Treatment in the Peruvian Highlands Using Indigenous Consortia with *Bacillus sp*. and *Chlorella vulgaris*

Stefany Espinoza[1]; Stephany Ccanto[2]; Estefania Mercado[3]; Jesus Avila[4]

[123]Peruvian University of Applied Sciences, Perú, u20201c064@upc.edu.pe, u20201c318@upc.edu.pe, emercado@lamolina.edu.pe
[4]Division of Biosphere Sciences and Engineering, Carnegie Science, Standford, USA, javilapeltroche@carnegiescience.edu

Abstract–*The treatment of wastewater in Lucanas, Ayacucho, employed indigenous consortia of* ***Chlorella vulgaris and Bacillus sp.*** *Initial analyses showed thermotolerant coliform levels exceeding established limits. After 4 days, the treatment achieved a 73% reduction compared to 62.8% without treatment. Samples from nearby water bodies were collected to isolate and characterize indigenous microorganisms, which were applied in a laboratory-scale experimental system with hydraulic retention times of 24 and 48 hours. The results showed an average coliform reduction of* ***65.56% at 24 hours and 71.77% at 48 hours****, with statistically significant differences compared to untreated controls. The combined use of Chlorella vulgaris (3,820,000 cells/mL) and Bacillus sp. proved to be an effective, economical, and adaptable solution for contexts in the Peruvian highlands.*

Keywords: *wastewater, indigenous consortia, Bacillus sp., Chlorella vulgaris, thermotolerant coliforms.*

Wastewater Treatment in the Peruvian Highlands Using Indigenous Consortia with *Bacillus sp.* and *Chlorella vulgaris*

Stefany Espinoza[1]; Stephany Ccanto[2]; Estefania Mercado[3]; Jesus Avila[4]

[123]Peruvian University of Applied Sciences, Perú, u20201c064@upc.edu.pe, u20201c318@upc.edu.pe, emercado@lamolina.edu.pe
[4]Division of Biosphere Sciences and Engineering, Carnegie Science, Standford, USA, javilapeltroche@carnegiescience.edu

Resumen– *El tratamiento de aguas residuales domésticas en Lucanas, Ayacucho, empleó consorcios autóctonos* ***de Chlorella vulgaris y Bacillus sp.*** *Los análisis iniciales mostraron niveles de coliformes termotolerantes por encima de los límites establecidos. Tras 4 días, el tratamiento logró una reducción del 73% frente al 62.8% sin tratamiento. Se recolectaron muestras de cuerpos hídricos cercanos para aislar y caracterizar microorganismos autóctonos, aplicándolos en un sistema experimental a escala de laboratorio con tiempos de retención hidráulica de 24 y 48 horas. Los resultados mostraron una reducción promedio de coliformes* ***del 65.56% a las 24 horas y del 71.77% a las 48 horas****, con diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles sin tratamiento. El uso combinado de Chlorella vulgaris (3 820 000 células/mL) y Bacillus sp. demostró ser una solución eficaz, económica y adaptable para contextos de la sierra del Perú.*

Palabras clave: *aguas residuales, consorcios autóctonos, Bacillus sp.*, *Chlorella vulgaris, coliformes termotolerantes.*

Abstract- *The treatment of wastewater in Lucanas, Ayacucho, employed indigenous consortia of* ***Chlorella vulgaris and Bacillus sp.*** *Initial analyses showed thermotolerant coliform levels exceeding established limits. After 4 days, the treatment achieved a 73% reduction compared to 62.8% without treatment. Samples from nearby water bodies were collected to isolate and characterize indigenous microorganisms, which were applied in a laboratory-scale experimental system with hydraulic retention times of 24 and 48 hours. The results showed an average coliform reduction of* ***65.56% at 24 hours and 71.77% at 48 hours****, with statistically significant differences compared to untreated controls. The combined use of Chlorella vulgaris (3,820,000 cells/mL) and Bacillus sp. proved to be an effective, economical, and adaptable solution for contexts in the Peruvian highlands.*

Keywords: *wastewater, indigenous consortia, Bacillus sp., Chlorella vulgaris, thermotolerant coliforms.*

I. Introducción

La gestión sostenible del agua se ha convertido en un desafío crítico debido a que la agricultura consume el 70% del agua dulce extraída, transformando a la escasez hídrica en una amenaza directa para la producción de alimentos [1]. Este problema se intensifica ante la necesidad de alimentar a una población mundial proyectada en 9 mil millones para 2050, lo que exige aumentar la producción alimentaria con recursos hídricos cada vez más limitados [2]. Además, en países en desarrollo, más del 80% de las aguas residuales se descargan en el entorno natural sin ningún tipo de tratamiento, lo que resulta en riesgos significativos al ser reutilizadas en el riego agrícola, estas mismas aguas contienen altas concentraciones de productos químicos y metales pesados, que se acumulan en los organismos vegetales, afectando la cadena alimenticia [3].

A nivel global, más del 10% de la población consume alimentos irrigados con aguas residuales, afectando tanto a agricultores como a consumidores [4]. Esta situación incrementa la inversión en salud pública, ya que los patógenos transmitidos por el agua provocan aproximadamente 564 000 muertes por enfermedades diarreicas al año [5]. La situación se agrava debido a la falta de sistemas de saneamiento adecuados, que afecta al 46% de la población mundial, especialmente en comunidades rurales, donde el 82% carece de estas instalaciones [6].

Desde un enfoque ambiental, los vertimientos de aguas residuales domésticas alteran la composición de los cuerpos de agua debido a su alto contenido de nitrógeno y fósforo [7]. La irrigación prolongada con estas aguas ha causado acumulación de metales pesados en suelos, como en Egipto, donde se han detectado plomo, cadmio y hierro tras 30 años de uso [8]. Estos contaminantes afectan el microbiota del suelo y la cadena alimentaria, contribuyendo a la eutrofización y degradación de hábitats *[9]*; además, un estudio en Singapur demostró que la reutilización de aguas residuales sin tratamiento es una fuente de contaminación microbiológica en la agricultura [10].

Para mitigar estos impactos, se han implementado normativas sobre el vertido de aguas residuales domésticas y su uso en riego. Aunque existen estándares internacionales, la falta de uniformidad dificulta su aplicación por ello, se han mejorado los sistemas de tratamiento en Bolivia, Honduras y Ecuador [11].

En Perú, las normativas sobre tratamiento de aguas residuales aún requieren actualización. Se ha promulgado un decreto para el reúso de aguas municipales tratadas en riego urbano; Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM y el Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM determinan los Límites Máximos Permisibles (LMP) y los estándares de calidad del agua para riego con agua residual doméstica [12], [13], basado en estándares de la Organización Mundial de Salud (OMS). Según, La Superintendencia Nacional de Saneamiento

(SUNASS), el 62.4% de las aguas residuales domésticas es gestionado, pero solo el 42.6% de pequeñas ciudades cuenta con plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR). En 2022, se estimó que 211 millones de metros cúbicos de aguas residuales fueron vertidos sin tratamiento, reflejando una mejora limitada respecto a años anteriores [14]. Por otra parte, persisten vacíos normativos que dificultan su aplicación. Por ejemplo, el 75% de las regulaciones nacionales no monitorean el fósforo como contaminante, lo que limita la evaluación de riesgos ambientales [15]. De igual manera, la ausencia de normativas sobre tarifas de recolección de agua complica la sostenibilidad operativa de las PTAR [16], afectando el cumplimiento del Objetivo de Desarrollo Sostenible número 6, enfocado en la gestión sostenible del agua.

