

FACULTAD DE INGENIERÍAS Y ARQUITECTURA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL



**Evaluación de un sistema de tratamiento continuo para la
biorremediación del efluente de la producción de aceite de oliva
(alpechín) de la localidad de Atico, con un hongo aislado del alpechín
y microalga *Chlorella vulgaris*, Arequipa, 2017**

Tesis para el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Presentado por:

Diego Gonzalo Rosales Cuaquira

AREQUIPA – PERÚ

2017

DEDICATORIA

Lo dedico principalmente al dador de la vida, por haberme permitido llegar a culminar esta meta que es un hito en mi formación profesional. A mi madre, Nancy Cuaquira, por ser mi apoyo y por su amor incondicional que sin ella no hubiera logrado culminar este trabajo. A mi padre, Juan Rosales, por ser ejemplo de perseverancia y constancia; por su cariño y por mostrarme el valor de salir adelante. A mi tía, Esther Cuaquira, que es como una madre para mí por el cariño que me da y por su apoyo en los momentos difíciles. A mi hermano, Jonathan Rosales, por ser un ejemplo, por su apoyo y cariño incondicional.

AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todos mis maestros; ya que ellos me enseñaron a valorar los estudios y a superarme cada día, también agradezco a mis padres porque ellos estuvieron en los días más difíciles de mi vida como estudiante; agradezco a Dios por darme la salud que tengo; por tener una cabeza con la que puedo pensar muy bien y un cuerpo sano. Estoy seguro que mis metas planteadas darán fruto en el futuro y por ende me debo esforzar cada día más, para ser mejor en todo lugar; sin olvidar el respeto que engrandece a la persona.

Índice

Resumen.....	xi
Abstract.....	xii
Introducción.....	xiii
Capítulo I.....	1
Planteamiento del Problema	1
1.1. Descripción de la realidad.....	1
1.1.1. Caracterización del problema.	1
1.1.2. Definición del problema	3
1.1.3. Delimitación de la investigación.....	4
1.2 Formulación del problema.....	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problemas específicos	6
1.3 Objetivos de la investigación	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	7
1.4 Justificación de la investigación.....	7
1.5 Importancia.....	9
1.6 Limitaciones.....	10
Capítulo II.....	11
Fundamentos Teóricos de la Investigación	11
2.1 Marco referencial.....	11
2.1.1. Antecedentes de la investigación.....	11
2.2. Marco teórico.....	16

2.2.1	Biorremediación.....	16
2.2.2	El olivo.....	17
2.2.3	Sistemas de extracción de aceite de oliva.....	18
2.2.4	Valoración de los subproductos del olivo.....	21
2.2.5	Característica de los hongos.....	27
2.2.6	Características de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	32
2.3	Definición de términos.....	39
Capítulo III.....		41
Planteamiento Metodológico.....		41
3.1.	Diseño de la investigación.....	41
3.2.	Tipo y nivel de la investigación.....	54
3.2.1.	Tipo de la investigación.....	54
3.2.2.	Nivel de la investigación.....	54
3.3.	Método.....	54
3.4.	Hipótesis de la investigación.....	54
3.5.	Variables de investigación.....	55
3.5.1.	Variable independiente.....	55
3.5.2.	Variable dependiente.....	55
3.5.3.	Operacionalización de variables.....	55
3.6.	Técnicas, instrumentos y fuentes de recolección de datos.....	58
3.6.1.	Técnicas de la investigación.....	58
3.6.2.	Instrumentos de la investigación.....	59
3.6.3.	Fuentes de recolección de datos.....	59
3.7.	Procesamiento y análisis de la información.....	60
3.7.1.	Medidas estadísticas.....	60

3.7.2. Representación.....	60
Capítulo IV	61
Resultados y Discusiones	61
4.3 Caracterización de la cepa fúngica nativas de efluentes industriales.	61
4.4 Caracterización de los parámetros físico-químicos y compuestos tóxicos del alpechín.....	62
4.5 Determinación de la resistencia de la cepa de hongo nativo aislado y de <i>Chlorella vulgaris</i> diferentes diluciones del alpechín.....	65
4.6 Determinación de la capacidad de biorremediación, mediante la concentración de parámetros físico-químicos (DBO ₅ , DQO, TSS, Ph, conductividad eléctrica), y compuestos tóxicos (Fenoles, cloruros, sulfatos) del alpechín tratado en un sistema continuo.....	78
Conclusiones.....	116
Recomendaciones.....	118
ReferenciasBibliográficas.....	119

Índice de tablas

TABLA 1.....	32
TABLA 2.....	56
TABLA 3.....	64
TABLA 4.....	65
TABLA 5.....	72
TABLA 6.....	79
TABLA 7.....	81
TABLA 8.....	83
TABLA 9.....	85
TABLA 10.....	87
TABLA 11.....	91
TABLA 12.....	93
TABLA 13.....	97
TABLA 14.....	99
TABLA 15:.....	101
TABLA 16.....	103
TABLA 17.....	105
TABLA 18.....	107
TABLA 19.....	110
TABLA 20.....	112
TABLA 21.....	114

Índice de Imágenes

Figura N° 1. Ubicación de la empresa PERUCOLIVE. Fuente Google Earth	4
Figura N° 2 Diagrama de flujo de elaboración de aceite de oliva virgen. Se indican a la derecha equipos e instalaciones utilizados y a la izquierda los residuos generados. Fuente: Navarro et al. (2005)	20
Figura N° 3. Hidroxitirosol libre o conjugado. Fuente (Ryan <i>et al.</i> 2012).....	25
Figura N° 4. Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i> (100X). Fuente: Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de <i>Chlorella vulgaris</i> Beyerinck (Montes J., 2012).	33
Figura N° 5. Representación esquemática de la preparación de la tinción para la observación de hongo nativo de alpechín. La descripción se realizó con la ayuda de bibliografía especializada (Lane Charles R. Beales P. Hughes K., 2012).	43
Figura N° 6: Unidad experimental para dilución del alpechín.	46
Figura N° 7. Esquema del sistema de tratamiento continuo para la biorremediación de efluentes de la producción de aceite de oliva, cultivado con un hongo nativo aislado de los efluentes y la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	48
Figura N° 8. Observación a microscopía de hongo aislado de alpechín: Se observa en A) Los esporangios redondeados de hifas no septadas del hongo filamentoso y esporangios aislados de alpechín a 10X de aumento. B) Se muestran los esporangios del hongo filamentoso aislado de alpechín a 40X de aumento.	62
Figura N° 9. Comparación del diámetro de crecimiento del hongo aislado en diferentes diluciones de alpechín a los 3, 6, 9, 12, 15 días de evolución.	68
Figura N° 10. Diámetro de crecimiento del hongo aislado según tiempo de evolución	70

Figura N° 11.Comparación del crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> en diferentes diluciones de alpechín a los 3, 6, 9, 12, 15 días de evolución.....	74
Figura N° 12.Crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> según tiempo de evaluación.	76
Figura N° 13. Evaluación del pH en el alpechín según el tiempo.	80
Figura N° 14.Comparación de concentración de la demanda biológica de oxígeno en el	82
Figura N° 15.Porcentaje de remoción de DBO ₅ según el tiempo de evaluación.	84
Figura N° 16.Comparación de concentración de la demanda química de oxígeno en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación.	86
Figura N° 17. Porcentaje de remoción de DQO según el tiempo de evaluación.	88
Figura N° 18.Comparación de la concentración de fenoles en el alpechín en un sistema.....	92
Figura N° 19.Porcentaje de remoción de fenoles según el tiempo de evaluación....	94
Figura N° 20. Comparación de la concentración de cloruros en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación	98
Figura N° 21.Porcentaje de remoción de cloruros según el tiempo de evaluación	100
Figura N° 22. Comparación de la concentración de sulfatos en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación.	102
Figura N° 23. Porcentaje de remoción de sulfatos según el tiempo de evaluación.	104
Figura N° 24. Evaluación la concentración de SST en el alpechín en un sistema de	106
Figura N° 25. Porcentaje de remoción de SST según el tiempo de evaluación.	108
Figura N° 26: Evaluación la concentración de aceites y grasas en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo.	111

Figura N° 27. Porcentaje de remoción de aceites y grasas según el tiempo de evaluación..... 113

Resumen

La presente investigación tiene por objetivo, la biorremediación del efluente de la producción de aceite de oliva (alpechín), mediante un hongo nativo aislado del alpechín y *Chlorella vulgaris* cultivados en un sistema de tratamiento continuo. Para ello, se determinó la resistencia de ambos microorganismos a las diluciones de 0%, 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% del efluente; mostrando una resistencia por parte del hongo hasta la dilución de 75% del efluente a los 15 días de evaluación, con un crecimiento promedio de 3.83 cm de diámetro, en tanto, que la resistencia para la alga *C. vulgaris* fue hasta la dilución de 25%, con un crecimiento promedio 336 667 cél./mL. Para la biorremediación del alpechín, se implementó un sistema de tratamiento continuo, integrado por un primer biorreactor de 20 L de volumen, que contenía 25% cultivo de hongo aislado de alpechín con agitación continua a 25°C, seguido de un sedimentador de 8L conectado a dos fotobiorreactores tipo panel de 37, cada uno con 75% de cultivo de *Chlorella vulgaris*. La evaluación de la biorremediación de alpechín en el sistema de flujo continuo se determinó mediante el porcentaje de remoción de los parámetros físico-químicos y compuestos tóxicos, obteniéndose un 82.74% de remoción de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅), 78,62% de remoción de Demanda Química de Oxígeno (DQO), 88.67% de remoción de Sulfatos, 88.52% de remoción de Sólidos Suspendidos Totales (SST) y 32.46% de remoción de Grasas y Aceites; también se presentó remoción de compuestos tóxicos, 91.67% de remoción de Fenoles, 93.97% de remoción de Cloruros, con una variación del Ph de 4.9- 8.4 durante los 21 días de tratamiento.

Palabras Clave: biorremediación, alpechín, *Chlorella vulgaris*, hongo nativo.

Abstract

The present research aims at the bioremediation of the effluent from the production of olive oil (alpechín) by means of a native fungus isolated from the alpechín and *Chlorella vulgaris* grown in a continuous treatment system. For this purpose, the resistance of both microorganisms to the dilutions of 0%, 12.5%, 25%, 50%, 75% and 100% of the effluent was determined; Showing a resistance by the fungus to the dilution of 75% of the effluent at 15 days of evaluation, with an average growth of 3.83 cm in diameter, while the resistance for alga *C. vulgaris* was up to 25% dilution with An average growth 336 667 cells / mL. For the bioremediation of the alpechín, a continuous treatment system was implemented, consisting of a first bioreactor of 20 L volume that contained 25% culture of isolated fungus of alpechín with continuous agitation at 25 ° C, followed by an 8L settler connected to 2 panel-type photobioreactors of 37, each with 75% *Chlorella vulgaris* culture. The evaluation of the bioremediation of alpechín in the continuous flow system was determined by the percentage of removal of the physical-chemical parameters and toxic compounds, obtaining a 82.74% of biochemical oxygen demand (BOD) removal, 78.62% of Removal of chemical oxygen demand (COD), 88.67% removal of sulfates, 88.52% removal of SST and 32.46% removal of fats and oils; Removal of toxic compounds, 91.67% removal of phenols, 93.97% removal of chlorides, with a Ph variation of 4.9-8.4 during the 21 days of treatment.

Keywords: Bioremediation, alpechín *Chlorella vulgaris*, native fungus.

Introducción

El alpechín contiene materia orgánica que presenta en su constitución grasas, azúcares, sustancias nitrogenadas, ácidos orgánicos, polialcoholes, pectinas, mucílagos, taninos y polifenoles (Fiestas, 1986; Saiz-Jiménez *et al.*, 1987; Martínez N. y Garrido H., 1994). Los problemas relacionados con el alpechín dependen de su alta demanda química de oxígeno (DQO) (hasta 100 g / L), la demanda biológica de oxígeno (DBO₅) (13-46 g / L), pH bajo (4-5), y otros compuestos orgánicos recalcitrantes, tales como fenoles solubles en agua (hidroxitiroso, tiroso, catecol, metilcatecol, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, etc.) y los polifenoles originarios de las aceitunas (Migliorini *et al.*, 2011); la conductividad del agua residual de aceite de oliva (OMW) es de alrededor de 18,0 mmhos/cm (milimhos por centímetro), mientras que el valor medio de SST (sólidos suspendidos totales) y SSV (sólidos en suspensión volátiles) son respectivamente 40-60 g/L y 30-50 g/L (Migliorini *et al.*, 2011). El alpechín es uno de los más complejos efluentes agroindustriales (Azbar *et al.*, 2004). La mayoría de los problemas asociados con la contaminación de aguas residuales de aceite de oliva (OMW) se puede atribuir a la fracción fenólica (Asses *et al.*, 2009). Fenoles monoméricos de OMW se han asociado con lo fitotóxico y las propiedades antimicrobianas de estas aguas residuales, mientras que el color marrón oscuro de OMW, que es particularmente recalcitrante a la decolorización, se ha atribuido a la polimerización de taninos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Amaral *et al.*, 2012).

En los países productores el alpechín es un residuo muy contaminante debido a su elevada composición orgánica, sus efectos inhibitorios y la tendencia de sus

componentes a sufrir oxidación biológica. Estas características y la estacionalidad de su producción dificultan su eliminación. El problema medioambiental que se plantea es la producción de un efluente con alto contenido orgánico, salino y bajo pH, caracteres que impiden su vuelco en cursos de agua superficial o alcantarillado, por no cumplir con los requisitos indicados en la normativa vigente (Navarro *et al.*, 2006).

En el Perú se ha venido obteniendo el aceite de oliva de países como España e Italia desde hace tiempo; sin embargo, últimamente se ha dedicado a producirlo para consumo nacional, pues hay bastante producción sobre todo en el sur (Arequipa, Moquegua y Tacna); incluso nuevas empresas se están aventurando en la exportación de este producto (Fernández 2013).

En los últimos años, se han propuesto como varios métodos de eliminación procesos térmicos (combustión y pirólisis), tratamientos físico-químicos (por ejemplo, la precipitación / floculación, ultrafiltración y ósmosis inversa, adsorción, procesos de oxidación química e intercambio iónico), la extracción de compuestos valiosos (por ejemplo: antioxidantes, aceite residual y azúcares), aplicaciones agronómicas (por ejemplo, la difusión de la tierra), los métodos de los animales de cría (por ejemplo, la utilización directa o después del enriquecimiento de proteínas) y los tratamientos biológicos (Niaounakis *et al.*, 2004). Entre las diferentes opciones los tratamientos biológicos se consideran el más compatible con el medio ambiente y el menos costoso (Mantzavinos *et al.*, 2005).

Hongos y microalgas han sido utilizados ampliamente en procesos de biorremediación con el fin de remover metales pesados y materia orgánica. Los componentes de su pared celular contribuyen a su capacidad, para retener variados contaminantes ambientales presentes en cuerpos de agua.

Algunos hongos aislados de efluentes con alta concentración de lignina y celulosa, presentan alta capacidad de degradar compuestos que poseen una alta concentración de anillos aromáticos; los cuales son degradados por acción enzimática de oxidasas y peroxidasas, que poseen una baja especificidad, lo cual permite su acción sobre la estructura de diferentes sustratos fenólicos y azo. Las microalgas son conocidas por tener un excelente potencial de bioabsorción (Arief *et al.*, 2008 ; Wang y Chen 2008). La pared celular de las microalgas son ricos en grupos funcionales tales como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfhídrico (-SH), fosforilo (-PO₃O₂), y amino (-NH₂), que pueden actuar como sitios de unión para metales (Gupta y Rastogi 2008 ; Monteiro *et al.*, 2009; Bayramoglu *et al.*, 2006) y son adecuados para el proceso de bioabsorción (Xue *et al.*, 1988 ; Richmond 2004 ; Arief *et al.*, 2008 ; Wang y Chen, 2008).

Por lo anteriormente descrito es que con la presente investigación se pretende biorremediar el efluente de la industria de la producción de aceite de oliva (alpechín), mediante tratamiento con un hongo aislado de alpechín y la microalga *Chlorella vulgaris*, cultivados en un sistema de tratamiento continuo.

Capítulo I

Planteamiento del Problema

1.1. Descripción de la realidad

1.1.1. Caracterización del problema.

La eliminación o depuración de los dos subproductos de la industria del aceite de oliva, en especial la del alpechín (efluente de producción de aceite de oliva), constituye un problema para este sector de producción (García R., 1990; Román R., 1990; Fiestas *et al.*, 1992; López y Cabrera, 1993).

La materia orgánica del alpechín está constituida por grasas, azúcares, sustancias nitrogenadas, ácidos orgánicos, polialcoholes, pectinas, mucílagos, taninos y polifenoles (Fiestas, 1986; Saiz-Jiménez *et al.*, 1987; Martínez N. y Garrido H., 1994). La presencia de compuestos fenólicos, de los que se han identificado más de 50 (Saiz-Jiménez *et al.*, 1987), confieren al alpechín tres de sus

más importantes propiedades: el efecto bactericida, el efecto fitotóxico y el color (González *et al.*, 1999; Pérez *et al.*, 1992).

Los problemas relacionados con alpechín dependen de su alta demanda química de oxígeno (DQO) (hasta 100 g / L), la demanda biológica de oxígeno (DBO₅) (13-46 g / L), pH bajo (4-5), y otros compuestos orgánicos recalcitrantes, tales como fenoles solubles en agua (hidroxitirosol, tirosol, catecol, metilcatecol, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido p-cumárico, etc.) y los polifenoles originario de las aceitunas (Migliorini *et al.*, 2011) ; la conductividad del agua residual de aceite de oliva (OMW) es de alrededor de 18,0 mmhos/cm (milimhos por centímetro), mientras que la valor medio de TSS (sólidos suspendidos totales) y VSS (sólidos en suspensión volátiles) son respectivamente 40-60 g / L y 30-50 g / L, con un TOC (materia orgánica total) de 10-30 g / L y TN (nitrógeno Total) de 0,6-1,4 g / L (Migliorini *et al.*, 2011). El alpechín contiene también otros elementos minerales como P₂O₅, K₂O, Na, Mg, Fe, Cu, etc., pero la cantidad de estos compuestos es en gran medida variable.

El alpechín es uno de los más complejos efluentes agroindustriales (Azbar *et al.*, 2004). La mayoría de los problemas asociados con la contaminación de aguas residuales de aceite de oliva (OMW) se puede atribuir a la fracción fenólica (Asses *et al.*, 2009). Fenoles monoméricos de OMW se han asociado con lo fitotóxico y las propiedades antimicrobianas de estas aguas residuales, mientras que el color marrón oscuro de OMW, que es particularmente recalcitrante a la decoloración,

se ha atribuido a la polimerización de taninos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Amaral *et al.*, 2012).

En los países productores el alpechín es un residuo muy contaminante debido a su elevada composición orgánica, sus efectos inhibitorios y la tendencia de sus componentes a sufrir oxidación biológica. Estas características y la estacionalidad de su producción dificultan su eliminación. El problema medioambiental que se plantea es la producción de un efluente con alto contenido orgánico, salino y bajo pH, caracteres que impiden su vuelco en cursos de agua superficial o red de cloacas, por no cumplir con los requisitos indicados en la normativa vigente. (Navarro *et al.*, 2006).

1.1.2. Definición del problema

Se sabe que el Perú ha venido importando aceite de oliva de países como España e Italia desde hace tiempo, pero recientemente se ha dedicado a producirlo; debido a la gran demanda del consumo nacional, existe una creciente producción sobre todo al sur, como en las localidades de Arequipa, Moquegua y Tacna; incluso nuevas empresas se están aventurando en la exportación de este producto. Sin embargo, el tratamiento y disposición final de sus efluentes (alpechín) es inadecuado, ya que estos sobrepasan los LMPs para ciertos parámetros fisicoquímicos (DBO₅, DQO, SST, conductividad eléctrica, pH) y compuestos tóxicos (cloruros, sulfatos y fenoles) (Fernández, 2013).

1.1.3. Delimitación de la investigación

1.1.3.1. Delimitación espacial

Las muestras del efluente de la producción de Aceite de Oliva fueron colectadas por la empresa PERUCOLIVE, ubicada en el Distrito de Atico, Provincia de Caravelí, departamento de Arequipa; cuyas coordenadas en UTM son $16^{\circ} 13' 21.55''$ S y $73^{\circ} 37' 0.49''$ O.



Figura N° 1. Ubicación de la empresa PERUCOLIVE. Fuente Google Earth

La investigación en su parte experimental fue llevada a cabo en el laboratorio de Biología Acuática de la escuela de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

1.1.3.2. Delimitación temporal

La investigación está delimitada temporalmente desde agosto de 2016 como periodo inicial y fue su finalización en mayo de 2017 como segundo periodo.

1.1.3.3. Delimitación cuantitativa

Elaboración de 01 Tesis en el 2017.

1.2 Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Es posible que la microalga *Chlorella vulgaris* y un hongo aislado de efluente de la industria del aceite de oliva (alpechín), cultivado en un sistema de tratamiento continuo, presenten un efecto biorremediador en los parámetros físico-químicos y compuestos tóxicos del alpechín?

1.2.2. Problemas específicos

- ¿Cuáles serán las concentraciones de los parámetros físico-químicos y compuestos tóxicos presentes en el alpechín?
- ¿Es posible aislar una cepa de hongo nativo del alpechín de la producción de aceite de oliva para ser utilizada en biorremediación?
- ¿Presentará resistencia la microalga *Chlorella vulgaris* diferentes diluciones del efluente del alpechín?
- ¿La implementación de un sistema de tratamiento continuo cultivado con un hongo nativo aislado de alpechín *Chlorella vulgaris*, será eficiente para la biorremediación del alpechín?
- ¿Cuáles será la capacidad de biorremediación del sistema de tratamiento continuo con efluentes del alpechin?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Evaluar un sistema de tratamiento continuo para la biorremediación del efluente de la producción de aceite de oliva (alpechín), empacado con cultivo de un hongo nativo y la microalga *Chlorella vulgaris*.

1.3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar los parámetros físico-químicos y compuestos tóxicos del alpechín crudo.
- Aislar, describir, determinar la resistencia de la cepa del hongo nativo aislado a diferentes diluciones del alpechín.
- Determinar la resistencia de *Chlorella vulgaris* a diferentes diluciones del alpechín.
- Determinar la concentración inicial de los microorganismos (hongos nativos y la microalga *Chlorella vulgaris*)
- Diseñar un prototipo a escala de laboratorio de un sistema de tratamiento continuo para la biorremediación del alpechín, empacado con un cultivo de hongo nativo aislado del alpechín y la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Determinar la capacidad de biorremediación del sistema de tratamiento continuo con efluentes de alpechín.

1.4 Justificación de la investigación

- Justificación técnica: Las algas y ciertas cepas de hongos han sido utilizadas ampliamente en procesos de biorremediación con el fin de remover metales pesados y materia orgánica. Los componentes de su pared celular contribuyen a su capacidad para retener variados contaminantes

ambientales presentes en cuerpos de agua. Es deseable obtener suficiente biomasa algal para poder aplicarla al desarrollo de materiales biosorbentes.

- Las microalgas y hongos son conocidos por tener un excelente potencial de bioabsorción (Arief *et al.*, 2008; Wang y Chen 2009). La pared celular de las microalgas son ricos en grupos funcionales tales como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), sulfhidrilo (-SH), fosforilo (-PO₃ O₂), y amino (-NH₂); que pueden actuar como sitios de unión para metales (Gupta y Rastogi 2009 ; Monteiro *et al.*, 2009; Bayramoglu *et al.*, 2006) y son adecuados para el proceso de bioabsorción (Xue *et al.*, 1988 ; Richmond 2004 ; Arief *et al.*, 2008 ; Wang y Chen 2008).
- Justificación ambiental: El uso de microorganismos para la remoción de contaminantes de efluentes industriales, representa un medio renovable y sostenible completamente viable, ya que los microorganismos implicados en la biorremediación se usan como substrato en aguas residuales, haciendo posible una biorremediación de estas; además presenta ciertas ventajas frente a otras alternativas tradicionales, por ser mucho más selectivas, de mayor eficacia para grandes volúmenes, generando pocos o ningún subproducto contaminante en su proceso, resultando un mínimo impacto ambiental.

- Justificación social: La acumulación de efluentes de la industria del aceite de oliva va ocasionar malos olores, toxicidad, presencia de vectores que permiten la transmisión de enfermedades y la modificación de la apariencia física, ocasionando perjuicio a la población de Atico. La remoción de contaminantes de aguas residuales industriales por acción microbiana en sistemas de biotratamiento, permitirá atenuar los efectos tóxicos de contaminantes presentes, permitiendo la reutilización de aguas residuales para ciertas operaciones industriales de la producción del aceite oliva, para riego, para la recuperación de zonas impactadas, para la recreación y para cultivos agrícolas.
- Justificación económica: La implementación de sistemas de tratamiento que implican el uso de aguas residuales como sustrato para el metabolismo microbiano, permitirán disminuir los costos de tratamiento de los efluentes residuales de la industria de la producción del aceite de oliva a gran escala; puesto que no implica monitoreo permanente, ni el uso desmesurado de reactivos químicos para lograr su eficiencia.

1.5 Importancia

En los últimos años, se han propuesto varios métodos de eliminación de tratamiento para efluentes de industrias orgánicas; sin embargo, los tratamientos biológicos presentan diferentes opciones que se consideran los más compatibles

con el medio ambiente y menos costosos (Mantzavinos *et al.*, 2005), en la ciudad de Arequipa las tecnologías aplicadas para el tratamiento de aguas residuales es mínima, las que resultan ser poco eficientes y eficaces. La aplicación de tratamiento biológico de efluentes industriales implica una reducción en los costos de operación, sin generación de subproductos peligrosos.

