficocianina (AP). Estas moléculas están arregladas en partículas llamadas ficobilisomas (Behrens, 1999, Fray, 1983, Olvera-Ramírez, 2003). Esto es muy importante porque se reconoce otro uso potencial de *Arthrospira* sp. en el uso de sus ficobiliproteínas como colorantes naturales.

**2.9.2 Antecedentes *Arthrospira* sp.** En un estudio de la Biosorción de metales pesados influenciadas por la composición química de la biomasa de *Spirulina* sp. (Carrillo *et al.*, 2002), se evaluó la capacidad de células de *Spirulina* sp. con diferentes composiciones químicas para la adsorción de Pb (II), Cd (II) y Cr (VI). Dos de los ensayos de biomasa contenían un alto porcentaje de proteína (68,95 +/- 0,30 y 63,73 +/- 0,25%) como resultado de haber sido cultivadas en medio Zarrouk y expuesta a dos intensidades de luz (66 micromoles de fotones  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  y 144 micromoles de fotones  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) en cultivos discontinuos. Un tercer tipo de biomasa, cultivada en un medio "complejo" y expuesta a 66 micromoles de fotones  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  contenía un alto porcentaje de lípidos (30,08 +/- 1,92). Finalmente, el cuarto tipo de biomasa fue enriquecida en polisacáridos (25,54 +/- 0,51%) luego de ser cultivada en un medio "complejo", pero expuesta en 144 micromoles de fotones  $\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , se encontró que la composición química de *Spirulina* sp. tenía una fuerte influencia sobre su capacidad de adsorción. Las máximas capacidades de adsorción de Pb y

Cd fueron de 172,41 mg/g a un pH 5 y 54,05 mg/g a un pH 4,5 respectivamente, también las mayores adsorciones se produjeron cuando las células mostraron un contenido de polisacáridos superior. En el caso del Cr VI, el más alto q (max), fue exhibida por las células cultivadas en medio Zarrouk y mostrando el mayor contenido de proteína (a pH 2,0). El pH no afectó la adsorción de Pb II en el intervalo de 3 a 5,5, ni de Cd en el intervalo de 4 a 7 para Cr VI la adsorción sólo se observó a un pH igual o inferior a 2.

### 2.9.3 Clasificación Taxonómica de *Arthrospira* sp. (Checklist, 2011).

Reino: Bacteria  
 Philum: Cyanobacteria  
 Clase: Cyanophyceae  
 Orden: Oscillatoriales  
 Familia: Phormidiaceae  
 Género: *Arthrospira*  
 Especie: *Arthrospira* sp.

**2.9.4 Reproducción.** La reproducción se lleva a cabo por fisión binaria transversal. El alargamiento del tricoma o filamento se debe a las numerosas divisiones transversales de sus células. La multiplicación ocurre solo por fragmentación del filamento y es de naturaleza intracelular, involucrando la destrucción de la célula intercalar existente dentro de los mismos filamentos (Leopoldo, 2010).

**2.9.5 Cultivo.** El crecimiento de *Arthrospira* ocurre entre los 25 – 40 °C, siendo el rango de mayor producción a temperaturas más elevadas que pueden ir entre 35 – 40 °C y con un pH entre 9 y 11, requiere de iluminación estándar, salinidades de 18 – 22 UPS y abundante agitación (Zarrouk, 1966, Pedraza, 1989).

Las cianobacterias, por ser organismos fotótrofos, necesitan en su metabolismo elementos inorgánicos de partida para formar biomasa, tales como, nitrógeno, oxígeno, carbono, hidrógeno, fósforo y azufre, los que intervienen en la formación de carbohidratos, grasas y proteínas (Rodrigues, 2010).

## **2.10 Separación y post-tratamiento de las algas producidas.**

**2.10.1 Separación.** Las microalgas son en general difíciles de separar por su pequeño tamaño, además por su tamaño, algunas cianobacterias sedimentan (decantación espontánea) o flotan, y algunas microalgas forman agregados (biofloculación), lo que facilita su decantación.

La técnica de separación depende de la microalga en cuestión, la densidad del cultivo, el uso posterior y factores económicos como el precio del subproducto obtenido. En general, tiene lugar en dos etapas: en una primera etapa se produce una separación más basta en la que se alcanza una concentración de microalgas entre el 2 y 7%. Proceso que se puede realizar ya sea por floculación, sedimentación por gravedad o flotación. En una segunda etapa se realiza un secado más fino y de mayor costo energético, mediante centrifugación, filtración o ultrasonidos.

La eficacia de la decantación depende del radio de los microorganismos y su densidad. Es el método más empleado en el tratamiento de agua, debido a las grandes cantidades de biomasa con que se trabaja y su bajo valor añadido. Sin embargo, sólo es posible de utilizar en algunos casos, como en el de la *Spirulina* sp. Los ultrasonidos previos a la decantación han demostrado que optimizan la eficiencia de agregación y el factor de concentración del proceso.

La filtración se puede llevar a cabo mediante flujo tangencial (membranas externas) o fibra hueca (membranas sumergidas), así como mediante microfiltración, ultrafiltración, filtración a vacío, etc. Sin embargo, las microalgas pueden causar un importante deterioro

en las membranas debido a que segregan materia orgánica extracelular, un material mucilaginoso que ayuda a la obtención de biomasa.

**2.10.2 Post-tratamiento.** La biomasa, una vez separada del medio de cultivo, suele ser deshidratada para evitar reacciones de descomposición, se deshidrata mediante secado al sol, a baja presión, con spray, en tambores, en lecho fluidizado o por congelación. En el caso de extracción de lípidos para la obtención de biodiesel, es importante encontrar el compromiso entre grado de secado y rentabilidad del proceso (valor energético del producto final).

En el caso de extracción de productos de interés, es común la necesidad de romper previamente las células, para lo cual se emplean homogeneizadores, autoclavado, adición de ácido hidroc্লórico o NaOH y lisis alcalina. También se llevan a cabo extracciones con disolventes.

## **2.11 Control microbiológico.**

Para alcanzar la calidad microbiológica es necesario aplicar pasos ordenados a través de la cadena de producción. A lo largo de esta cadena se pueden presentar una serie de inconvenientes que pueden llevar a obtener un producto o productos que tengan características muy distintas a las esperadas, tanto para el consumidor final como para la empresa. Por esta razón, para garantizar la calidad es importante tener en cuenta que ésta se basará en el control de la presencia y la multiplicación de los microorganismos ya que factores como el ambiente, temperatura, humedad relativa entre otros, pueden ocasionar su presencia. Los problemas microbiológicos suelen presentarse cuando no se alcanza el efecto deseado durante el proceso o por los sistemas de conservación que se tengan, y esto suele ser consecuencia de errores en la manipulación o procesado. La detección de dichos errores, su rápida corrección y prevención, son el principal objetivo de cualquier sistema de control microbiológico (Forysthe, 2000).

**2.11.1 Criterios microbiológicos.** Para diferenciar un producto de calidad microbiológica admitido de una de calidad no admitida, es necesario aplicar normas o criterios microbiológicos que serán específicos para cada producto. La forma más segura, es emplear el número o tipo de microorganismos en el producto o sobre el producto, para evaluar su calidad y su seguridad microbiológica (Forsythe, 2002). Todo criterio microbiológico debe incluir:

- Los microorganismos contaminantes: Aquellos que pueden ser de características patógenas o no patógenas, importantes en salud pública.
- Los métodos analíticos: Mediante los cuales, se busca el microorganismo implicado o sus toxinas.
- Los planes de muestreo: Obtener una muestra representativa de un determinado lote o producto, teniendo en cuenta el número de muestras que se toman y las que se analizan.
- Los límites microbiológicos: El límite contemplado dentro de la normatividad para el producto evaluado (Forsythe, 2002).

**2.11.1.1 Tipos de criterios:**

- Obligatorios: Aquel que no debe sobrepasar la norma. Si el producto no cumple las normas establecidas, será de carácter obligatorio establecer un tipo de corrección, incluyendo su rechazo, destrucción, reproceso o la utilización para otro tipo de productos (Forsythe, 2002).
- Consultivos: Permiten establecer límites de aceptabilidad y estos a su vez sirven para alertar las posibles deficiencias en el proceso (Forsythe, 2002).

Componentes de un examen microbiológico:

- Muestreo: Debe ser de manera adecuada, siguiendo los protocolos apropiados, las muestras deberán ser estadísticamente significativas y por esta razón se llevan a cabo planes o programas de muestreo.
- Método Analítico: Se busca el más sensible, que permita lo que se quiere, de igual manera se busca también que sea económico.
- Interpretación de resultados: Conocimiento y significado de los microorganismos presentes en el producto evaluado (Forsythe, 2002).

### **3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1 Material de Laboratorio**

##### **3.1.1 Material de vidrio**

- Beakers (25, 50, 100 ml) GERMANY
- Baguetas
- Pipetas ( 1,2,5,10 ml ) GERMANY
- Matraces aforados ( 25, 50, 100 ml ) GERMANY
- Probeta (50ml, 100 ml) GERMANY

##### **3.1.2 Material biológico**

- El material biológico para este ensayo consta de las cepas de *Arthrospira* sp. que se adquirieron en la Empresa Solárium Biotechnology S.A.
- Los residuos industriales líquidos (Riles) provienen de una empresa faenadora avícola.

##### **3.1.3 Equipos de laboratorio**

- Potenciómetro 808 TitrandometROHM
- Microscopio MOTIC
- Termómetro GERMANY
- Oxímetro HANNA

- Incubadora ZHCHENG
- Luxómetro LI-COR
- Salinómetro Modelo Universal Serie 300

#### **3.1.4 Reactivos**

- Etanol al 95%
- Buffer de Calibración pH 4.1
- Buffer de Calibración pH 7.1

#### **3.1.5 Otros materiales**

- Papel Whatman # 1
- Difusores
- Mangueras
- Bombas

Los experimentos se realizaron, en el “Laboratorio de Química Ecológica y Bioprocesos” de la Escuela de Ingeniería Industrial Informática y Sistemas (EUIIS) de la Universidad de Tarapacá Campus Velásquez sede Arica.

### **3.2 Medios de cultivo para el Crecimiento.**

Para el cultivo de *Arthrospira* sp. se utilizó el caldo de cultivo selectivo *Spirulina* (Anexo 2) a una temperatura de 25°C+/-5°C, se requiere también de aireación constante

para tener un crecimiento homogéneo evitando la sedimentación, también se tuvo el cultivo a luz constante para asegurar un incremento de la biomasa, agregándole medio de cultivo *Spirulina* se mantuvo a las cepas constantemente en fase de crecimiento.