En este contexto, el desarrollo de tecnologías innovadoras ha permitido la reducción de contaminantes en aguas residuales como la electro-Fenton para reducir la carga microbiana y los residuos farmacéuticos en aguas residuales domésticas, aunque su implementación es limitada por la falta de inversión [17]. Ante ello, se han desarrollado alternativas como los vermifiltros con geofiltros [6], humedales artificiales y microorganismos como bacterias.

Una innovación en biotecnología resalta el uso de consorcios de microalgas y bacterias autóctonas como una estrategia avanzada que permiten revalorizar los cuerpos hídricos, destacando microalgas y bacterias por su eficacia en la remoción de nitrógeno, fósforo y carga microbiana [18]. Este último, se muestra con la presencia de un consorcio bacteriano en aguas residuales domésticas, a destacando *Bacillus subtilis*, el cual ha demostrado una disminución significativa en parámetros como demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO), sólidos disueltos totales (TDS), sólidos totales (TS) y coliformes fecales, mejorando la calidad del agua [19]. Un estudio reciente evaluó el efecto de *Chlorella vulgaris y Spirulina artrospora* en la reducción de coliformes fecales en aguas residuales. Los resultados indicaron que *Chlorella vulgaris* logró una eliminación del 88.92% de coliformes fecales tras siete días de tratamiento, evidenciando su potencial como agente biorremediador en sistemas de tratamiento de aguas residuales [20].

Los consorcios de microalgas y bacterias representan una alternativa sostenible para el tratamiento de aguas residuales, superando las limitaciones de los métodos convencionales y reduciendo su impacto ambiental [21]. En este estudio, proponemos el uso de consorcios autóctonos de bacterias y microalgas, aislados de cuerpos hídricos lénticos de la sierra del Perú, para evaluar la reducción de coliformes termotolerantes en aguas residuales domésticas durante el tratamiento secundario a escala de laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. *Área de Estudio*

El estudio se realizó en la localidad de Lucanas, en el distrito del mismo nombre, provincia de Lucanas, región Ayacucho, situada en la sierra peruana a 3,385 m.s.n.m. En esta localidad se encuentra una PTAR inhabilitada, lo que ha provocado el vertimiento de aguas residuales domésticos en el riachuelo Cuculihuaicco, este riachuelo es utilizado para el riego agrícola en la zona baja del distrito (fig. 1). Sin embargo, el procedimiento experimental se realizó en la Universidad de Peruana de Ciencias Aplicadas (UPC), Lima, Perú.

B. *Muestreo de agua*

Para evaluar la calidad inicial del agua en el ***riachuelo*** Cuculihuaicco, se tomó una muestra compuesta en horarios estratégicamente seleccionados, a 200 metros aguas abajo del punto de descarga de aguas residuales domésticas sin tratamiento previo (fig. 1) identificadas en ArcGIS Pro, siguiendo el Protocolo Nacional para el Monitoreo de la Calidad de los Recursos Hídricos Superficiales [15] y la guía otorgada por el laboratorio NSF INASSA S.A.C acreditado por el Instituto Nacional de Calidad (INACAL). La Tabla 1 presenta información detallada sobre el punto de muestreo y los horarios de recolección.

TABLA I
PUNTO DE MUESTREO Y HORARIO DE RECOLECCIÓN

Punto	Características	Medidas	Horario
N°!	Latitud	14°37’7.56’’S	7 am
	Longitud	74°14’7.45’’O	1 pm
	Altitud	3303 m.s.n.m.	3 pm

Nota. Elaboración propia

La muestra compuesta consta de agua residual doméstica recolectada en un frasco de vidrio de 250 ml esterilizado para la evaluación de microorganismos, un frasco de plástico de 1 litro, dos frascos de plástico de 500 ml (uno de ellos destinado para el análisis de turbidez, el cual debe ser refrigerado a ≤ 4°C con un tiempo de vida de 48 horas desde la toma de la muestra), además de incluir etiquetas, preservantes, gel pack y el documento de cadena de custodia.

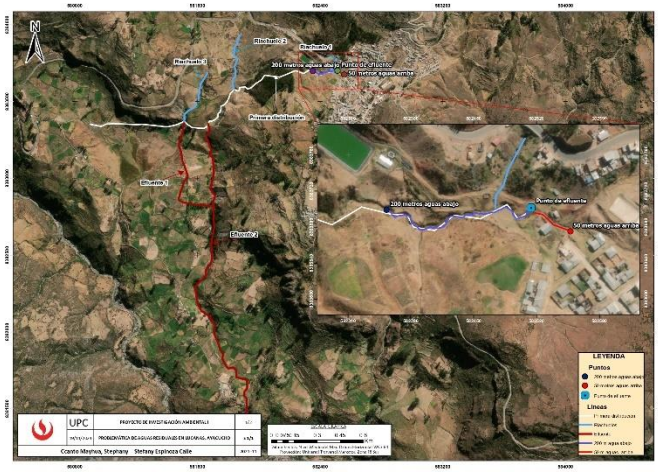

Fig. 1. Ubicación de puntos de muestreo.

C. *Caracterización de microorganismos autóctonos*

La caracterización de microorganismos autóctonos se realizó en el laboratorio de la UPC de las muestras de los cuerpos hídricos cercanos al riachuelo Cuculihuaicco, cuyo estudio es descriptivo que busca identificar y clasificar

bacterias y microalgas mediante la observación de su morfología en su entorno natural, sin manipulación de variables. De las cuales se quiere identificarán dos tipos de bacterias y microalgas para determinar cuál de ellas tiene mayor presencia en la zona.

Se recolectaron 41 muestras a través de un muestreo aleatorio estratificado calculadas con la ecuación 1, identificadas en 3 cuerpos de agua lóticos (fig. 2): la laguna PadrePaccochan, con un perímetro de 800 m, donde se establecieron cuatro puntos de control cada 200 m, subdivididos en intervalos de 10 m, totalizando 80 puntos [22]; y la laguna Qoreccocha, de 970 m, con un procedimiento similar que resultó en 96 puntos de muestreo. Este enfoque es pertinente debido a la escasa cobertura vegetal en los pisos altitudinales de quechua y puna de la zona de estudio [23] lo que justifica un muestreo denso para obtener resultados representativos, por último, se incluyó un pequeño cuerpo hídrico, conocido como puquio.

$$n_h = \frac{N_h \times n}{N} \qquad (1)$$

Donde:

n_h: ***Tamaño de muestra de cada estrato***

N_h: ***Tamaño de muestra de población***

n: , ***Tamaño total de la muestra***

N: ***Tamaño total de la población***.