1.6 Limitaciones

- La obtención de efluentes de la producción del aceite de oliva es limitada, debido a que la mayoría de empresas dedicadas a esta actividad funcionan sin la autorización debida, además de no presentar prácticas adecuadas en su producción.
- El traslado de los efluentes muestreados de la producción del aceite de oliva deberá de ser inmediato, a fin de que las concentraciones de los parámetros físico-químicos no se modifiquen en gran medida. Para esto se seguirá el procedimiento indicado en el “El Protocolo de Monitoreo de efluentes líquidos y Emisiones atmosféricas, aprobado por el Ministerio de Industria, Turismo, Integración y Negociaciones Comerciales Internacionales (MITINCI), mediante R.M. No.026-2000 ITINCI/DM.

Capítulo II

Fundamentos Teóricos de la Investigación

2.1 Marco referencial

2.1.1. Antecedentes de la investigación

Hadiyanto Marcelinus and Soetrisnanto Danny, 2013 en “**Phytoremediations of Palm Oil Mill Effluent (POME) by Using Aquatic Plants and Microalge for Biomass Production**”. Estudiaron la fitorremediación mediante el uso de plantas acuáticas y microalgas; para reducir la DQO de los efluentes de la fábrica de aceite de palma utilizaron el jacinto de agua (*Eichhornia crassipes*), lirio de agua (*Nymphaea sp.*) y *Spirulina sp.* La fitorremediación se llevó a cabo en un proceso secuencial, las plantas acuáticas se utilizaron en la primera etapa de remediación hasta alcanzar una altura de cultivo de 5 - 15cm de longitud durante 3 - 8 días. A continuación, el efluente de la primera etapa se transfirió a la segunda remediación donde la microalga *Spirulina sp.* utilizó este efluente como medio de crecimiento durante 15 días. Los resultados mostraron que las plantas acuáticas fueron

capaces de reducir la DQO, N, P hasta 50, 88 y 64% respectivamente, mientras que las microalgas disminuyeron la DQO, N, P hasta 50,79; 96,5 y 85,92% respectivamente.

Paredes J., 2012, “**Recuperación electroquímica del agua del Alpechín del Aceite de Oliva, para evitar la contaminación del medio ambiente y su reutilización como agua de riego**”. Emplearon el método de electrocoagulación, que consistió en pasar la energía eléctrica, a través de una cuba electrolítica con el efluente a tratar. Se realizaron dos experiencias, de las cuales en la segunda experiencia se trató con una tensión de 8 vol. y 23 amperios en un tiempo de 16 minutos, estableciéndose que al aplicar al efluente denominado alpechín a un proceso electroquímico, este sirve para utilizarse como agua de riego, al observarse en los valores de los análisis, una reducción aproximada de un 17% en concentración de Fenoles, una reducción aproximada de un 21% en la concentración de grasas y aceites y una reducción aproximada de un 35 % en la conductividad.

Hanafi F. *et al.*, 2010, “**Combined Electrocoagulation and Fungal Processes for the Treatment of Olive Mill Wastewater**”. Evaluaron mejorar la eficacia en el tratamiento de las aguas residuales (OMW) del aceite de oliva mediante electrocoagulación (pre-tratamiento) y posterior tratamiento usando hongos. Se encontró que la electrocoagulación era útil como un tratamiento completo, pero diluyendo cuatro veces el agua residual del aceite de oliva, bajo las siguientes

condiciones: tiempo de 15 minutos, la concentración de NaCl 1 g /L, pH inicial 4,5 y la densidad de corriente de 250 A/m² electrólisis. La electrocoagulación fue capaz de disminuir el contenido de DQO y el fenol del agua residual del aceite de oliva de un 25% en más de un 80% y el color en más de un 90%.

La cepa *Aspergillus niger* variedad Tieghem (DSM 24787) fue más eficiente para reducir la demanda química de oxígeno, contenido de fenoles y color; cuando el alpechín fue diluido antes o pretratado. Los resultados muestran que el hongo es capaz de reducir todos los parámetros analizados (DQO, contenido de fenol y color) en al menos un 60%, después de 7 días de crecimiento del 25% OMW.

Hodaifa G. *et al.*, 2007, **“Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*”**. Estudiaron la relación de la cinética de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* con el agua de enjuague que se utiliza en la extracción de aceite de Oliva. Los experimentos se realizaron en 5 fotobiorreactores, cada reactor tenía 0,75 L de capacidad (70mm de diámetro y 200mm de altura) con circulación de agua controlado termostáticamente, agitación magnética, y la aireación; el medio de cultivo de aguas residuales se preparó con agua ultra pura para las concentraciones de 5%, 25%, 50% y 100%. Llegaron a la conclusión que estas aguas residuales industriales (RW) son un medio completo para el cultivo de la microalga *S. obliquus*, el valor más alto de la máxima tasa de crecimiento específico fue de 0.044 h⁻¹ registrado en el cultivo con 5% RW. Sin embargo, la productividad de biomasa resultó mayor en el cultivo con 100% RW.

Garrido H. *et al.*, 1995 en el “**Estudio de la Cinética de Degradación de las Aguas Residuales de la Industria de Extracción de Aceite de Oliva**”. Estudia la aplicación del modelo cinético propuesto por Quiroga y Sales (1991) en la depuración aerobia del alpechín (agua residual del proceso de extracción del aceite de oliva). La desviación de los valores experimentales de los teóricos tiene un error de más del 10%. Las velocidades de degradación de la materia orgánica expresadas como DQO y DBO₅ para una concentración del 80% de alpechín son: 143.9 mg/L·h y de 395 mg/L·h, y como materia orgánica residual DQOr de 9,500 mg/L y una DBO_r de 4,000 mg/L. En la zona exponencial de crecimiento el hongo (*Aspergillus terreus*) crece con una (μ máx) de 0.10 h⁻¹. Utilizaron como método de depuración, la vía aerobia por necesitar un menor tiempo y un menor volumen de fermentado.

Maestro D. *et al.*, 1991 en “**Biodegradación de los Compuestos Fenólicos presentes en el Alpechín**”. Estudiaron tanto cualitativa como cuantitativamente, los fenoles presentes en alpechines frescos y después los depuraron por métodos aerobios y anaerobios. Cuantitativamente se midieron en extractos de alpechín con acetato de etilo los polifenoles totales, por valoración con el reactivo de Folin, los ortos difenoles por formación de quelato con molibdato sódico (reactivo de Arnow), y de meta-difenoles por reacción con vainillina-ácido sulfúrico. El tratamiento aerobio, disminuyó en gran medida el valor de los distintos tipos de fenoles, algunos de ellos (trans- y ciscafeico, p-cumárico, tirosol y oleuropeína). La DQO se

redujo a menos de la mitad (22.000 mg/L). El tratamiento anaerobio final transcurrió de 4 a 5 días y no tuvo lugar ningún tipo de inhibición, presentando constantes de velocidad cinco veces más altas que en el alpechín sin biotratar. La DQO se redujo a 4.000 mg/L y se apreció una desaparición prácticamente total de los compuestos fenólicos inicialmente presentes en el alpechín.

Martínez N.*et al.*, 1991 en **“Biodegradación de Compuestos Fenólicos del Alpechín con *Aspergillus terreus*”**. Estudiaron la degradación de alpechines con *Aspergillus terreus* en condiciones de aerobiosis y temperatura de 28°C, utilizando como parámetro el contenido fenólico. Para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos, utilizaron el método de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Antes de proceder al tratamiento biológico todas las muestras se filtran al vacío en un Büchner, con objeto de eliminar las partículas suspendidas presentes en la muestra. Utilizaron el hongo *Aspergillus terreus*, se inoculó en medio líquido (alpechín en diferentes concentraciones). En todos los casos, los experimentos los realizaron en un reactor de 5 litros de capacidad tipo tanque agitado.

De los experimentos realizados, se pudo concluir, que el *Aspergillus terreus* se comporta como un buen degradador de compuestos fenólicos de bajo peso molecular, habiéndose acomodado bien, cuando se ha partido de alpechín sin diluir, observándose no obstante una disminución de su acción degradadora, al aumentar la concentración de alpechín.

2.2. Marco teórico.

2.2.1 Biorremediación.

Uno de los procesos más usados es la biorremediación que consiste en el uso de organismos vivos (bacterias, hongos, animales y plantas) para degradar sustancias contaminantes. Las biotransformaciones de compuestos orgánicos e inorgánicos por la actividad metabólica de organismos son procesos bioquímicos naturales que ocurren en el medio ambiente, aunque el hombre puede interferir potenciando estos procesos o introduciendo organismos más eficientes para tal fin. La biorremediación puede realizarse in situ, cuando se realiza en su localización original o bien ex situ cuando el sedimento contaminado es transportado a otra localización para su posterior tratamiento.

La biorremediación se viene empleando en el tratamiento de todo tipo de residuos, con el fin de reducir la demanda biológica y química de dichos residuos y de este modo poderlos utilizar o desechar, sin ningún peligro medioambiental. En el caso de residuos orgánicos con potencial fertilizante como los residuos agrícolas, la biorremediación permite eliminar los componentes tóxicos de estos y formar un producto estabilizado con posibilidad de uso, como abonos (Dick y Tabatabai, 1993).

2.2.2 El olivo.

El árbol del olivo (*Olea europea*) de la familia botánica Oleaceae, es la única especie con fruto comestible. Este árbol es perenne, de tronco grueso y corteza grisácea y con hojas que suelen vivir dos o tres años. Sus hojas son simples, de forma lanceolada y bordes enteros, verdes oscuras por el haz, con un característico brillo, debido a la existencia de una gruesa cutícula y blanquecinas por el envés. La flor del olivo es menuda posee un fruto pequeño ovoide de color verde amarillento, de sabor muy amargo y con pulpa oleosa una vez que ha llegado a la madurez. El origen del cultivo del olivo es incierto, ciertos historiadores indican que procede de Persia, otros del valle del Nilo y otro indican que es originario del valle del Jordán. Sin embargo, la mayoría creen que procede de la antigua Mesopotamia, lugar desde el cual se expandió al resto de los países. Su cultivo para la obtención del aceite de oliva empieza en las épocas paleolítica y neolítica (5000 a 3500 A.C). Los primeros documentos escritos sobre el aceite lo constituyen las tablillas minoicas e indican que el primer cultivo del aceite se desarrolla, por lo tanto, en una región comprendida entre Palestina, Creta y Egipto.

En la actualidad, el país que más olivos posee es España, seguido de Grecia e Italia y un poco más atrás se encuentran situadas Túnez, Turquía y Siria. Con el descubrimiento de América (1492), España llevo el olivo a América. De Sevilla parten los primeros olivos hacia las Antillas y después al continente. La producción

total del aceite de oliva del mundo está en constante crecimiento desde principios del siglo XX (Aragón y Palancar, 2001).

2.2.3 Sistemas de extracción de aceite de oliva.

Las aceitunas llegan al molino, donde se deben molturar el mismo día de su recolección, ya que el fruto tiene agua vegetal que fermenta y aceite que se oxida, por lo que el tiempo de almacenamiento deteriora notablemente la calidad del producto final. A la llegada a las almazaras, después de haber efectuado la limpieza, las aceitunas se depositan en las tolvas de recepción, clasificándolas por calidades o variedades para obtener los mejores aceites, diferenciándolas principalmente en función de que procedan del árbol, del suelo o con algún posible defecto; a continuación, se pasan a las tolvas de alimentación del molino, para posteriormente pasar a la molturación y todo el proceso de fabricación (Arjona., *et al.*, 2005). Hasta 1960 aproximadamente, la tecnología empleada en este proceso era el molino de rulos, y separación de las fases por decantación, pero en la actualidad se emplean trituradores metálicos o molinos de martillos y centrifugas tanto horizontales como verticales para la separación de los tres elementos que forman parte de la composición de la aceituna (aceite, orujo y alpechín). Los rendimientos industriales no son del 100% en lo que a separación de estas fases se refiere, por lo tanto, en el orujo como en el alpechín existen restos de aceite, que las maquinas no son capaces de extraer y que en el caso del orujo en el proceso de tres fases y del alperujo en dos fases; se extrae posteriormente, mediante procesos

químicos que no dan un aceite apto para el consumo de forma directa y que se debe refinar. Estos rendimientos industriales, varían dependiendo de multitud de factores, que van desde el proceso seguido para la elaboración del aceite, pasando por la naturaleza de la maquinaria utilizada, y llegando incluso a la profesionalidad y experiencia del personal (Uceda *et al.*, 1995). Los sistemas de extracción de aceite de oliva han ido cambiando progresivamente debido a los avances tecnológicos en el sector, así, a principios de los años 70 el sistema de prensado clásico por presión se sustituyó por un sistema de centrifugas en tres fases. En este sistema se introduce la masa de aceituna en el decánter o decantador centrífugo horizontal junto con agua del exterior, para fluidificar la pasta y hacerla girar a gran velocidad. Con esta centrifugación se consigue la separación por diferencia de densidad de una fase líquida oleosa o aceite, otra líquida acuosa o alpechín resultante del agua añadida para fluidificar la pasta de aceituna antes de introducirla en la centrífuga, la del lavado de aceituna, y la propia que contiene el fruto y una fase sólida u orujo compuesta por la pulpa, hueso y piel de la aceituna. Este sistema requiere la aplicación suplementaria de agua y provoca la aparición de alpechines con un gran poder contaminante (Alburquerque *et al.*, 2004).

A principios de los 90, se introdujo un nuevo sistema de extracción de aceite de oliva mediante centrifugas de dos fases, que redujo en un 75% la proporción de residuos. Con este sistema de extracción no es preciso aplicar agua del exterior a la pasta de aceituna, por lo tanto, el volumen generado de fase acuosa o alpechín es casi nulo. Tras la centrifugación con el sistema conocido como “sistema

ecológico” se obtiene la fase oleosa y un residuo sólido con algo de aceite y con bastante más humedad del que se obtiene en el sistema continuo de tres fases y conocido como alperujo húmedo. Una de las principales ventajas de este sistema de extracción de aceite de oliva con respecto al de tres fases; como se ha mencionado anteriormente, es la reducción de la cantidad de agua empleada con la consecuente disminución de los alpechines obtenidos. Por otra parte, la calidad del aceite de oliva es mayor ya que con el sistema de extracción de dos fases el contenido de fenoles que permanece en el aceite de oliva aumenta 1% con respecto al de tres fases (Vierhuis *et al.*, 2001).

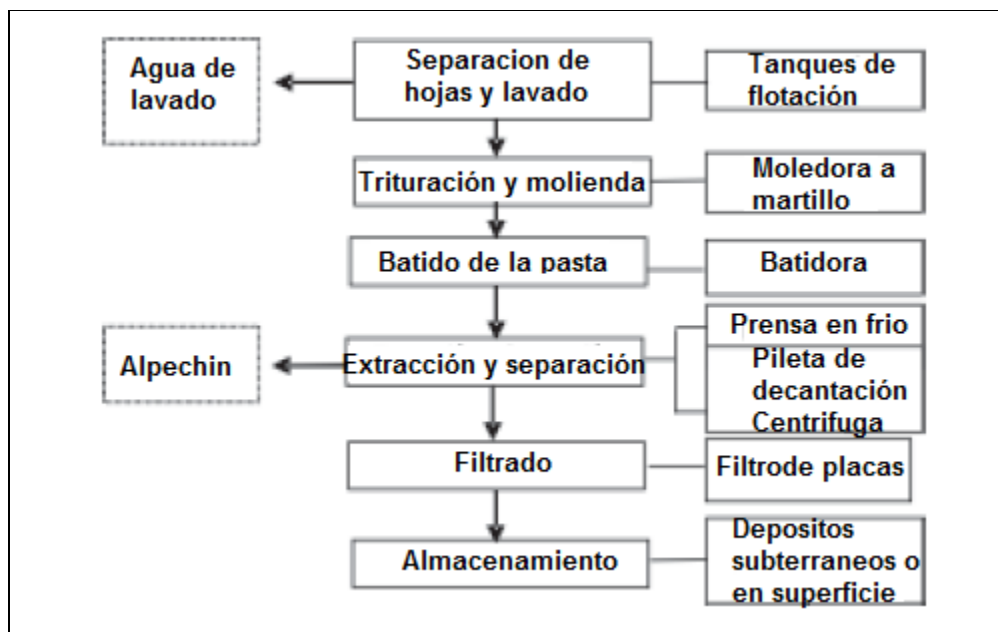


Figura N° 2 Diagrama de flujo de elaboración de aceite de oliva virgen. Se indican a la derecha equipos e instalaciones utilizados y a la izquierda los residuos generados. Fuente: Navarro et al. (2005)

2.2.4 Valoración de los subproductos del olivo.

2.2.4.1 El alpechín.

El alpechín presenta una elevada carga contaminante y su eliminación siempre ha constituido un grave problema medioambiental, de hecho desde 1983 en España está prohibida la descarga directa de los alpechines en lugares públicos. Este residuo está constituido por restos de pulpa, aceite, mucílagos y pectinas; suspendidos en una emulsión estable (Paredes *et al.*, 1999). Su composición química es muy variable dependiendo de la variedad de aceitunas, el proceso de extracción, el periodo de recogida del fruto, etc. El alpechín presenta un alto contenido en materia orgánica así como numerosos nutrientes como magnesio y potasio, además de ácidos orgánicos, alcoholes, lípidos y polifenoles. El poder contaminante del alpechín ha sido atribuido fundamentalmente al contenido fenólico y de ácidos grasos así como al efecto sinérgico de estos con otros compuestos orgánicos e inorgánicos (Della Greca *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a las grandes cantidades de materia orgánica y macronutrientes, sobre todo potasio este subproducto puede ser considerado útil como enmendante y fertilizante (Pallioti y Proietti., 1992). Se han realizado numerosas investigaciones dirigidas a reutilizar, directa o previa transformación estos efluentes con fines agroganaderos o industriales (Roig *et al.*, 2006). Para ello ha sido necesario eliminar la alta demanda química orgánica y el contenido fenólico del alpechín, que pueden ocasionar problemas de contaminación ambiental. Entre los métodos físicos utilizados

destacan la evaporación en balsas, criogénesis, coagulación con limos, separación con membranas (ósmosis reversa y ultrafiltración), floculación con polielectrolitos, concentración térmica y el empleo de biopolímeros que absorben fenoles y sales del alpechín (Sarika *et al.*, 2005).

2.2.4.2 Compuestos fenólicos del alpechín.

Los fenoles poseen uno o varios anillos aromáticos (fenoles monoméricos o polifenoles) con sustituyentes hidroxilos o derivados funcionales tipo éster, metiléster o glicósidos; estos compuestos se encuentran formando parte de los tejidos de las plantas o como metabolitos primarios implicados en la síntesis de material esencial para estos, como la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos o bien intervienen como metabolitos secundarios con una función restringida y poco clara en el metabolismo general, ya que no son necesarios para la fotosíntesis y respiración, pero son requeridos para el crecimiento de las plantas. Los fenoles desempeñan importantes funciones fisiológicas en los vegetales. En general y debido a su condición de polifenoles se oxidan con mucha facilidad y actúan como antioxidantes. También se han encontrado fenoles que de forma específica activan el crecimiento de las plantas e inducen la dormancia de semillas, mientras que otros en cambio inhiben la germinación de semillas, elongación radical, expansión de hojas, fotosíntesis, absorción de nutrientes y acumulación de materia seca en vástagos y raíces de plantas, de ahí sus propiedades fitotóxicas (Rasmussen y Einhellig, 1977; Reynolds, 1989) Los fenoles al acumularse en las

capas más superficiales de los vegetales, captan la mayor parte de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de las mismas en los tejidos internos de la planta, al mismo tiempo que la protegen de microorganismos, por su carácter antimicrobiano (Ryan y Robards, 1998). En la aceituna existe un gran número de compuestos fenólicos (Mateos *et al.*, 2001; Ryan *et al.*, 2002; Bianchi, 2003; Owen *et al.*, 2003). Estos presentan un gran potencial antioxidante y juegan un papel importante dentro de las propiedades químicas organolépticas y nutricionales del aceite de oliva virgen y de la aceituna de mesa. Bien conocido son los efectos positivos de las aceitunas y de los productos que se obtienen a partir de ella, sobre la salud (Perez-Jimenez *et al.*, 2005). Una dieta rica en antioxidantes puede proteger al organismo frente a enfermedades causadas por agentes oxidantes (oxígeno activo, radicales libres, etc.), y que están implicados en la etiología de enfermedades crónicas como el cáncer y la arterosclerosis (Aruoma, 2003; Visioli *et al.*, 2005). También previenen la oxidación lipídica y con ello el deterioro de los alimentos. Por lo tanto, la adición de antioxidantes naturales puede ser una buena estrategia para la formulación y desarrollo de alimentos funcionales, en donde además de proteger al alimento durante su conservación aporta efectos beneficiosos para la salud. La composición fenólica de las aceitunas varía en función de su variedad, estado de madurez y condiciones climáticas en las que se ha desarrollado cada campaña (Romero *et al.*, 2004). En la aceituna aparecen componentes de tipo secoiridoide como la oleuropeína (formada por la unión del ácido elenólico, el hidroxitirosol y una molécula de glucosa), verbascósido y ligustrósido; grupos de compuestos fenólicos derivados del ácido cinnámico (ácido

ferúlico, cafeico y pcumárico) y del ácido benzoico (ácidos 3,4-dihidroxifenilacético y 4- hidroxibenzoico) y otra serie de fenoles como el catecol, metilcatecol, fenilalcoholes (tirosoles, hidroxitirosoles), flavonoides presentes en una concentración relativamente alta (luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, rutina y quercetina) y pigmentos antocianos (cianidina-3-glucósido y cianidina-3- rutinósido) responsables de la coloración violácea de las aceitunas maduras (Ryan *et al.*, 2002).

Entre los compuestos fenólicos del aceite de oliva se encuentra el (3,4-dihidroxifenil) etanol, más conocido como hidroxitirosoles. Este compuesto procede de la hidrólisis de la oleuropeina, un glicósido amargo que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco del fruto del olivo (Ryan y Robards, 1998). En el transcurso de la maduración del fruto y durante el proceso de la maduración de las aceitunas de mesa, la oleuropeina se hidroliza dando lugar a sus componentes: oleuropeina aglicona, hidroxitirosoles y ácido elenóico. El hidroxitirosoles representa el principal compuesto fenólico presente en la aceituna, ya sea en forma libre o conjugada (Figura 3).

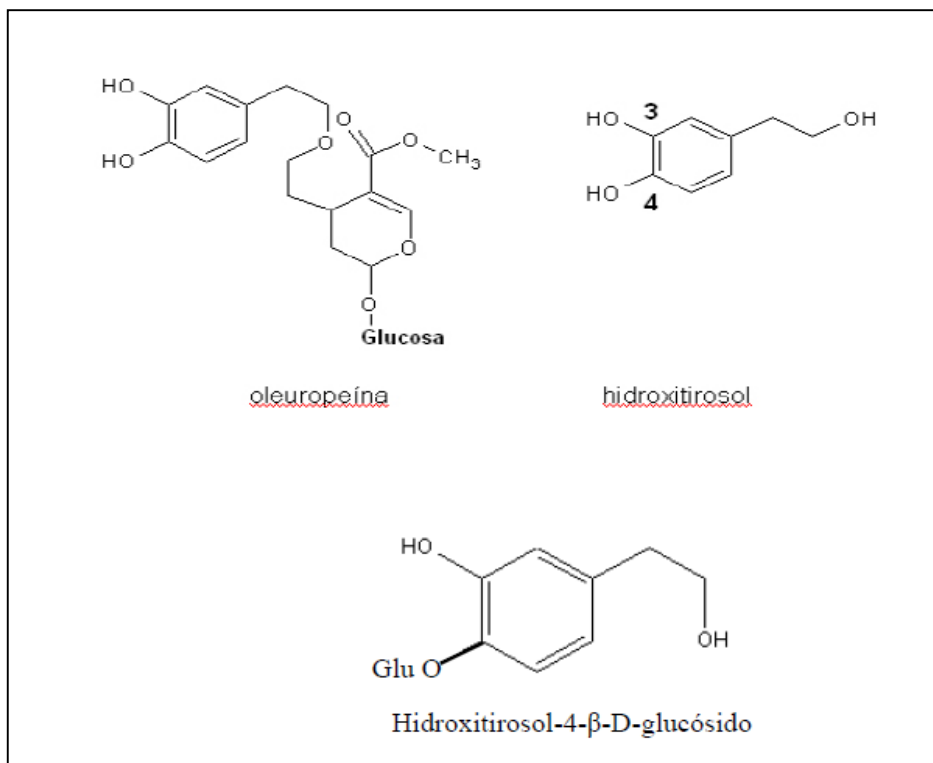


Figura N° 3. Hidroxitirosol libre o conjugado. Fuente (Ryan *et al.* 2012).

Las aceitunas, por lo tanto, son la fuente substancial de hidroxitirosol en la dieta, donde se han encontrado concentraciones de hasta 761mg/kg en algunas variedades (Blekas *et al.*, 2002). Debido a su carácter polar, durante el proceso de elaboración del aceite, la mayor parte de los compuestos fenólicos quedan en residuos acuosos formando parte del orujo, el alpechín o las aguas de lavado. Por consiguiente, estos residuos procedentes de la industria del aceite de oliva también son muy ricos en compuestos fenólicos y podrían constituir una fuente muy importante de hidroxitirosol (Fernández-Bolaños *et al.*, 2002). Por otra parte, debido a su carácter anfipático, una parte de hidroxitirosol permanece en el aceite de oliva. La concentración de hidroxitirosol en el aceite de oliva depende de muchos factores

tales como la variedad de la aceituna de procedencia, su grado de maduración, el proceso de extracción, etc. Entre los aceites de oliva vírgenes españoles el contenido de hidroxitirosol oscila entre 113,7 y 381,2 mg/kg. Otra fuente importante de hidroxitirosol y oleuropeina es la hoja del olivo cuyo extracto se comercializa actualmente como suplemento nutricional. (Brenes *et al.*, 2000).