### 3.3 Residuos Líquido Industrial.

Se utilizó Ril procedente de una planta faenadora avícola, el cuál fue previamente tratado por los procesos obligatorios de la empresa. En una primera etapa, este Ril sirvió para el ensayo de Biorremediación.

### 3.4 Ensayo de Biorremediación.

Se realizaron 3 tratamientos más 1 control cada uno por triplicado utilizando cuatro matraces Erlenmeyer de 1L, los tratamientos se detallan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Ensayos de Biorremediación realizados bajo condiciones no controladas en dependencias de la universidad de Tarapacá.

| Muestras      | RIL(ml)/ Inóculo (ml) | RIL(ml)/inóculo(%) | Volumen Final (mL) |
|---------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| Grupo Control | 0/1000                | 0/100              | 1000               |
| Trat.1        | 250/750               | 25/75              | 1000               |
| Trat.2        | 500/500               | 50/50              | 1000               |
| Trat.3        | 750/250               | 75/ 25             | 1000               |

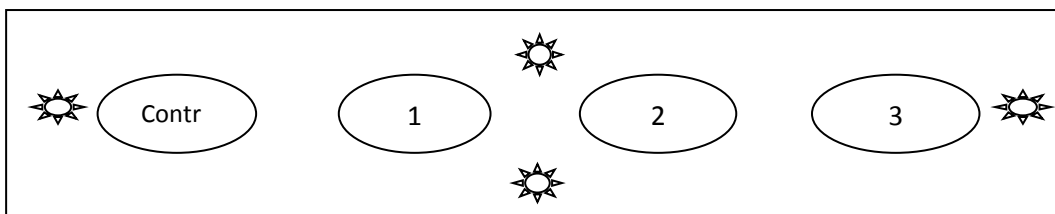
**3.4.1 Monitoreo del Ensayo de Biorremediación.** Durante todo el periodo del ensayo (6 días) se realizó el monitoreo de los parámetros a las 5:00 pm. El ensayo se realizó en un ambiente no controlado a temperatura y luz natural dentro de un invernadero, es decir de acuerdo a las condiciones climáticas del día. Este ensayo permitirá obtener resultados representativos para un proceso de Biorremediación a mayor escala (Figura.4).



**Figura 4.** Ensayo de Biorremediación en Ambiente No Controlado

**3.4.2 Parámetros Monitoreados.** Durante los seis días del ensayo de biorremediación los parámetros monitoreados fueron los siguientes:

**3.4.2.1 Intensidad Lumínica.** Para la medición de la intensidad lumínica se utilizó un luxómetro, que proporcionaba los datos en  $\mu\text{moles}$ , se muestreo en cuatro diferentes puntos para cada conjunto de muestras (Figura.5).



**Figura 5.** Monitoreo de la Intensidad Lumínica.

 : Puntos de muestreo

**3.4.2.3 Temperatura.** Se realizó la medición diaria de la temperatura a las 17.00 hrs durante todo el tiempo que duro el ensayo, utilizando para esto un termómetro digital marca HANNA dentro de cada uno de los matraces, manteniendo las condiciones de esterilidad.

**3.4.2.4 Biomasa Húmeda.** Se tomó muestras interdiarias de cada uno de los matraces, utilizando para ello tubos eppendorf estériles los cuales fueron primeramente rotulados y pesados en una balanza analítica posteriormente se tomó 1.5mL de muestra y se centrifugó a 3500rpm, luego se extrajo el sobrenadante (agua clara) y se volvió a pesar los tubos eppendorf con el precipitado final, la diferencia del peso final menos el inicial nos proporcionó el valor de la biomasa húmeda (g) en 1.5mL de muestra pero para los cálculos respectivos se extrapoló a 1L de muestra.

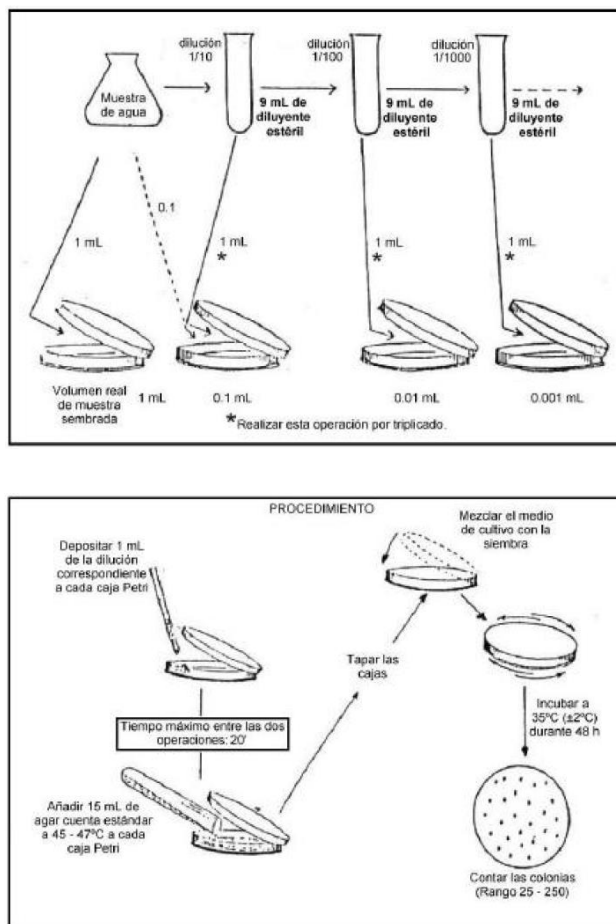
**3.4.2.5 pH.** Se realizó la medición diaria del pH a las 17.00, para ello se utilizó un pHmetro digital marca HANNA midiendo dentro de cada uno de los matraces, manteniendo condiciones de esterilidad.

**3.4.2.6 Oxígeno Disuelto (OD).** Se realizó la medición diaria del Oxígeno Disuelto a las 17.00 hrs, con el uso de un oxímetro digital marca HANNA incorporando este al interior de cada uno de los matraces y midiendo en ppm de oxígeno ( $O_2$ ).

**3.4.2.7 Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO<sub>5</sub>).** Para la medición de la DBO<sub>5</sub>, se midió el oxígeno disuelto inicial (ppm  $O_2$ ) y se incubaron las muestras a 20°C durante cinco días, al quinto día se volvió a medir el oxígeno disuelto final (ppm  $O_2$ ); la diferencia entre el oxígeno disuelto inicial menos el final, nos proporciona la cantidad de material biodegradable en los cinco días. Esta DBO<sub>5</sub> se midió en todas las muestras.

### 3.5 Recuento de bacterias mesófilas aerobias.

Para el recuento de bacterias mesófilas aerobias se siguió la técnica de placa vertida, que se resume en la Figura 6 y se detalla en el protocolo descrito en el Anexo 3.



**Figura 6.** Preparación de diluciones decimales y Procedimiento para el recuento de Bacterias Mesófilas Aerobias (Ramos and Hernandez, 1998).

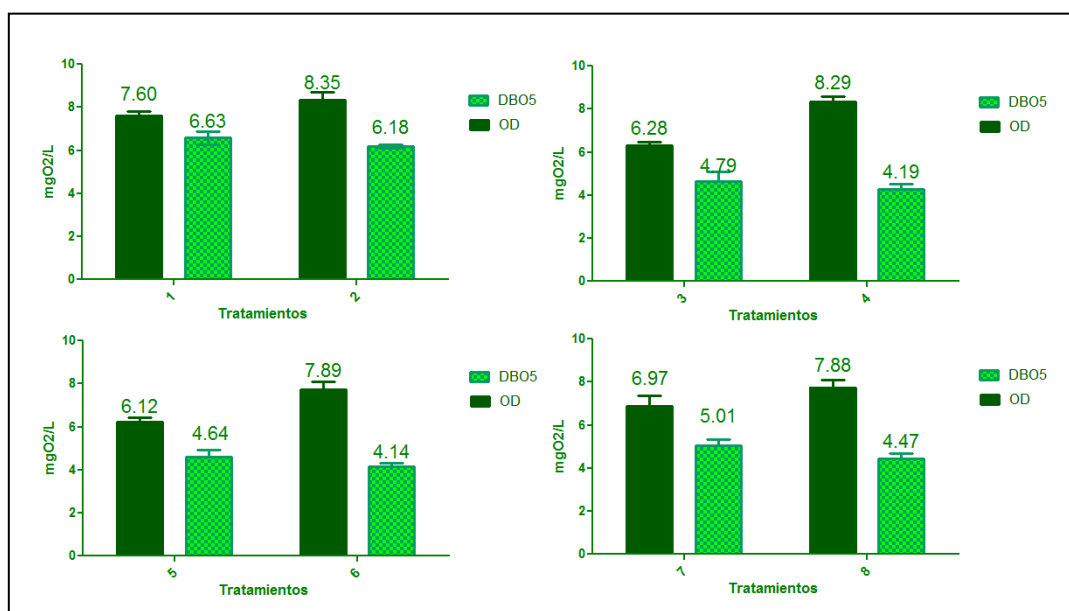
### 3.6 Recuento de coliformes totales y fecales.

Se realizó el recuento de coliformes totales y fecales con la técnica de tubos múltiples o número más probable (NMP). El protocolo seguido en este proceso se encuentra detallado en el Anexo 4.

## 4. PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1 Análisis del Oxígeno Disuelto y la Demanda Bioquímica de Oxígeno en *Arthrospira* sp.

Para este análisis todos los tratamientos fueron sometidos a las mismas condiciones de cultivo explicadas anteriormente. Se realizó la medición de oxígeno disuelto (OD) inicial y fue comparado con la medición del oxígeno disuelto pasado 6 días, que fue el tiempo que duró el ensayo completo, cada uno de los tratamientos demostró el mismo comportamiento, quiere decir que aumentó su oxígeno disuelto hacia el final del ensayo. Por su parte la demanda bioquímica de oxígeno (DBO5) fue evaluada en las mismas condiciones que el OD, la tendencia fue inversamente proporcional, mientras el OD en todos los tratamiento aumento, el DBO5 disminuyó (Figura 7). Además se calculo una tabla de porcentajes en donde se detalla el aumento del OD y la disminución del DBO5 (Cuadro 4).



