



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS  
CICIMAR**

**EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE MICROALGAS Y BACTERIAS PARA LA  
ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA**

**JUAN PABLO HERNÁNDEZ SÁNCHEZ**

**La Paz B.C.S. AGOSTO DEL 2004**



CGPI-14

**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**  
*ACTA DE REVISION DE TESIS*

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., siendo las \_\_\_\_\_ horas del día \_\_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del \_\_\_\_\_ se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CICIMAR para examinar la tesis de grado titulada:

**"EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE MICROALGAS Y BACTERIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS"**

Presentada por el alumno:

**HERNÁNDEZ**  
Apellido paterno

**SÁNCHEZ**  
materno

**JUAN PABLO**  
nombre(s)

Con registro: 

A	0	3	0	4	0	7
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante al grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISION REVISORA**

Director de tesis  
PRIMER VOCAL

MC. LUZ ESTELA GONZÁLEZ DE BASHAN

PRESIDENTE

DR. YOAV BASHAN

SECRETARIO

DR. BENJAMIN ANGUAS VELEZ

SEGUNDO VOCAL

DR. DAVID ALVARO SIQUEIROS BELTRONES  
Co-Director

TERCER VOCAL

MC. DORA ESTHER HERNANDEZ CEBALLOS

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. RAFAEL CERVANTES DUARTE



**I. P. N.**  
**CICIMAR**  
Directorio



**INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**  
**COORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de La Paz, B.C.S., el día 27 del mes Septiembre del año 2004, el (la) que suscribe JUAN PABLO HERNANDEZ SÁNCHEZ alumno(a) del Programa de MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MANEJO DE RECURSOS MARINOS con número de registro A030407 adscrito al CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE CIENCIAS MARINAS manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de tesis, bajo la dirección de: MC. LUZ ESTELA GONZÁLEZ GONZÁLEZ y cede los derechos del trabajo titulado: **"EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE MICROALGAS Y BACTERIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS"** al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: juanhdez04@cibnor.mx

Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**JUAN PABLO HERNÁNDEZ SÁNCHEZ**

*nombre y firma*

## RECONOCIMIENTOS ACADÉMICOS

A la Ing. Abigail Solano de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de La Paz, B.C.S.  
México

A la Ing. Juanita Solano de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de La Paz, B.C.S.  
México

Al CICIMAR-IPN por el apoyo económico en el pago de la colegiatura.

Al proyecto “Diatomeas Bentónicas en la dieta de abulones (*Haliotis* spp.) en la península de B.C.” CGPI 200030211, Por el apoyo económico.

Al Grupo de Microbiología Ambiental del CIB

Al Dr. David A. Siqueiros Beltrones por la Ciencia, su Método y su Filosofía.

A la M. en C. Luz González de Bashan por sus enseñanzas en el ámbito científico.

Al Dr. Yoav Bashan por sus conocimientos científicos

A la M. en C. Dora Esther Hernández Cevallos y al Dr. Benjamín H. Anguaz Vélez por la revisión crítica del escrito

## **AGRADECIMIENTOS.**

Le doy gracias a Dios por permitirme subir un escalón más de mi vida al lado de mis padres y por darme la oportunidad de compartir con mis hermanos y cuñados los triunfos y las derrotas.

A mis sobrinos, Sergio, Andrés, Ana Maria, Tomas, Lucia y Manuela para ellos todo mi amor.

A mi tía Elvia por su apoyo espiritual siempre y por su apoyo económico

A mis tíos y primos Hernández por que siempre están cuando yo voy.

A mis primos Sánchez por brindarme su cariño desde lejos.

A Adriana Rojas por todo su apoyo durante buena parte de mi maestría

A Fercho, Clara y familia, por que ellos me enseñaron que el esfuerzo lo hace todo.

A mis compañeros de maestría del CICIMAR.

A mis dos grandes amigos Uri y Oscar, para ellos simplemente gracias totales.