El hidroxitirosol presenta propiedades farmacológicas y una elevada actividad antioxidante, esta última debida tanto a un efecto quelante de iones de metales, como a un efecto secuestrador de radicales libres. Se ha demostrado que este compuesto fenólico posee una actividad igual o superior a la de otros antioxidantes conocidos como la vitamina E, vitamina C y el hidroxitoluenobutilado (BHT) (Galli y Visioli, 1999). Estudios *in vitro* han demostrado que posee propiedades biológicas que hacen pensar que podría tener efectos beneficiosos en enfermedades tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular y las enfermedades neurodegenerativas (Visioli *et al.*, 2004). Se están realizando numerosos estudios sobre la biodisponibilidad de este antioxidante natural y su metabolismo en humano, que implican importantes efectos beneficiosos para la salud (Visioli *et al.*, 2005).

Un hongo es cualquier miembro de un gran grupo de organismos eucariotas que incluye microorganismos tales como levaduras y mohos, así como los hongos más conocidos. Al igual que otros eucariotas, las células fúngicas contienen núcleos unidos a membranas con cromosomas que contienen ADN con regiones no codificantes llamadas intrones y regiones codificantes llamadas exones. Se

componen de carbohidratos solubles y compuestos de almacenamiento, incluidos los alcoholes de azúcar, disacáridos y polisacáridos (Deacon J.W., 2005).

2.2.5 Característica de los hongos.

Los hongos son organismos heterotróficos y requieren compuestos orgánicos como fuentes de energía. Se reproducen por medios sexuales y asexuales y esporas. Algunas especies crecen como levaduras unicelulares que se reproducen por brotación o fisión binaria. Las células de la mayoría de los hongos crecen como estructura tubular, alargada y filiforme (filamentosa) llamada hifas, que pueden contener múltiples núcleos y extenderse en sus puntas (Alexopoulos C.J., *et al*, 1996). Al igual que algunas especies vegetales y animales, más de 60 especies de hongos muestran el fenómeno de la bioluminiscencia (Desjardin D.E., *et al*, 2008). Los hongos dimórficos pueden cambiar entre una fase de levadura y una fase de hifa en respuesta a las condiciones ambientales.

Los hongos son los únicos organismos que combinan glucanos y moléculas estructurales de quitina en su pared celular (Alexopoulos C.J., *et al*, 1996).

2.2.5.1 Requerimientos de crecimiento de hongos.

A) Temperatura

La mayoría de los hongos son mesófilos y relativamente pocos pueden crecer a 37 ° C o incluso por encima de 30 ° C, mientras que muchas bacterias pueden crecer a esta temperatura. El límite superior para el crecimiento de las necesidades nutricionales de cualquier hongo, los mecanismos de regulación de las reacciones enzimáticas y la permeabilidad de las células.

La estructura y la composición de las membranas citoplasmáticas en las células también se alteran por las temperaturas que determinan la tasa de utilización de sustrato de hongos (Madigan M.T., 1997). Además, la temperatura también juega un papel importante en la determinación de la supervivencia de esporas fúngicas (Hong T.D., *et al*, 1997).

La mayoría de los hongos tienen un crecimiento máximo a una temperatura de 25 ° C con crecimiento reducido en Temperaturas inferiores a 20 ° C y superiores a 35 ° C (Hussain A., *et al.*, 2003). Los hongos termófilos dominan en un ambiente de alta temperatura (por encima de 35 ° C). No son más eficientes en la utilización de sustrato que los mesófilos (Deacon J.W., 2005).

A) PH

Muchos hongos crecerán en el rango de pH 4.0-8.5, o a veces 3.0-9.0, y muestran un pH óptimo relativamente amplio de aproximadamente 5.0-7.0 (Deacon J.W., 2005). Los hongos acidófilos, capaces de crecer hasta pH 1 ó 2, se encuentran en unos pocos ambientes tales como puntas de basura de carbón y desechos de minas ácidas; muchas de estas especies son levaduras. Los hongos alcalofílicos son capaces de colonizar ambientes alcalinos con un pH de 10, e incluyen especies especializadas de hongos filamentosos. La morfología de los hongos también se ve afectada por el pH. típicamente, el cambio morfológico atribuido a la variación del pH está en la forma del gránulo fúngico. Esto varía de esponjoso a grumoso y compacto dependen del pH (Jin B., *et al.*, 1999).

Los hongos pueden cambiar rápidamente el pH del cultivo mediante absorción selectiva o intercambio de iones; por lo tanto, las respuestas de los hongos al pH del cultivo deben evaluarse en medios fuertemente tamponada (Deacon J.W., 2005).

A) Oxígeno

La mayoría de los hongos son estrictos aerobios; no solo requieren oxígeno en algunas, sino en todas las etapas de su ciclo de vida.

Por lo tanto, los hongos suelen encontrarse creciendo en o cerca de la superficie del sustrato que se abren al aire. Algunos hongos son aerobios facultativos pueden sobrevivir en ambientes limitados de oxígeno, incluyendo lodos de depuradora y aguas contaminadas. El suministro insuficiente de oxígeno aumenta la demanda nutricional y por lo tanto disminuye el crecimiento de hongos (Moore-Landecker E., 1996).

2.2.5.2 Nutrientes.

Los hongos tienen necesidades nutricionales muy simples, necesitan una fuente de nutrientes orgánicos para suministrar su energía y para proporcionar esqueletos de carbono para la síntesis celular (Deacon J.W., 2005). Los hongos absorben nutrientes simples y solubles a través de la pared y la membrana plasmática; en muchos casos, esto se logra liberando enzimas para degradar polímeros complejos a nutrientes simples y luego absorberlos.

A) Fuente de carbono.

Los hongos difieren ampliamente en sus habilidades de usar diferentes fuentes de carbono, la eficiencia de utilización de una fuente de carbono definida por hongos puede estar influenciada por la composición del medio y las condiciones de cultivo. Normalmente, las fuentes de carbono pueden ser celulósicas, CH₄, monosacáridos, disacáridos y diferentes tipos de desechos. Los sustratos que

tienen diferente carbono decolorar los colorantes específicos (Cing S. y Yesilada O., 2004). Las investigaciones han demostrado que la degradación del colorante es posiblemente debido al hecho de que los hongos producen las enzimas modificadoras de lignina lacasa, peroxidasa de manganeso y lignina peroxidasa que mineralizan la lignina o colorantes (Chander M. y Arora D.S., 2007). Los hongos son también muy eficaces en la degradación de complejos compuestos orgánicos aromáticos presentes en las aguas residuales; por ejemplo, los compuestos fenólicos presentes en las aguas residuales del molino de oliva son similares a los derivados de la degradación de la lignina (Jaouani A., *et al.*, 2005). Por lo tanto, los hongos son un excelente candidato para tratar las aguas residuales de molienda de aceitunas.

Los hongos también se han utilizado para tratar aguas residuales con alto contenido de DQO de los procesadores de alimentos Industria (Mishra B.K., *et al.*, 2004; Truong Q.T., *et al.*, 2004). La Tabla 1 resume la aplicación y el rendimiento de hongos en el tratamiento de aguas residuales.

TABLA 1
RESULTADOS DEL TRATAMIENTO DE HONGOS EN DIFERENTES AGUAS
RESIDUALES INDUSTRIALES

EFLUENTE RESIDUAL	PROCESO TRATAMIENTO	ESPECIES DE HONGOS	RESULTADOS
Efluentes textiles	SBR	Trametes versicolor	Remoción de color 91-95%
Efluente del aceite de oliva	Reactor airlift	Pycnoporus coccineus	Remoción de DQO 20-50%
Aguas residuales de la industria de papas fritas	Estudios por Lotes	Aspergillus niger	DQO removal: 90%
Almacenamiento de almidón	Reactor airlift	Aspergillus oryzae	DQO removal: 47-96%

Fuente: Truong Q.T., *et al*, 2004.

2.2.6 Características de la microalga *Chlorella vulgaris*

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

Es un alga unicelular de color verde, de forma esférica, con un diámetro que oscila entre 100 y 1.000 veces menor a 1mm. El color verde lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis; gracias a la fotosíntesis, que es el proceso por el que adquiere carbono de la atmósfera (como elemento vital para su crecimiento y desarrollo) forma parte de la base de la cadena alimenticia (Madigan, M., 2002).

Se reproduce muy rápidamente y de forma asexual. Para eso precisa el carbono que obtiene de la fotosíntesis, agua, luz y pequeñas cantidades de minerales. Debido a su rápido crecimiento, se estudia la posibilidad de que sea utilizada para producir biodiesel. Contiene grandes cantidades de proteínas, vitamina C, betacaroteno y vitaminas B (B1, B2, B6 y B12). Es utilizada para fabricar suplementos alimenticios, productos cosméticos contra el envejecimiento, para estimular el sistema inmune y para la desintoxicación de metales pesados (Madigan, M., 2002).

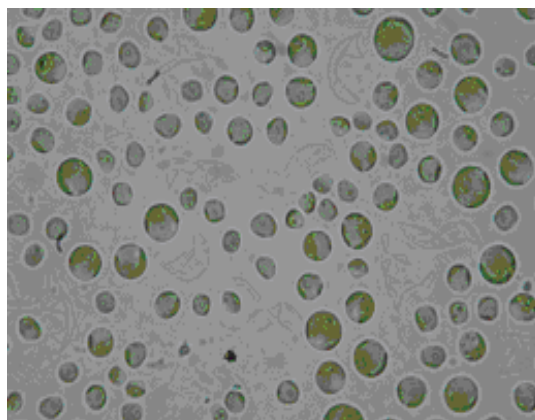


Figura N° 4. Cultivo de *Chlorella vulgaris* (100X). Fuente: Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck (Montes J., 2012).

2.2.6.1 Taxonomía de *Chlorella vulgaris*.

La microalga *Chlorella vulgaris* taxonómicamente (M.W. Beyerinck) se encuentra clasificada de la siguiente manera:

Reino: Protista

División: Chlorophyta

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlorococcales

Familia: Oocystaceae

Género: *Chlorella*

Especie: *Chlorella vulgaris*

2.2.6.2 Usos potenciales de *Chlorella vulgaris*.

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

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

los acuarios o puede ayudar a resolver problemas de salud pública, por medio de la purificación biológica de las aguas negras de las ciudades (Kanno y Kazie, 2005).

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

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

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

2.2.6.3 Parámetros del cultivo de *Chlorella vulgaris*.

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

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

A) Temperatura

La mayoría de la especies de microalgas toleran temperaturas entre 16 y 27°C, aunque esto puede variar de acuerdo a la composición del medio de cultivo o la especie cultivada. Un valor intermedio de 18-20°C es frecuentemente empleado. Temperaturas por debajo de los 16°C pueden retardar el crecimiento, mientras que aquellas por arriba de los 35°C son letales para cierto número de especies (Barsanti *et al.*, 2006).

B) Luz

Como en las plantas, la luz es la fuente de energía que promueve las reacciones fotosintéticas en las algas. Aquí, la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo deben ser considerados (Barsanti *et al.*, 2006).

C) pH

El rango del pH para la mayoría de las especies de algas cultivadas es entre 7 y 9, siendo el rango óptimo 8.2-8.7. Para mantener un pH aceptable es necesario airear el medio de cultivo (Barsanti *et al.*, 2006).

D) Aireación

La aireación es necesaria para prevenir la sedimentación de las algas, para asegurar que todas las células de la población están igualmente expuestas a la luz y los nutrientes, para mejorar el intercambio de gases entre el medio de cultivo y el aire (Barsanti *et al.*, 2006).

2.2.6.4 Potencial biorremediador de *Chlorella vulgaris*.

El género *Chlorella* es un alga verde que, debido a su capacidad de fotosintetizar (le permite carecer de un aporte exógeno de materia orgánica) y a su situación en

las cadenas tróficas como productor primario, le convierte en un organismo ideal para experimentar su capacidad de acumular metales. Se trata de un alga esférica, unicelular, eucariota y que presenta clorofila a y b. Vive en medios marinos, en el agua dulce e incluso en suelos encharcados. Además es frecuente que aparezca en simbiosis con esponjas, hydra y paramecio. Se ha demostrado que es capaz de absorber grandes cantidades de metales, principalmente Cr^{4+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} y Hg^{2+} . El proceso que realiza para incorporar los metales a sus células consiste, a grandes rasgos, en dos etapas.

La primera de ellas, denominada biosorción, transcurre en muy poco tiempo y es similar tanto en la pared celular como en toda la célula, es decir, que ambas estructuras introducen, en un tiempo similar, cadmio, plomo y cobre, mediante un intercambio de iones en el que el Na, Mg y Ca resultan desplazados a favor de los metales pesados. A continuación el metal puede unirse a distintos grupos funcionales como aminas, alcoholes, fosfatos, hidroxilos. Uno de los factores que contribuyen a la eficacia de este sistema es la composición de la pared celular, que posee una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido urónico.

La segunda fase, llamada bioacumulación requiere un período de tiempo mayor y a diferencia de la primera etapa, se trata de un proceso activo en el que se piensa que interviene el metabolismo de la célula (Aksu, Z. 2005).

2.3 Definición de términos

- Alpechín: Efluente de la producción del aceite de oliva presenta un alto contenido en materia orgánica así como numerosos nutrientes como magnesio y potasio, además de ácidos orgánicos, alcoholes, lípidos y polifenoles.
- Biorremediación: Proceso que consiste en el uso de organismos vivos (bacterias, hongos, animales y plantas) para degradar sustancias contaminantes.
- Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅): parámetro que mide la cantidad de dioxígeno consumido al degradar la materia orgánica de una muestra líquida; es la materia susceptible de ser consumida u oxidada por medios biológicos que contiene una muestra líquida, disuelta o en suspensión.
- Demanda Química de Oxígeno (DQO): parámetro que mide la cantidad de sustancias susceptibles de ser oxidadas por medios químicos que hay disueltas o en suspensión en una muestra líquida; se utiliza para medir el grado de contaminación y se expresa en miligramos de oxígeno diatómico por litro (mg O₂/L).

- Valores Máximos Admisibles (VMA): Es aquel valor de la concentración de elementos, sustancias o parámetros físicos y/o químicos, que caracterizan a un efluente No doméstico que va a ser descargado a la red de alcantarillado sanitario, que al ser excedido en sus parámetros aprobados causa daño inmediato o progresivo a las instalaciones, infraestructura sanitaria, tratamiento de aguas residuales y tiene influencias negativas en los procesos de tratamiento de aguas residuales.
- Microalga: Microorganismo que contiene un único núcleo con un cloroplasto, sus estructuras de este tipo de algas solo pueden ser observadas con un microscopio electrónico.
- Compuesto fenólico: Este compuesto procede de la hidrólisis de la oleuropeína, un glicósido amargo, que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco del fruto del olivo.
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia o *high performance liquid chromatography* (HPLC) se realiza en columna, se usa en bioquímica y química analítica.
- Medio Basal Bold (BBM): es un medio de cultivo que contiene nutrientes en agua destilada para el cultivo de la *Chlorella vulgaris*

Capítulo III

Planteamiento Metodológico

3.1. Diseño de la investigación.

Lugar de investigación: Las muestras del efluente de la Producción de Aceite de Oliva fueron colectadas de la Empresa PERUCOLIVE ubicada en el Distrito de Atico, Provincia de Caravelí del Departamento de Arequipa, en el mes de Febrero de 2017. Considerando el volumen total del prototipo a diseñar se colectó un volumen total de 20L de efluente y en 5 frascos estériles se colectó muestras para el análisis de los parámetros físico-químicos (SST, Sulfatos, Cloruros, Fenoles, DBO₅, DQO), los frascos fueron conservados a 4°C de temperatura para preservar las muestras debidamente etiquetadas.

A. Obtención de muestras de hongo nativo aislado de efluente de la producción del aceite de oliva.

La cepa de hongo fue aislada a partir de efluentes de la industria de producción del aceite de oliva, de la que se colectó 250ml de muestras de agua, en envases estériles debidamente rotulados, los mismos que fueron trasladados y almacenados en el laboratorio a 4°C. (Protocolo de Monitoreo de efluentes líquidos y Emisiones atmosféricas, aprobado por el Ministerio de Industria, Turismo, Integración y Negociaciones Comerciales Internacionales (MITINCI), mediante R.M. NO. 026-2000 ITINCI/DM.)

A partir de la muestra colectada se prepararon diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 además de la muestra sin diluir, las mismas que se prepararon por triplicado de las cuales se tomó un inóculo de 50 uL en medio sólido de cultivo simple Sabouraud suplementado con 50% del efluente de la producción del aceite de oliva (Nuñez R., 2007). Los cultivos fueron incubados por 72 horas a 25°C.

El hongo aislado fue descrito en cuanto a sus características culturales y morfológicas. Para la observación del hongo aislado de alpechín se realizó la siguiente metodología (López J., *et al.*, 2014):

1. Se colocó el material necesario en la cámara de siembra.
2. Se seleccionó las colonias para realizar las tinciones.

3. Se cortaron segmentos de cinta adhesiva transparente aproximadamente de 1 cm².
4. Los segmentos de cinta se pegaron en un asa de siembra.
5. Se colocó una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos.
6. Con el lado adhesivo de la cinta, se tocó la parte superior de hongo.
7. Se colocó la cinta sobre una gota de azul de lactofenol y se puso otra gota de azul de lactofenol.
8. Se puso un cubreobjetos sobre la preparación.
9. Se observó en microscopio óptico en aumento de 40 X.

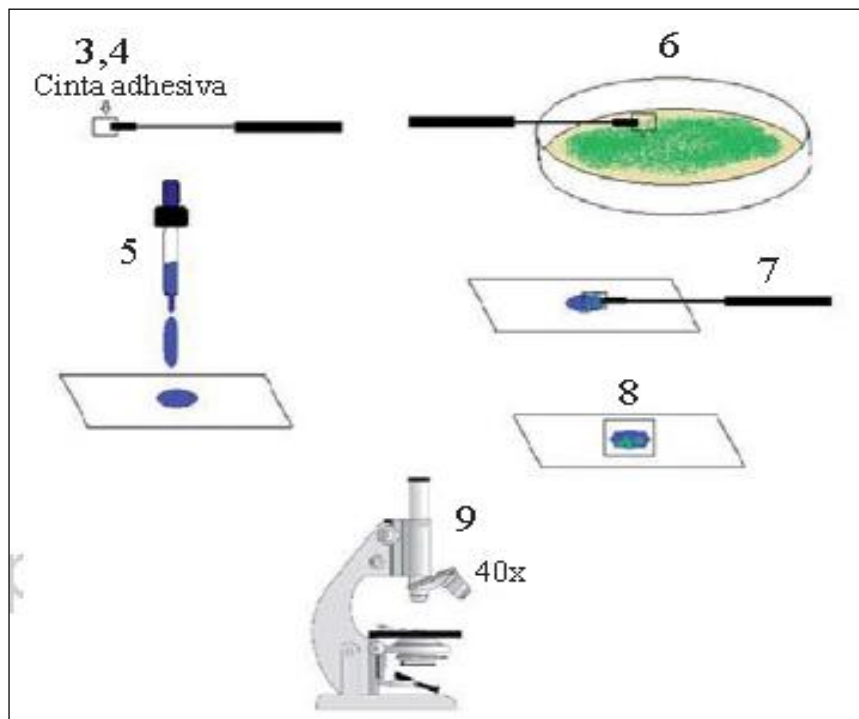


Figura N° 5. Representación esquemática de la preparación de la tinción para la observación de hongo nativo de alpechín. La descripción se realizó con la ayuda de bibliografía especializada (Lane Charles R. Beales P. HughesK., 2012).

B. Obtención de muestras de la microalga *Chlorella vulgaris*.

La cepa pura de *Chlorella vulgaris*, fue proporcionada por el laboratorio de biología acuática, plenamente identificada y aislada en medio de cultivo líquido.

C. Determinación de la resistencia del hongo aislado y de la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes diluciones del efluente de la producción de aceite de oliva.

Para la evaluación de la resistencia del hongo aislado y de la microalga *Chlorella vulgaris*, en diferentes diluciones del efluente se implementó un ensayo experimental mediante un diseño completamente randomizado (DCR). El diseño completamente al randomizado consiste comparar dos o más tratamientos, solo se considera dos fuentes de variabilidad los tratamientos y el error aleatorio, el diseño completamente al randomizado está basado en una prueba de varianza en este caso anova.

C.1) Diseño completamente randomizado (DCR)

Ambos bioensayos se realizaron por triplicado, se utilizó 6 tratamientos con diferentes diluciones del efluente de la producción de aceite de oliva (alpechín):

1. FACTOR:	NIVELES
DILUCIONES DEL EFLUENTE DE LA PRODUCCIÓN DE ACEITE DE OLIVA	C = 0%
	T1=5%
	T2=25%
	T3=50%
	T4=100%

-La Unidad experimental para el Hongo aislado estuvo representada por una placa petri de 9cm de diámetro conteniendo 20ml de medio cultivo sabouraud para cada dilución del efluente de la producción del aceite de oliva, en las que se inoculo el hongo aislado, las placas fueron incubadas a temperatura constante de 25°C.

-La Unidad experimental para *Chlorella vulgaris* estuvo representada por un matraz de 250mL, cultivado con 25mL de biomasa de Chlorella vulgaris en medio del cultivo BBM (Medio Basal Bold) que presenta la siguiente composición en g/L: NaNO_3 , 0,75 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,02 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,07 g; K_2HPO_4 , 0,07 g; De NaCl , 0,02 g; KH_2PO_4 , 0,17 g; 6 ml de solución de metal P-IV ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,75 g; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,097 g; de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,041 g; de ZnCl_2 , 0,005 g; de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,002 g y $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,004g) y 225mL de cada dilución del efluente, con aireación continua a 25 °C.

- El Croquis de la figura 6 muestra la disposición de tratamientos en las UE para dilución del efluente de la producción de aceite de oliva.

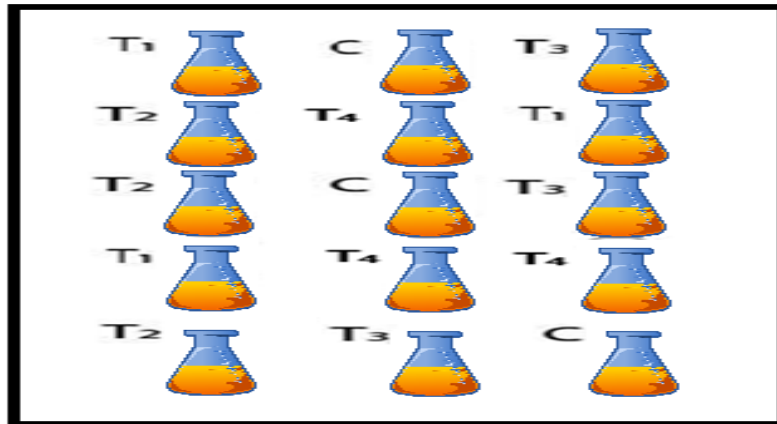


Figura N° 6: Unidad experimental para dilución del alpechín.

- La evaluación de la resistencia del hongo aislado; se evaluó mediante la medición del halo miceliar, con la ayuda de un vernier, cada 3 días después de su cultivo inicial, hasta que reporten su máximo crecimiento por cada dilución del efluente de la producción del aceite de oliva.
- La Evaluación de la resistencia de *Chlorella vulgaris*; se evaluó mediante la densidad celular, mediante conteo directo con cámara de Neubauer (contando 4 campos de la cámara y multiplicando por el factor de corrección 10 000). en microscopio óptico a 20X, cada 3 días después de su cultivo inicial, hasta que reportaron su máximo crecimiento por cada dilución del efluente de la producción del aceite de oliva.

D. Implementación de un sistema de tratamiento continuo para la biorremediación de efluentes de la producción de aceite de oliva, empacado con un hongo nativo aislado de los efluentes y la microalga *Chlorella vulgaris*.

Para evaluar la biorremediación del efluente de la producción de aceite de oliva se implementó un sistema de tratamiento continuo compuesto por un biorreactor de 20 L con agitación continua a 25°C conteniendo 25% de cultivo de hongo aislado de alpechín (v/v), conectado a un sedimentador de 8 L volumen, el sedimentador estará conectado a dos fotobiorreactores tipo panel de 37 cm de alto x 28 cm de largo x 6 cm de ancho cada uno con 75% de cultivo de *Chlorella vulgaris*, con llaves de paso a 6 cm de la base, conectado con mangueras de (½ pulgada) con bombas peristálticas de 20mL/min., con aireación constante, con fotoperiodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad, mediante 2 fluorescentes de 30 watts y a 25°C de temperatura; como se muestra en el siguiente esquema.

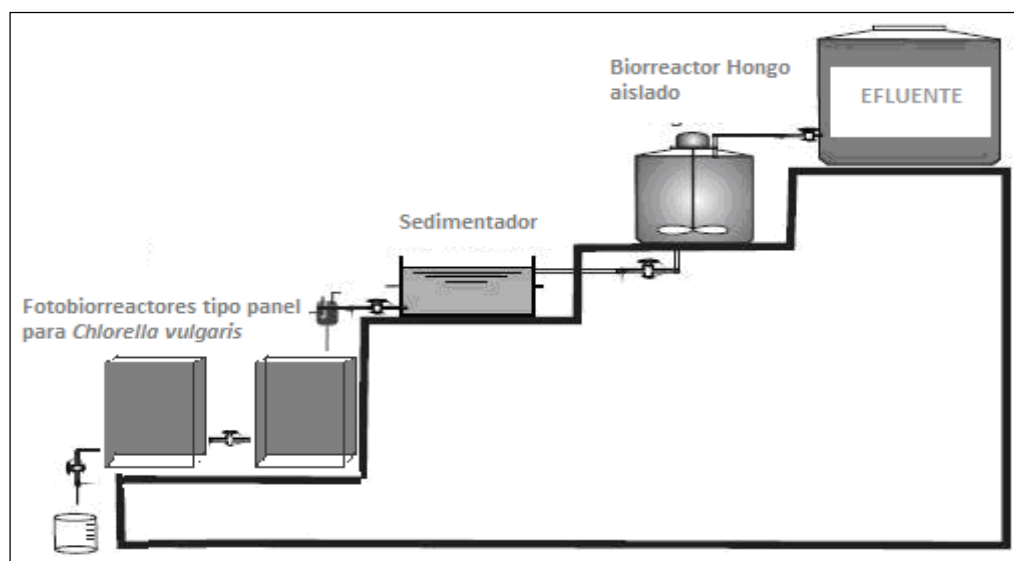


Figura N° 7. Esquema del sistema de tratamiento continuo para la biorremediación de efluentes de la producción de aceite de oliva, cultivado con un hongo nativo aislado de los efluentes y la microalga *Chlorella vulgaris*.