**Figura 7.** Resultados de Oxígeno Disuelto y Demanda Bioquímica de Oxígeno en todos los tratamientos de biorremediación con *Arthrospira* sp., comparando la medición Inicial (día 0) y medición final (día 6).

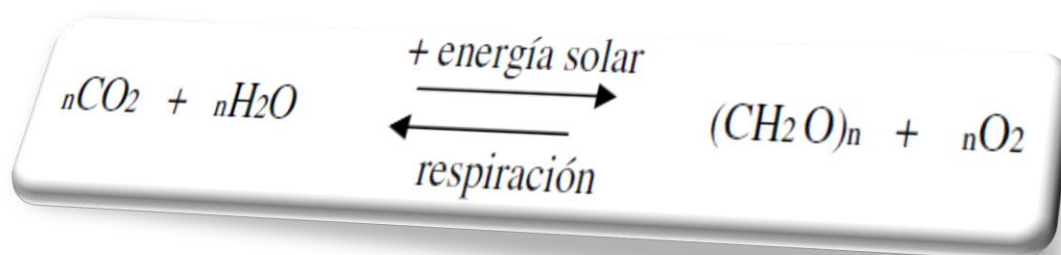
Donde: 1 "Control *Arthrospira* sp. Inicial"  
 3 "75% *Arthrospira* sp./25% Ril Inicial"  
 5 "50% *Arthrospira* sp./50% Ril Inicial"  
 7 "25% *Arthrospira* sp./75% Ril Inicial"

2 "Control *Arthrospira* sp. Final"  
 4 "75% *Arthrospira* sp./25% Ril Final"  
 6 "50% *Arthrospira* sp./50% Ril Final"  
 8 "25% *Arthrospira* sp./75% Ril Final"

**Cuadro 4.** Cuadro resumen en porcentajes del aumento de Oxígeno Disuelto y disminución Demanda Bioquímica de Oxígeno en todos los tratamientos de biorremediación con *Arthrospira* sp., comparando la medición Inicial (día 0) y medición final (día 6).

|                                    | Aumento OD (%) en 6 Días | DESV. STD. | Disminución DBO5 (%) en 6 Días | DESV. STD. |
|------------------------------------|--------------------------|------------|--------------------------------|------------|
| Control <i>Arthrospira</i> sp.     | 8.9                      | 0.53       | 6.78                           | 0.28       |
| 75% <i>Arthrospira</i> sp./25% Ril | 24.2                     | 1.43       | 12.5                           | 0.26       |
| 50% <i>Arthrospira</i> sp./50% Ril | 22.4                     | 1.06       | 8.8                            | 0.30       |
| 25% <i>Arthrospira</i> sp./75% Ril | 11.5                     | 0.62       | 10.7                           | 0.43       |

Los resultados del oxígeno disuelto en el proceso de biorremediación de Riles mediante *Arthrospira* sp. presenta una relación positiva para todos los tratamientos, el mayor aumento se reflejó en el tratamiento 3 y 4 (75% *Arthrospira* sp./25% Ril) aumentando hasta en un 24.2% en un periodo de 6 días, el aumento de oxígeno disuelto está relacionado a la fotosíntesis ya que es el proceso fotoquímico más importante en la biosfera, realizado por plantas y cianobacterias, en éstas, la energía solar se transforma en energía química a través de la transformación de moléculas de carbono en materia orgánica (Figueroa, 2001) (Figura 8).

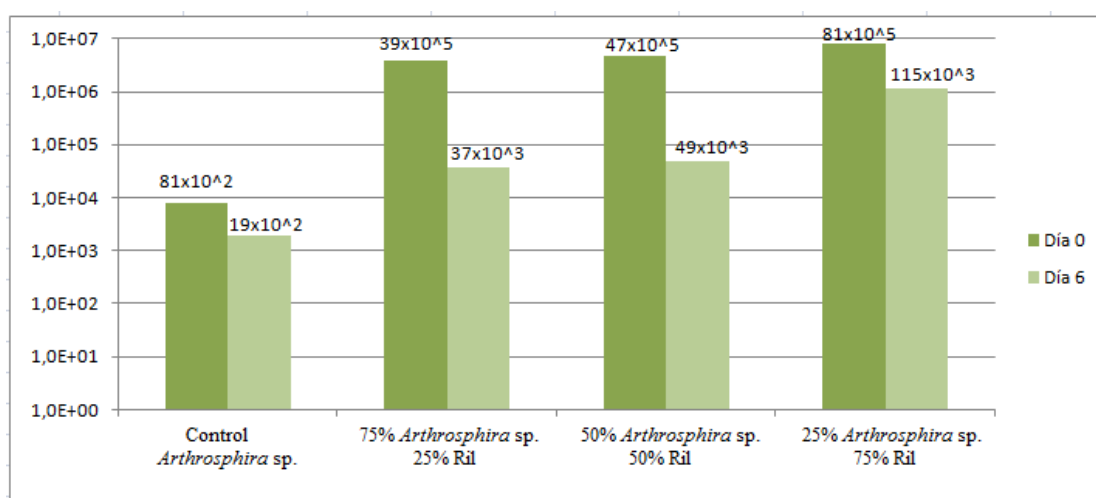


**Figura 8.** Proceso químico de la Fotosíntesis (Figueroa, 2001).

Por su parte la demanda bioquímica de oxígeno presentó una relación negativa en el ensayo de biorremediación de Riles con *Arthrospira* sp, disminuyendo en todos los tratamientos, la mayor disminución se presentó en el tratamiento 3 y 4 (75% *Arthrospira* sp./25% Ril) con un 12.5% en un periodo de 6 días, confirmando la relación expuesta por Basterrechea, (1997) quien plantea que la cantidad de oxígeno disuelto es inversamente proporcional a la DBO, ya que si aumenta la producción de oxígeno disminuirá la DBO por la acción de las bacterias aeróbicas que degradarán sin ningún problema la materia orgánica y biodegradable.

#### 4.2 Recuento de Mesófilos Aerobios en ensayo de biorremediación con *Arthrospira* sp.

Se realizó el recuento de mesófilos aerobios en las condiciones de tratamientos antes explicadas por la técnica de vertido en placa, los tratamientos fueron evaluados en su inicio y al final y donde los valores se expresan en unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL). En todos los tratamientos, incluido el control se observa una disminución en el recuento de mesófilos aerobios. Esta disminución es superior en los tratamientos de 75%, 50% y 25% de *Arthrospira* sp. que en el control de *Arthrospira* sp. (Figura 9).



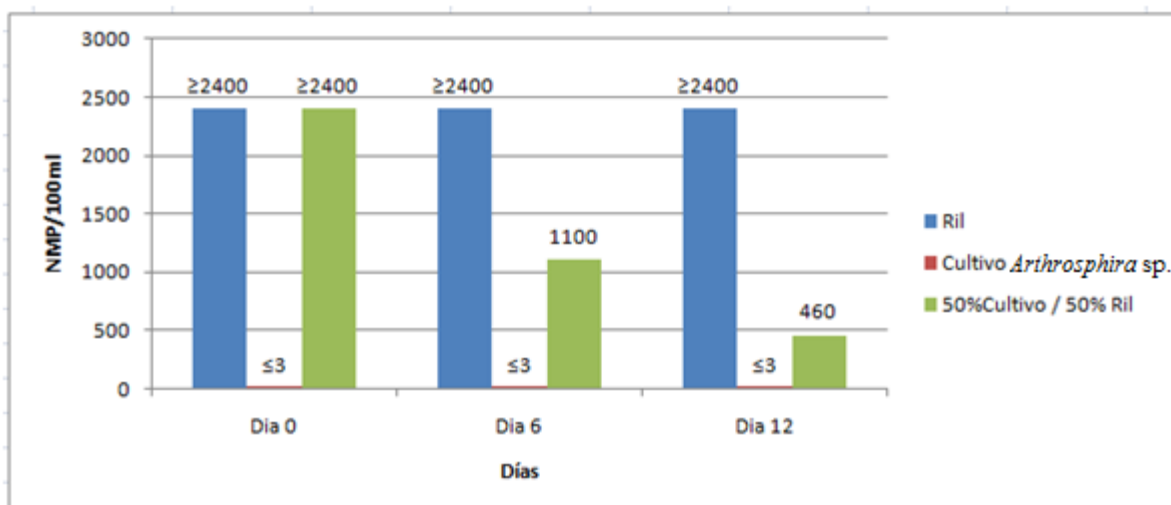
**Figura 9.** Recuento de Mesófilos Aerobios en ensayo de biorremediación con *Arthrospira* sp. se midió el estado inicial (día 0) y el estado final (día 6) los valores se expresan en Unidades formadoras de colonias por mililitro.

Los recuentos de Mesófilos Aeróbicos en placa son útiles para determinar la potabilidad de un agua, así como también la eficiencia de las operaciones para eliminar microorganismos, como la sedimentación, filtración, cloración y en este caso como se ven afectadas las poblaciones por el proceso de biorremediación. Los recuentos se hicieron antes y después del tratamiento. Los resultados muestran la reducción de las poblaciones microbianas en todos los tratamientos lo cual se puede explicar por la competencia que existe por los nutrientes presentes en el sistema, *Arthrospira* sp. a medida que pasan los días va duplicando su concentración en el sistema por lo que se ve obligada a requerir de más recursos nutricionales, por otra parte, los organismos mesófilos presentes se ven desfavorecidos por el crecimiento de *Arthrospira* sp. ya que la capacidad de adquirir nutrientes se ve limitada, comienzan inevitablemente a disminuir sus poblaciones. Otra posible explicación puede ser que *Arthrospira* sp. pueda estar exudando algún metabolito secundario al sistema y este inhiba el crecimiento de los organismos mesófilos. Sin embargo, pasado los 6 días de tratamiento la cantidad de organismos mesófilos sigue siendo elevada en promedio unos  $50 \times 10^3$  UFC/mL, un recuento total de aerobios mesófilos bajo no asegura que un producto este exento de patógenos o sus toxinas; tampoco un recuento total alto significa, inevitablemente, presencia de microbiota patógena (Pascual, 2000).