1) Bacteria: Bacillus sp., Pseudomonas sp

Para la caracterización se emplearon medios de cultivo específicos: agar Cetrimida para *Pseudomonas sp*. y agar nutritivo para *Bacillus subtilis* [24]. Para la preparación, se pesaron 128.46 g de Cetrimida y 26.9 g de agar nutritivo, disueltos en 956 mL de agua destilada, cada una para obtener un total de 41 placas, las cuales fueron esterilizadas en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente, se vertió el medio en placas Petri debidamente rotuladas y se procedió a la siembra de las muestras utilizando el método de estrías. La clasificación morfológica de las bacterias se realizó mediante la tinción de Gram, observándose que *Bacillus subtilis* (Gram positiva) presentó una coloración naranja, mientras que *Pseudomonas sp.* (Gram negativa) mostró una tinción verde [24]. Finalmente, se efectuó el conteo de colonias bacterianas utilizando un contador de colonias del laboratorio de la UPC, con el objetivo de identificar las zonas con mayor concentración de microorganismos.

2) Microalgas: Spirulina arthospira y Chlorella vulgaris

Para su identificación, la preparación del medio de cultivo, se pesaron 6 g de agar nutritivo y se disolvieron en un matraz de 500 ml con el medio Chu para microalga de agua dulce, seguido de una esterilización en autoclave a 121 °C durante 1 hora. Luego, se dejó enfriar hasta aproximadamente 50 °C y se vertió en placas Petri estériles [25]. Para la siembra, se tomó dos gotas con una micropipeta estéril y se depositó sobre el agar; luego, con un asa de siembra flameada, se realizó el rayado en la superficie, se selló con Parafilm®, rotuló y se almacenó en una cámara climática a 14 °C durante 8 días [26]. Luego se utilizó la observación microscópica, donde *Chlorella vulgaris* presentó células esféricas, unicelulares, de 2 a 10 µm de diámetro [27], mientras que *Spirulina arthospira* mostró una morfología filamentosa y helicoidal, típica de cianobacterias [28].

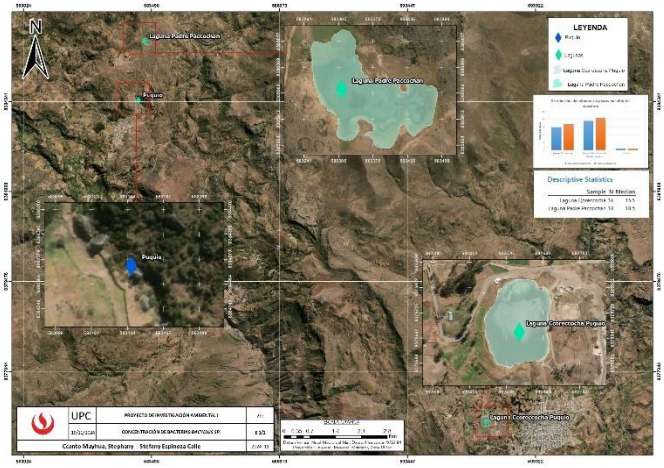

Fig. 2. Ubicación de los cuerpos hídricos aledaños y la distribución del número de placas con Agar bacteriano.

D. Diseño y procedimiento del sistema de tratamiento

El diseño es un experimento con sistemas independientes para la aplicación de bacterias y microalgas autóctonas, debido a que las bacterias pueden emitir sustancias tóxicas que afectan el crecimiento de las microalgas y competir por los nutrientes [29].

Para evitar esta interferencia, se utilizaron envases de plástico separados (11 x 11 x 19 cm) en soportes que facilitan el monitoreo (fig.4). El diseño del experimento es unifactorial, ya que se evaluará un solo factor el tiempo de retención hidráulica (TRH) en dos niveles diferentes (24h y 48h), [30] manteniendo constantes las demás condiciones experimentales.

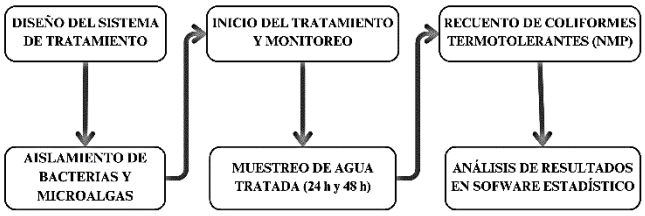

Fig. 3. Fases del sistema.

El procedimiento del sistema del tratamiento consta de 5 fases (fig. 3) a partir del diseño del tratamiento***:***

1) Obtención de cepas bacterianas y microalgas

La activación de bacterias se inicia descongelando viales conservados en glicerina a temperatura ambiente, seguida de la siembra en placas de agar nutritivo, utilizando una muestra del cultivo para su incubación a 37°C durante 24-48 horas y observación del crecimiento de colonias bacterianas.

Posteriormente, se prepara un caldo de cultivo nutritivo (Nutrient Broth) en condiciones estériles, inoculando una colonia seleccionada de *Bacillus sp*. e incubándola en agitación a 37°C durante 24 horas para su reproducción. Se realizan diluciones sucesivas en solución salina estéril (0.85% NaCl) hasta alcanzar concentraciones de 10^{-6}. Finalmente, se inoculan 10 mL de las diluciones 10^{-7} o 10^{-8} de *Bacillus sp*. en los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

El conteo de microalgas se realizó manualmente utilizando la Cámara de Neubauer, lo que permitió obtener una estimación precisa de su densidad celular. La concentración de células se encontró dentro del rango ideal de 1 a 10 millones de células por mililitro, lo que la hace adecuada para el tratamiento.

2) Inicio de tratamiento

Antes de aplicar los tratamientos, el efluente de agua doméstica se filtró para reducir los sólidos suspendidos. Luego, cada sistema se equipó con aireación para garantizar una óptima oxigenación y la temperatura, el pH, la intensidad lumínica (12 h luz / 12 h oscuridad) para favorecer la fotosíntesis de las microalgas [31].

El proceso se desarrolló en dos etapas iniciales: la primera etapa: aplicación de bacterias 1 x 10^7 UFC/mL 1% de 1800 ml de agua residual [30]; segunda etapa: aplicación de 30% de microalgas [32], de 1800 ml de agua residual (fig.3) pasadas las 24 h y en el segundo envase.

3) *Muestreo y monitoreo de agua tratada*

Se realiza diariamente para asegurar el cumplimiento de los estándares establecidos, colocando los frascos en una cámara de crecimiento o incubadora con control de temperatura (25-30°C) y fotoperiodo (12h luz/12h oscuridad), verificando el correcto funcionamiento del instrumento de agitación para la aireación de los sistemas. El muestreo consiste en la recolección de 10 mL de cada frasco al inicio del experimento (día 0) y en los días 1, 2 y 3, según el tiempo de retención hidráulica y las repeticiones asignadas.