D.1) Determinación del crecimiento del cultivo de *Chlorella vulgaris* en el sistema de fotobiorreactores en panel.

El crecimiento se determinó mediante la densidad celular (N), se evaluó por conteo directo mediante cámara de Neubauer en microscopio óptico a 20X cada 3 días, durante 21 días de evaluación.

E. Evaluación de los parámetros físico-químicos DBO₅, DQO, fenoles, cloruros, sulfatos, SST y pH, del efluente de la producción de aceite de oliva.

E.1) Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO₅).

La determinación se realizó según los métodos estándar para el examen de aguas y aguas residuales (APHA, 2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Se tomó la muestra en envases de plástico y se llenó evitando airear, hasta el borde superior. El análisis se realizó inmediatamente antes de 24 horas de la recolección.

La muestra o una dilución adecuada de la misma, se incubará por 5 días a 20°C en la oscuridad; se medirá la concentración de oxígeno disuelto antes y después de la incubación; el consumo de oxígeno correspondiente a la demanda bioquímica de oxígeno se calcula mediante la ecuación

$$\text{DBO}_5 \text{ mg/L} = (\text{ODi} - \text{ODf}) \times V/T$$

Dónde:

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

ODf = concentración de oxígeno disuelto final

V = capacidad de la botella de DBO₅, (300 mL)

T = mL de muestra tomados para la dilución

Los resultados se expresarán en mg de oxígeno consumido/L

La evaluación de la DBO₅ se realizó cada 7 días, durante 21 días de evaluación.

E.2) Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO).

La determinación se realizó según APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. La muestra será oxidada con una cantidad conocida de dicromato de potasio en exceso, en medio ácido y con catalizadores. El dicromato de potasio remanente será determinado espectrofotométricamente a 600 nm y se calculará según la ecuación:

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

Dónde:

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

T = mL de muestra tomada para el ensayo

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

La evaluación de la DQO se realizó cada 7 días durante 21 días de evaluación.

E.3) Determinación de fenoles

Según Determination of Phenols in Drinking Water with Agilent Bond Elut Plexa SPE and HPLC, La muestra se preparó ajustando a un pH de 2 con una solución de

ácido fosfórico (0,1 mol / L). El Agilent Bond Cartucho Elut Plexa se acondiciono previamente con 3 ml de tetrahidrofurano y 3 ml de metanol, a continuación se equilibró con 3 ml de agua.

La muestra de 250 ml se pasó a través del cartucho a una tasa de 5 ml/ min al vacío; después que la muestra pasó completamente a través del cartucho, el cartucho se lavó con 2 ml de agua; el cartucho se secó bajo presión negativa por debajo de 2,0 kPa durante 3 minutos; finalmente, el cartucho fue eluido con 3 ml de tetrahidrofurano, la solución eluida resultante se llevó hasta 0,5 ml con agua; a continuación, la solución se filtró a través de una membrana de 0,45 micras filtro (p / n 5185 a 5836) y se analizó por HPLC.

La evaluación de fenoles se realizó cada 7 días, durante 21 días de evaluación.

E.4) Determinación de cloruros

La determinación se realizó según APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, se tomó en un matraz erlenmeyer de 250 mL, 100 mL de muestra o una alícuota diluida a 100 mL. Se agregará 3 mL de hidróxido de aluminio, se mezcló, sedimentó y filtro. Se Agregó 1 mL de solución indicadora. Finalmente se tituló con solución estándar de nitrato de plata, hasta color amarillo-rosado como punto final.

La evaluación de cloruros se realizó cada 7 días, durante 21 días de evaluación.

E.5) Determinación de sulfatos

La determinación se realizó según APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, se colocó 10 ml de la muestra de efluente tratado en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se añadió 1 ml de la solución ácida acondicionadora, se mezcló bien y se agregó 0.5 g de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y después se agitó durante 1 minuto. Se transfirió la muestra a una celda de 1 cm del espectrofotómetro, para después leer la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm dentro de los 2 minutos siguientes. Se obtuvo las ppm de SO_4^- , de acuerdo con la lectura de absorbancia de la muestra.

La evaluación de sulfatos (SO_4^-) se realizó cada 7 días, durante 21 días de evaluación.

E.6) Determinación de aceites y grasas

La determinación se realizó según APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, los aceites y las grasas viscosas presentes, así como los sólidos, son separados por filtración de la muestra líquida acidificada, mientras que los jabones metálicos son hidrolizados por la acidificación. Una vez separados de la solución, en el material retenido en el filtro se realiza una extracción en un equipo Soxhlet, utilizando como solvente éter de petróleo. La

ganancia de peso en el frasco de extracción luego de evaporado el solvente corresponde al contenido de aceites y grasas presentes en la muestra.

E.7) Determinación del pH y sólidos suspendidos totales (SST)

El pH se determinó directamente mediante un equipo digital múltiparámetro Hanna cada 3 días hasta los 21 días de evaluación.

F. Determinación de la capacidad de biorremediación del efluente de la producción del aceite de oliva, mediante el sistema de tratamiento continuo.

La capacidad de biorremediación se midió mediante el porcentaje de remoción de los parámetros físico-químicos se calculó mediante la siguiente fórmula.

$$\% R = \frac{C_F \times 100}{C_o} - 100$$

Donde:

%R= porcentaje de remoción

C_F = concentración final del parámetro

C_o = concentración inicial del parámetro

3.2. Tipo y nivel de la investigación

3.2.1. Tipo de la investigación

El tipo de investigación es Básica.

3.2.2. Nivel de la investigación

El nivel de la Investigación es Experimental.

3.3. Método.

El método que se empleado en la investigación corresponde al método experimental (causa- efecto), ya que se manipuló las variables de interés por parte del investigador, mediante el planteamiento de un diseño experimental DCR (diseño completamente randomizado)

3.4. Hipótesis de la investigación

Es probable que un hongo nativo del efluente de la producción del aceite de oliva y la microalga *Chlorella vulgaris*, empacados en un sistema de biorremediación continuo presente alta capacidad de reducir la concentración de parámetros fisicoquímicos y compuestos tóxicos del alpechin.

3.5. Variables de investigación

3.5.1. Variable independiente

- Sistema de tratamiento continuo.

3.5.2. Variable dependiente

- Caracterización de parámetros fisicoquímicos y compuestos tóxicos del alpechín.
- Capacidad de biorremediación del alpechín

3.5.3. Operacionalización de variables.

TABLA 2

Operalización de variables

VARIABLE	DIMENSIONES DE LA VARIABLE	INDICADOR	UNIDAD	ESCALA
Sistema de tratamiento continuo (Variable Independiente)	Resistencia frente alpechín del hongo nativo aislado	Crecimiento de micelio en medio de cultivo sólido con diferentes diluciones del efluente de la producción del aceite de oliva.	Diámetro cm.	Cuantitativa continua Razón
	Resistencia frente alpechín de <i>Chlorella vulgaris</i>.	Recuento del número de individuos de <i>Chlorella vulgaris</i> en cámara de Neubauer, en diferentes diluciones del efluente de la producción del aceite de oliva.	Nº individuo s/ml	Cuantitativa Discreta Razón
Caracterización de parámetros físicoquímicos y compuestos tóxicos del alpechin	Concentración Inicial de los parámetros físico químicos del alpechín	DBO	mg/L	Cuantitativa
		DQO	mg/L	continua
		SST	mg/L	Razón
	ACEITES Y GRASAS	mg/L	Cuantitativa	
		PH	Unidades de pH	continua Intervalo

VARIABLE	DIMENSIONES DE LA VARIABLE	INDICADOR	UNIDAD	ESCALA
(variable dependiente)	Concentración Inicial	FENOLES	mg/L	Cuantitativa
	de los compuestos	CLORUROS	mg/L	continua
	tóxicos del alpechín	SULFATOS	mg/L	razón
		DBO	mg/L	Cuantitativa
		DQO	mg/L	continua
Capacidad de biorremediación del alpechín (variable dependiente)	Concentración residual de los	SST	mg/L	razón
	parámetros físico	ACEITES Y GRASAS	mg/L	Cuantitativa
	químicos del efluente	PH	Unidades de pH	continua
(variable dependiente)	de la producción de			Intervalo
	aceite de oliva	FENOLES	mg/L	Cuantitativa
		CLORUROS	mg/L	continua
Capacidad de biorremediación del alpechín (variable dependiente)		SULFATOS	mg/L	razón
		Reducción en la concentración		Cuantitativa
	Eficiencia	de parámetros fisicoquímicos y compuestos tóxicos	%	continua
Capacidad de biorremediación del alpechín (variable dependiente)		Reducción en la concentración		Cuantitativa
	Eficiencia	de parámetros fisicoquímicos y compuestos tóxicos	%	continua

3.6. Técnicas, instrumentos y fuentes de recolección de datos.

3.6.1. Técnicas de la investigación.

Técnica evaluación directa, mediante la aplicación de Normas y protocolos:

- Valores máximos admisibles de las descargas de aguas residuales en el sistema de alcantarillado sanitario aprobado por D.S. N° 003-2011-VIVIENDA.
- Protocolo de Monitoreo de efluentes líquidos y Emisiones atmosféricas, aprobado por el Ministerio de Industria, Turismo, Integración y Negociaciones Comerciales Internacionales (MITINCI), mediante R.M. No. 026-2000 ITINCI/DM.)

Técnica Estadística, se emplearán pruebas de estadística paramétrica como la prueba de comparación de ANOVA, estadísticos descriptivos como la media y la desviación estándar y la prueba de especificidad de Tukey para determinar el mejor tratamiento.

Manejo de Software, se hará uso de programas:

- Excel 2010: procesar datos
- SPSS versión 22: análisis estadísticos para el DBO₅, DQO, crecimiento de hongos y algas, sulfatos, fenoles, sólidos totales, Ph, aceites y grasas.
- GraphPad Prism versión 6: graficar las variables analizadas.

3.6.2. Instrumentos de la investigación.

- Equipo para medición DBO₅.
- Equipo para medición DQO.
- Equipo Multiparámetro , para medir parámetros fisicoquímicos (Ph,SST)
- El HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica.
- Espectrofotómetro, para medir Cloruros, Sulfatos, Fenoles.

3.6.3. Fuentes de recolección de datos.

- Empresa productora de aceite de oliva PERUCOLIVE.
- Laboratorio de Biología Acuática de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Agustín.
- Publicaciones Oficiales de ScienceDirect.com sobre tratamiento de aguas.
- Norma Técnica: Valores máximos admisibles de las descargas de Aguas residuales en el sistema de alcantarillado Sanitario aprobado por D.S. N° 003-2011-VIVIENDA .

3.7. Procesamiento y análisis de la información.

3.7.1. Medidas estadísticas.

Se realizó el cálculo de promedios desviaciones estándar, pruebas de comparación de estadística de Análisis de la Varianza (ANOVA) para la comparación de las variables, para el 95% y 99% de confianza y pruebas de contraste múltiple de Tukey, para indicar las diferencias entre evaluaciones.

3.7.2. Representación.

La presentación de resultados se efectuó mediante tablas, gráficos en barras y gráficos de tendencia (concentración según tiempo de evaluación).

Capítulo IV

Resultados y Discusiones

4.3 Caracterización de la cepa fúngica nativas de efluentes industriales.

El hongo encontrado presentó las siguientes características morfológicas: se trata de un hongo filamentoso, hifas gruesas y aseptadas, esporangia café, con esporas ovoides. Las colonias son de crecimiento rápido (cubren prácticamente toda la superficie de la placa en tres días a 25 °C), de aspecto consistente, con denso micelio aéreo, algodonosas, de un color gris oscuro (micelio grisáceo - marrón) (Figura 8).

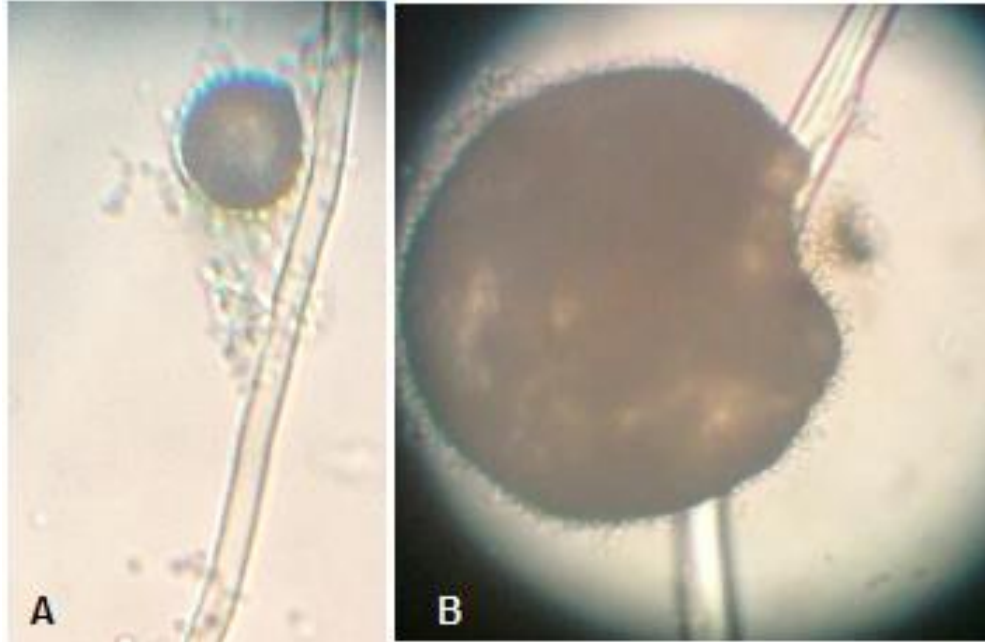


Figura N° 8. Observación a microscopia de hongo aislado de alpechín: Se observa en A) Los esporangios redondeados de hifas no septadas del hongo filamentoso y esporangios aislados de alpechín a 10X de aumento. B) Se muestran los esporangios del hongo filamentoso aislado de alpechín a 40X de aumento.

4.4 Caracterización de los parámetros físico-químicos y compuestos tóxicos del alpechín.

Los parámetros físico-químicos evaluados fueron DBO₅, DQO, SST, aceites y grasas, mientras que los compuestos tóxicos considerados en la evaluación de la muestra de alpechín fueron fenoles, cloruros y sulfatos, la caracterización previa al tratamiento en el sistema de tratamiento continuo, se muestra en la tabla 3, comparado a los límites máximos permisibles; según el decreto supremo D.S. N° 021-2009-VIVIENDA, las muestra tomadas de los efluentes de alpechín exceden

estos límites considerablemente, la DBO₅, DQO, SST y los aceites debieran ser según la norma 50mg/L, 250mg/L, 50mg/L, 10 mg/L respectivamente. El análisis inicial muestra un fuerte contraste, ya que para los mismos parámetros se obtienen 59112.00 mg/L, 128134.00 mg/L, 1742.00 mg/L, 41.90 mg/L. Estos residuos generan una degradación del ambiente en el que son vertidos, ya que a simple vista se pudo notar la erosión causada, el ph tomado fue de 4, este junto al contenido alto de SST contribuye a la descompensación, y el desequilibrio de elementos vitales para la supervivencia de plantas; así como de nitratos y contenido de C/N, los compuestos fenólicos son responsables de fitotoxicidad y tanto como los cloruros y sulfatos, pueden por lixiviación contaminar capas profundas del suelo, llegando a aguas subterráneas aumentando así la contaminación del agua.

TABLA 3
CARACTERIZACIÓN INICIAL DE PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS DE
ALPECHÍN COMPARADOS VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES (VMA) DE LAS
DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES NO DOMÉSTICAS EN EL SISTEMA DE
ALCANTARILLADO SANITARIO (D.S. N° 021-2009-VIVIENDA).

PARÁMETRO	CONCENTRACIÓN	VMA
FISICOQUÍMICO	(mg/L)	(mg/L)
DBO ₅	59112.00	500
DQO	128134.00	1000
SST	1742.00	500
ACEITES Y GRASAS	41.90	100
COMPUESTOS	CONCENTRACIÓN	
TÓXICOS	(mg/L)	
FENOLES	0.36	-
CLORUROS	34722.00	-
SULFATOS	6000.00	500

4.5 Determinación de la resistencia de la cepa de hongo nativo aislado y de *Chlorella vulgaris* a diferentes diluciones del alpechín.

La resistencia de la cepa de hongo aislado y de la microalga *Chlorella vulgaris* se realizó a las concentraciones de 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% de alpechín, en medio de cultivo sólido Sabouraud y medio de cultivo líquido BBM respectivamente para cada microorganismo, como se muestra a continuación:

TABLA 4
RESISTENCIA DE CEPA DE HONGO NATIVO AISLADO DE ALPECHÍN A
DIFERENTES DILUCIONES DEL ALPECHÍN A DIFERENTES TIEMPOS DE
EVALUACIÓN.

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO (cm)					
DILUCIÓN DE ALPECHÍN	3 (DÍAS)	6 (DÍAS)	9 (DÍAS)	12 (DÍAS)	15 (DÍAS)
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
0%	3.60 ± 0.66	4.03 ± 1.04	4.47 ± 1.27	4.83 ± 0.97	5.03 ± 0.84
12,5%	2.27 ± 0.55	2.77 ± 0.29	2.85 ± 0.30	2.97 ± 0.31	3.30 ± 0.53
25%	2.20 ± 0.10	2.28 ± 0.13	2.45 ± 0.15	2.80 ± 0.20	3.20 ± 0.40
50%	2.27 ± 0.32	2.40 ± 0.26	2.47 ± 0.24	3.17 ± 0.06	3.60 ± 0.26
75%	2.17 ± 0.35	2.12 ± 0.29	2.38 ± 0.38	2.60 ± 0.46	3.83 ± 0.67
100%	2.00 ± 0.26	2.12 ± 0.29	2.22 ± 0.29	2.30 ± 0.26	2.57 ± 0.40
ANOVA(F)	5.983	6.809	6.347	10.604	6.777
SIGNIFICANCIA (p)	0.005 (P<0.01) (A.S.)	0.003 (P<0.01) (A.S.)	0.004 (P<0.01) (A.S.)	0.000... (P<0.01) (A.S.)	0.003 (P<0.01) (A.S.)
C.V.	17.22 %	18.59 %	20.57 %	15.30 %	7.25 %

Se observa en la Tabla 4, los valores de crecimiento promedio del hongo aislado de alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, resultado del efecto de diferentes diluciones de alpechín, se detallan también los valores del estadístico de Fisher (F) del “Análisis de Varianza”, los que indican diferencias altamente significativas (AS) en el diámetro de crecimiento del hongo aislado en las diluciones realizadas hasta los 15 días de evaluación. Los CV obtenidos para cada evaluación muestran valores menores al 30% establecido como límite, para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas y tampoco se presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.

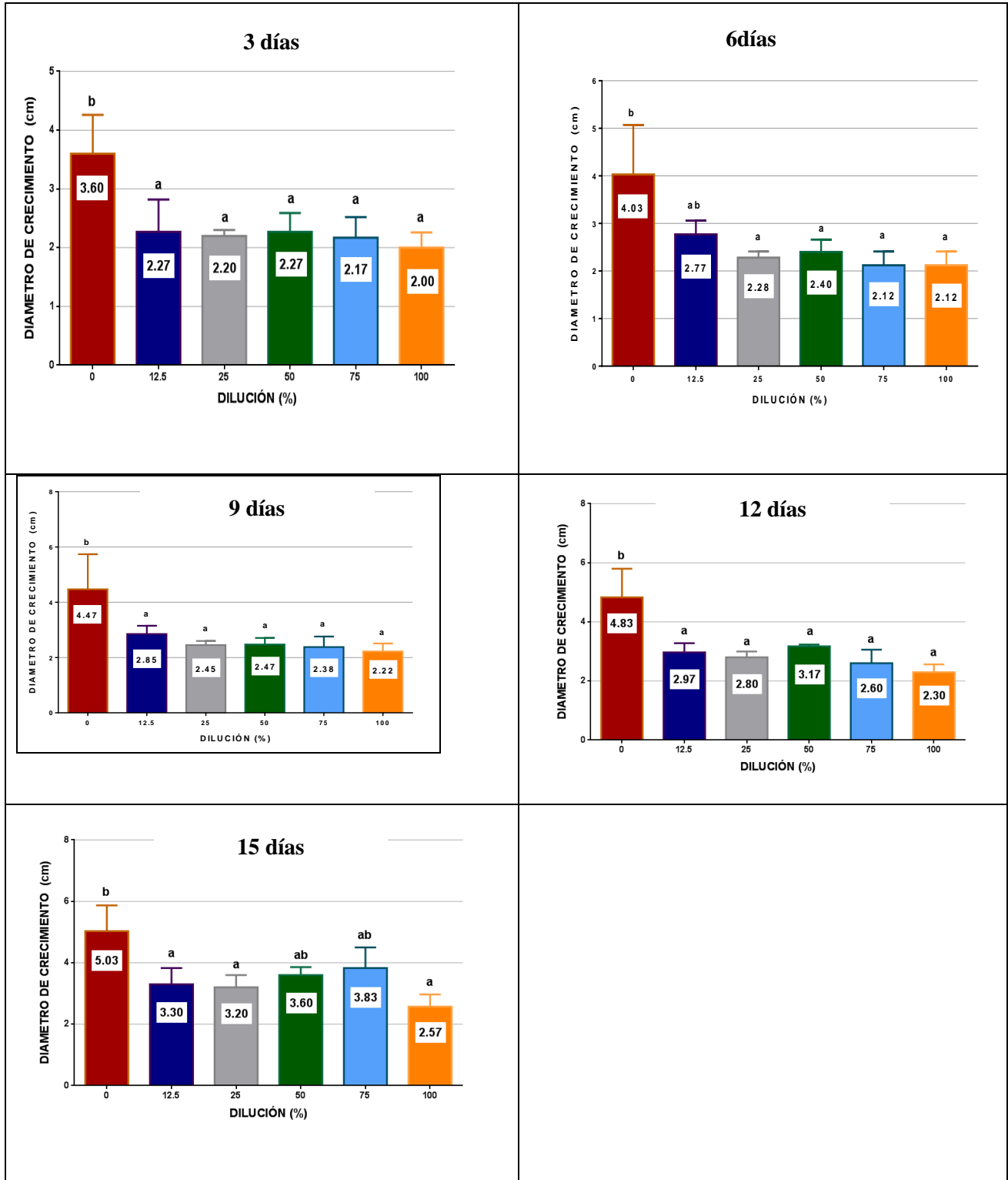


Figura N° 9. Comparación del diámetro de crecimiento del hongo aislado en diferentes diluciones de alpechín a los 3, 6, 9, 12, 15 días de evolución.

En la Figura 9, se muestra los resultados de la prueba de Tukey, para el diámetro promedio del hongo sometido a diferentes concentraciones de alpechín, medidos a 3, 6, 9, 12 y 15 días, estos gráficos nos indican la presencia de dos grupos estadísticamente diferentes (A y B), en los 5 días de haber medido la dilución 0%, que viene a ser nuestro grupo control; corresponde al grupo B, según la prueba de Tukey, en esta dilución se muestra un mayor diámetro de crecimiento del hongo. El tercer día las diluciones de 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% de alpechín, con promedios de 2.27 cm, 2.20 cm, 2.27 cm, 2.17 cm y 2.00 respectivamente; forman el grupo, a lo que quiere decir, que en estas diluciones los hongos presentaron un menor crecimiento en comparación con el control (0%) cuyo diámetro promedio fue 3.60 cm, a los 6 días de evaluación, el crecimiento del hongo en el control (0%) fue 4.03 cm, seguido del 12.5% de dilución de alpechín con 2.77 cm, que forma el grupo AB, indicándonos que es un grupo intermedio, en las demás diluciones el crecimiento del hongo fue menor. A los 9 días, el patrón de crecimiento es similar al que se mostró a los 3 días, ya que los menores diámetros de crecimiento del hongo fueron en las diluciones de 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100% de alpechín con promedios de 2.85 cm, 2.45 cm, 2.47 cm, 2.38 cm y 2.22 respectivamente y el control (0%) presentó 4.47 cm de diámetro promedio. De igual manera a los 12 días de evaluación se encontró que los hongos en las diluciones de 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100%, muestran un crecimiento menor con promedios de 2.97 cm, 2.80 cm, 3.17 cm, 2.60 cm y 2.30 respectivamente (A), en comparación con el control (0%), que presentó 4.83 cm de diámetro promedio. En el último día de medición (día 15) el mayor diámetro de crecimiento del hongo

corresponde al control (0%) con 5.03 cm, seguido del 75% de dilución de alpechín con 3.83 cm y 50% 2.60 los cuales corresponden al grupo AB según la prueba de Tukey.