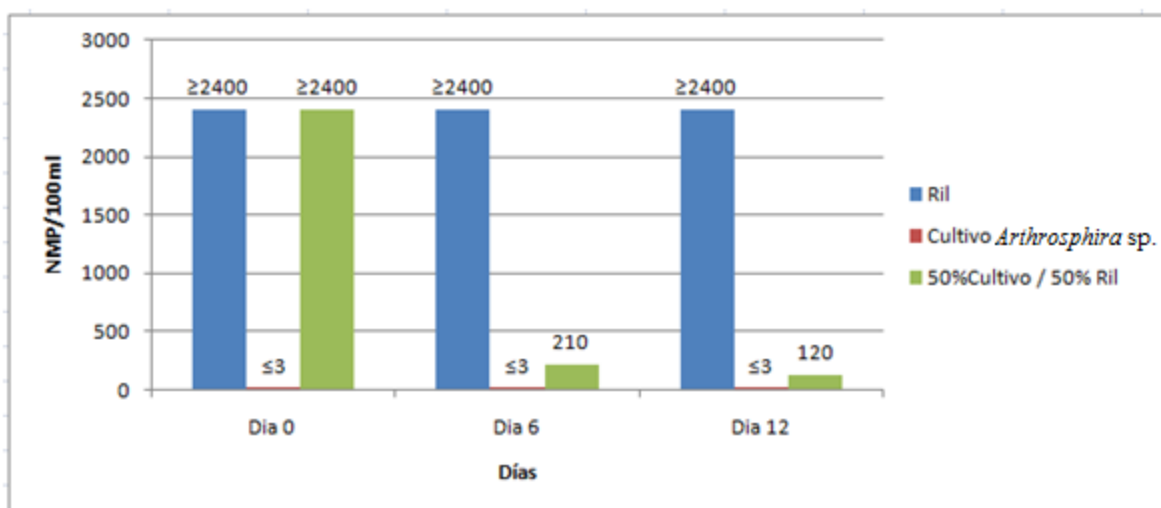
#### **4.3 Determinación del NMP de Coliformes Totales y Fecales en ensayo de biorremediación con *Arthrospira* sp. en un periodo de 12 días.**

Se realizó un recuento de coliformes totales y fecales bajo las condiciones antes descritas, los valores están expresados en número más probable (NMP) por 100ml, el ensayo de biorremediación tuvo una duración de 12 días en total. El recuento de coliformes totales (Figura 10) mostró que en el día 0 tanto el ril solo como la mezcla de 50% cultivo/50% Ril, presentan valores fuera del límite superior de detección de la técnica mayores a 2400 NMP/100ml y el cultivo de *Arthrospira* sp. presenta el valor mínimo de detección de la técnica menor a 3 NMP/100mL. Luego en los días 6 y 12 se ve una

disminución del recuento de coliformes totales. El recuento de coliformes fecales presentó la misma tendencia a la disminución de NMP/100mL (Figura 11).



**Figura 10.** Recuento de coliformes totales en ensayo de biorremediación con *Arthrosphira* sp., se midió el estadio inicial (día 0), estadio intermedio (día 6) y el estadio final (día 12) los valores se expresan en número más probable por 100ml.



**Figura 11.** Recuento de coliformes fecales en ensayo de biorremediación con *Arthrosphira* sp., se midió el estadio inicial (día 0), estadio intermedio (día 6) y el estadio final (día 12) los valores se expresan en número más probable por 100ml.

Los *Coliformes Fecales* son un subgrupo de los *Coliformes totales*, capaces de fermentar la lactosa a 44° C en vez de 37 °C como lo hacen los totales.

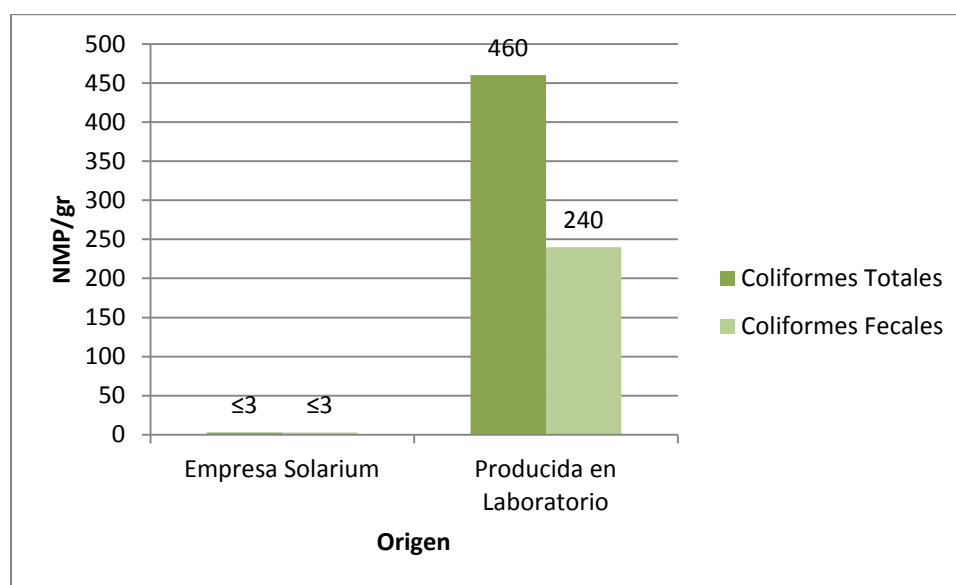
Aproximadamente el 95% del grupo de los *Coliformes* presentes en heces están formados por *Escherichia coli* y ciertas especies de *Klebsiella*. Ya que los *Coliformes Fecales* se encuentran casi exclusivamente en las heces de los animales de sangre caliente, se considera que reflejan mejor la presencia de contaminación fecal. Éstos últimos se denominan termotolerantes por su capacidad de soportar temperaturas más elevadas. Esta es la característica que diferencia a *Coliformes Totales* y *Fecales* (Pascual, 2000).

Los resultados obtenidos concuerdan con la dinámica de decrecimiento obtenida en el recuento de mesófilos aerobios, este grupo particular de coliformes ve disminuido su NMP/100mL siguiendo la misma justificación antes mencionada, el potencial uso del líquido como recurso hídrico para regadío se ajusta perfectamente a la norma chilena Nch 1333 para agua de riego, que especifica para sus requisitos bacteriológicos un contenido de coliformes fecales menor o igual a 1000 coliformes fecales en 100mL, con lo cual el tratamiento de biorremediación en el día número seis está muy por debajo de la norma con un recuento de 210 NMP/100mL.

Cabe mencionar que este es un proceso variable, la cantidad de coliformes presentes en el ril va a influir directamente en la disminución del NMP/100mL en relación a los días, ya que un ril con mayor cantidad de coliformes debiese tardar más días en disminuir su NMP/100mL, lo que implica un monitoreo constante de estos parámetros. En el caso de no cumplir la norma se recomienda aplicar un proceso de desinfección post cosecha de *Arthrospira* sp.

#### 4.4 Determinación del NMP de Coliformes Totales y Fecales en la Biomasa cosechada de *Arthrospira* sp.

Se realizó una evaluación del NMP de coliformes totales y fecales en la biomasa cosechada seca post ensayo de biorremediación, para ver la calidad microbiológica del producto, esta evaluación fue comparado con un producto de similares características llamado “spirulina en polvo” proveniente de la empresa Solarium, los valores están expresados en número más probable por 100mL. La “spirulina en polvo” presentó los valores mínimos representados por el valor mínimo de sensibilidad de la técnica menor a 3 NMP/100mL para coliformes totales y fecales, la biomasa cosechada de *Arthrospira* sp. en el laboratorio posterior al ensayo de biorremediación arrojó valores de 240 NMP/100mL para coliformes fecales (Figura 12).



**Figura 12.** Recuento de coliformes totales y fecales para la “Spirulina en polvo” proveniente de la empresa Solarium y para la biomasa cosechada de *Arthrospira* sp. post tratamiento de biorremediación, los valor están expresados en número más probable por 100ml.

Aunque los productos de origen vegetal suelen contener un elevado número de bacterias (Pérez, 1998), son las condiciones en que se recolectan las que favorecen una contaminación abundante y el crecimiento de microorganismos diversos, aunque esta suele disminuir mediante un tratamiento de secado (Pérez, 1998).

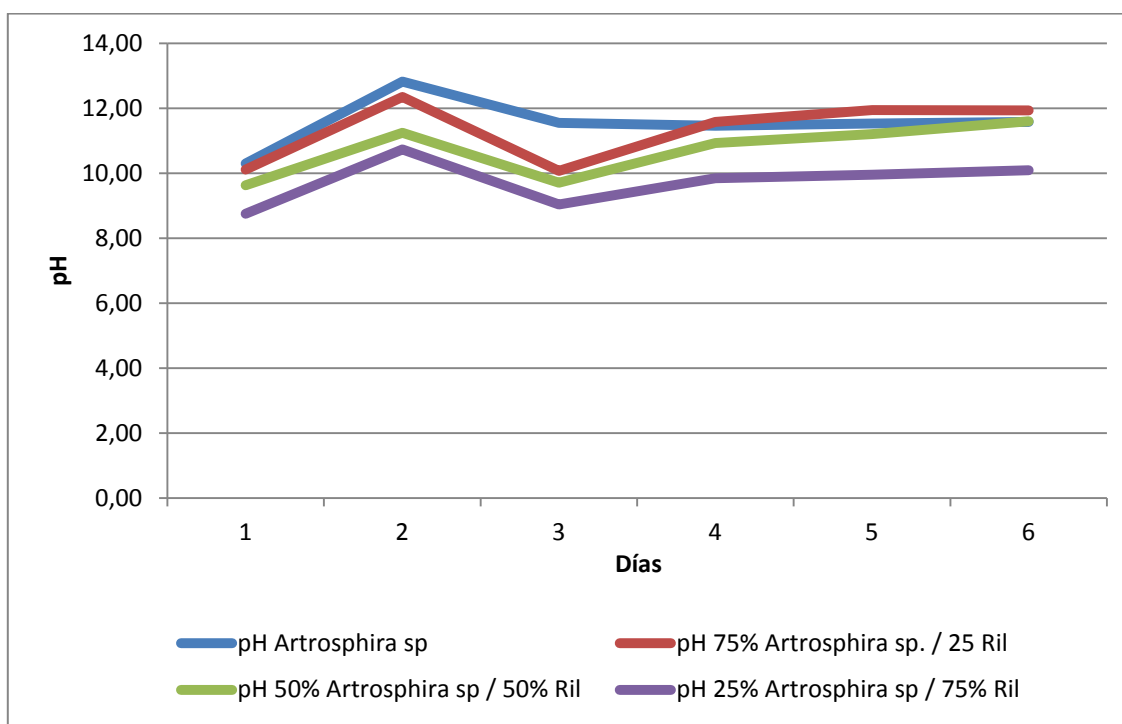
El análisis de coliformes para la biomasa de *Arthrospira* sp. cosechada y provenientes de los ensayos de biorremediación indican un grado de contaminación fecal de 240 NMP/gr dicha contaminación se arrastra del ensayo de biorremediación con Riles de la planta faenadora avícola, por otra parte la spirulina en polvo proveniente de la empresa solárium no presenta dicha contaminación ya que proviene de cultivos puros y no de ensayos de biorremediación. Se recomienda realizar un tratamiento de descontaminación de la biomasa de *Arthrospira* sp. para asegurar su calidad microbiológica.