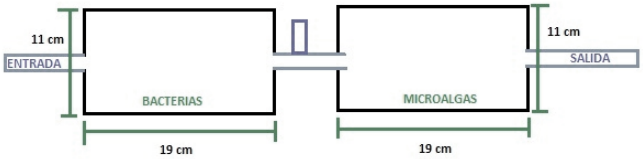

Fig. 4. Diseño de sistema

4) Recuento de coliformes termotolerantes

El método del Número Más Probable (NMP) [33] para el recuento de coliformes termotolerantes se calculará mediante la ecuación de reducción porcentual:

$$\text{Reducción (\%)} = \left(\frac{\text{Valor inicial} - \text{Valor final}}{\text{Valor inicial}}\right. \times 100\% \qquad (2)$$

Utilizando los datos iniciales y finales NMP de coliformes obtenidos para cada intervalo de tiempo evaluado (24 y 48 horas) y bajo condiciones con y sin tratamiento. Se calculará el porcentaje promedio de reducción y su desviación estándar, considerando las repeticiones experimentales.

5) *Análisis de resultados en software estadístico*

El análisis estadístico se realizará con una metodología descriptiva y comparativa, empleando software como Minitab y Excel. Se calcularán estadísticas descriptivas como media, desviación estándar y coeficiente de variación, y se compararán los datos obtenidos con los ECA. Se aplicarán pruebas de comparación como Kruskal-Wallis, ANOVA de un factor y test de Tukey, además de la prueba de Mann-Whitney en algunos casos. Para la validación de los supuestos estadísticos, se utilizará la prueba de Shapiro-Wilk para normalidad. Finalmente, los resultados se visualizarán mediante gráficos de barras, boxplots y diagramas de medias con intervalos de confianza.

III. RESULTADOS

A. Análisis de las condiciones de los parámetros fisicoquímicos y microbiológicos del riachuelo Cuculihuaijo

Las muestras compuestas recolectadas de los puntos descritos en la Tabla 1 fueron trasladadas al laboratorio NFS S.A.C. para su análisis. Las concentraciones de coliformes totales superan significativamente los niveles ambientales nacionales permitidos (Fig. 4), alcanzando una concentración de 1 230 000 NMP/100 mL. Esto contrasta con los estándares ambientales de LMP de 10 000 NMP/100 mL y el ECA de 1 000 NMP/100 mL[12], [13].

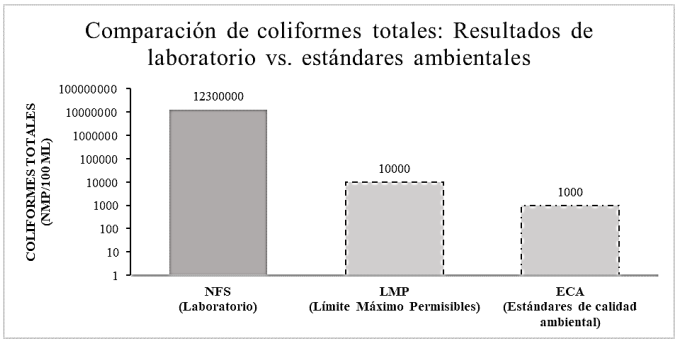

Fig. 5. Comparación de concentraciones de coliformes totales

Los parámetros físicos presentan valores dentro de los límites establecidos por los LMP y ECA. Sin embargo, al contrastar los resultados con los ECA para Categoría 3 (Fig. 5), se observa que los valores obtenidos superan los límites permitidos. Los ECA establecen un máximo de 15 mg/L para DBO_5 y 40 mg/L para DQO, lo que muestra un exceso de 12 mg/L en DBO_5 y 24 mg/L en DQO.

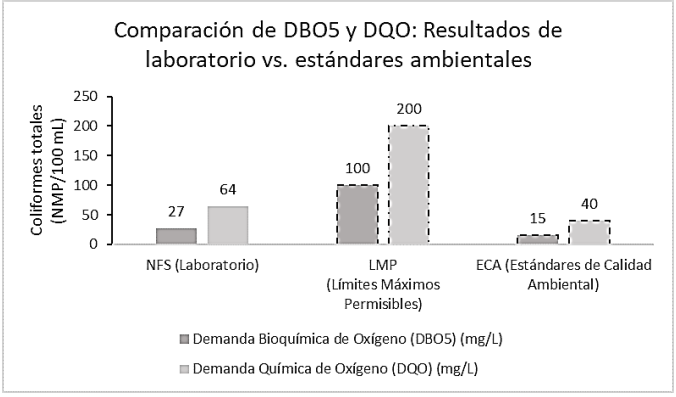

Fig. 6. Comparación de valores DBO_5 y DQO

Los resultados obtenidos sirven como referencia para evaluar las condiciones fisicoquímicas actuales del riachuelo. A partir de este análisis, se identificaron microorganismos adaptados al agua dulce que contribuyan a la mejora de su calidad.

B. Caracterizar microorganismos en cuerpos hídricos aledaños

A partir de allí, se realizaron procedimientos separados para la identificación de bacterias y microalgas autóctonas.

1) *Bacterias Autóctonas*

El análisis de las muestras recolectadas en los cuerpos hídricos permitió la identificación de bacterias autóctonas, confirmándose la presencia de los géneros *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp*. mediante su aislamiento en medios de cultivo selectivos. La presencia de estos microorganismos sugiere su adaptación a las condiciones del ecosistema y su potencial funcional en la biotransformación de contaminantes.

El cultivo en Agar Nutritivo permitió el crecimiento y aislamiento de *Bacillus sp*., mientras que el Agar Cetrimide favoreció el desarrollo selectivo de *Pseudomonas sp.* La caracterización morfológica mediante tinción de Gram confirmó la naturaleza de los microorganismos: *Bacillus sp.* presentó una tinción Gram positiva (color violeta) (Fig. 6), mientras que *Pseudomonas sp*. exhibió una tinción Gram negativa (color rosado).

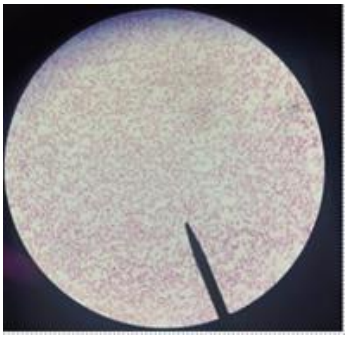

Fig. 7. Bacterias *Bacillus sp.* autóctonas de Lucanas

El análisis estadístico del conteo bacteriano por punto de muestreo utilizando la prueba estadística de Kruskal-Wallis indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los tres cuerpos de aguas analizados: Laguna Qoreccocha, Laguna PadrePaccochan y el Puquio ($p = 0.353$).

Sin embargo, la prueba de Mann-Whitney reveló una tendencia hacia una mayor abundancia de *Bacillus sp*. en la Laguna PadrePaccochan, con una diferencia de medianas de 3 unidades en comparación con la Laguna Qoreccocha. Además, la menor variabilidad observada en los datos de la Laguna PadrePaccochan sugiere condiciones más estables y homogéneas, mientras que en la Laguna Qoreccocha se evidenció una mayor dispersión y fluctuaciones en los niveles bacterianos.

En función de estos resultados, la Laguna PadrePaccochan fue seleccionada como el sitio óptimo para el aislamiento de *Bacillus sp.,* debido a la estabilidad en sus niveles bacterianos y su proximidad a la localidad de Lucanas, lo que facilita su accesibilidad.