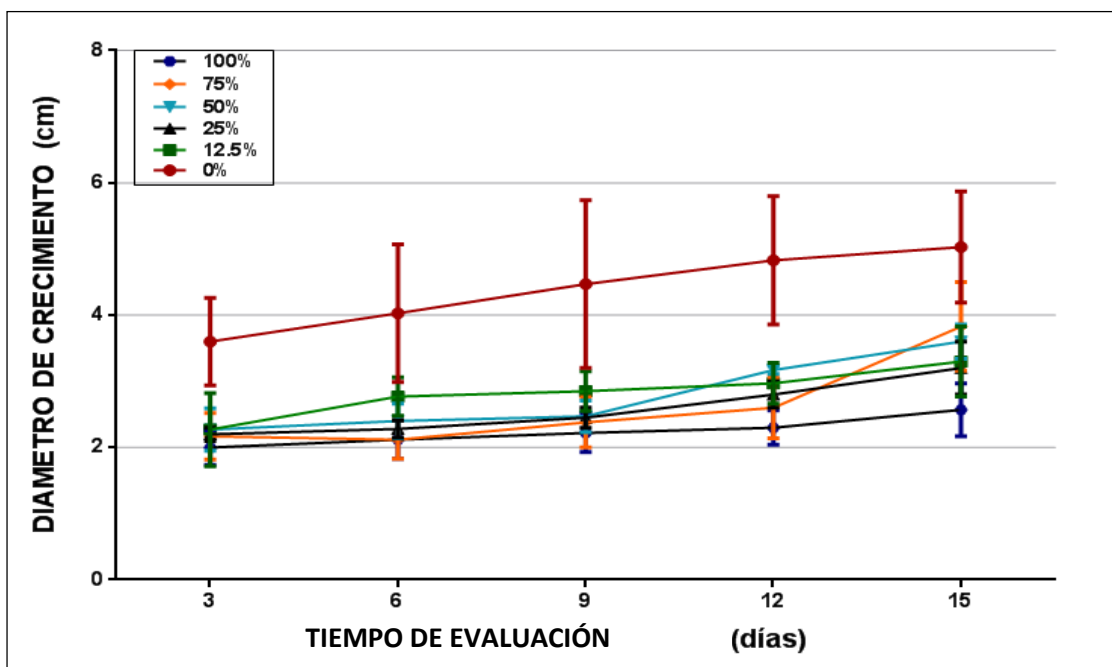


Figura N° 10. Diámetro de crecimiento del hongo aislado según tiempo de evolución.

La Figura 10 se muestra los resultados de la comparación en el aumento progresivo del diámetro de crecimiento del hongo aislado, según tiempo de evaluación, presentándose los mayores diámetros promedio para el grupo control (0%) y la dilución del 75% de alpechín a los 15 días de evaluación, con 5.03 cm y 3.83 cm respectivamente.

La misión principal de los compuestos fenólicos en las plantas es inhibir a los microorganismos patógenos, es por esto que son tóxicos, por lo menos a

concentraciones elevadas, para los organismos que realizan la depuración, lo cual se ve en los resultados, las diluciones ejercieron un efecto inhibitor del crecimiento, Maestro, (1990) el cual fue el máximo en la solución 100% de alpechín, sin embargo en el día 15 las diluciones de 50% y 75% marcan una leve diferencia habiendo crecido más en promedio debido a la adaptación y gradual degradación de los compuestos fenólicos.

TABLA 5

RESISTENCIA DE *CHLORELLA VULGARIS* A DIFERENTES DILUCIONES DEL ALPECHÍN.

DILUCIÓN DE ALPECHÍN	EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO (cel./mL)				
	3	6	9	12	15
	(DÍAS)	(DÍAS)	(DÍAS)	(DÍAS)	(DÍAS)
	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$	$\bar{X} \pm S$
0%	410000 ± 26458	340000 ± 30000	450000 ± 26458	490000 ± 10000	460000 ± 43589
12,5%	226667 ± 51316	303333 ± 20817	350000 ± 17321	230000 ± 26458	270000 ± 17321
25%	353333 ± 5774	343333 ± 32146	360000 ± 26458	380000 ± 45826	336667 ± 40415
50%	323333 ± 20817	276667 ± 20817	296667 ± 28868	310000 ± 26458	310000 ± 20000
75%	266667 ± 25166	240000 ± 17321	343333 ± 35119	230000 ± 60828	290000 ± 34641
100%	390000 ± 20000	373333 ± 15275	310000 ± 36056	276667 ± 37859	246667 ± 15275
ANOVA					
(F)	18.815	12.994	10.354	20.889	18.264
SIGNIFICANCIA	0.000...	0.000...	0.001	0.000...	0.000...
(p)	(P<0.01)	(P<0.01)	(P<0.01)	(P<0.01)	(P<0.01)
	(A.S.)	(A.S.)	(A.S.)	(A.S.)	(A.S.)
C.V.	8.64%	7.54%	8.26%	11.94%	9.64%

Se observa en la Tabla 5, los valores de crecimiento promedio de la microalga *Chlorella vulgaris* aislado de alpechín y sus respectivas desviaciones estándar,

resultado del efecto de diferentes diluciones de alpechín, se detallan también los valores del estadístico de Fisher (F) del "Análisis de Varianza", los que indican diferencias altamente significativas (A.S.) en el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en las diluciones realizadas hasta los 15 días de evaluación. Los C.V. obtenidos para cada evaluación muestran valores menores al 30% establecido como límite, para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas y tampoco se presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.

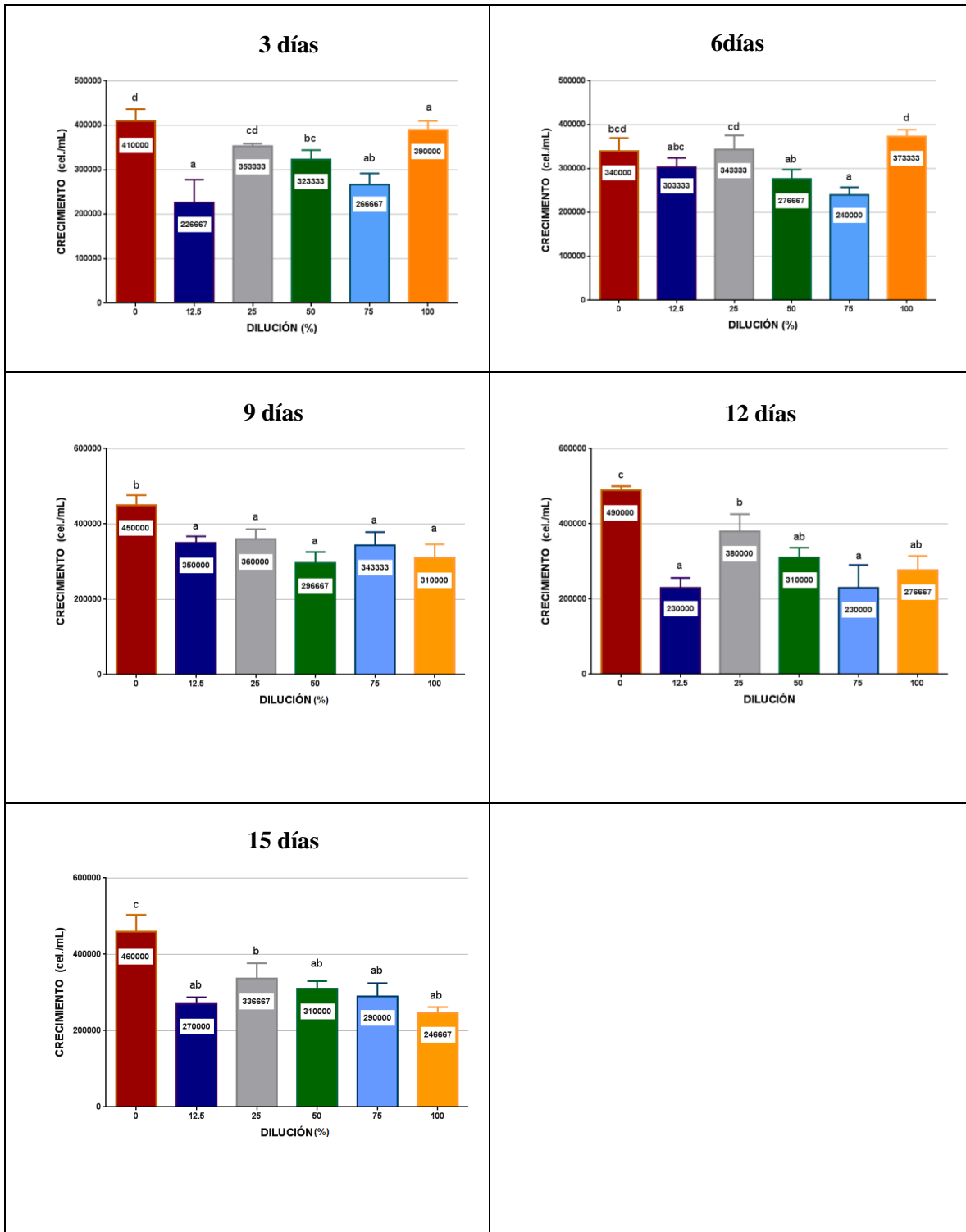


Figura N° 11. Comparación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes diluciones de alpechín a los 3, 6, 9, 12, 15 días de evolución.

En la Figura 11 se muestra los resultados de la prueba de Tukey de la comparación del crecimiento de *Chlorella vulgaris* en diferentes diluciones de alpechín a los 3, 6, 9, 12, 15 días de evolución, los que indica la presencia de cuatro grupos estadísticamente diferentes (a, b, c, d) presentándose mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el control (0%) con 410000 cel./mL (d), y el 100% de dilución de alpechín con 390000 cel./mL (d), habiendo diferencias altamente significativas con respecto a las otras concentraciones, indicado por seguido del 25% de dilución con 353333 cel./mL (cd) a los 3 días de evaluación. A los 6 días la prueba indica la presencia de cuatro grupos estadísticamente diferentes de igual manera (a, b, c, d) presentándose mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* en la dilución (100%) con 373333 cel./mL (d), seguido del grupo control con 340000 cel./mL (bcd). En cambio a los 9 días la figura indica la presencia de dos grupos estadísticamente diferentes (a, b) presentándose mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el grupo control con 450000 cel./mL (b), seguido de las diluciones 12.5%, 25%, 50%, 75% y 100%, con 350000 cel./mL, 360000 cel./mL, 296667 cel./mL, 343333 cel./mL y 310000 cel./mL (a) respectivamente. A los 12 días los resultados de Tukey, muestran tres grupos estadísticamente diferentes (a, b, c) presentándose mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* en el grupo control con 490000 cel./mL (c), seguido del 25% de dilución de alpechín con 380000 cel./mL, (b). A los 15 días de evaluación se presentan tres grupos estadísticamente diferentes (a, b, c) el mayor crecimiento de *Chlorella vulgaris* corresponde al grupo control con 460000 cel./mL (c), seguido del 25% de dilución de alpechín con 336667 cel./mL, (b).

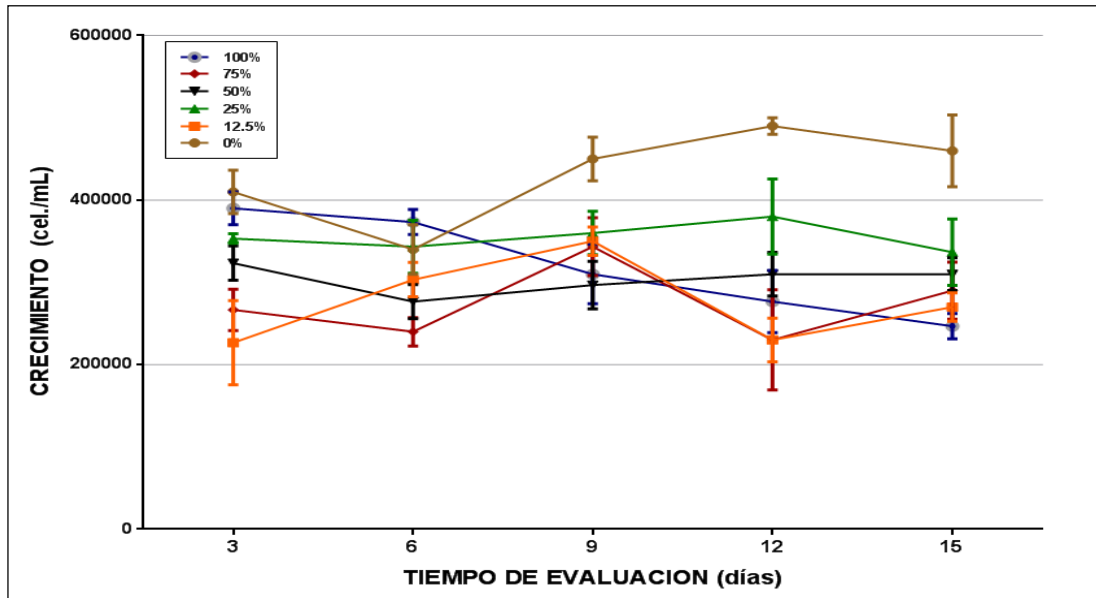


Figura N° 12. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* según tiempo de evaluación.

La Figura 12 se muestra los resultados de la comparación en el aumento progresivo del crecimiento de *Chlorella vulgaris* según tiempo de evaluación, presentándose los mayores crecimientos promedio para el grupo control (0%), seguido de la dilución del 25% de alpechín a los 15 días de evaluación con 460000 cel./mL y 336667 cel./mL respectivamente.

La naturaleza heterotrófica y autótrofa del alga permite a este organismo tener más recursos aprovechando la materia orgánica contenida en residuos o efluentes que le sirven de sustrato para el incremento de su densidad celular, a esta condición se le conoce como mixotrofia, como se pudo observar la gráfica control muestra un claro patrón de crecimiento sigmoideo en el que a partir del día 6 al día

12 el alga incrementa su número, sin embargo en las diluciones la razón por la cual disminuye en las primeras fases es por efecto de adaptación al efluente, en la dilución de 25% se alcanza una población de 380000 cel/ml a los 12 días y de 336667 cel/ mil hasta los 15 días de evaluación, dilución la cual es estadísticamente superior para el crecimiento celular, en comparación con la literatura este número es menor al mostrado por Patiño F(2016) que reportó un crecimiento máximo a la dilución de 50% cultivo puro de *Scenedesmus obliquus* a los 15 días de evaluación con 4373333 cel./ ml respectivamente, igual a lo reportado por Hodaifa *et al.*,(2007) donde se utilizaron diferentes concentraciones del efluente de la industria de aceite de oliva (5%, 25%, 50% y 100%) y evaluaron el crecimiento de *Scenedesmus obliquus* donde se mantuvo constante el crecimiento para las concentraciones de 5%, 25%, mientras que en las concentraciones de 50% y 100% de efluente se presentó un incremento en el crecimiento a los 12 días en otros estudios para aguas residuales tratadas utilizando la misma alga (He 2013) muestran resultados similares. En el trabajo realizado por Aguilar A. (2014), en el cual se utilizó aguas residuales de la industria chocolatera como medio de crecimiento para *C. vulgaris*, a los 28 días se obtuvo un densidad celular igual a 5420000 cel./ml, en el trabajo de Pizarro R. (2012) , el cual uso como medio de cultivo aguas residuales generadas en la producción de *Seriolla lalandi* , a los 2 días se alcanzó 2810000 cel./ml. La razón por la cual las diluciones no alcanzan o superan el crecimiento control a pesar de su alto contenido en materia orgánico, es por la presencia de otras sustancias de urea, amonio, ácidos

orgánicos, compuestos fenólicos y plaguicidas frecuentes que ejercen un efecto inhibitorios en el metabolismo del alga (Hodaifa *et al.*,2007).

4.6 Determinación de la capacidad de biorremediación, mediante la concentración de parámetros físico-químicos (DBO₅, DQO, TSS, Ph, conductividad eléctrica), y compuestos tóxicos (Fenoles, cloruros, sulfatos) del alpechín tratado en un sistema continuo.

Se evaluaron los parámetros físico-químicos DBO₅, DQO, SST, pH y los compuestos tóxicos como son sulfatos, fenoles y cloruros en el alpechín, cada 7 días en un sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo asilado del alpechín y la microalga *Chlorella vulgaris* hasta los 21 días de evaluación, los resultados se muestran a continuación.

TABLA 6
PH EN EL ALPECHÍN SEGÚN TIEMPO DE EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN
EL SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO CON UN HONGO NATIVO Y
Chlorella vulgaris.

EVALUACIÓN (DÍAS)	pH $\bar{x} \pm S$	F	Significancia P
0	4.9 ± 0.00		
7	5.2 ± 0.26	73.81	0,000
14	7.9 ± 0.66		A.S.
21	8.4 ± 0.17		P<0.01

C.V. = 4.13%

Se observa en la Tabla 6 los promedios de la concentración de pH del efluente de la producción de aceite de oliva y sus respectivas desviaciones estándar, al cual se le sometió a un proceso de biorremediación con *S. obliquus* empacado en un sistema de fotobiorreactores tipo panel hasta los 12 días de evaluación, se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 140.13 de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de pH en las evaluaciones realizadas.

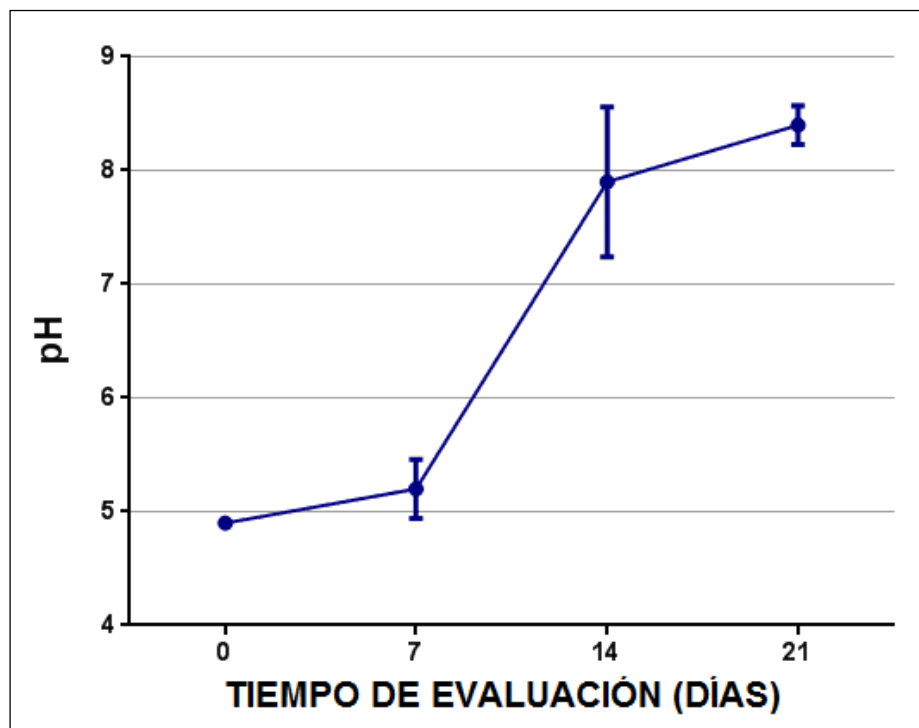


Figura N° 13. Evaluación del pH en el alpechín según el tiempo.

La figura 13 muestra que los valores de pH fueron aumentando progresivamente desde un inicial de 4.9 hasta 8.4 a los 12 días de evaluación, lo que puede atribuirse a la reducción en la concentración de fenoles, los fenoles son ácidos en solución y su eliminación reduce la acidez de la solución por la microalga lo que es corroborado por (Goldman *et al.*, 1982) quien reporta que *Chlorella vulgaris* tolera hasta un pH 10.6.

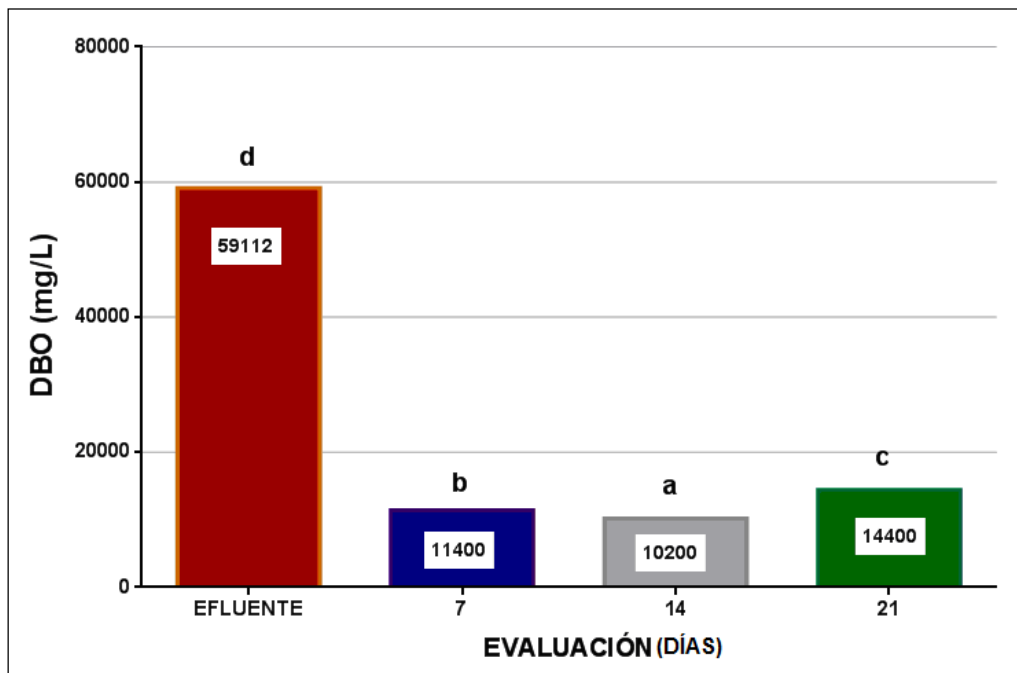
TABLA 7
EVALUACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE LA DEMANDA BIOLÓGICA DE
OXIGENO DEL ALPECHÍN EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.

TRATAMIENTOS (DÍAS)	DBO ₅ (mg/L) $\bar{X} \pm S$	F	Significancia P
0	59112.00 ± 1.00	66960616.32	
7	11400.00 ± 3.61		0.000...
14	10200.00 ± 6.56		A.S.
21	14400.00 ± 6.56		P<0.01

C.V. = 0.02%

Se observa en la Tabla 7 los promedios de la concentración de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅) del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, a la cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo, hasta los 21 días de evaluación. Se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 66960616.32 de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de la Demanda Biológica de Oxígeno (DBO₅) en las evaluaciones realizadas. El C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas, tampoco se

presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 14. Comparación de concentración de la demanda biológica de oxígeno en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo, hasta los 21 días de evaluación.

En la Figura 14, se muestra los resultados de la prueba de Tukey, la que indica la presencia de cuatro grupos (a, b, c, d), presentándose mayor concentración de DBO_5 en el efluente con 59112 mg/L (d), seguido de la concentración a los 21 días de evaluación con 14400 mg/L (c), mientras que la menor concentración de la DBO_5 de alpechín se presentó a los 14 días de tratamiento con 10200 mg/L, (a).

TABLA 8
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE DBO₅ DEL ALPECHÍN SEGÚN TIEMPO DE
EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO
CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LA DBO ₅ (mg/L)	REMOCIÓN DE LA DBO ₅ (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA DBO ₅ (mg/L)
0	59112	0	-
7	11400	80.71	47712
14	10200	82.74	48912
21	14400	75.64	44712

En la tabla 8 se muestra un porcentaje de remoción del 82.74% a los 14 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de DBO₅ muestran que la máxima remoción se presentó a los 14 días de evaluación con 48912 mg/L.

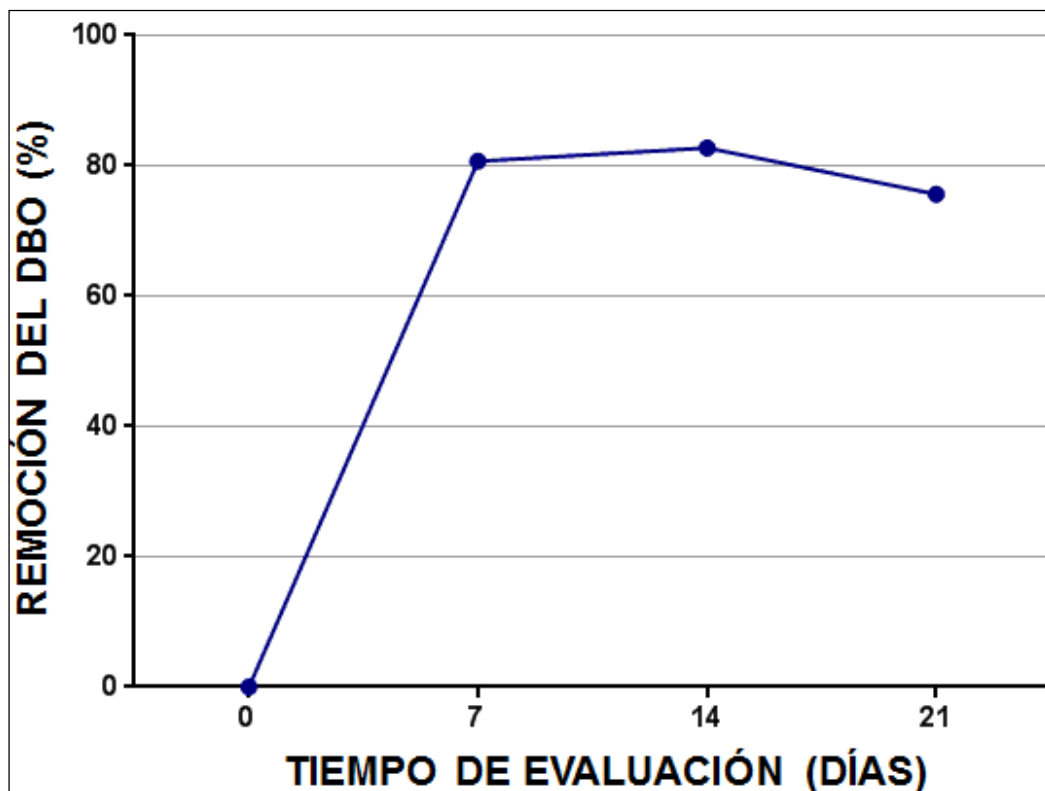


Figura N° 15. Porcentaje de remoción de DBO₅ según el tiempo de evaluación.