#### **4.5 Comportamiento del pH en el ensayo de biorremediación en RILES tratados, provenientes de una empresa avícola con *Arthrospira* sp.**

Se realizó el monitoreo del pH a lo largo del ensayo de biorremediación con *Arthrospira* sp., todos los tratamientos incluido el control (*Arthrospira* sp.) presentaron la misma dinámica aumentando su pH en el día 2 y volviendo a disminuir en el día 3 para así estabilizarse a lo largo del ensayo. El rango en que se distribuyó el pH fue entre pH 9 y pH 12 (Figura 13).

La medida de pH en el ensayo de biorremediación es una referencia clave para el desarrollo del cultivo de *Arthrospira* sp. El medio de cultivo se alcaliniza por el consumo de la fuente de carbono, lo que genera bases como el NaOH, todo esto se ve representado en el día 2. Las variaciones de pH en los primeros días se puede atribuir a una adaptación de *Arthrospira* sp. al ensayo de biorremediación, para luego adaptarse y mantenerse

constante con una tendencia a volverse más alcalino por la razón antes mencionada. La medición del pH, puede convertirse en una evaluación cuantitativa de la cantidad de biomasa en el medio: A mayor biomasa, mayor degradación de bicarbonato y por consiguiente se eleva la concentración de grupos hidroxilos en el medio, aumentándose así el pH (Pelizer, 2002).

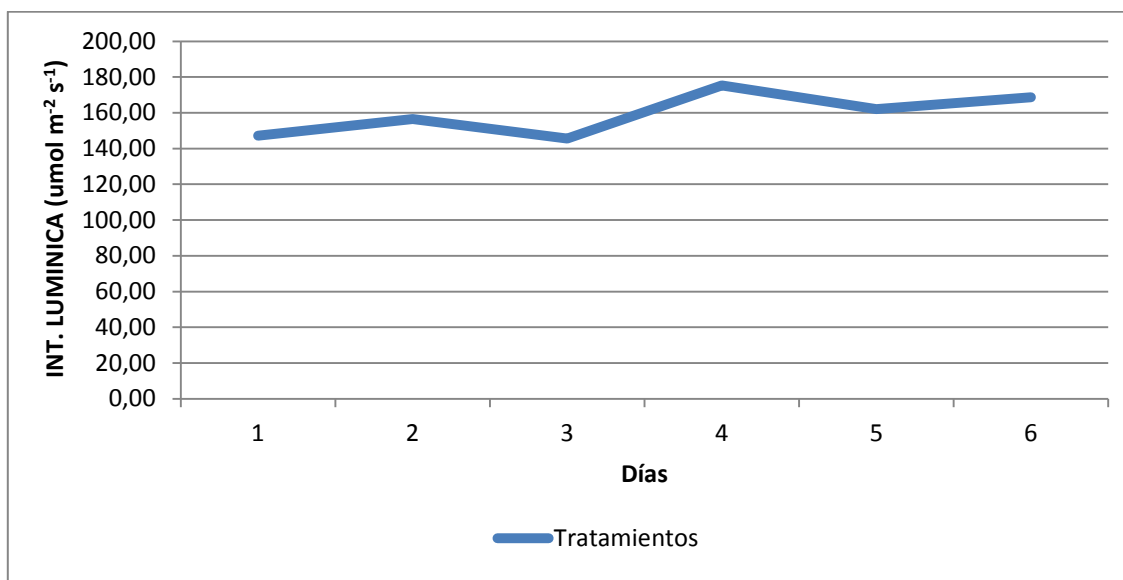


**Figura 13.** Comportamiento del pH en el ensayo de biorremediación de Riles tratados provenientes de una empresa faenadora avícola con *Arthrospira* sp.

#### 4.6 Comportamiento de la intensidad lumínica en el ensayo de biorremediación en Riles tratados, provenientes de una empresa avícola con *Arthrospira* sp.

Se realizó un monitoreo de la intensidad lumínica ( $\mu\text{mol}$ ) en todos los tratamientos pertenecientes al ensayo de biorremediación con *Arthrospira* sp. ya que corresponde a una

variable no controlada, dependiendo del clima, como se explicó en la metodología. De igual forma se registró el comportamiento de la intensidad lumínica durante el proceso de biorremediación. La intensidad lumínica se mantuvo relativamente constante manteniéndose siempre dentro del rango de  $140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y  $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en el proceso completo de evaluación (Figura 14).



**Figura 14.** Comportamiento de la intensidad lumínica ( $\mu\text{mol}$ ) en el ensayo de biorremediación de Riles tratados provenientes de una empresa faenadora avícola con *Arthrospira* sp.

La iluminación es indispensable para el crecimiento de *Arthrospira* sp. debido al proceso de la fotosíntesis, determinante para su constitución estructural. Las condiciones de luminosidad no fueron controladas sino que dependieron exclusivamente de las condiciones climáticas, mostrando un comportamiento bastante dinámico, como se observa en la Figura 14. Sin embargo, las condiciones de luminosidad fueron favorables para el crecimiento de *Arthrospira* sp. en el ensayo de biorremediación. Este comportamiento requiere tener en consideración que un filamento individual de *Arthrospira* sp. no puede soportar una exposición prolongada a la iluminación ya que podría ser destruido por fotólisis. Es importante señalar que es en la noche cuando ocurren las reacciones bioquímicas de síntesis del material proteico (Vonshak, 1984 ).

Los datos discutidos en los ensayos realizados demuestran que el tratamiento de 75% *Arthrospira* sp. / 25% Ril presenta los mejores valores en el proceso de biorremediación, no obstante el tratamiento de 50% *Arthrospira* sp. / 50% Ril también presenta valores óptimos en el proceso de biorremediación, el factor determinante entre ambos tratamientos es la optimización del proceso por lo cual el segundo tratamiento es el más adecuado porque nos permite tratar una mayor cantidad de Ril en el mismo tiempo que dura el proceso.

## 5. CONCLUSIONES

El ensayo de biorremediación en Riles provenientes de una empresa faenadora avícola y tratados con *Arthrospira* sp. presenta valores positivos de oxígeno disuelto y su inversa demanda bioquímica de oxígeno presenta valores que avalan la remoción de la materia orgánica presente en el Ril, justificando la capacidad biorremediadora de *Arthrospira* sp.

El recuento de mesófilos aerobios evaluado en el tratamiento refleja una disminución de la flora microbiana presente en el ensayo, esto se ve relacionado con la disminución en el recuento de coliformes Totales y Fecales, cumpliendo con los parámetros establecidos en la Nch1333 para agua de riego.

El numero más probable (NMP) de coliformes Totales y Fecales para la biomasa seca de *Arthrospira* sp. post cosecha refleja la presencia del grupo coliforme en la muestra, por lo que se recomienda un proceso de descontaminación para un uso adecuado a posteriori.

La evaluación de pH e intensidad lumínica avalan las buenas condiciones de producción de biomasa de *Arthrospira* sp.

El proceso de biorremediación de Riles provenientes de una empresa faenadora avícola con *Arthrospira* sp. disminuye la flora microbiana presente en el ensayo de biorremediación.

## 6. RESUMEN

El agua ha sido considerada hasta no hace muchos años como inagotable. Sin embargo, debido a factores tales como su irregular distribución geográfica, la alarmante escasez de recursos hídricos en áreas de clima árido o semiárido, la cada vez mayor demanda de agua por parte de una población creciente, la presión ejercida por la agricultura y la actividad industrial sobre las reservas de agua, etc., ha provocado que el agua no sólo haya dejado de ser considerada como un recurso natural inagotable, sino que en muchas ocasiones se haya convertido en un factor limitante al crecimiento socioeconómico.

El uso de procesos biológicos en el tratamiento de aguas contaminadas, abre una puerta a la reutilización del recurso hídrico con el debido cumplimiento de las normas establecidos por el país. Se propuso biorremediar residuos industriales líquidos tratados (Ril), provenientes de una empresa faenadora avícola con *Arthrospira* sp., enfocándose principalmente en las poblaciones de microorganismos presentes en el ril y la carga microbiana contaminante en la recuperación de la biomasa microalgal. Se realizaron mediciones de oxígeno disuelto y demanda bioquímica de oxígeno, para confirmar la capacidad biorremediadora de *Arthrospira* sp., además se realizaron recuentos de mesófilos aerobios y recuento de coliformes totales y fecales en el ensayo de biorremediación y en la biomasa microalgal cosechada al final del ensayo.

Los resultados obtenidos del proceso de biorremediación con *Arthrospira* sp. confirman su capacidad biorremediadora, los datos obtenidos del recuento de mesófilos aerobios demuestran la disminución de estos a lo largo del proceso, de igual forma el recuento de coliformes totales y fecales va disminuyendo, cumpliendo con parámetros establecidos para la utilización del recurso hídrico en riego. Los resultados obtenidos de la recuperación de la biomasa microalgal, muestran una contaminación de coliformes totales y fecales lo cual recomienda un proceso de descontaminación en su eventual uso.

## 7. ABSTRACT

Water, not recently, has been considered a questioning and also an inexhaustible resource, however, due to factors like its irregular geographic distribution, an alarming lack of water resources in dry areas, the more and more demand of water by increasing population, agriculture and industrial activities over water reserves, etc, has caused not only a less consideration as an inexhaustible resource but also a restricting factor against the socioeconomic growth.

The uses of biological processes in the treatment of contaminated water, gives the opportunity of reutilization of water resources with the proper performance of rules established by the country. It was proposed a bio-repairing of industrial liquid residues. Bio-repairing industrial treated liquids (Ril), from a slaughtering poultry company with *Arthrospira* sp., focusing on population of microorganism present in RIL and the microbial contaminating content in the recuperation of the of the micro-seaweed biomes. Oxygen measurement and the biochemical demand has been executed to confirm the bio-repairing capacity of *Arthrospira* sp., moreover aerobes mesophyll recounts and total coliform recounts and fecal in the sample of bio-repairing and in the micro-seaweed biomes grown at the end of the sample.