2) *Microalgas Autóctonas*

Ahora bien, el análisis microscópico de las 82 muestras recolectadas permitió la identificación de microorganismos en los cuerpos hídricos evaluados. En la Laguna Qoreccocha, de los 18 puntos analizados, 4 muestras mostraron microorganismos visualizables, destacando la presencia de microalgas, mientras que el resto contenía principalmente sedimentos y residuos. En la Laguna PadrePaccochan, de los 22 puntos evaluados, solo 2 muestras presentaron microorganismos detectables.

Por otro lado, en el manantial Puquio, se identificaron microalgas en una de las dos muestras recolectadas, destacando las especies *Spirulina arthrospira* (Fig. 7) y *Chlorella vulgaris* (Fig. 8).

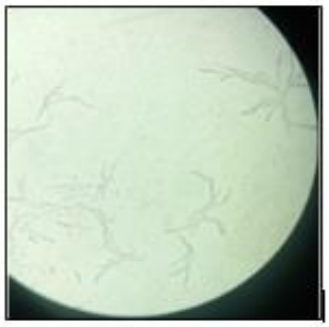

Fig. 8. Microalgas *Spirulina arthrospira* autóctonas del distrito de Lucanas

La *Spirulina arthrospira* mostró su característica estructura filamentosa helicoidal, mientras que *Chlorella vulgaris* presentó células redondas de entre 2 y 10 µm. Esto permitió confirmar su identificación.

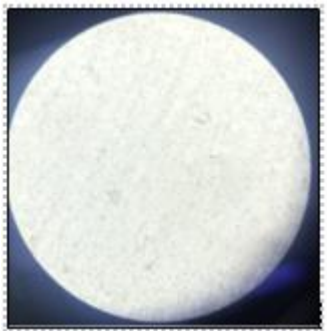

Fig. 9. Microalgas *Chlorella vulgaris* autóctonas del distrito de Lucanas

Se seleccionó *Chlorella vulgaris* para su uso en el sistema de tratamiento de aguas residuales, debido a su mayor capacidad de remoción de nutrientes, además de su eficacia en condiciones de bajas temperaturas.

Tras el aislamiento y producción de las cepas, se llevó a cabo el cultivo de microalgas a mayor escala para cubrir los cuatro sistemas experimentales y sus respectivas repeticiones. Se aplicó un 30% de 1800 mL de agua residual en cada sistema. Además, la densidad celular de *Chlorella vulgaris* se determinó mediante un recuento en la Cámara de Neubauer, obteniéndose un total de 764 células con un tamaño menor a 6 µm, lo que equivale a una concentración de 3,820,000 células/ml.

Este resultado confirma que la concentración de *Chlorella vulgaris* se encuentra dentro del rango óptimo de 1 a 10 millones de células/mL para su aplicación en sistemas de tratamiento de aguas residuales, posicionándola como la microalga ideal para el proyecto.

C. *Porcentaje de reducción de coliformes termotolerantes mediante la aplicación de dosis controladas de consorcios autóctonos Chlorella variabilis y Bacillus sp.*

Se registraron los valores iniciales de coliformes (P1) mediante tres repeticiones a las 24 y 48 horas. En la Tabla 1 se presentan los porcentajes de reducción de coliformes, tanto en condiciones de tratamiento como en ausencia de este.

TABLA II
PORCENTAGEPROMEDIO DE REDUCCIÓN DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES

Prueba	Horas de tratamiento	Reducción ST* (% promedio)	Reducción CT** (% promedio)
P1	24 horas	44.00	67.60
	48 horas	62.80	73.00
P1-R1	24 horas	50.00	66.25
	48 horas	61.67	68.83
P1-R2	24 horas	58.33	65.42
	48 horas	61.25	65.42
P1-R3	24 horas	42.86	60.95
	48 horas	56.67	70.95

ST*: Sin tratamiento
CT**: Con tratamiento

Nota. Elaboración propia en base a los resultados obtenidos en el laboratorio de la Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas.

Los resultados obtenidos muestran la reducción porcentual de coliformes termotolerantes bajo diferentes condiciones de tratamiento. A las 24 horas, el tratamiento logra una reducción promedio del 65.56%, mientras que, sin tratamiento, la reducción es de 48.3%. A las 48 horas, la reducción con tratamiento asciende a un 71.77%, en comparación con un 60.1% en ausencia de tratamiento (Fig. 9).

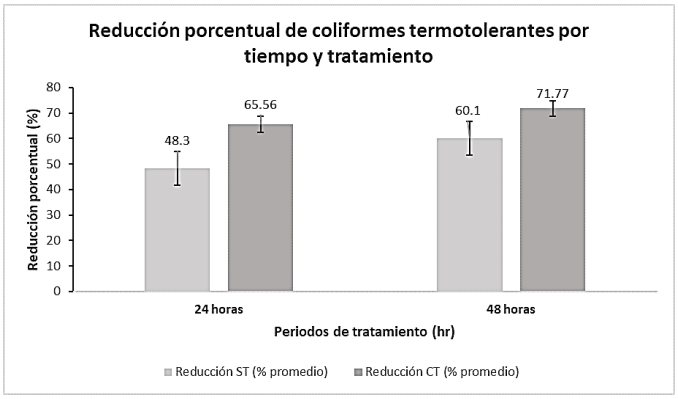

Fig. 10. Reducción porcentual de coliformes termotolerantes

D. *Análisis estadístico*

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores para evaluar el impacto de los tiempos de retención y las condiciones de tratamiento, comparando tratamiento (CT) y sin tratamiento (ST). Para los periodos de tratamiento de 24 y 48 horas, el análisis mostró un valor p de 0.004 ($p < 0.05$), indicando diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. En particular, el tiempo de retención de 48 horas demostró una mayor eficacia, con un porcentaje promedio de reducción del 71.77%, en comparación con el 65.56% registrado a las 24 horas.

Condiciones de tratamiento (CT vs. ST):

El análisis estadístico reveló diferencias significativas en la reducción de coliformes termotolerantes entre las condiciones evaluadas ($p = 0.000$, $p < 0.05$). El tratamiento (CT) mostró una mayor eficacia, con un porcentaje promedio de reducción del 67.3%, en comparación con el 54.7% registrado en la condición sin tratamiento (ST). Además, el diagrama de interacción evidenció que el efecto del tiempo de retención depende de la condición de tratamiento, sugiriendo una relación significativa entre ambos factores.

El análisis post hoc de Tukey mostró que, a las 48 horas, la reducción promedio de coliformes en CT osciló entre el 70% y el 75%, con menor variabilidad en los datos, lo que indica una mayor estabilidad y eficacia del tratamiento en tiempos prolongados. En contraste, en ST se observó una menor reducción promedio, con una mayor dispersión de los datos, particularmente a las 24 horas. Sumado a ello, la condición ST presentó una variabilidad significativamente mayor a lo largo del experimento, lo que sugiere una respuesta menos predecible

y una menor estabilidad en la reducción de coliformes, especialmente en tiempos de retención más cortos.