En la Figura N° 15 se muestra el porcentaje de remoción hasta los 21 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris* presentando una máxima remoción a los 14 días con 82.74%.

El tratamiento redujo hasta más de un 80% el DBO₅ hasta el día 14; sin embargo, para el día 21 no siguió la tendencia reductora, ya que los componentes de las aguas residuales no diluidas, de naturaleza oleosa, pueden adsorberse a la superficie celular, dificultando el acceso a los nutrientes (Hodaifa *et al.*, 2007), esto también es consistente con la caída en la fase de crecimiento y de valores inferiores a los esperados de biomasa generada.

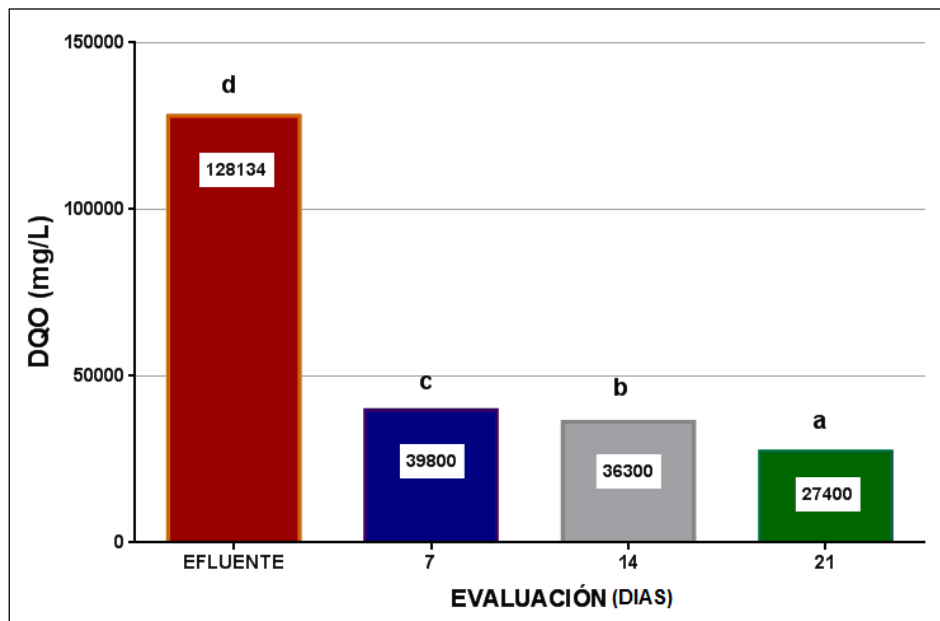
TABLA 9
EVALUACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE LA DEMANDA QUÍMICA OXÍGENO
EN EL ALPECHÍN EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.

TRATAMIENTOS (DÍAS)	DQO(mg/L) $\bar{x} \pm S$	F	Significancia P
0	128134.00 ± 3.61		
7	39800.00 ± 3.61	187527731.5	0.000...
14	36300.00 ± 6.56		A.S.
21	27400.00 ± 8.54		P<0.01

C.V.= 0.01%

Se observa en la Tabla 9 los promedios de la concentración de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, a la cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación. Se detalla también el valor del estadístico de Fisher $F= 187527731.47$ de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de la Demanda Química de Oxígeno (DQO) en las evaluaciones realizadas. El C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite, para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas, tampoco se

presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 16. Comparación de concentración de la demanda química de oxígeno en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación.

En la Figura 16 se muestran los resultados de la prueba de Tukey, la cual indica la presencia de cuatro grupos (a, b, c, d) presentándose mayor concentración de DQO en el efluente con 128134 mg/L (d), seguido de la concentración a los 7 días de evaluación con 39800 mg/L (c), mientras que la menor concentración de la DQO de alpechín se presentó a los 21 días de tratamiento con 27400 mg/L, (a).

TABLA 10
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE DQO DEL ALPECHÍN SEGÚN TIEMPO DE
EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO
CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LA DQO (mg/L)	REMOCIÓN DE LA DQO (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA DQO (mg/L)
0	128134	0	-
7	39800	68.94	88334
14	36300	71.67	91834
21	27400	78.62	100734

En la tabla 10 se muestra un porcentaje de remoción del 78.62% a los 21 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de DQO muestran que la máxima remoción se presentó a los 21 días de evaluación con 100734 mg/L.

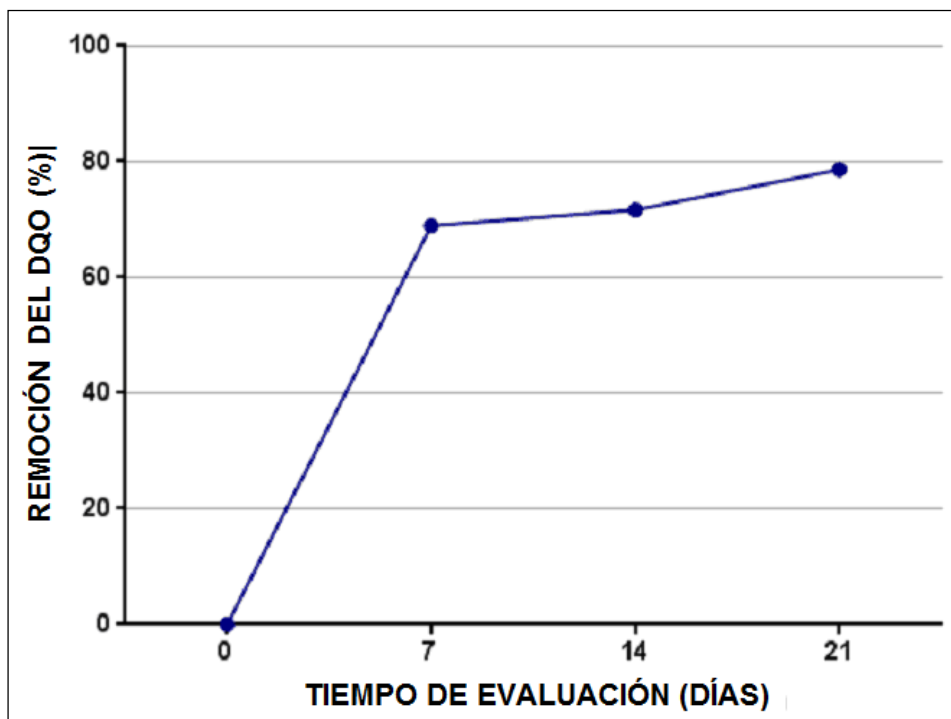


Figura N° 17. Porcentaje de remoción de DQO según el tiempo de evaluación.

En la figura 17 se muestra el porcentaje de remoción hasta los 17 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris* presentando una máxima remoción a los 21 días con 78.62%.

Las mínimas concentraciones de DBO₅ y DQO obtenidas para la biorremediación de alpechín mediante un sistema de tratamiento continuo con cultivo de un hongo nativo de alpechín y *Chlorella vulgaris*, fueron de 10200 mg/L y 27400 mg/L con remociones de 82.74% y 78.62% respectivamente.

La eliminación de la materia orgánica y los nutrientes de las aguas residuales es un aspecto importante del tratamiento biológico. La reducción de los valores de la

DQO podría ser debido a la gran cantidad de nutrientes presentes en la forma de materia orgánica disuelta utilizado para el crecimiento de los cultivos (Porwal, Mane y Velhal, 2014). La utilización de microalgas ha demostrado ser eficiente en la reducción de DBO₅ y DQO (Abdel-Raouf *et al.*, 2012).

En la investigación con *Scenedesmus obliquus* empacado en un sistema de fotobiorreactores tipo panel, reportado por Patiño F., 2016, se presentó un porcentaje de remoción de 44% y 64% para ambos factores físico-químicos; sin embargo, estos resultados se muestran mayores a los reportados por (Garrido H. *et al.*,1995) que utilizaron el alpechin a una concentracion del 80%del efluente en un medio minimo de mantemimiento (MMM) para el cultivo del hongo *Aspergillus terreus*, donde la parte experimental se operó en un reactor discontinuo tipo tanque agitado de una capacidad de 5 L, con un caudal de aire de 14.4 v/v-h, con una agitación de 200 rpm, obteniendo una concentración residual igual a 3687.97 mg/L para la DBO₅, mientras que para la DQO se presentó una concentracion residual de 9353.48 mg/L, es posible que este resultado se deba a una mayor aireación constante por parte del sistema aplicado, ya que es una razón importante para la reducción de la DBO₅ en el tratamiento.

En otros trabajos, Birame *et al.*, (2007), logran disminuir la DBO₅ y DBQ hasta un 80% y 90%, respectivamente por un tratamiento electroquímico, García (2000) obtiene resultados similares con una reducción de 80% de DBO₅ a partir de un cultivo aerobio. Cartagena J. y Malo B. 2016 realiza una investigación comparando

un tratamiento químico vs uno biológico en el cual se obtuvo una remoción de DQO de 35,30% y 81.80%, respectivamente.

Chacón (2004) usando *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus sp* para un tratamiento de aguas residuales se obtiene una remoción DQO entre 54,8% y 55,8%. En el estudio de López 2016, mediante la acción de *Scenedesmus* y *Chlorococcum littorale* se reduce en un 70 % la cantidad de DQO usando aguas residuales bajo una dilución de 50%, Ramirez 2014 logró un abiorremoción de DBO₅ y DQO en 67% y 66%, respectivamente del efluente de aguas residuales en un canal.

McNamara *et al.*, 2008, afirma en su investigación que la acción conjunta de microorganismos, es decir formando consorcios entre bacterias y hongos en un mismo reactor, mejora los resultados individuales en cuanto al tiempo de reducción de DQO hasta de 24 horas en un 70%.

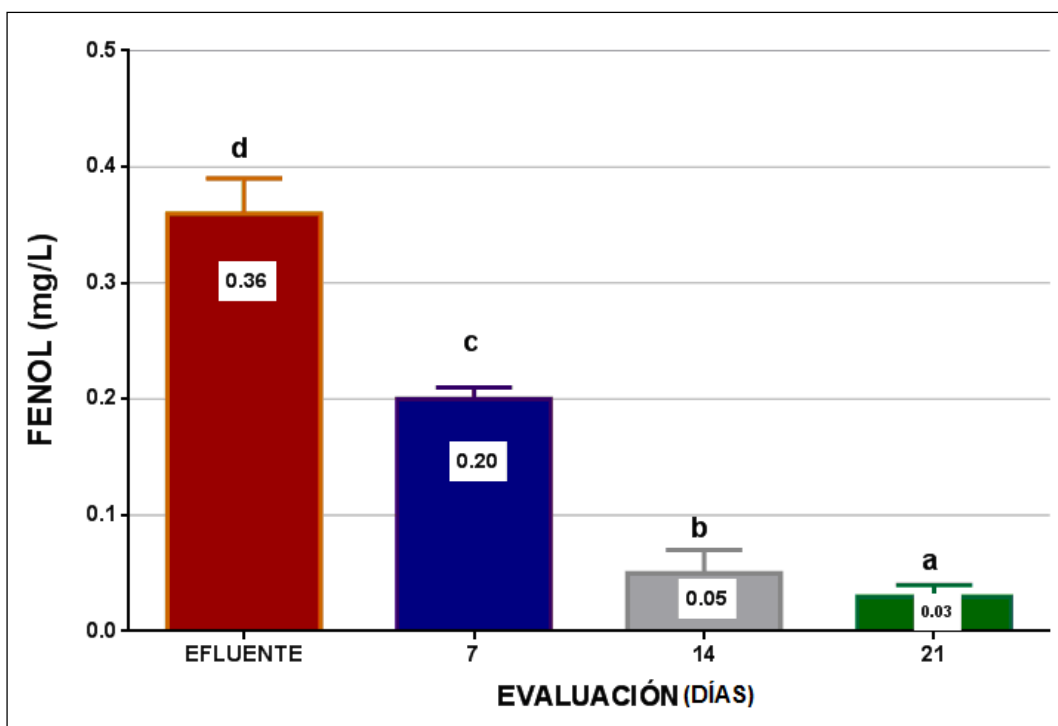
TABLA 11
EVALUACIÓN LA CONCENTRACIÓN DE FENOLES EN EL ALPECHÍN EN UN
SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.

TRATAMIENTOS (DÍAS)	FENOLES (mg/L)	F	Significancia P
	$\bar{X} \pm S$		
0	0.36 ± 0.03		
7	0.20 ± 0.01	4488.13	0.000...
14	0.05 ± 0.02		A.S.
21	0.03 ± 0.01		P<0.01

C.V.= 2.48%

Se observa en la Tabla 11 los promedios de la concentración de los fenoles del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, al cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación, se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 4488.13 de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de fenoles en las evaluaciones realizadas. El C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas, tampoco se

presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 18. Comparación de la concentración de fenoles en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación.

En la Figura 18 se muestran los resultados de la Tukey, la que indica la presencia de cuatro grupos (a, b, c, d) presentándose mayor concentración de fenoles en el efluente, con 0.36 mg/L (d); seguido de la concentración a los 7 días de evaluación, con 0.20 mg/L (c); mientras que la menor concentración de fenoles de alpechín se presentó a los 21 días de tratamiento con 0.03 mg/L, (a), este contenido representa menos del 10 %.

TABLA 12
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE FENOLES DEL ALPECHÍN SEGÚN TIEMPO
DE EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE TRATAMIENTO
CONTINUO CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LA FENOLES (mg/L)	REMOCIÓN DE LA FENOLES (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA FENOLES (mg/L)
0	0.36	0	-
7	0.20	44.44	0.16
14	0.05	86.11	0.31
21	0.03	91.67	0.33

En la tabla 12 se muestra un porcentaje de remoción del 91.67% a los 21 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de fenoles muestran que la máxima remoción se presentó a los 21 días de evaluación con 0.33 mg/L.

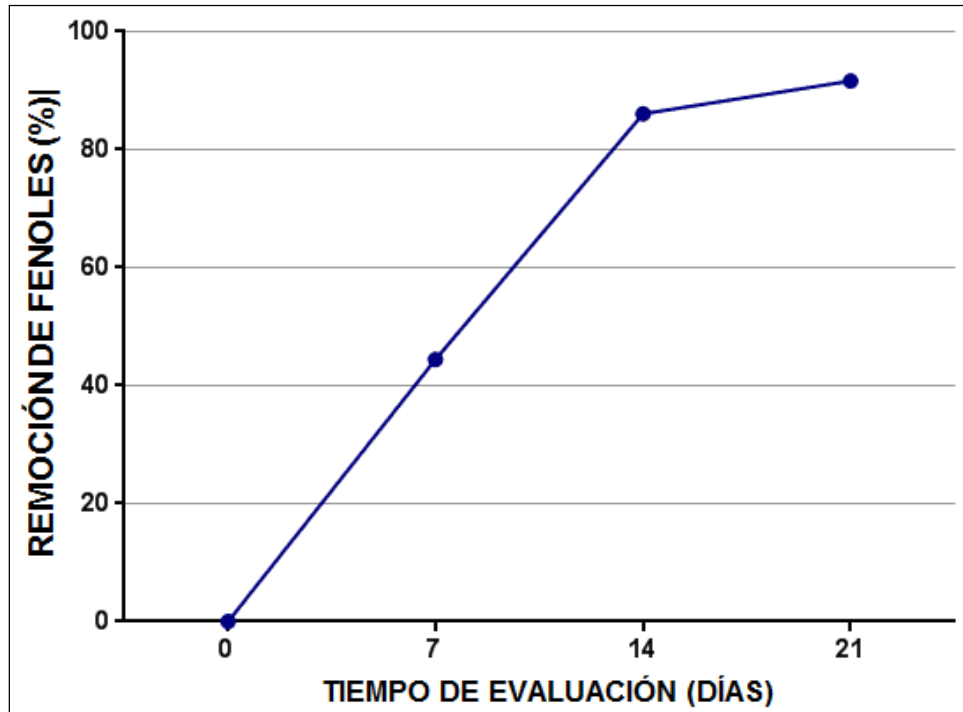


Figura N° 19. Porcentaje de remoción de fenoles según el tiempo de evaluación.

Se muestra el porcentaje de remoción hasta los 21 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris* presentando una máxima remoción a los 21 días con 91.67%.

La concentración promedio de fenoles totales obtenida en el sistema de tratamiento continuo hasta los 21 de evaluación fue de 0.03 mg/L, representando un 91.67% de remoción, el cual es mayor al reportado por Patiño F. (2016) con un 75% de remoción, esta concentración residual también resulta menor en comparación a los reportados por (Garrido H. et al., 1995) donde utilizaron el alpechín a una concentración del 80% del efluente en un medio mínimo

demantemimiento (MMM) para el cultivo del hongo *Aspergillus terreus* en un reactor discontinuo, tipo tanque agitado, de una capacidad de 5 L, con un caudal de aire de 14.4 v/v·h, con una agitación de 200 rpm, con el que se obtuvo una concentración residual de fenoles de 1151.29 mg/L a partir de una concentración inicial de 1804.03 mg/L representando un 36% remoción de fenoles; además (Paredes, 2012), que trabajó con una muestra patrón de alpechín que registró un valor de fenoles de 0,12 mg/l., en el que se usó un proceso electroquímico para tratar el efluente con valores de tensión de 8 vol y 23 Amper en un tiempo de 16 minutos, obteniendo una concentración final de 0.10 mg/l. de fenoles, lo que corresponde a un 17% de porcentaje de remoción, siendo este porcentaje menor al registrado en comparación a lo obtenido en la presente investigación donde se obtuvo un 75% de remoción; además (Maestro D. *et al.*, 1991), sometió al alpechín que presentaba concentración inicial de 300 mg/l. de fenoles a un tratamiento aerobio con microorganismos específicos durante 5 días, donde se presentó una disminución drástica de fenoles a 103 mg/l, posteriormente este alpechín residual se sometió a una biotimización anaeróbica utilizando un reactor discontinuo de mezcla completa que contuvo Sepiolita como soporte para la inmovilización de las bacterias responsables del proceso anaerobio, con el cual obtuvieron un residual de 0.4 mg/l correspondiente al 99% de porcentaje de remoción. (Hanafi F. *et al.*, 2010) trabajó con concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% de un efluente con concentración inicial de fenoles de 18000 mg/l, donde la concentración de 25% de efluente obtuvo un remanente de fenoles de 4500 mg/l, representando un porcentaje de remoción del 73% y para la concentración de 50% de efluente 9000 mg/l., representando un

55% de remoción mediante un tratamiento con *Aspergillus niger*. Según Usaquen (2008) quien realiza un tratamiento de alperujo (una mezcla de alpechín y orujo) los hongos tienen la capacidad de reducir los compuestos fenólicos debido a su actividad lignocelulósica, en su estudio muestra una reducción de 38% a partir de un 33.07 g/kg, Martínez (1992) demuestra con el uso de *Aspergillus terreus* una disminución de hasta un 68.9 % de reducción de compuestos fenólicos totales. Maestro (1992) realiza un estudio comparativo utilizando un sistema aerobio y anaerobio para el tratamiento de alpechín en el cual logra una reducción de más de 70 % aeróbicamente, y un 99% utilizando un sistema anaeróbico. McNamara *et al.*, (2008) quien realiza una revisión resume los siguientes géneros cuya actividad reductora de compuestos fenólicos es superior a 70 *Lentinula*, *Aspergillus*, *Coriolus versicolor*, *Funalia trogii*, *Phanerochaete*, *Geotrichum*, especies de *Pleurotus* pueden reducir hasta en un 100% los compuestos fenólicos totales. Ryan *et al* (2005) Menciona que los hongos son los organismos en excelencia en remover compuestos fenólicos debido a su alta actividad de enzimas fenoloxidasas y peroxidasas entre ellas las denominadas lacasa, el autor menciona que la adición del co-metabolito (glucosa) tuvo el efecto de aumentar y mantener la producción de lacasa, esto debido a que los hongos son organismos que prefieren y requieren azúcar en su metabolismo, lo cual sugiere que para mejorar la biorremediación son los efluentes se debe añadir una fuente glucosídica fácilmente asimilable como la glucosa.

Semple *et al.*, (1998) en una revisión detalla que las microalgas son capaces de biodegradar los compuestos aromáticos de donde obtienen C y N, además indica

que son capaces de utilizar los compuestos aromáticos como fuente de azufre para la producción de biomasa.

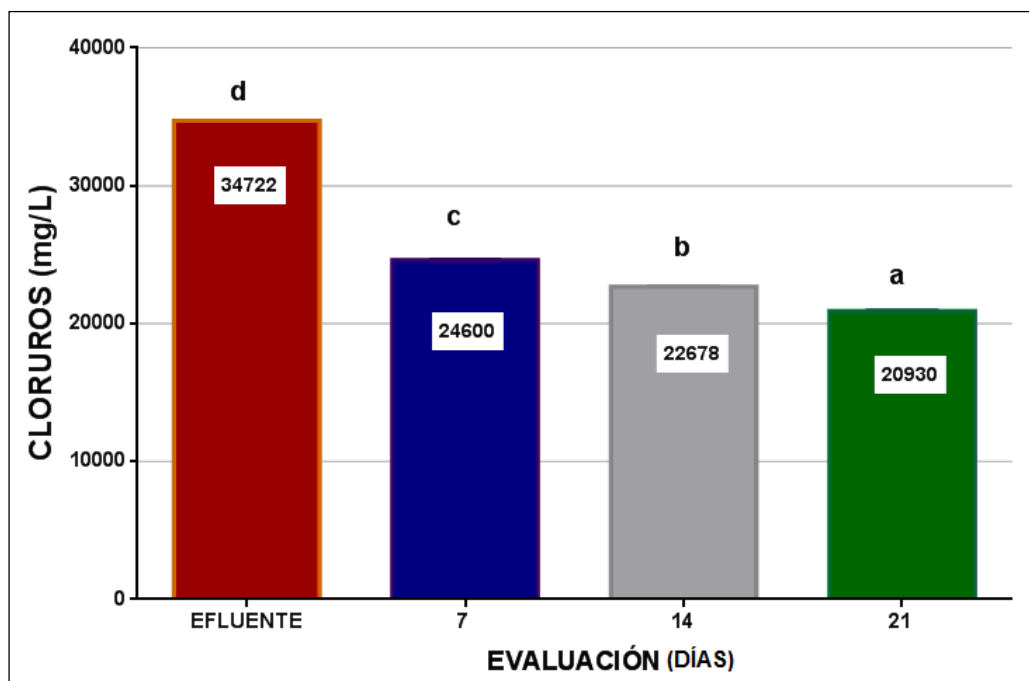
TABLA 13
EVALUACIÓN LA CONCENTRACIÓN DE CLORUROS EN EL ALPECHÍN EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.

TRATAMIENTOS (DÍAS)	CLORUROS (mg/L)	F	Significancia P
	$\bar{x} \pm S$		
0	34722.00 ± 4.58		
7	24600.00 ± 7.55	158405.60	0.000...
14	22678.00 ± 3.61		A.S.
21	20930.00 ± 5.29		P<0.01

C.V.= 0.10%

Se observa en la Tabla 13 los promedios de la concentración de los cloruros del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, a la cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación, se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 158405.60 de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de cloruros en las evaluaciones realizadas. El C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite, para indicar

que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas y tampoco se presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 20. Comparación de la concentración de cloruros en el algarrobo en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación

En la Figura 20 se muestra los resultados de la Tukey, la que indica la presencia de cuatro grupos (a, b, c, d) presentándose mayor concentración de cloruros en el efluente con 34722 mg/L (d), seguido de la concentración a los 7 días de evaluación con 24600 mg/L (c), mientras que la menor concentración de cloruros de algarrobo se presentó a los 21 días de tratamiento con 20930 mg/L, se demuestra que hay una reducción en la concentración.

TABLA 14
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE CLORUROS DEL ALPECHÍN SEGÚN
TIEMPO DE EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE
TRATAMIENTO CONTINUO CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LA CLORUROS (mg/L)	REMOCIÓN DE LA CLORUROS (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA CLORUROS (mg/L)
0	34722	0	-
7	24600	29.15	10122
14	22678	34.69	12044
21	20930	39.92	13792

En la tabla 14 se muestra un porcentaje de remoción del 93.97% a los 21 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de cloruros muestran que la máxima remoción se presentó a los 21 días de evaluación con 32629 mg/L.

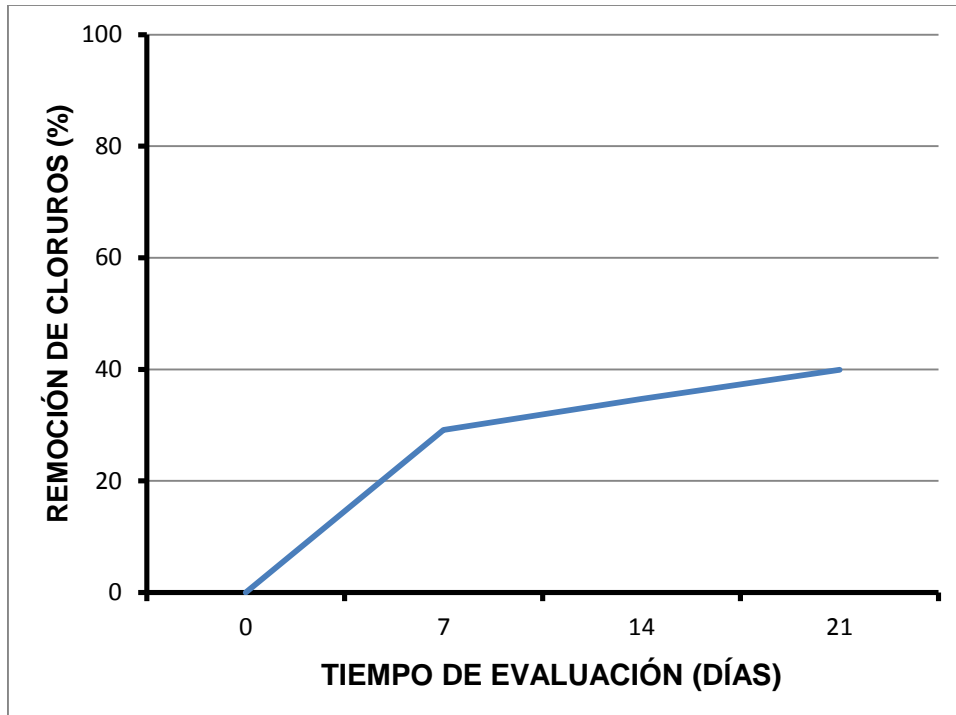


Figura N° 21. Porcentaje de remoción de cloruros según el tiempo de evaluación

Se muestra el porcentaje de remoción hasta los 23 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris*, presentando una máxima remoción a los 21 días con 93.97%.