The results obtained in the process of bio-repairing *Arthrospira* sp. confirm its bio-repairing capacity, the information received of the recount of aerobes mesophills demonstrate the decrease of these along the process, in the same way as the of total and fecal which goes in decrease, obeying the parameters established for the utilization of water resource in. The results obtained in the recuperation of micro-seaweed biomes show a contamination of total coliform and fecal which recommends the process of decontamination on its eventual use.

## 8. LITERATURA CITADA

- ABBAYES, H.** 1989. Botánica: Vegetales inferiores. *Ed. Reverte S.A. Guadalajara. México.* , Pp. 68 – 95.
- ABELIOVICH, A.** 1986. Algae in wastewater oxidation ponds. *Handbook of Microalgal Mass Culture (Richmond, A. ed.). CRC Press. Boca Ratón.*, pp. 331-338.
- BEHRENS** 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. . *J. Phycol.* , 35: 215-226.
- BEN OTHMAN, N., AYED, L., ASSAS, N., KACHOURI, F., HAMMAMI, M. & HAMDI, M.** 2008. Ecological removal of recalcitrant phenolic compounds of treated olive mill wastewater by *Pediococcus pentosaceus*. *Bioresour Technol*, 99, 2996-3001.
- BLACKBURN, J. Y. H., W.** 1993. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *TIBTECH*. 11, 328.
- CARRILLO, A., CHAMORRO, S., RODRIGUEZ-GAGO, M., ALVAREZ, B., MOLINA, M. J., RODRIGUEZ-BARBOSA, J. I., SANCHEZ, A., RAMIREZ, P., MUNOZ, A., DOMINGUEZ, J., PARRILLA, P. & YELAMOS, J.** 2002. Isolation and characterization of immortalized porcine aortic endothelial cell lines. *Vet Immunol Immunopathol*, 89, 91-8.
- CHAMORRO, G., SALAZAR, M., ARAUJO, K. G., DOS SANTOS, C. P., CEBALLOS, G. & CASTILLO, L. F.** 2002. [Update on the pharmacology of *Spirulina (Arthrospira)*, an unconventional food]. *Arch Latinoam Nutr*, 52, 232-40.
- CHECKLIST, C. O. L. A.** 2011. Indexing the world's known species. The Integrated Taxonomic Information System (ITIS). *Species 2000* ([www.sp2000.org](http://www.sp2000.org))
- DODD, J.** 1980. Algae production and harvesting from animal wastewaters. . *Applied Science Publishers Ltd, England.* , 23-37.
- EWES, J. B., ERGAS, S. J., CHANG, D. P. Y. & SCHROEDER, E. D.** 1999. Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. *Ed. Mc GrawHill, Madrid.*
- FALLOWFIELD, H. J. G., M.K.** 1985. The treatment of wastes by algal culture. . *Journal of Applied Bacteriology. 53rd Symposium Supplement.*, pp. 187-205.

- FIGUERUELO, J. E., DAVILA, M.** 2001. Química física de medio ambiente. *Ed. Reverte S.A. 1 ed. Puebla. México.* , pp. 243 – 271.
- FORYSTHE, S., J.** 2000. Higiene de los alimentos. *Microbiología y HACCP. 2 edición. Acribia, S.A.*
- FRAY** 1983. The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria). *Arnold. Londres, UK.* , pp. 88.
- GALLARDO, M. A. C. S. Y. T.** 1990. Dinámica temporal de las microalgas de un tratamiento terciario de aguas residuales urbanas a escala de laboratorio. *Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad Complutense. E-28040 Madrid.*
- GONZÁLEZ, J. M. B., E. Y LUIS, E.** 2001. Limnología de sistemas experimentales de lagunaje para el tratamiento de aguas residuales. *Limnetica.*
- GONZÁLEZ, M. S.** 2005. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma de México.*
- KOJIMA, H. A. L. Y. K.** 2001. Photosynthetic microorganisms in Environmental Biotechnology. Springer-Verlag. *Hong-Kong.*, 310
- LAGREGA, M. D. B., P. L.; EVANS, J. C. AND ENVIRONMENTAL RESOURCES MANAGEMENT.** 2001. Hazardous waste management. *Mc Graw-Hill.*, 7-23.
- LEOPOLDO, N. B.** 2010. Arthrospira platensis como biofactoría de metabolitos secundarios de interés farmacológico: el ácido pipercolico. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal*, 1.
- MAHRO, B.** 2000. Bioavailability of Contaminants. En Biotechnology. Environmental Processes II. Soil Descontamination. *Wiley-VCH.*, Volume 11b, 63-87.
- MATLAKOWSKA, R., NARKIEWICZ, W. & SKLODOWSKA, A.** 2010. Biotransformation of organic-rich copper-bearing black shale by indigenous microorganisms isolated from lubin copper mine (Poland). *Environ Sci Technol*, 44, 2433-40.
- MEDINA, M., GUTZEIT, G. Y NEIS, U.** 2005. BIOMASA BACTERIO-ALGAL: UNA ALTERNATIVA PARA EL MEJORAMIENTO DE SISTEMAS NATURALES DE TRATAMIENTO DE AGUA. *Seminario Internacional sobre Métodos Naturales para el Tratamiento de Aguas Residuales, España.*
- NCH1333** 1978. Norma Chilena Oficial. Requisitos de calidad del agua para diferentes usos.

- OLVERA-RAMÍREZ, R.-L. E., VICENTE-GARCÍA V** 2003. Manual de Técnicas para el Cultivo y Extracción de Bioproductos a Partir de Microalgas. *ENCB-IPN. México.*, pp. 69.
- OMS, O. M. D. L. S.** 1989. Directrices sanitarias sobre el uso de aguas residuales en agricultura y acuicultura. *Informe técnico 778. OMS, Ginebra.*
- OSWALD, W. J.** 1957. Light conversion efficiency in photosynthetic oxygenation. . *IER, series 44. Sanitary Engr. Res. Lab. Univ. Calif. Berkeley.*, pp. 127.
- PASCUAL, A. M. D. R.** 2000. Microbiología Alimentaria: metodología analítica y bebidas. *Madrid. Ed. Diaz de Santos. S.A.*, 2 edición.
- PEARSON, H. W.** 1996. Expanding the horizons of pond technology and application in an environmentally conscious world. *Wat. Sci. Tech.*, 33, 1-10.
- PEDRAZA, G.** 1989. Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación proteica. . *Living. Resource for Rural Development. 1(1)*, 1-6.
- PELIZER, L. H., CARVALHO, J.C.M., SATO, S., DE OLIVEIRA, I** 2002. *Spirulina platensis* growth estimation by pH determination at different cultivations conditions. *Electr. J. Biotech. 5*, pp. 251 – 257.
- PÉREZ, S., BERNABÉ, TR.** 1998. Microorganismos de los alimentos. *Ecología Microbiana de los productos alimentarios. Acribia. Zaragoza, España.*
- RAMOS, J. M. & HERNANDEZ, I.** 1998. [Methods for evaluating diagnostic tests in Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 16, 179-84.
- RHEINHEIMER, G.** 1987. Microbiología de las aguas. *Ecl. Acribia. Zaragoza.*
- RODRIGUES, M. S., FERREIRA L.S, CONVERTI A., SATO S., CARVALHO J.C.M.** 2010. Fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*: potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. *Bioresource Technol*, 101, 4491-4498.
- RODRÍGUEZ, A. V.** 2005. Reutilización de aguas residuales para riego. Tendencias Tecnológicas. *Jornadas sobre Tratamiento de Aguas Residuales Industriales.*
- SÁNCHEZ, M. L. P.** 2011. LAS CIANOBACTERIAS: COOPERACIÓN VERSUS COMPETENCIA. *REAL ACADEMIA DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS, QUÍMICAS Y NATURALES DE ZARAGOZA.*
- TCHOBANOGLIOUS, G.** 2000. Sistema de manejos de aguas residuales. *Mc Graw – Hill Interamerica, Santafé de Bogotá, Colombia.*

- TOMASELLI, V. A.** 2000. The Ecology of Cyanobacteria. "Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology". . *Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Holanda*, 505-522.
- VALDÉS, M. F. B. S.** 2008. ALGAS, ALIADAS EN EL PASADO Y SUSTENTO PARA EL FUTURO. *TECNOLOGÍA QUÍMICA*, XXVIII.
- VARGAS, A. R.** 2004. RESIDUOS INDUSTRIALES LIQUIDOS. *Facultad de Biotecnología, Universidad de Iztalapa, México*.
- VONSHAK, A.** 1984 Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. . *Richmond, A., Ed. Handbook of microalgal mass culture. CRC Press, Inc, Boca Ratón*, pp. 117-134.
- VONSHAK, A., BOUSSIBA, S., ABELIOVICH, A. & RICHMOND, A.** 2000. Production of Spirulina biomass: Maintenance of monoalgal culture outdoors. *Biotechnol Bioeng*, 25, 341-9.
- WHITTON, B. A.** 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. *In: N.H. Mann and N.G. Carr [Eds] Photosynthetic Prokaryotes. Plenum Press, New York*, 1-51.
- ZARROUK, C.** 1966. Contribution l'étude d' ue cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croisse et la photosynth se de Spirulina maxima (Setch et Gardner) Geitler. *Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad de París.* , pp. 41.

## 9. ANEXOS

### **Anexo 1. Leyes que rigen el vertido de aguas a los cursos naturales**

**Ley N° 3.133** y su reglamento sobre neutralización por depuración de Riles. El 7 de Septiembre de 1916, se publica en el diario oficial la Ley N° 3.133/16 del Ministerio de Obras Públicas. En ésta, se establece como norma general que los establecimientos industriales de distinta índole no pueden vaciar sus aguas en ningún medio acuífero, sin antes depurarlas o neutralizarlas, por medio de un sistema adecuado y permanente, y tampoco podrán arrojar a dichos cauces o depósitos de aguas las materias sólidas que puedan provenir de esos establecimientos ni las semillas perjudiciales a la agricultura.