IV. DISCUSIÓN

La concentración de coliformes termotolerantes y totales en el riachuelo Cuculihuaijo, que alcanza los 1 230 000 NMP/100 mL, evidencia una situación crítica de contaminación fecal, ya que supera ampliamente tanto los Límites Máximos Permisibles (10 000 NMP/100 mL) como los Estándares de Calidad Ambiental para categoría 3 (1 000 NMP/100 mL), lo cual refleja no solo la ausencia de tratamiento de aguas residuales, sino también las deficiencias estructurales del sistema de saneamiento local; esta situación ha sido reportada previamente en contextos similares donde se ha demostrado que la falta de infraestructura sanitaria adecuada se asocia directamente con una elevada carga microbiana en cuerpos de agua urbanos [34], [35]. Si bien los parámetros fisicoquímicos como la DBO_5 (27 mg/L) y la DQO (64 mg/L) cumplen con los límites máximos permisibles, estos aún exceden los estándares para usos agrícolas y pecuarios, lo que implica una carga orgánica residual capaz de fomentar procesos de eutrofización; adicionalmente, aunque los niveles de aceites y grasas (< 5 mg/L), sólidos suspendidos (27 mg/L) y pH (7.29) se mantienen dentro de los rangos normativos, es importante considerar el efecto acumulativo de los sólidos suspendidos sobre la dinámica de los ecosistemas acuáticos, tal como advierten en otros investigadores[34] .

La concentración de coliformes termotolerantes y totales en el riachuelo Cuculihuaijo, que alcanza los 1 230 000 NMP/100 mL, evidencia una situación crítica de contaminación fecal, ya que supera ampliamente tanto los Límites Máximos Permisibles (10 000 NMP/100 mL) como los Estándares de Calidad Ambiental para categoría 3 (1 000 NMP/100 mL), lo cual refleja no solo la ausencia de tratamiento de aguas residuales, sino también las deficiencias estructurales del sistema de saneamiento local; esta situación ha sido reportada previamente en contextos similares donde se ha demostrado que la falta de infraestructura sanitaria adecuada se asocia directamente con una elevada carga microbiana en cuerpos de agua urbanos [35], [36]. Si bien los parámetros fisicoquímicos como la DBO_5 (27 mg/L) y la DQO (64 mg/L) cumplen con los límites máximos permisibles, estos aún exceden los estándares para usos agrícolas y pecuarios, lo que implica una carga orgánica residual capaz de fomentar procesos de eutrofización; adicionalmente, aunque los niveles de aceites y grasas (< 5 mg/L), sólidos suspendidos (27 mg/L) y pH (7.29) se mantienen dentro de los rangos normativos, es importante considerar el efecto acumulativo de los sólidos suspendidos sobre la dinámica de los ecosistemas acuáticos, tal como advierten en otros investigadores[34] .

A nivel microbiológico, se procedió a la identificación de microorganismos autóctonos en la laguna PadrePaccochan, donde predominaron cepas de *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.*; aunque las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney no mostraron diferencias significativas entre las distintas lagunas analizadas ($p > 0.05$), la abundancia relativa de *Bacillus sp*. resulta relevante por su reconocida capacidad de adaptación y eficiencia en la descomposición de materia orgánica [37]. En paralelo, el análisis de microalgas reveló una notable superioridad de *Chlorella vulgaris* (3 820 000 células/mL) frente a *Spirulina arthrospira* (37 500 células/mL), lo que justificó su elección para conformar un consorcio biológico junto con *Bacillus sp.*, debido a su reconocida capacidad para contribuir en procesos de remoción de contaminantes y su tolerancia a condiciones ambientales variables.

En este contexto, se evaluó un sistema experimental basado en dicho consorcio biológico, el cual logró eficiencias de remoción del 65.56% a las 24 horas y del 71.77% a las 48 horas de tiempo de retención hidráulica (TRH), incluso en condiciones de laboratorio sin control artificial de temperatura ni iluminación; estos resultados son comparables con estudios previos que, utilizando *Scenedesmus almeriensis* en sistemas abiertos, reportaron eficiencias cercanas al 70% aunque con mayor variabilidad debido a la menor estabilidad ambiental [21]. A su vez, el análisis estadístico de interacción demostró que el TRH tiene un efecto significativo únicamente en presencia del consorcio biológico, como se refleja en la condición CT (consorcio tratado), donde se observó una reducción promedio del 70% con baja variabilidad (65%–75%), a diferencia de la condición ST (sin tratamiento), que presentó una eficiencia menor y más dispersa (45%–55%); esta falta de paralelismo entre condiciones confirma que el TRH influye de manera diferenciada dependiendo de la presencia del consorcio, lo que pone en evidencia la importancia de la sinergia microbiana en la eficacia del tratamiento [38], [39]. Estos hallazgos coinciden con investigaciones previas que reportan reducciones superiores al 90% en DBO_5 y DQO mediante consorcios similares, reforzando el uso de microorganismos autóctonos como una estrategia eficiente, sostenible y de bajo costo para el tratamiento de aguas residuales, especialmente en zonas como Lucanas [40]); además, a diferencia de estudios centrados únicamente en la eliminación de *Escherichia coli* [41], esta investigación abordó coliformes termotolerantes totales, lo cual evidencia una mayor robustez del sistema ante comunidades microbianas más complejas.

Con base en estos resultados, se plantea el escalamiento del sistema mediante un reactor modular de 2 000 m^3, con un caudal de 1 000 m^3/día y un TRH de 48 horas, capaz de alcanzar una remoción cercana al 70% de coliformes termotolerantes, cumpliendo con los estándares nacionales sin requerir infraestructura energética adicional; para ello, se propone el diseño de un biorreactor tubular cerrado que aproveche la radiación solar y mantenga un microclima estable en altitudes entre 2 300 y 3 500 m s.n.m., lo que garantiza su operatividad en regiones altoandinas [42]. Si bien otros estudios recomiendan sistemas HRAP (High Rate Algal Pond) por su bajo requerimiento energético, estos requieren superficies extensas y presentan mayor sensibilidad a condiciones ambientales variables [43], mientras que el sistema evaluado en esta investigación optimiza el uso del volumen con un mayor gasto operativo debido a la necesidad de circulación interna [44]. Aunque existen reportes de eficiencias de remoción del 92% en

cinco días y hasta del 99% en diez días [39], el presente estudio ofrece una ventaja competitiva al lograr niveles elevados de remoción en solo 48 horas, lo que incrementa su viabilidad técnica y económica; sin embargo, para asegurar su sostenibilidad a largo plazo y ampliar su alcance, se recomienda incorporar una etapa de coagulación-sedimentación antes y después del tratamiento biológico, desarrollando así esquemas híbridos más robustos [45], además de realizar bioensayos que consideren contaminantes emergentes y evalúen posibles subproductos tóxicos derivados de tratamientos terciarios [44].

V. CONCLUSIÓN

Los resultados confirman la eficacia del consorcio *Chlorella vulgaris* y *Bacillus sp*. en la remediación de efluentes con alta carga microbiana, logrando reducciones del 65.56% en 24 horas y 71.77% en 48 horas para coliformes termotolerantes. Su acción sinérgica permite una degradación eficiente de materia orgánica y patógenos, representando una alternativa viable a métodos convencionales.