A los 21 días de evaluación se mostró la máxima remoción de cloruros hasta 20930 mg/L con 93.97% mayor al obtenido en el sistema de tratamiento continuo; sin embargo, se muestra mayor a la concentración de cloruros obtenidos por Patiño (2016) que reportó una concentración final de 3188 mg/L por efecto del sistema de flujo continuo empacado con *Scenedesmus obliquus*, esto se debe probablemente a que estos elementos se encuentran en los requerimientos nutricionales del alga, además de la diferencia en volúmenes utilizados en los sistemas, ya que el sistema

reportado presentó aproximadamente 26 L de capacidad, mientras que el usado solo fue para un volumen máximo de 20L.

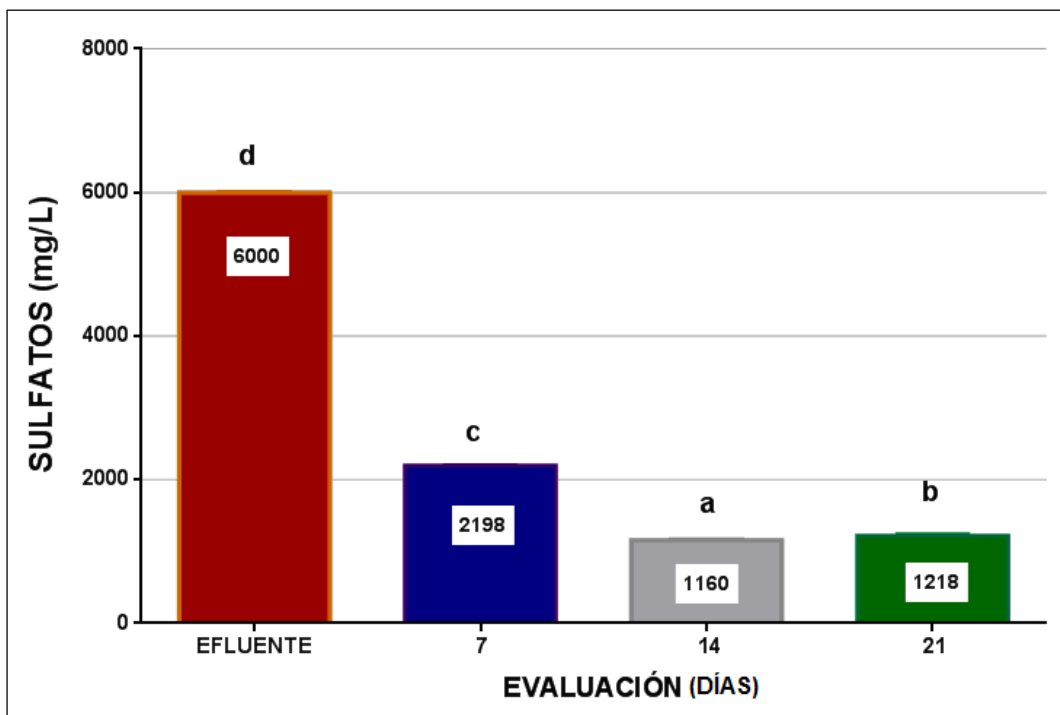
**TABLA 15:
EVALUACIÓN LA CONCENTRACIÓN DE SULFATOS EN EL ALPECHÍN EN UN
SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.**

TRATAMIENTOS (DÍAS)	SULFATOS (mg/L)	F	Significancia P
	$\bar{X} \pm S$		
0	6000.00 ± 6.25		
7	2198.00 ± 1.00	116276.92	0.000...
14	1160.00 ± 7.81		A.S.
21	1218.00 ± 20.95		P<0.01

C.V.= 0.44%

Se observa en la Tabla 15 los promedios de la concentración de la sulfatos del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, a la cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación, se detalla también el valor del estadístico de Fisher $F= 116276.92$ de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existe diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de sulfatos en las evaluaciones realizadas. El

C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite, para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas y tampoco se presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 22. Comparación de la concentración de sulfatos en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación.

En la Figura 22 se muestra los resultados de la prueba de Tukey, la que indica la presencia de cuatro grupos (a, b, c, d) presentándose mayor concentración de sulfatos en el efluente con 6000 mg/L (d), seguido de la concentración a los 7 días de evaluación con 2198 mg/L (c), mientras que la menor concentración de sulfatos de alpechín se presentó a los 14 días de tratamiento con 1160 mg/L, (a).

TABLA 16
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE SULFATOS DEL ALPECHÍN SEGÚN TIEMPO
DE EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE TRATAMIENTO
CONTINUO CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LA SULFATOS (mg/L)	REMOCIÓN DE LA SULFATOS (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA SULFATOS (mg/L)
0	6000	0	-
7	2198	63.37	3802
14	1160	80.67	4840
21	1218	79.70	4782

En la tabla 16 se muestra un porcentaje de remoción del 80.67% a los 14 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de sulfatos muestran que la máxima remoción se presentó a los 14 días de evaluación con 4840 mg/L.

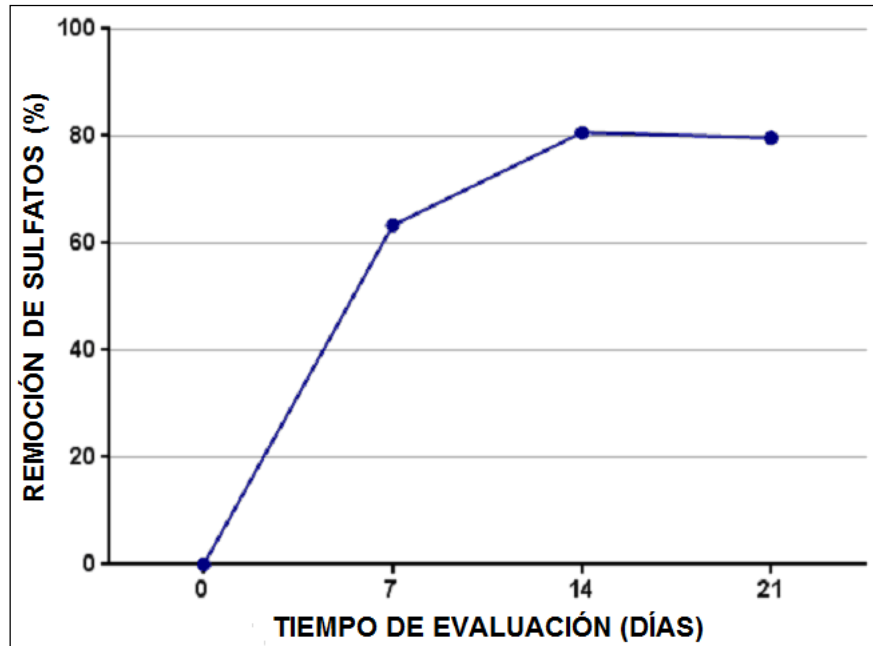


Figura N° 23. Porcentaje de remoción de sulfatos según el tiempo de evaluación.

Se muestra el porcentaje de remoción hasta los 25 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris* presentando una máxima remoción a los 14 días con 80.67% .

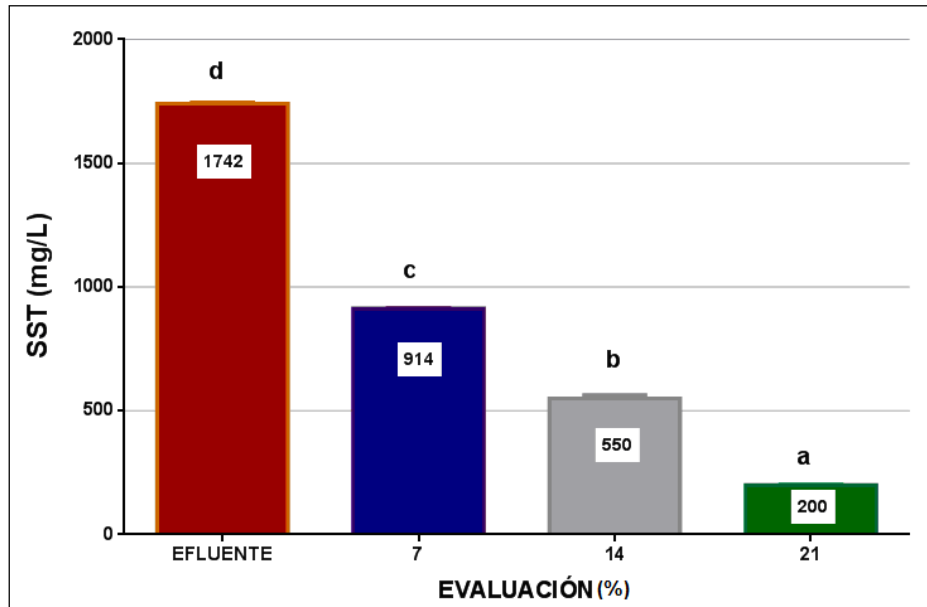
La concentración residual de 1160mg/L de sulfatos (representando el 80.67% de remoción) obtenida hasta los 14 días de evaluación fue mayor al reportado por Patiño (2016) que presentó una concentración inicial de 1840 mg/l. y una concentración final de 383,4 mg/l. representando una remoción del 79% a los 12 días de evaluación, mostrándose que *S. obliquus* presenta un mayor requerimiento nutricional de sulfatos en comparación a la microalga *Chlorella vulgaris* utilizada en el sistema en el sistema de tratamiento continuo.

TABLA 17
EVALUACIÓN LA CONCENTRACIÓN DE SST EN EL ALPECHÍN EN UN
SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.

TRATAMIENTOS (DÍAS)	SST (mg/L) <hr style="width: 50%; margin: auto;"/> $\bar{X} \pm S$	F	Significancia P
0	1742.00 ± 4.58		
7	914.00 ± 2.00	20912.37	0.000...
14	550.00 ± 14.73		A.S.
21	200.00 ± 3.00		P<0.01

C.V.= 0.93%

Se observa en la Tabla 17 los promedios de la concentración de SST del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, al cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación, se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 20912.37 de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de SST en las evaluaciones realizadas. El C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite, para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas y tampoco se presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 24. Evaluación la concentración de SST en el alpechín en un sistema de Tratamiento continuo.

En la Figura 24 se muestra los resultados de la Tukey, la que indica la presencia de cuatro grupos (a, b, c, d) presentándose mayor concentración de SST en el efluente con 1742 mg/L (d), seguido de la concentración a los 7 días de evaluación con 914 mg/L (c), mientras que la menor concentración de SST de alpechín se presentó a los 21 días de tratamiento con 200 mg/L, (a).

TABLA 18
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE SST DEL ALPECHÍN SEGÚN TIEMPO DE
EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO
CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LA SST (mg/L)	REMOCIÓN DE LA SST (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA SST (mg/L)
0	1742	0	-
7	914	47.53	828
14	550	68.43	1192
21	200	88.52	1542

En la tabla 18 se muestra un porcentaje de remoción del 88.52% a los 21 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de sulfatos muestran que la máxima remoción se presentó a los 21 días de evaluación con 1542 mg/L.

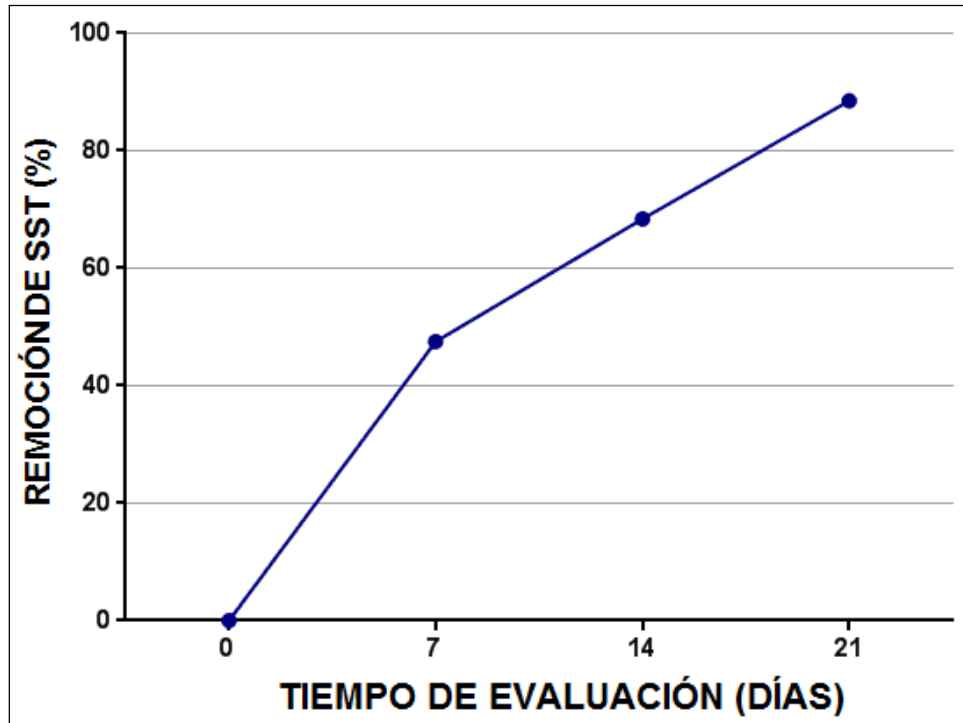


Figura N° 25. Porcentaje de remoción de SST según el tiempo de evaluación.

Se muestra el porcentaje de remoción hasta los 27 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris*, presentando una máxima remoción a los 21 días con 88.52%.

Los resultados muestran que la concentración residual de 200 mg/L de SST obtenida hasta los 21 días (representando 88.52% de remoción) de evaluación fue menor a la reportada por (Patiño F., 2016) que obtuvo 412 mg/L hasta los 12 días de evaluación fue menor a los VMA (Valores Máximos Admisibles) de las descargas de aguas residuales en el sistema de alcantarillado Sanitario aprobado por D.S. N° 003-2011-VIVIENDA, donde establece que el VMA para SST es de 500 mg/L en el efluente, estos valores que podrían disminuir más al realizar la

separación de sólidos del alpechín con sedimentadores adicionales en el tratamiento primario adicional al sistema de tratamiento continuo. Travieso *et al.*, (2008) lograron disminuir los SST hasta un 90%. El proceso de remoción de estos sólidos mediante efluentes brutos, las microalgas tienen un proceso de adaptación de hasta 13 días, mientras que un efluente que pasa previamente por un tratamiento previo comienza la absorción a partir del segundo día de cultivo (Hernández 2010), tal es el caso del presente estudio que tuvo un tratamiento en tres fases, el cual incrementó su % de remoción hasta el día 21. Cartagena y Malo (2016) realizó una investigación comparando un tratamiento químico versus uno biológico, en la cual se obtuvo una remoción de 57,51% y 89,91% por SST respectivamente.

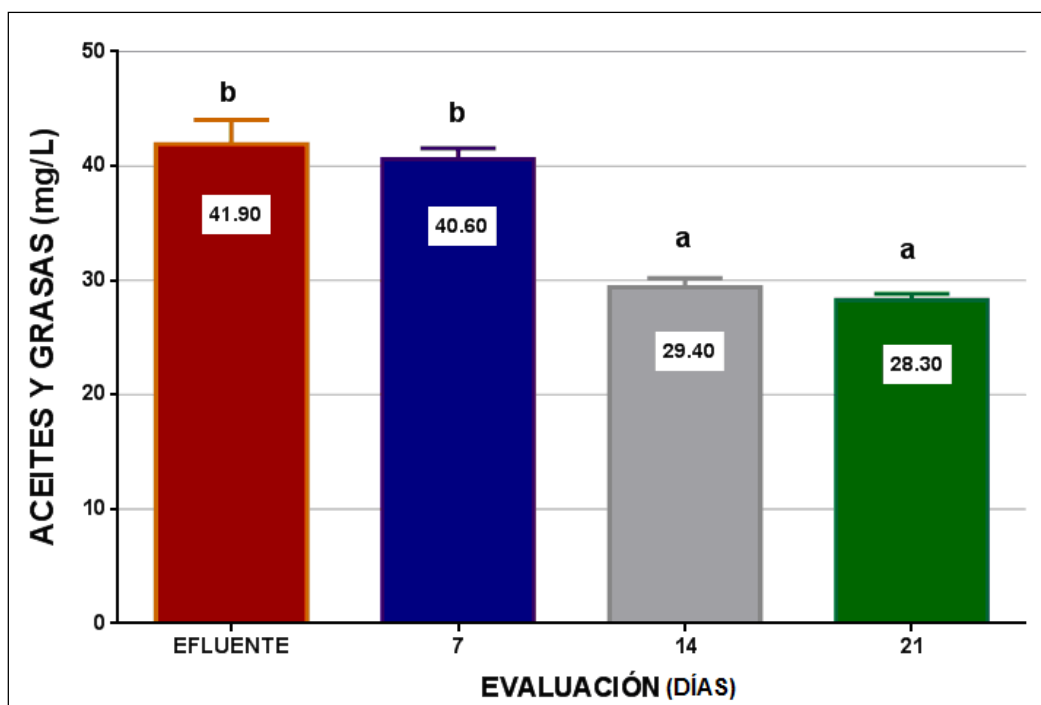
TABLA 19
EVALUACIÓN LA CONCENTRACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN EL
ALPECHÍN EN UN SISTEMA DE TRATAMIENTO CONTINUO.

TRATAMIENTOS (DÍAS)	ACEITES Y GRASAS (mg/L)	F	Significancia P
	$\bar{X} \pm S$		
0	41.90 ± 2.13		
7	40.60 ± 0.98	96.86	0.000...
14	29.40 ± 0.79		A.S.
21	28.30 ± 0.53		P<0.01

C.V.= 3.61%

Se observa en la Tabla 19 los promedios de la concentración de aceites y grasas del alpechín y sus respectivas desviaciones estándar, al cual se le sometió a un proceso de biorremediación con un hongo aislado y *C. vulgaris* en un sistema de tratamiento continuo hasta los 21 días de evaluación, se detalla también el valor del estadístico de Fisher F= 96.86 de la prueba estadística de comparación de ANOVA, la cual muestra que existen diferencias altamente significativas (A.S.) en el promedio de las concentraciones de aceites y grasas en las evaluaciones realizadas. El C.V. obtenido muestra un valor menor al 30% establecido como límite para indicar que las unidades experimentales evaluadas fueron homogéneas y

tampoco se presentaron errores de calibración de equipos o medición por parte del investigador.



TUKEY (a, b, c, d)

Figura N° 26: Evaluación la concentración de aceites y grasas en el alpechín en un sistema de tratamiento continuo.

En la Figura 26 se muestra los resultados de la Tukey, la que indica la presencia de dos grupos (a, b) presentándose mayor concentración de aceites y grasas en el efluente y a los 7 días de evaluación con 41.90 mg/L y 40.60 mg/L (b), mientras que las menores concentraciones de aceites y grasas se presentaron a los 14 y 21 días de evaluación con 29.40 mg/L y 28.30 mg/L (a).

TABLA 20
CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE GRASAS Y ACEITES DEL ALPECHÍN
SEGÚN TIEMPO DE EVALUACIÓN DEL EFLUENTE EN EL SISTEMA DE
TRATAMIENTO CONTINUO CON UN HONGO NATIVO Y *Chlorella vulgaris*.

EVALUACIÓN (DÍAS)	CONCENTRACIÓN RESIDUAL DE LAGRASAS Y ACEITES (mg/L)	REMOCIÓN DE LA GRASAS Y ACEITES (%)	DIFERENCIAS DE LA REMOCIÓN DE LA GRASAS Y ACEITES (mg/L)
0	41.90	0	-
7	40.60	3.10	1.30
14	29.40	29.83	12.50
21	28.30	32.46	13.60

En la tabla 20 se muestra un porcentaje de remoción del 32.46% a los 21 días de evaluación por efecto del sistema de tratamiento continuo con un hongo nativo y *Chlorella vulgaris*. Las diferencias en la remoción de grasas y aceites muestran que la máxima remoción se presentó a los 21 días de evaluación con 13.60 mg/L.

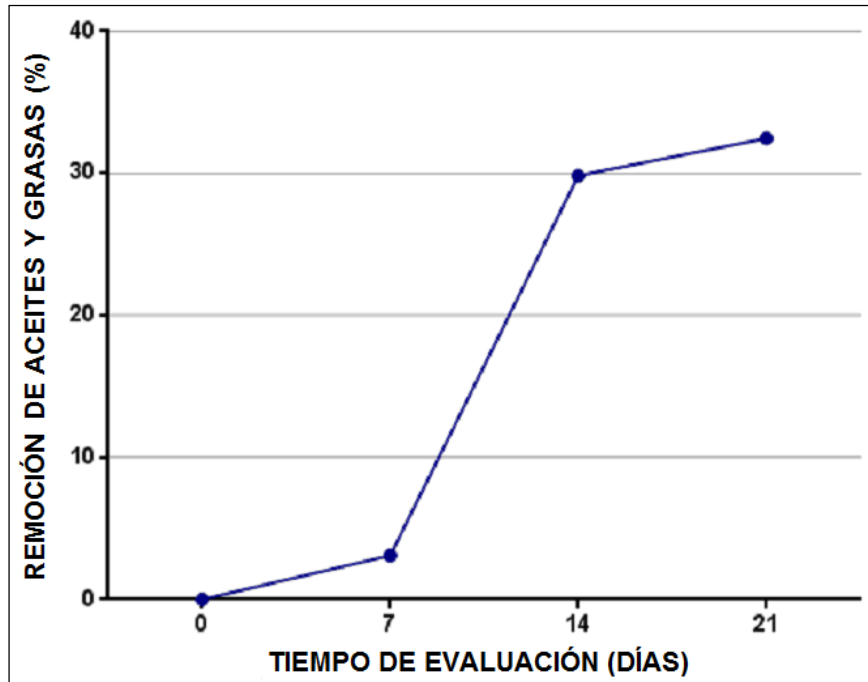


Figura N° 27. Porcentaje de remoción de aceites y grasas según el tiempo de evaluación

Se muestra el porcentaje de remoción hasta los 29 días de evaluación de tratamiento de alpechín, en el sistema de tratamiento continuo de un hongo nativo aislado de alpechín y *Chlorella vulgaris*, presentando una máxima remoción a los 21 días con 32.46%.

Agualimpia (2016) realiza un trabajo usando el hongo *Candida* en asociación con distintas cepas bacterianas, las cuales individualmente logran una reducción de 75% de la materia orgánica y 72% de grasas y aceites, después de 48 h para el caso de *Candida*. Todos estos microorganismos presentan una capacidad lipolítica responsable de la reducción de grasa, este autor refiere que los hongos y levaduras

tienen la capacidad de mantener la actividad a lo largo de amplias temperaturas y rangos de pH, además de la posibilidad de secreción de otras enzimas hidrolíticas fúngicas útiles para la degradación de aceite y grasas tales como celulasas, proteasas, lacasas y catalasas.

TABLA 21

RESUMEN DE LAS CONCENTRACIONES INICIAL, FINAL, Y EL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE LOS PARÁMETROS EVALUADOS EN EL SISTEMA CONTINUÓ DE ALPECHÍN, FRENTE A LOS VALORES MÁXIMOS ADMISIBLES DE LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES EN EL SISTEMA DE ALCANTARILLADO SANITARIO APROBADO POR D.S. N° 003-2011-VIVIENDA.

PARÁMETRO	CONCENTRACIÓN INICIAL (mg/L)	CONCENTRACIÓN FINAL (mg/L)	REMOCIÓN (%)	VMA(mg/L)
DBO₅	59112	14400	75.64	500
DQO	128134	27400	78.62	1000
Solidos suspendidos totales	1742	200	88.52	500
ACEITES Y GRASAS	41.9	28.3	32.46	100
FENOLES	0.36	0.03	91.67	-
CLORUROS	34722	20930	39.92	-
SULFATOS	6000	1218	79.7	500
Ph	4	8		6-9

Los resultados nos indican que el sistema continuo tiene una capacidad de remoción de más del 70% para todos los parámetros estudiados a excepción de los aceites y grasas que fue de un 32 %, sin embargo estos niveles en algunos parámetros fueron mayores a los límites máximos permisibles (VMA) (Tabla 21), esto se debió a que la evaluación realizada se da de acuerdo al tiempo de desarrollo (21 días), ya que como se ve en los gráficos a medida que pasa el tiempo la reducción de los parámetros se hace más notoria en relación al crecimiento del alga y del hongo, además según las tendencias de los gráficos se habría conseguido la remoción de los tóxicos por más tiempo de evaluación ya que el sistema continuo permite el crecimiento por un suministro continuo de alimento o en su defecto la formación de un consorcio en un mismo birreactor para ambos microorganismos como lo indica Mc Namara (2007) quien explica que el rendimiento de biorremediación supera la eficiencia individual de los microorganismos.