**D.S. MOP 351/93** (Decreto Supremo) El 23 de Febrero de 1993, se publica en el diario oficial el Decreto Supremo N° 351/93 del Ministerio de Obras Públicas, en éste, se establece el Reglamento para la neutralización de residuos líquidos industriales a que se refiere la Ley N° 3.133. De acuerdo con lo establecido en los artículos 1° y 2° de la ley, los establecimientos no podrán vaciar Riles u otras sustancias nocivas al riego o a la bebida en ningún acueducto, cauce natural o artificial, superficial o subterráneo que conduzcan aguas, o en vertientes, lagos, lagunas, depósitos de agua, o terrenos que puedan filtrar la napa subterránea sin la autorización del Presidente de la República, otorgada por decreto del Ministerio de Obras Públicas, previo informe favorable de la SISS (Superintendencia de Servicios Sanitarios). Igual autorización será necesaria para los establecimientos cuyos Riles u otras sustancias desagüen en redes de alcantarillado y puedan dañar los sistemas de recolección o tratamiento de aguas servidas, o contravengan las normas vigentes sobre la calidad de los afluentes, aun cuando no sean nocivas a la bebida o al riego.

**D.S. MOP 1172/97** (Decreto Supremo) El Decreto Supremo N° 1172/97 (del Ministerio de Obras Públicas, publicado en el Diario Oficial del 18 de Abril de 1998): Modifica el Decreto Supremo N°351/92, principalmente en lo que respecta a la competencia de las

empresas de servicios sanitarios, en la aprobación y fiscalización de los sistemas de tratamiento de Riles descargados a sus redes.

**Norma Técnica Provisoria/92** (de la Superintendencia de Servicios Sanitarios, no ha sido publicada):

Norma técnica relativa a descargas de residuos industriales líquidos, directamente a cursos y masas de aguas superficiales y subterráneas.

**D.S. MOP 609/98** En mayo de 1998 se aprueba la "norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos industriales líquidos a sistemas de alcantarillado", Norma D.S. MOP N°609, publicada en el Diario Oficial en julio de 1998. Ésta norma establece una serie de tablas en las que se indica la cantidad máxima de contaminante permitida para los residuos industriales líquidos, descargados por los establecimientos industriales en los servicios públicos de recolección de aguas servidas y el tiempo que tienen para adecuarse a la norma. Los establecimientos industriales podrán solicitar al prestador de servicios sanitarios, autorización para descargar efluentes con una concentración mayor a  $300 \text{ mgL}^{-1}$ , siempre que ello no provoque obstrucción a la red colectora, conforme a lo dispuesto en el Art. 21 inciso 2° del Decreto con Fuerza de Ley N°70 del año 1988, del Ministerio de Obras Públicas sobre Fijación de Tarifas de Servicios de Agua Potable y Alcantarillado.

## **Anexo 2. Medio de Cultivo para *Arthrospira* sp.**

***Spirulina* Medium (modified).** Aiba and Ogawa 1977, Schlösser 1994. Primero en necesario preparar las soluciones stock. Seguidamente, preparar Soluciones I y II; Solución II incluye 1mL de la solución stock de la traza de metales pero no del stock de vitaminas. Autoclavar la solución I y II y enfriar; asépticamente combinar las dos soluciones y añadir 1mL de la solución de Cyanocobalamina (B12).

**Cuadro 5. Componentes del Medio de Cultivo para *Arthrospira* sp.**

| Componente                             | Solución Stock                                        | Cantidad | Concentración Molar en el Medio Final |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------|---------------------------------------|
| Solución I                             | 500 mL                                                | ---      | ---                                   |
| NaHCO <sub>3</sub>                     | ---                                                   | 13.61 g  | 1.62 x 10 <sup>-4</sup> M             |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>        | ---                                                   | 4.03 g   | 3.80 x 10 <sup>-5</sup> M             |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>        | ---                                                   | 0.50 g   | 2.87 x 10 <sup>-6</sup> M             |
| Solución II                            | 500 mL                                                | ---      | ---                                   |
| NaNO <sub>3</sub>                      | ---                                                   | 2.5 g    | 2.94 x 10 <sup>-5</sup> M             |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>         | ---                                                   | 1.0 g    | 5.74 x 10 <sup>-6</sup> M             |
| NaCl                                   | ---                                                   | 1.0 g    | 1.71 x 10 <sup>-5</sup> M             |
| MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O    | ---                                                   | 0.2 g    | 8.11 x 10 <sup>-7</sup> M             |
| CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O    | ---                                                   | 0.04 g   | 2.72 x 10 <sup>-7</sup> M             |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O    | ---                                                   | 0.01 g   | 3.60 x 10 <sup>-8</sup> M             |
| Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O | ---                                                   | 0.08 g   | 2.15 x 10 <sup>-7</sup> M             |
| Solución traza de metales              | Ver Cuadro 6 de<br>Solución traza de metales          | 1 mL     | ---                                   |
| Solución stock de vitaminas            | Ver receta de Solución<br>Stock de<br>Cianocobalamina | 1 mL     | ---                                   |

### Solución Trazas de Metales

En 900mL de H<sub>2</sub>O disolver el EDTA. Independientemente, disolver cada componente y llevar a volumen final de 1L, autoclavar por separado y combinar asépticamente cuando estén frías.

**Cuadro 6. Solución traza de metales**

| Componente                                          | Solución Stock Primaria                   | Cantidad | Concentración Molar en el Medio Final |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------|---------------------------------------|
| Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O              | ---                                       | 0.8 g    | 2.15 x 10 <sup>-6</sup> M             |
| FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                 | ---                                       | 0.7 g    | 2.52 x 10 <sup>-6</sup> M             |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 1.0 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O   | 1 mL     | 3.48 x 10 <sup>-9</sup> M             |
| MnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O                 | 2.0 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O   | 1 mL     | 8.97 x 10 <sup>-9</sup> M             |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 10.0 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O  | 1 mL     | 1.62 x 10 <sup>-7</sup> M             |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O | 1.0 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O   | 1 mL     | 3.44 x 10 <sup>-9</sup> M             |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O  | 1.0 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O   | 1 mL     | 4.13 x 10 <sup>-9</sup> M             |
| CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O                 | 0.005 g L <sup>-1</sup> dH <sub>2</sub> O | 1 mL     | 2.00 x 10 <sup>-11</sup> M            |

### Solución Stock de Cianocobalamina

Disolver la cianocobalamina en 1L de H<sub>2</sub>O esterilizada. Mantener en refrigeración.

| Componente                             | Solución Stock Primaria | Cantidad | Concentración Molar en el Medio Final |
|----------------------------------------|-------------------------|----------|---------------------------------------|
| cianocobalamin (vit. B <sub>12</sub> ) | ---                     | 5 mg     | 3.69 x 10 <sup>-9</sup> M             |

### **Anexo 3. Recuento de Bacterias Mesófilas**

En condiciones asépticas:

1. Agitar vigorosamente la muestra de agua, para homogeneizar.
2. Pipetear 1 mL de muestra y verterlo en el primer tubo con 9 mL de agua de dilución estéril, quedando entonces una dilución de  $10^{-1}$ . (Figura 6)
3. Agitar para homogeneizar y tomar 1 mL de esta dilución ( $10^{-1}$ ) y verterlo en el segundo tubo, quedando una dilución de  $10^{-2}$ .
4. Agitar para homogeneizar y tomar 1 mL de esta dilución ( $10^{-2}$ ) y verterlo en el tercer tubo, quedando una dilución de  $10^{-3}$ . Y así sucesivamente hasta la dilución  $10^{-7}$ .
5. Utilizando pipeta estéril, tomar 1 mL de la dilución  $10^{-1}$  y verterlo en la caja Petri estéril marcada con  $10^{-1}$ , distribuyéndolo bien en el fondo de la caja Petri vacía. (Figura 6).

Efectuar esta misma operación por triplicado.

6. De la misma manera, tomar 1 mL de la dilución  $10^{-2}$  y verterlo en la caja Petri marcada con  $10^{-2}$ .

Efectuar esta misma operación por triplicado.

7. Hacer lo mismo con el tubo de la dilución  $10^{-3}$  y la caja marcada con  $10^{-3}$ .

Efectuar la misma operación por triplicado. Hacer este mismo procedimiento hasta la  $10^{-7}$ . Es recomendable usar una pipeta estéril para cada dilución.

8. Antes de que pasen 10 minutos, agregar a cada caja Petri el medio de cultivo contenido en un tubo, a una temperatura máxima de 47 °C (todavía líquido).
9. Antes de que el medio de cultivo solidifique homogeneizar cada caja mediante movimientos de translación y rotación en una superficie plana aproximadamente durante 1 minuto evitando que se mojen la tapa y los costados de la caja, de esta manera el agua y el agar son mezclados íntimamente.

10. Dejar reposar las cajas el tiempo necesario para que solidifique el agar.
11. Una vez solidificado el agar en las cajas, incubar en posición invertida con objeto de que el agua de condensación del agar no caiga sobre la superficie del cultivo.  
  
Las condiciones de incubación son: 37°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) durante 24 horas ( $\pm 3$  h). Ahora bien, si se desea conocer la flora bacteriana total de la muestra las condiciones serán: 22°C ( $\pm 2^\circ\text{C}$ ), durante 72 horas ( $\pm 4$ h).
12. Transcurrido el tiempo de incubación contar las colonias que se han desarrollado en cada una de las placas (Figura 6).

**Al hacer el recuento, tener en cuenta las siguientes consideraciones:**

- Seleccionar las cajas que contengan entre 25 y 250 colonias y descartar las otras.
- Si son varias las que entran en este intervalo, contar todas y seleccionar las del grado de dilución por triplicado que represente menor margen de error en el recuento y como resultado, tomar el promedio de las tres cajas y referirlo al volumen real de muestra sembrado para efectos del cálculo correspondiente.
- Si no hay ninguna caja con un recuento dentro del intervalo mencionado, se hará de aquella que tenga el valor más próximo a cualquiera de los dos extremos. En estos casos los resultados se tomarán como aproximados, excepto en los casos de siembra de muestra directa donde se efectuará, también el recuento en cajas con menos de 25 colonias.
- Si el recuento no se hace en el mismo momento de sacarlas de la incubadora, se pueden conservar las cajas dentro del refrigerador entre 5 y 10 °C, durante un período máximo de 24 horas.