El análisis fisicoquímico mostró que, aunque DBO5 y DQO cumplen con los límites normativos, aún superan estándares para riego y consumo animal, sugiriendo la necesidad de tratamientos más eficientes. La predominancia de *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp*. destaca su potencial biorremediador, mientras que la mayor concentración de *Chlorella vulgaris* frente a *Spirulina arthrospira* resalta su idoneidad para remover nutrientes y metales pesados.

Estos hallazgos coinciden con estudios previos que reportan eficiencias superiores al 90% en tiempos de retención prolongados, pero este estudio demuestra reducciones comparables en plazos más cortos, optimizando la operatividad del sistema. La interacción entre tiempo de retención y consorcio biológico fue estadísticamente significativa, mostrando menor variabilidad en sistemas con microorganismos.

En conclusión, los sistemas combinados de microalgas y bacterias ofrecen una solución sostenible y eficiente para la biorremediación de aguas residuales. Se recomienda investigar la optimización de la relación bacteria-microalga, evaluar el impacto de variables ambientales y validar el sistema a escalas piloto e industriales para su implementación en contextos reales.

REFERENCIAS

[1] UNESCO, *Alianzas y cooperación por el aguaInforme Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2023*, vol. 7. Paris: Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura, 2023.

[2] "El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2023," *El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2023*, Dec. 2023, doi: 10.4060/CC7724ES.

[3] A. Rashid, S. A. Mirza, C. Keating, S. Ali, and L. C. Campos, "Indigenous Bacillus paramycoides spp. and Alcaligenes faecalis: sustainable solution for bioremediation of hospital wastewater," *Environmental Technology (United Kingdom)*, vol. 43, no. 12, 2022, doi: 10.1080/09593330.2020.1858180.

[4] S. Mishra, R. Kumar, and M. Kumar, "Use of treated sewage or wastewater as an irrigation water for agricultural purposes-Environmental, health, and economic impacts," *Total Environment Research Themes*, vol. 6, p. 100051, Jun. 2023, doi: 10.1016/J.TOTERT.2023.100051.

[5] "Saneamiento." Accessed: Jan. 27, 2025. [Online]. Available: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sanitation

[6] A. Kumar and M. Khwairakpam, "A comparative study with vermifilter and geofilter for domestic wastewater treatment and its Phyto-toxicity efficacy," *Journal of Water Process Engineering*, vol. 60, p. 105245, Apr. 2024, doi: 10.1016/J.JWPE.2024.105245.

[7] M. Preisner, E. Neverova-Dziopak, and Z. Kowalewski, "Mitigation of eutrophication caused by wastewater discharge: A simulation-based approach," *Ambio*, vol. 50, no. 2, pp. 413–424, Feb. 2021, doi: 10.1007/S13280-020-01346-4/FIGURES/5.

[8] M. A. Alnaimy, S. A. Shahin, Z. Vranayova, M. Zelenakova, and E. M. W. Abdel-Hamed, "Long-Term Impact of Wastewater Irrigation on Soil Pollution and Degradation: A Case Study from Egypt," *Water 2021, Vol. 13, Page 2245*, vol. 13, no. 16, p. 2245, Aug. 2021, doi: 10.3390/W13162245.

[9] "Sick water? the central role of wastewater management in sustainable development a rapid response assessment", Accessed: Jan. 27, 2025. [Online]. Available: www.grida.no

[10] S. S. Mendoza-Retana *et al.*, "Uso potencial de las aguas residuales en la agricultura," *Rev Mex De Cienc Agric*, vol. 12, no. 1, pp. 115–126, Jan. 2021, doi: 10.29312/REMEXCA.V12I1.2789.

[11] M. Félix-López, M. Ormaza-Murillo, C. Álvarez-Santana, and C. Banchon, "Exploring the Impact of Reclaimed Water on Latin America's Development," *Journal of Ecological Engineering*, vol. 24, no. 10, pp. 157–173, 2023, doi: 10.12911/22998993/169962.

[12] Ministerio del Ambiente (MINAM), "Decreto Supremo N° 003-2010-MINAM | Ministerio del Ambiente." Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://www.minam.gob.pe/disposiciones/decreto-supremo-n-003-2010-minam/

[13] Ministerio del Ambiente (MINAM), "Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM.- | Ministerio del Ambiente." Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://www.minam.gob.pe/disposiciones/decreto-supremo-n-004-2017-minam/

[14] "Diagnósticos de las PTAR en el ámbito de las empresas prestadoras - Informes y publicaciones - Superintendencia Nacional de Servicios de Saneamiento - Plataforma del Estado Peruano." Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://www.gob.pe/institucion/sunass/informes-publicaciones/3087490-diagnosticos-de-las-ptar-en-el-ambito-de-las-empresas-prestadoras

[15] V. Carrillo, R. Castillo, A. Magrí, E. Holzapfel, and G. Vidal, "Phosphorus recovery from domestic wastewater: A review of the institutional framework," *J Environ Manage*, vol. 351, p. 119812, Feb. 2024, doi: 10.1016/J.JENVMAN.2023.119812.

[16] T. Koottatep, A. Taweesan, T. Kanabkaew, and C. Polprasert, "Inconvenient truth: unsafely managed fecal sludge after achieving MDG for decades in Thailand," *Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*, vol. 11, no. 6, pp. 1062–1070, Nov. 2021, doi: 10.2166/WASHDEV.2021.118.

[17] D. Martínez-Pachón *et al.*, "Treatment of wastewater effluents from Bogotá – Colombia by the photo-electro-Fenton process: Elimination of bacteria and pharmaceutical," *Science of The Total Environment*, vol. 772, p. 144890, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2020.144890.

[18] A. Sánchez-Zurano *et al.*, "Wastewater treatment using Scenedesmus almeriensis: effect of operational conditions on the composition of the microalgae-bacteria consortia," *J Appl Phycol*, vol. 33, no. 6, 2021, doi: 10.1007/s10811-021-02600-2.

[19] A. Nishat *et al.*, "Wastewater treatment: A short assessment on available techniques," Aug. 01, 2023, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.aej.2023.06.054.

[20] T. T. A. Le and T. Nguyen, "Potential of hospital wastewater treatment using locally isolated Chlorella sp. LH2 from cocoon

wastewater," *Bioresour Bioprocess*, vol. 11, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1186/s40643-024-00748-6.

[21] G. Ruas, M. L. Serejo, S. L. Farias, P. Scarcelli, and M. Boncz, "Removal of pathogens from domestic wastewater by microalgal-bacterial systems under different cultivation conditions," *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 19, no. 10, 2022, doi: 10.1007/s13762-021-03820-2.