A mi profe, y amiga Luz Estela González de Bashan, la persona más importante en mi tesis, por estar a mi lado y por apoyarme en los momentos más difíciles, muchas gracias por todo

A sumerce

## DEDICATORIA.

Este trabajo esta dedicado a Doña Ana y Don Arge padres abnegados  
y a mis hermanos Francisco y Ximena, los quiero mucho.

A la memoria de Jorge Chávez y Ximena Peñaloza

### PARA MI HIJO JUAN PABLO

Cómo cortarte las alas,  
!Hijo mío!  
Si quieres como el cóndor,  
volar muy alto,  
remontar los Andes,  
y sentirte,  
dueño del aire,  
del mar,  
del desierto,  
de la tierra y de la vida.

El origen del ser  
ya te apasiona.  
Dices conocer  
la creación del mundo.  
y no la has aprendido,  
como lo enseña  
la ciencia religiosa,  
sino con la conciencia  
del sabio descreído.

El Big Bang  
del universo,  
es tu principio.  
Y piensas como Darwin,  
que la transformación  
progresiva de la especie,  
es el verdadero origen  
de la vida.

El estudio de  
células y genes,  
te hunde  
en una especie  
de catarsis.  
Y es tan difícil  
llegar hasta tu mundo,  
el mundo material  
que has construido.

Hay un sitio  
al cual yo deseo  
que retornes.  
Al espacio nebuloso  
del espíritu.  
Que pienses,  
que un Ser  
Eterno y Poderoso,  
en un arranque  
de amor  
nos dió la vida.  
Que somos  
lo que somos,

porque ese Espíritu Grandioso,  
nos otorgó  
la inteligencia,  
a su medida.

Que si de una célula  
venimos,  
de dónde esa célula ha salido?  
No fue por accidente  
pasajero,  
que los genes y células  
se unieron,  
y del núcleo  
hecho amor  
surgió la vida.

Y antes de la célula,  
qué había?  
No te ha hecho vacilar  
en tus creencias,  
el que una teoría  
es solo una hipótesis  
y cuantas veces  
hijo mío,  
una teoría ha hecho  
que otra teoría  
se derrumbe?

Siempre recuerda  
cuando estudies algo  
que todo no es  
materia.  
Que algo poderoso  
e infinito,  
señala nuestro  
rumbo,  
ordena el universo,  
y no olvides  
!hijo mío!  
que en la tierra  
solo eres,  
gaviota pasajera  
de un navío.

Ana Cilia Sánchez de Hernández  
Septiembre de 1992

# Índice

Glosario	
Resumen	
Abstract	
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
3. Justificación	7
4. Objetivos	8
5. Método	8
5.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento	8
5.1.1. <i>Chlorella vulgaris</i> (UTEX 2714) y <i>C. sorokiniana</i> (UTEX 1602)	8
5.2. <i>Azospirillum brasilense</i>	9
5.3. Inmovilización de <i>C. vulgaris</i> y <i>C. sorokiniana</i> en esferas de alginato	9
5.4. Co-inmovilización de <i>C. vulgaris</i> y <i>C. sorokiniana</i> en esferas de alginato con <i>A. brasilense</i>	10
6. Condiciones experimentales	10
6.1. Toma de muestras del agua residual doméstica (ARD)	10
6.2. Pruebas de eliminación de nutrientes en ARD	11
6.2.1. Determinación del crecimiento de organismos	11
6.2.2. Diseño experimental y estadístico	12
6.3. Pruebas de eliminación de fósforo en agua residual sintética utilizando microalgas en ayuno	12
6.3.1. Eliminación de fósforo con microalgas en ayuno	13
6.3.2. Diseño experimental y estadístico	14
7. Resultados	14