## CÁLCULO Y PRESENTACION DE RESULTADOS

Una vez efectuado el recuento de las cajas correspondientes, los resultados obtenidos se elaboran de la siguiente manera:

- Si la cantidad de agua sembrada ha sido de 1 mL la expresión del resultado es directa.
- Si la cantidad de agua sembrada ha sido de 0.1 mL, el número de colonias contadas habrá de dividirse por el volumen de muestra sembrada, es decir, por 0.1, para obtener el número de colonias por mililitro.

### En general se tiene:

Bacterias Mesófilas aerobias/mL = Número de colonias en volumen real de muestra sembrada, en mL.

### Los resultados se expresarán así:

NUMERO DE BACTERIAS MESOFILAS AEROBIAS: \_\_\_\_ UFC/mL.

## Anexo 4. Recuento de Coliformes Totales y Fecales.

Descripción de la metodología de análisis:

La técnica del NMP comprende siempre una prueba presuntiva y otra confirmativa.

Esto es así porque una positividad en un tubo de la prueba presuntiva no indica necesariamente la presencia del grupo bacteriano a determinar (Coliformes Totales, Coliformes Fecales o *Streptococcus* Fecales), sino tan solo es una presunción, que habrá de confirmarse posteriormente.

Sin embargo, una negatividad en la prueba presuntiva permite dictaminar la ausencia de dicho grupo bacteriano en el agua examinada.

La denominada prueba presuntiva consiste en una metodología de tipo general para cualquier grupo de bacterias, mientras que la prueba confirmativa es específica.

### **PRUEBA PRESUNTIVA:**

**Todas las operaciones deberán efectuarse en absolutas condiciones de asepsia.**

1. Preparar tres series sucesivas de 3 tubos con caldo lactosado, una de doble concentración y las otras dos de concentración sencilla.
2. Etiquetar las series con 10, 1 y 0.1 mL.
3. Agitar vigorosamente la muestra por lo menos 20 veces antes de tomar el volumen que se va a inocular, a efecto de homogeneizar.
4. Antes y después de realizar las inoculaciones, la boca del frasco de la muestra deberá ser flameada con objeto de evitar contaminación.
5. Inocular con una pipeta de 10 mL este volumen de muestra en la serie de tubos con caldo de doble concentración, con otra pipeta de 1 mL para 1 mL de muestra en la segunda serie de tubos con concentración sencilla.
6. Igualmente con la misma pipeta podrá inocularse la tercera serie de tubos con 0.1 mL de muestra.

Normalmente, siempre que no se sospecha que el agua contenga elevada carga bacteriana, solo se inoculan estas tres primeras series de tubos.

En caso contrario, será necesario inocular otras series y por lo tanto, realizar diluciones de la muestra original.

7. Incubar todos los tubos a una temperatura de 35 °C durante 24-48 horas.
8. Después de 24 horas de incubación efectuar una primera lectura para observar si hay tubos positivos, es decir, con producción de ácido, si el medio contiene un indicador de pH, turbidez y producción de gas en la campana Durham.

Al hacer esta verificación es importante asegurarse que la producción de gas sea resultado de la fermentación de la lactosa en cuyo caso se observará turbidez en el medio de cultivo y no confundir con burbujas de aire.

Para evitar este tipo de confusiones es recomendable revisar las campanas Durham antes de proceder a la inoculación y desechar aquellos que contengan burbujas de aire ó de alguna manera eliminar éstas y así poder utilizarlos.

9. De los tubos que en esta primera lectura den positivos, ya se pueden hacer las pruebas confirmatorias para coliformes totales y coliformes fecales.

10. En caso de no apreciarse alguno o todos los cambios mencionados en el resto de los tubos, continuarán en incubación 24 horas más.

11. Después de 48 horas ( $\pm 2h$ ) a partir de la inoculación, se hace la lectura final.

12. Si pasadas estas 48 h tampoco se aprecia turbidez ni producción de gas, los tubos se toman como negativos.

#### **INTERPRETACION:**

- Si el total de tubos son **NEGATIVOS**: El examen se da por terminado, reportando la **AUSENCIA DE COLIFORMES TOTALES Y FECALES** en la muestra analizada.
- Todos aquellos tubos que den **POSITIVOS** para prueba presuntiva se anotarán convenientemente y se procederá a realizar la **PRUEBA CONFIRMATORIA** para **Coliformes Totales y Fecales**.

**PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES TOTALES:**

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos previamente para homogeneizar, inocular con tres asadas tubos conteniendo caldo Lactosa Bilis Verde Brillante (LBVB).
2. Incubar durante  $48 \pm 3$  h a  $35 \pm 0.5$  °C.
3. Después de la incubación observar la presencia de turbidez y de gas.

**INTERPRETACION:**

- **Si se observa turbidez y producción de gas:**

La prueba se considera **POSITIVA**, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.

- **Si en ninguno de los tubos se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez:**

Se consideran **negativos**, estableciéndose el Código 0,0,0 para efecto del cálculo del NMP.

**PRUEBA CONFIRMATORIA PARA COLIFORMES FECALES:**

1. A partir de cada uno de los tubos que han resultado positivos en la prueba presuntiva, agitándolos para homogeneizar, inocular con tres asadas tubos conteniendo caldo E.C. (*Escherichia coli*).
2. Incubar durante 24 horas a 44 °C ( $\pm 0.5$  °C), observar presencia de turbidez y gas.

### INTERPRETACION:

- **Si se observa turbidez y producción de gas:** La prueba se considera **POSITIVA**, debiendo anotar el número de tubos positivos para posteriormente hacer el cálculo del NMP.
- **Si no se observa producción de gas, aun cuando se observe turbidez:** Se reporta la **AUSENCIA DE COLIFORMES FECALES**.

### CALCULOS.

De acuerdo a los tubos positivos en las pruebas confirmativas para Coliformes Totales y Fecales:

Establecer los códigos correspondientes para calcular por referencia en la tabla estadística correspondiente (Cuadro 7), el NMP de Coliformes Totales y Fecales en 100 mL de agua.

En caso de no encontrar en las tablas la combinación de tubos adecuada, emplear para los cálculos la siguiente ecuación:

$$\text{NMP}/100 \text{ mL} = \frac{\text{No. De tubos positivos} \times 100}{\sqrt{\text{mL de muestra en tubos negativos} \times \text{mL de muestra en todos los tubos}}}$$

**Cuadro 7. Índice del NMP.** Índice del NMP y límite confiable de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos cuando se usan: 3 tubos con porciones de 10 cm<sup>3</sup>, 3 tubos con porciones de 1 cm<sup>3</sup> y 3 tubos con porciones de 0,1 cm<sup>3</sup>.

| No. de tubos con reacciones positivas. |                                  |                                       | Índice del NMP<br>Por 100 cm <sup>3</sup> | Límite confiable de 95% |          |
|----------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------|----------|
| 3 tubos<br>con 10<br>cm <sup>3</sup>   | 3 tubos<br>con 1 cm <sup>3</sup> | 3 tubos<br>con 0,1<br>cm <sup>3</sup> |                                           | Inferior                | Superior |
| 0                                      | 0                                | 0                                     | < 3                                       |                         |          |
| 0                                      | 0                                | 1                                     | 3                                         | < 0.5                   | 9        |
| 0                                      | 1                                | 0                                     | 3                                         | < 0.5                   | 13       |
| 1                                      | 0                                | 0                                     | 4                                         | < 0.5                   | 20       |
| 1                                      | 0                                | 1                                     | 7                                         | 1                       | 21       |
| 1                                      | 1                                | 0                                     | 7                                         | 1                       | 23       |
| 1                                      | 1                                | 1                                     | 11                                        | 3                       | 36       |
| 1                                      | 2                                | 0                                     | 11                                        | 3                       | 36       |
| 2                                      | 0                                | 0                                     | 9                                         | 1                       | 36       |
| 2                                      | 0                                | 1                                     | 14                                        | 3                       | 37       |
| 2                                      | 1                                | 0                                     | 15                                        | 3                       | 44       |
| 2                                      | 1                                | 1                                     | 20                                        | 7                       | 89       |
| 2                                      | 2                                | 0                                     | 21                                        | 4                       | 47       |
| 2                                      | 2                                | 1                                     | 28                                        | 10                      | 150      |
| 3                                      | 0                                | 0                                     | 23                                        | 4                       | 120      |
| 3                                      | 0                                | 1                                     | 39                                        | 7                       | 130      |
| 3                                      | 0                                | 2                                     | 64                                        | 15                      | 380      |
| 3                                      | 1                                | 0                                     | 43                                        | 7                       | 210      |
| 3                                      | 1                                | 1                                     | 75                                        | 14                      | 230      |
| 3                                      | 1                                | 2                                     | 120                                       | 30                      | 380      |
| 3                                      | 2                                | 0                                     | 93                                        | 15                      | 380      |
| 3                                      | 2                                | 1                                     | 150                                       | 30                      | 440      |
| 3                                      | 2                                | 2                                     | 210                                       | 35                      | 470      |
| 3                                      | 3                                | 0                                     | 240                                       | 36                      | 1300     |
| 3                                      | 3                                | 1                                     | 460                                       | 71                      | 2400     |
| 3                                      | 3                                | 2                                     | 1100                                      | 150                     | 4800     |
| 3                                      | 3                                | 3                                     | ≥ 2400                                    |                         |          |

## ELABORACION Y PRESENTACION DE RESULTADOS.

Los resultados se elaboran de la siguiente manera:

- Si únicamente se inoculan tres series de cinco tubos cada una con 10, 1 y 0.1 mL de muestra, la lectura de los resultados nos permite tener dos códigos de valores uno para coliformes totales y otro para coliformes fecales los cuales leídos en la tabla del NMP

nos dará el valor de bacterias correspondientes en 100 mL de muestra, de manera directa.

- Si se han realizado diluciones, se ha de obtener una serie final con valor cero.
- A continuación se establece el triplete de valores correspondiente a las tres series anteriores a la del valor cero que podrá ser leída en la tabla del NMP.
- Para efectos de expresar el valor obtenido basándose en 100 mL de muestra habrá de dividirse el resultado de la tabla por el volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central de cada triplete escogido.
- Se tendrá un triplete de valores para cada tipo de determinación.

**En general se tiene:**

$$\text{NMP/C} = \frac{\text{NMP leído en la tabla}}{\text{Volumen real de muestra inoculada en cada tubo de la serie central (mL)}}$$

Los resultados obtenidos se expresarán de la siguiente manera:

NMP DE COLIFORMES TOTALES: \_\_\_\_\_ / 100 mL

NMP DE COLIFORMES FECALES: \_\_\_\_\_ / 100 mL