Conclusiones

- El efluente de la producción del aceite de oliva “alpechín” recolectada de la Empresa PERUCOLIVE del distrito de Atico, Arequipa presento los siguientes parámetros fisicoquímicos 59112.00 mg/L de DBO₅, 128134.00 mg/L de DQO, 1742.00 mg/L de SST y 41.90 mg/L de aceites y grasas, también se presentó en la caracterización de alpechín los siguientes compuestos tóxicos 0.36 mg/L de fenoles, 34722.00 mg/L de cloruros y 6000 mg/L de sulfatos.
- Se logró aislar una cepa de hongo a partir del efluente, la cual mostró crecimiento optimo hasta la dilución del 75% del alpechín, en los 15 días de evaluación de crecimiento con 3.83 cm de diámetro miceliar promedio.
- La microalga *Chlorella vulgaris*, obtenida a partir de un cultivo puro, presentó su mayor crecimiento promedio en la dilución del 25% de alpechín hasta los 15 días de evaluación, con 336667 cel/mL de crecimiento promedio en 250mL de medio de cultivo líquido BBM.
 - Se diseñó e implementó un prototipo a escala de laboratorio de un sistema de tratamiento continuo para la biorremediación de alpechín, integrado por un biorreactor de 20 L compuesto 25% cultivo de hongo

aislado de alpechín con agitación continua a 25°C, conectado a un sedimentador de 8L de volumen, este estuvo conectado a cuatro fotobiorreactores tipo panel de 37 cm de alto x 28 cm de largo x 6 cm de ancho cada uno con 75% de cultivo de *Chlorella vulgaris*, los fotobiorreactores presentaron bombas peristálticas de 20mL/min. para el flujo del efluente, el sistema presentó un fotoperiodo de 12 horas de luz / 12 horas de oscuridad mediante 2 fluorescentes de 30 watts

- El hongo aislado del alpechín junto con la microalga *Chlorella vulgaris* cultivados en un sistema de tratamiento continuo, presentaron potencial biorremediador con respecto al alpechín son sistema de biorremediación evidenciado por la remoción de parámetros fisicoquímicos de alpechín, con el 82.74% de remoción de la DBO₅; 78,62% de remoción de la DQO, 88.52% de remoción de SST y 32.46% de remoción de Grasas y Aceites; también se presentó remoción de compuestos tóxicos como el 91.67% de remoción de Fenoles, 39.92% de remoción de cloruros y 79.7% de remoción de sulfatos. Siendo estadísticamente significativas hasta los 21 días de evaluación; sin embargo, no llegaron a ser menores a los valores máximos admisibles
- Se acepta la hipótesis del investigador, porque se logró reducir la concentración de parámetros fisicoquímicos y compuestos tóxicos del alpechín tratado con un sistema de tratamiento continuo

Recomendaciones

- Sería necesario probar la remoción de sólidos totales suspendidos acoplándole sedimentadores a la entrada del sistema de tratamiento continuo para poder aproximarse aún más a los LMPS requeridos.
- Se consideraría necesario hacer el escalamiento del sistema de tratamiento para evaluar su eficiencia, con la adición de filtros percoladores al final del sistema de tratamiento continuo, para poder reducir los SSt y materia orgánica.
- Para la recuperación de sal y cloruros es recomendable acoplar un sistema de destilación al final del tratamiento, ya que estos se encuentran en concentraciones elevadas en el efluente de la producción del aceite de oliva (alpechín).
- Se recomendaría realizar pruebas de remoción de otros compuestos tóxicos, como efluentes de minera, para probar la eficiencia del sistema de tratamiento continuo con hongos nativos de alpechín y *Chlorella vulgaris*.

Referencias Bibliográficas

1. Abdel-Raouf N, AA Al-Homaidan & IBM Ibraheem. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences* 19: 257-275.
2. Abalde J., A. Cid, J. P. Fidalgo, E. Torres Y C. Herrero. (1995). *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Universidad La Coruña.
3. Agualimpia, Bayron, Otero, José Vicente, & Zafra, German. (2016). Evaluation of native microorganisms for biodegradation of oil and grease in palm oil refinery effluents. *Biotecnología Aplicada*, 33(1), 1221-1226. Recuperado en 04 de julio de 2017, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522016000100003&lng=es&tlng=en.
4. Aksu Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochem.* 40 997–1026.
5. Aceves Diez, Angel Emilio, Castañeda Sandoval, Laura Margarita. (2012) Producción biotecnológica de lipasas microbianas, una alternativa sostenible para la utilización de residuos agroindustriales. *Vitae*. Volumen 19 número 3 pp. Colombia. 244--247. ISSN 0121--4004
6. Alburquerque J.A., González J., García D., Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Biores. Technol.* 91: 195-200.
7. Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996). *Introductory mycology*. Wiley.

8. Amaral C, Lucas MS, Sampaio A, Peres JA, Dias AA, Peixoto F, Anjos M, Pais C. (2012). Biodegradation of Olive Mill Wastewaters by a Wild Isolate of *Candida oleophila*. *International Biodeterioration & Biodegradation*; 68 (3): 45-50.
9. American Public Health Association (APHA) (2005) Standard method for examination of water and wastewater, 21st ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington
10. APHA. 1998, Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th edition.
11. Aragón, J.M., Palancar, M.C. (2001). *Improlive 2000. Present and future of alpeorujo*; Ed Complutense, S.A., Madrid.
12. Arief, V.O., Trilestari, K., Sunarso, J., Indraswati, N. & Ismadji, S. (2008) Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using lowcost biosorbents: characterization, biosorption parameters and mechanism studies. *Clean* 36(12): 937–962.
13. Arjona, R., Ollero, P., Vidal, B. (2005) Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *J. Food. Engin.* 68: 239-247.
14. Aruoma, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant food. *Mut. Res.* 523: 9-20.
15. Asses N, Ayed L, Bouallagui H, Ben Rejeb I, Gargouri M, Hamdi M. (2009). Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresource Technology*; 100 (7): 2182–2188.

16. Azbar N, Bayram A, Ayes F, Ayesn M, Fusun S, Ozer A. (2004). A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production. *Critical Reviews on Environmental Science and Technology*; 34 (3): 209–247.
17. Barsanti L., Gualtieri P. (2006). *Algae. Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. Taylor & Francis group. 301 páginas.
18. Bayramoglu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M. & Arica, M.Y. (2006) Biosorption of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. *Int. J. Miner. Process.* 81: 35–43.
19. Beyerinck [Beijerinck], M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
20. Bianchi, G. (2003). Lipids and phenols in table olives. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 105: 229-242.
21. Blekas, G., Vassilakis, C., Harizanis, C., Tsimidou, M., Boskou, D. (2002). Biophenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3688–3692.
22. Brenes, M., García, A., Ríos, J.J., García, P., Garrido, A. (2002). Use of 1-EtOAcxypinoresinol to autentícate picual olive oils. *Internt. Journ. Food. Scien. Techn.* 37: 615-625.
23. Cartagena Arévalo Julián Camilo Malo Malo Brian Orlando Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la PTAR el salitre a nivel laboratorio. (Tesis de grado)

Fundación Universidad De América Facultad De Ingenierías Programa De Ingeniería Química Bogotá

24. Chacón C. Andrade C. Cárdenas C. 2002. Uso de *Chorella vulgaris* y *Scenedesmus sp.* En la remoción de Nitrógeno, Fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Centro de Investigación del Agua (CIA), Facultad de Ingeniería, Universidad de Zulia – Maracaibo, Estado de Zulia. Boletín del centro de investigaciones biológicas 38(2): 94-98
25. Chander M., Arora D.S. (2007). Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes and Pigments.*; 72:192–8.
26. Cing S., Yesilada O. (2004). Astrazon red dye decolorization by growing cells and pellets of *Funalia trogii*. *Journal of Basic Microbiology.* 44:263–9.
27. Deacon J.W. (2005). *Fungal Biology.* Wiley.
28. Della Greca, M., Monaco, P., Pinto, G., Pollio, A., Previtera, L., Temussi, F. (2001). Phytotoxicity of low-molecular-weight phenols from olive mill wast waters. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 67: 352-359.
29. Desjardin D.E., Oliveira A.G., Stevani C. V. (2008). Fungi bioluminescence revisited. *Photochemical and Photobiological Sciences.*7:170–82.
30. Dick, W.A., Tabatabai, M.A. (1993). Significance and potential uses of soil enzymes. En: *Soil microbial ecology. Application in agricultural and environmental management* (F. Blaine, ed.) Marcel Dekker. New York. pp.95-127
31. Duran Maestro, Borja Padilla R., Martín Martín A., Fiestas Ros de Ursinos J. A. y Alba Mendoza J. (1991) *Biódegradación de los compuestos fenólicos*

presentes en el alpechín Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Licencia Creative Commons 3.0 España

32. Fernández C. (2013). El Mercado de Aceite de Oliva en el Perú.
33. Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, G., Rodríguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jiménez, A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "alperujo" J. Agric. Food Chem. 50: 6804-6811.
34. Fiestas Ros De Ursinos, J.A. (1986). Vegetation water used as fertilizer. Proc. International Symposium on Olive By-products Valorization. FAO, UNDP, Sevilla, págs: 321-330.
35. Fiestas Ros De Ursinos, J.A. y Borja Padilla, R. (1992). Use and treatment of olive mill wastewater: Current situation and prospects in Spain. Grasas y Aceites 43, 101-106.
36. Galli, C., Visioli, F. (1999). Antioxidant and other activities of phenolics in olives olive oil, typical components of the mediterranean diet. Lipids 34: 23-26.
37. García Rodríguez, A. (1990) . Eliminación y aprovechamiento agrícola del alpechín. Reunión Internacional sobre Tratamiento de Alpechines, Córdoba
38. Garrido Hoyos S., Martínez Nieto L., Camacho Rubio F.(1995) . Estudio de la Cinética de Degradación de las Aguas Residuales de la Industria de Extracción de Aceite de Oliva.
39. Gonzales, M.; Moreno, E.; Quevedo S. y Ramos C. (1990). Studies on antibacterial activity of wastewaters from olive oil mills (alpechín): Inhibitory activity of phenolic and fatty acids. Chemosphere 20, 423-432.

40. González B., Buitargo E., Frontado K. (1999). Evaluación de medios nutritivos para el crecimiento de tres microalgas marinas de uso común en acuicultura.
41. Gupta, V.K. & Rastogi, A. (2009) Biosorption of hexavalent chromium by raw and acid-treated green alga *Oedogonium* from aqueous solutions. *J. Hazard. Mater.* 163: 396–402.
42. Hadiyanto M. y Soetrisnanto D. (2013). Phytoremediations of Palm Oil Mill Effluent (POME) by Using Aquatic Plants and Microalge for Biomass Production.
43. Hanafi F., Mountadar M. y Assobhei O. (2010). Combined Electrocoagulation and Fungal Processes for the Treatment of Olive Mill Wastewater.
44. Hodaifa Gassan, Martínez M. Eugenia, Sánchez S. (2007). Use of industrial wastewater from olive-oil extraction for biomass production of *Scenedesmus obliquus*
45. Hernández B 2010 Remoción De Ortofosfato Y Amonio De Agua Residual Municipal Por Tre Cultivos Libres E Inmovilizados De Microalgas Tese De Especialidad En Biotecnología Universidad Autónoma Metropolitana México 57 pp.
46. He P., Mao B., Lu F., Shao L., Lee D. & Chang J. 2013. The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Journal of bioresource technology.* 146: 562-568.

47. Hong T.D., Ellis R.H., Moore D. (1997). Development of a model to predict the effect of temperature and moisture on fungal spore longevity. *Annals of Botany*. Feb 1;79(2):121–8.
48. Hussain A., Iqbal M., Ayub N., Haqqanii A.M. (2003). Physiological study of *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Pakistan Journal of Plant Pathology*.2 (2):102–6.
49. Jaouani A., Guillén F., Penninckx M.J., Martínez A.T., Martínez MJ. (2005). Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*.36:478–86.
50. Jin B., Van Leeuwen J., Yu Q., Patel B. (1999). Screening and selection of microfungi for microbial biomass protein production and water reclamation from starch processing wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*.74:106–10.
51. Kanno, Toshihiro. Uyama, Kazie. (2005). *Chlorella vulgaris*: The Powerful Japanese Medicinal Green Algae as a Biological Response Modifier. Publicadopor Woodland Publishing. 63 páginas.
52. Konishi, F., Mitsuyama M., Okuda M., Tanaka K., Hasegawa T., Nomoto K.(1996). Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* sp against myelo-suppression by 5-fluorouracil cancer immunolimmunolother, 46:268-274.
53. Lane Charles R., Beales Paul y Hughes Kelvin. (2012) *Fungal Plant Pathogens*CABI, 2012 ISBN N.º de páginas 307 p.p. ISBN 9781845936686
1. Lee R. E. (1995). *Phycology*. Cambridge, University Press, USA.

2. López, R. y Cabrera, F. (1993). La situación del tratamiento de alpechines en España. *Boletín Agropecuario* 30; 30-35.
3. Madigan M.T., Martinko J.M., Brock T.D., Parker J. (1997). *Brock Biology of Microorganisms* [Internet]. Prentice Hall International;.
4. Madigan, M. Martinko, J. Parker, J. (2002). *Cianobacterias. Biología de los Microorganismos*. Pearson, Prentice Hall. Madrid –España pp 418-423.
5. Martínez Nieto L., Ramos Cormenzana A., García Pareja M. y Garrido Hoyos S.E. (1992) *Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con *Aspergillus terreus** Consejo Superior de Investigaciones Científicas Licencia Creative Commons 3.0 España
6. Maestro D., Borja P., Martín M., y Fiestas R. (1991). *Biodegradación de los compuestos Fenólicos presentes en el Alpechín*
7. Mantzavinos D, Kalogerakis N. (2005). *Treatment of Olive Mill Effluents: Part I. Organic Matter Degradation by Chemical and Biological Processes an Overview*. *Environment International*; 31 (2): 289–295.
8. Martínez N. y Garrido H. (1994). *El alpechín, un problema medioambiental en vías de solución*. *Química e Industria* 41, 17- 27
9. Martínez N., Ramos C., Garcia P. y Garrido. (1991). *Biodegradación de Compuestos Fenólicos del Alpechín con *Aspergillus Terreus**.
10. Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Rios, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert. A. (2001). *Determination of phenols, flavones and lignans in virgin olive oils by solid-phase extration and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185-2192.

11. McNamara Christopher J., Anastasiouc Christos C., O'Flahertyd Vincent, Mitchell Ralph (2008) Bioremediation of olive mill wastewater International. Biodeterioration & Biodegradation 61. 127–134
12. Migliorini P. Development of Organic Olive Cultivation and its Importance for the Sustainability in the Mediterranean. In: Migliorini P., Minotou C., Lusic D., Hashem Y., Martinis A. (eds.) Book of Abstract. International Conference on ORGANIC AGRICULTURE and AGRO-ECO TOURSIM in the Mediterranean, International Conference AgriBioMediterraneo, 16-18 September 2011, Zakynthos, Greece.
13. Mishra B.K., Arora A., Lata. (2004). Optimization of a biological process for treating potato chips industry wastewater using a mixed culture of *Aspergillus foetidus* and *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. Aug;94(1):9–12.
14. Monteiro, C.M., Pasula, M.L. & Malcata, F.X. (2010) Cadmium removal by two strains of *Desmodesmus pleiomorphus* cells. Water Air Soil Pollut. 208: 17–27.
15. Montes J., y Pulido M. (2012). Obtención de protocolos para el aislamiento, cultivo y extracción de ADN de *Chlorella vulgaris* Beyerinck. Astrolabio vol.11.2 art. 04. Colombia.
16. Moore-Landecker E. (1996). Fundamentals of the Fungi. Prentice Hall.
17. Navarro A.,Gez M.,Mercado L.,Senatra L. y González G. (2006). Caracteres físico-químicos de efluentes de Fábricas de Aceite de Oliva. Mendoza-Argentina.
18. Niaounakis M, Halvadakis CP. Olive-Mill Waste Management: Literature Review and Patent Survey. Typothito: Greece; 2004.

19. Owen, R.W., Haubner, R., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2003). Isolation, structure, elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem. Toxicol.* 41: 703-717
20. Pedroza-Padilla Carmen Julia, Romero-Tabarez Magally, Orduz Sergio (2017) Actividad Lipolítica De Microorganismos Aislados De Aguas Residuales Contaminadas Con Grasas. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol 15 No. 1 (36-44)* doi: [http://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(15\)36-44](http://dx.doi.org/10.18684/BSAA(15)36-44)
21. Palliotti, A., Proietti, P. (1992). Ulteriori indagini sull'influenza delle acque reflue di frantoi oleari sull'olivo. *L'Informatore Agrario* 39: 72-76.
22. Paredes J., Brito R. (2012). Recuperación electroquímica del agua del Alpechín del Aceite de Oliva, para evitar la contaminación del medio ambiente y su reutilización como agua de riego.
23. Paredes, C., Cegarra, J., Roig, A., Sánchez-Monedero, M.A., Bernal, M.P. (1999). Characterization of olive mill wastewater (alpechín) and its sludge for agricultural purposes. *Biores. Technol.* 67: 111-115.
24. Pérez, J.; De la Rubia, T.; Moreno, J. y Martínez, J. (1992). Phenolic content and antibacterial activity of olive waste waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, 489-495.
25. Pérez-Jiménez, F., Álvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L. (2005). Internacional conference on the healthy effect of virgen olive oil. Consensus report, Jaen (Spain) 204. 35: 421-424.

26. Ramírez Leiva Ladys Anabel 2014 Evaluación in vitro de la capacidad de Biorremediación del consorcio microalgal *Chlorella sp* – *Scenedesmus sp.*, en la biorremoción de materia orgánica de aguas residuales del Camal de Ambato.(Tesis de grado) Universidad Central del Ecuador Facultad De Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental
27. Rasmussen, J.A., Einhellig, F.A. (1977). Synergistic inhibitory effects of paracoumaric and ferulic acids on germination and growth of grain-sorghum. J. Chem. Ecol. 3: 197-205.
28. Reyna Martínez Gustavo Raúl (2012) Producción de lípidos por cepas nativas de *Chlorella pyrenoidosa* y *Rhodotorula mucilaginosa* y generación de un consorcio microbiano.(Tesis de maestría) Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. México
29. Reynolds, T. (1989). Comparative effects of heterocyclic-compounds on inhibition of lettuce fruit germination. J. Exp. Bot. 40: 391-404.
30. Richmond A. (2004) Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. Blackwell Publishing, UK, 566 pp
31. Rodríguez Juan García (2010) Depuración de alpechín por procesos combinados químicos y biológicos.(Tesis de doctorado) Universidad de Extremadura Facultad de Ciencias Departamento de Ingeniería Química y Energética
32. Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez-Monedero M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. Waste Manage. 26: 960-969.

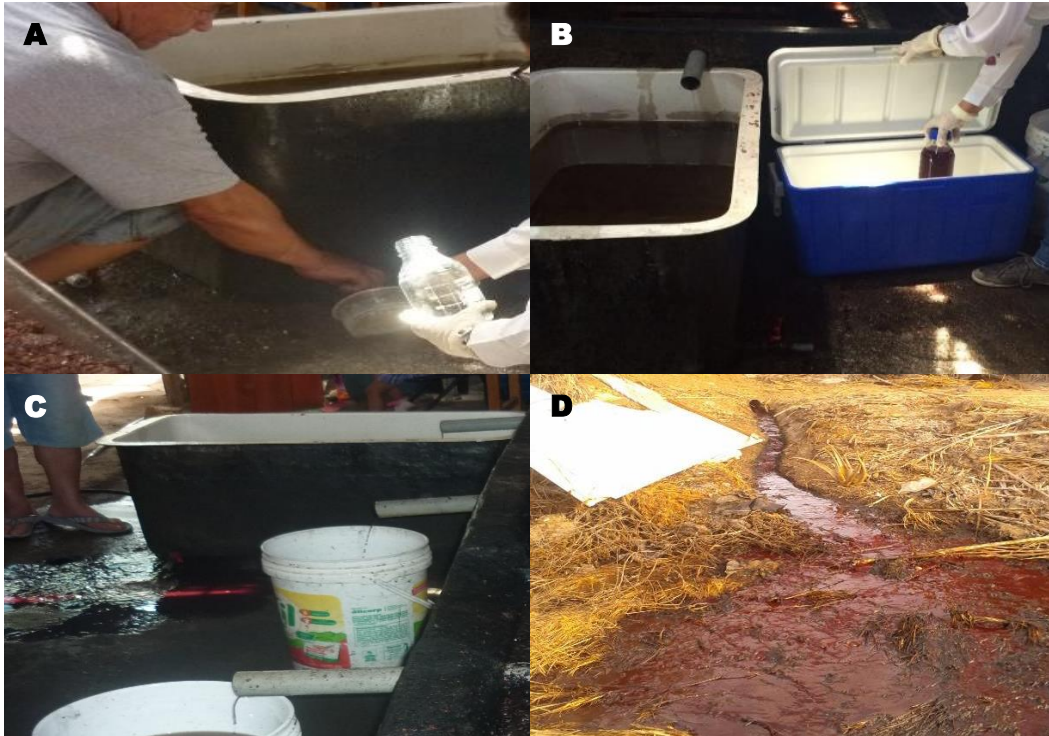
33. Roman Rodrigo, J. (1990). Situación en España. Reunión Internacional sobre Tratamiento de Alpmuechines, Córdoba.
34. Romero, C., Brenes, M., Yousfi, K., García, P., García, A., Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J. Agric. Food Chem.* 52: 479-484.
35. Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. (2002). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Sc. Hort.* 92: 147-176.
36. Ryan, D., Robards, K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst.* 123: 31R-44R.
37. Ryan Daniel R., Leukes Winston D., y Burton Stephanie G. (2005) Fungal Bioremediation of Phenolic Wastewaters in an Airlift Reactor. *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 1068-1074.
38. Sáiz Jiménez, C.; De Leeuw, J.W., Gómez Alarcón, G. (1987). Sludge from the waste water of the olive processing industry: a potential soil fertilizer. *Sci. Total Environ.* 62, 445-452.
39. Sarika, R., Kalogerakis, N., Mantzavinos, D., (2005). Treatment of olive mill effluents: Part II. Complete removal of solids by direct flocculation with poly-electrolytes. *Environ. Int.* 31, 297-304.
40. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater USA APHA WDC 2005 19th ed. 1995 Pp 5-34.

41. Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., León, M., Raposo, F., & Rincón, B. (2008). Assessment of a microalgae pond for post-treatment of the effluent from an anaerobic fixed bed reactor treating distillery wastewater. *Environ Technol.* 29(9):985- 992.
42. Trujillo Toro María Alejandra y Ramírez Quirama Juan Fernando (2012) Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental – Volumen 3 Número 2 ISSN 2145-6097*
43. Truong Q.T., Miyata N., Iwahori K. (2004). Growth of *Aspergillus oryzae* during treatment of cassava starch processing wastewater with high content of suspended solids. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 97(5):329–35.
44. Uceda, M., Hermoso, M., Gonzáles, J. (1995). Evolución de la tecnología del aceite de oliva, nuevos sistemas ecológicos, ensayos y conclusiones. *Alimentación, Equipos y tecnología* 5: 92-98.
45. Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., Montedoro, G. (2001). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 49:1218-1223.
46. Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C., Galli, C. (2005). Virgin olive oil study (VOLVOS): Vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur. J. Nutr.* 44: 121-127.
47. Visioli, F., Grande, S., Bogani, P., Galli, C. (2004). The role of antioxidants in the Mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer prev.* 13: 337-343.

48. Wang J, Chen C (2009) Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol Adv* 27:195–226.
49. Xue HB, Stumm W, Sigg L (1988) The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Res* 22:917–926.

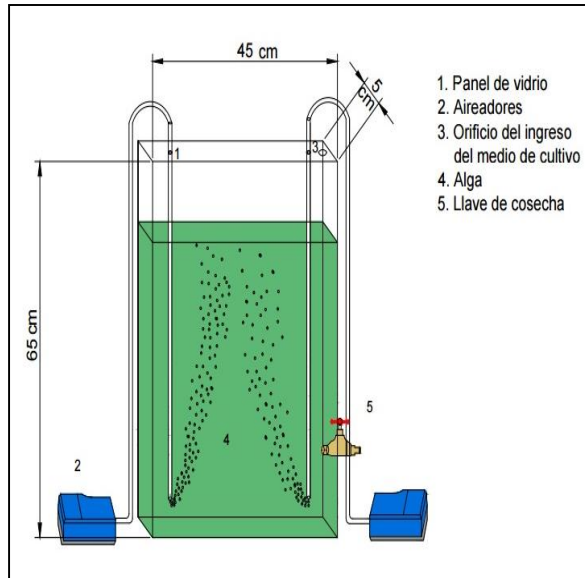
Anexos

Registro fotográfico



I. Muestreo del efluente de producción aceite de oliva.

- A) Toma de muestra del efluente de aceite de oliva (alpechín).
- B) Empacado de la muestra a 4°C para su traslado a laboratorio.
- C) Salida del alpechín de la planta de producción de PERUCOLIVE.
- D) Vertimiento del efluente en la parte externa de la empresa.



II: Esquema de panel para obtención de *Chlorella vulgaris*



III: Fotobiorreactor para obtención de *Chlorella vulgaris*



IV: Cultivo y propagación del hongo aislado del alpechín.



V: Cultivo del hongo aislado del alpechín en medio de cultivo líquido: Se muestra: A) Cultivo inicial del hongo aislado para inóculo de biorreactor fungal. B) Cultivo del hongo aislado en biorreactor fungal.



VI: Preparación de las soluciones de diferentes concentraciones del alpechín para evaluación de la resistencia de *Chlorella vulgaris*.



VII: Cultivo de la *Chlorella vulgaris* en fotobiorreactor.



VIII:Sistema de tratamiento continuo.