<b>7.1. Pruebas en agua residual doméstica (ARD)</b>	<b>14</b>
<b>7.1.1. Crecimiento poblacional</b>	<b>14</b>
<b>7.1.2. Eliminación de nutrientes</b>	<b>15</b>
<b>7.2. Efectos del ARD en las esferas</b>	<b>16</b>
<b>7.3. Pruebas con microalgas puestas en ayuno</b>	<b>17</b>
<b>7.3.1. Microalgas inmovilizadas y co-inmovilizadas puestas en ayuno e inoculadas en el ARS</b>	<b>17</b>
<b>7.3.1.1. Crecimiento poblacional</b>	<b>17</b>
<b>7.3.1.2. Eliminación de fósforo</b>	<b>18</b>
<b>7.3.2. <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada y co-inmovilizada inoculada en el ARS y luego puesta en ayuno e inoculada nuevamente en la misma ARS</b>	<b>19</b>
<b>7.3.2.1. Crecimiento poblacional</b>	<b>19</b>
<b>7.3.2.2. Eliminación de fósforo</b>	<b>19</b>
<b>7.4. Eliminación de fósforo con <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada y co-inmovilizada inoculada en el ARS, luego puesta en ayuno e inoculada nueva ARS</b>	<b>20</b>
<b>7.5. Eliminación de fósforo en secuencia con dos lotes de <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada y co-inmovilizada puestas en ayuno e inoculada en la misma ARS</b>	<b>20</b>
<b>8. Discusión</b>	<b>31</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>36</b>
<b>10. Recomendaciones</b>	<b>38</b>
<b>11. Literatura citada</b>	<b>38</b>



## Glosario

**Agar:** Extracto polisacárido desecado de las algas rojas del grupo de las *Rhodophyceae*, usado en microbiología como solidificante de los medios. (Pelczar *et al.*, 1982)

**Aguas negras:** Desechos líquidos y sólidos (desperdicios domésticos e industriales) vertidos en las alcantarillas. (Pelczar *et al.*, 1982)

**Aguas residuales:** Son aguas usadas, también denominadas aguas negras (Garza-Almanza *et al.*, 1999).

**Alginato:** Polímero exocélular lineal binario compuesto de ácido manurónico y ácido gulurónico que sirve de material de ensamble de las algas pardas (Cassidy *et al.*, 1996).

**Ayuno:** acción de ayunar. En este trabajo se uso para definir la deficiencia de nutrientes (Diccionario de la Lengua Española, 2001)

**Ayunar:** abstenerse de comer o beber (Diccionario de la Lengua Española, 2001).

**Biomasa:** masa de materia viva que se encuentra en un medio (Pelczar *et al.*, 1982)

**Biorremediación:** El uso de microorganismos o procesos microbiológicos para degradar los contaminantes ambientales (Baker y Herson, 1994)

**Biotecnología ambiental:** Aplicación de las técnicas biológicas para resolver o prevenir problemas de contaminación ambiental. (Vargas, 1999)

**Carragenina:** Polímero de cadenas alternadas de  $\beta$ - galactosa y  $\alpha$ -galactosa producido por las algas rojas (Cassidy *et al.*, 1996)

**Colonia:** Desarrollo microscópicamente visible de microorganismos en un medio de cultivo sólido (Pelczar *et al.*, 1982)

**Demanda Bioquímica de Oxígeno:** se define como la masa de oxígeno que es consumida por microorganismos en el transcurso de n días, para descomponer por oxidación las sustancias orgánicas presentes en 1 l de agua a 20 °C. (Diccionario de biología, 2000).

**Esterilizar:** Destruir los microbios que hay o puede haber en un medio (Diccionario de la Lengua Española, 2001).

**Eutroficación:** Proceso de envejecimiento en los lagos durante el cual el agua se sobre enriquece de sustancias nutritivas disueltas, lo que da por resultado un gran desarrollo de las algas y otras plantas microscópicas que hacen descender la cantidad de oxígeno disuelto (Pelczar *et al.*, 1982)

**Floculantes:** Compuestos o sustancias que aglomeran partículas suspendidas para formar otras de mayor tamaño y que puedan ser separadas por gravedad o filtración (Cassidy *et al.*, 1996).

**Incubación** Mantenimiento de cultivos de microorganismos en condiciones favorables de temperatura para su desarrollo. (Pelczar *et al.*, 1982)

**Inmovilización** Describe las diferentes formas de atrapar o encapsular células en diferentes matrices (Cassidy *et al.*, 1996).

**Inoculación:** Introducción artificial de microorganismos o sustancias en el cuerpo o en un medio de cultivo (Pelczar *et al.*, 1982).