[22] "Protocolo nacional para el monitoreo de la calidad de los recursos hidricos superficiales | SINIA." Accessed: Jan. 28, 2025. [Online]. Available: https://sinia.minam.gob.pe/documentos/protocolo-nacional-monitoreo-calidad-recursos-hidricos-superficiales

[23] Instituto Nacional de Estad´stica e Informática (INEI), *Directorio Nacional de Centros Poblados Censos Nacionales 2017: XII de Población, VII de Vivienda y III de Comunidades Indígenas*. 2019. Accessed: Jan. 31, 2025. [Online]. Available: https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1541/tomo2.pdf

[24] M. T. Madigan, J. M. Martinko, K. S. Bender, D. H. Buckley, and D. A. Stahl, "Brock Biología de los Microorganismos 14ª Edición," 2015.

[25] L. Cecil, T. García-Blásquez, H. E. Hernández, A. Marco, A. Aguirre, and O. Resumen, "Manual para obtención de cepas de microalgas," *Instituto del Mar del Perú - IMARPE*, 2018, Accessed: Jan. 31, 2025. [Online]. Available: https://repositorio.imarpe.gob.pe/handle/20.500.12958/3285

[26] M. Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal CAPÍTULO and P. Y. Mantenimiento De Cepas De Microalgas Christine J Band Schmidt, "Aislamiento, purificación y mantenimiento de cepas de microalgas."

[27] L. L. Ndlela, P. Schroeder, B. Genthe, and C. Cruzeiro, "Removal of Antibiotics Using an Algae-Algae Consortium (Chlorella protothecoides and Chlorella vulgaris)," *Toxics*, vol. 11, no. 7, Jul. 2023, doi: 10.3390/toxics11070588.

[28] M. A. Sinetova, E. V. Kupriyanova, and D. A. Los, "Spirulina/Arthrospira/Limnospira—Three Names of the Single Organism," Sep. 01, 2024, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*. doi: 10.3390/foods13172762.

[29] W. Kong *et al.*, "Cultivation of microalgae–bacteria consortium by waste gas–waste water to achieve CO2 fixation, wastewater purification and bioproducts production," Dec. 01, 2024, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s13068-023-02409-w.

[30] S. G. Sharma, P. Singla, and G. S. Kocher, "Development of Microalgae-Bacteria Consortium for the Treatment of Domestic Waste Water," *Water Air Soil Pollut*, vol. 235, no. 6, p. 347, Jun. 2024, doi: 10.1007/s11270-024-07139-9.

[31] T. J. Jui *et al.*, "Optimal growth conditions to enhance Chlorella vulgaris biomass production in indoor phyto tank and quality assessment of feed and culture stock," *Heliyon*, vol. 10, no. 11, Jun. 2024, doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e31900.

[32] N. Moondra, N. D. Jariwala, and R. A. Christian, "Sustainable treatment of domestic wastewater through microalgae," *Int J Phytoremediation*, vol. 22, no. 14, pp. 1480–1486, Dec. 2020, doi: 10.1080/15226514.2020.1782829.

[33] Universidad de Ciencias Aplicadas. Guía:"Ingeniería ambiental biotecnología ambiental guia de laboratorio guia de laboratorio."

[34] Y. Pérez, E. Vargas, D. García-Cortés, W. Hernández, H. Checo, and U. Jáuregui-Haza, "Efficiency and effectiveness of systems for the treatment of domestic wastewater based on subsurface flow constructed wetlands in Jarabacoa, Dominican Republic," *Water Science and Engineering*, vol. 17, no. 2, 2024, doi: 10.1016/j.wse.2023.08.004.

[35] L. Perelomov *et al.*, "Metal-Tolerant Bacteria of Wastewater Treatment Plant in a Large City," *Sustainability 2022, Vol. 14, Page 11335*, vol. 14, no. 18, p. 11335, Sep. 2022, doi: 10.3390/SU141811335.

[36] P. K. Akao *et al.*, "Coupled microalgal–bacterial biofilm for enhanced wastewater treatment without energy investment," *Journal of Water Process Engineering*, vol. 41, p. 102029, Jun. 2021, doi: 10.1016/J.JWPE.2021.102029.

[37] Z. Chen, Y. Zhang, Z. Li, and K. Yao, "High-efficiency metal-free electro-Fenton system on oxygenated graphene-based floating electrodes," *Sep Purif Technol*, vol. 346, Oct. 2024, doi: 10.1016/j.seppur.2024.127332.

[38] B. Ji, M. Zhang, J. Gu, Y. Ma, and Y. Liu, "A self-sustaining synergetic microalgal-bacterial granular sludge process towards energy-efficient and environmentally sustainable municipal wastewater treatment," *Water Res*, vol. 179, 2020, doi: 10.1016/j.watres.2020.115884.

[39] S. G. Sharma, P. Singla, and G. S. Kocher, "Development of Microalgae-Bacteria Consortium for the Treatment of Domestic Waste Water," *Water Air Soil Pollut*, vol. 235, no. 6, pp. 1–18, Jun. 2024, doi: 10.1007/S11270-024-07139-9/METRICS.

[40] L. L. Ndlela, P. Schroeder, B. Genthe, and C. Cruzeiro, "Removal of Antibiotics Using an Algae-Algae Consortium (Chlorella protothecoides and Chlorella vulgaris)," *Toxics 2023, Vol. 11, Page 588*, vol. 11, no. 7, p. 588, Jul. 2023, doi: 10.3390/TOXICS11070588.

[41] M. Mantovani, F. Marazzi, R. Fornaroli, M. Bellucci, E. Ficara, and V. Mezzanotte, "Outdoor pilot-scale raceway as a microalgae-bacteria sidestream treatment in a WWTP," *Science of the Total Environment*, vol. 710, 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.135583.

[42] G. Penloglou, A. Pavlou, and C. Kiparissides, "Recent Advancements in Photo-Bioreactors for Microalgae Cultivation: A Brief Overview," *Processes 2024, Vol. 12, Page 1104*, vol. 12, no. 6, p. 1104, May 2024, doi: 10.3390/PR12061104.

[43] E. G. de Morais, I. C. F. Sampaio, E. Gonzalez-Flo, I. Ferrer, E. Uggetti, and J. García, "Microalgae harvesting for wastewater treatment and resources recovery: A review," *N Biotechnol*, vol. 78, pp. 84–94, Dec. 2023, doi: 10.1016/J.NBT.2023.10.002.

[44] D. Nagarajan, D. J. Lee, S. Varjani, S. S. Lam, S. I. Allakhverdiev, and J. S. Chang, "Microalgae-based wastewater treatment – Microalgae-bacteria consortia, multi-omics approaches and algal stress response," *Science of The Total Environment*, vol. 845, p. 157110, Nov. 2022, doi: 10.1016/J.SCITOTENV.2022.157110.

[45] A. Abdo, "Treatment of mixed domestic–industrial wastewater by combined coagulation–sedimentation, biological processes and advanced oxidation," *Desalination Water Treat*, vol. 282, pp. 86–95, Jan. 2023, doi: 10.5004/DWT.2023.29173.

[46] E. Liwarska-Bizukojc, "Evaluation of Ecotoxicity of Wastewater from the Full-Scale Treatment Plants," *Water (Switzerland)*, vol. 14, no. 20, p. 3345, Oct. 2022, doi: 10.3390/W14203345/S1.