**Irradiancia:** energía radiante incidente sobre una superficie unitaria desde todas las direcciones (Percy, 1991),

**Metabolismo:** Cambios químicos totales por los cuales se mantienen las actividades nutritivas y funcionales de un organismo (Pelczar *et al.*, 1982).

**Microorganismo:** forma de vida de dimensiones microscópicas (Pelczar *et al.*, 1982).

**Nitratos:** Compuesto nitrogenado y oxidado que utilizan los microorganismos, incorporándolo a su metabolismo (Baker y Herson, 1994).

**Nutrientes:** Sustancias que toman los microorganismos del ambiente y lo usan en reacciones metabólicas: son compuestos como el nitrógeno (típicamente en forma de amonio o nitrato) y el fósforo (en forma de ortofosfatos) (Baker y Herson, 1994).

**Ortofosfatos:** Forma disponible del fósforo en el ambiente (Baker y Herson, 1994).

**Polímeros:** Compuesto químico de elevado peso molecular formado por la transformación de moléculas mediante enlaces (Diccionario de la Lengua Española, 2001).

**Sólidos suspendidos:** Partículas no solubles que no son lo suficientemente pesadas para sedimentarse en el cuerpo de agua en que están presentes (Baker y Herson, 1994).

**Unidades formadoras de colonias (UFC):** Es la unidad celular viable capaz de dividirse y formar una colonia (Atlas 1990).

## Lista de tablas

<b>Tabla 1</b> Caracterización química del agua residual de la planta de tratamiento de La Paz B.C.S. México	11
<b>Tabla 2</b> Pruebas de ayuno con microalgas	13
<b>Tabla 3</b> Diseño experimental con microalgas en ayuno	14

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd en agua residual doméstica.	21
<b>Figura 2.</b> Concentración final de amonio del Agua Residual Doméstica con <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd. y con <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd.	22
<b>Figura 3.</b> Concentración final de nitratos del agua residual doméstica con <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd. y con <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd.	23
<b>Figura 4.</b> Concentración final de fósforo del agua residual doméstica con <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd. y con <i>C. sorokiniana</i> inmovilizada sola y co-inmovilizada con <i>A. brasilense</i> Cd.	24

**Figura 5.** Crecimiento de *C. vulgaris* inmovilizada sola, crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola, crecimiento de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y crecimiento de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. 25

**Figura 6.** Concentración final de fósforo del agua residual sintética con *C. vulgaris* inmovilizada sola con tres días de ayuno, *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd, *C. sorokiniana* inmovilizada con y *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd con tres días de ayuno. 26

**Figura 7.** Crecimiento de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y *C. sorokiniana* inmovilizada sola. sin ayuno y dejando la misma agua residual y poniendo las mismas esferas después de tres días de ayuno. 27

**Figura 8.** Concentración final de fósforo con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y *C. sorokiniana* inmovilizada sola sin ayuno y dejando la misma agua residual y poniendo las mismas esferas después de tres días de ayuno. 28

**Figura 9.** Concentración final de fósforo con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y *C. sorokiniana* inmovilizada sola. sin ayuno y cambiando el agua residual y poniendo las mismas esferas después de tres días de ayuno. 29

**Figura 10.** Concentración final de fósforo del agua residual doméstica con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd con tres días de ayuno y *C. sorokiniana* inmovilizada sola con tres días de ayuno. Dejando la misma agua residual y cambiando las esferas a las 48 horas. 30

# EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE MICROALGAS Y BACTERIAS PARA LA ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES DE LAS AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS

## RESUMEN

Las microalgas han sido ampliamente estudiadas y utilizadas para la eliminación de nutrientes en el tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, la cosecha de la biomasa en suspensión representa una desventaja dentro de estos tratamientos biológicos, debido a que requieren la utilización de filtros o compuestos químicos. Una forma de solucionar este problema ha sido inmovilizar las microalgas incluyéndolas en esferas de alginato. Por otro lado, el co-inmovilizar las microalgas con bacterias promotoras de crecimiento, permite incrementar la biomasa microalgal, dando como resultado un aumento en la eliminación de nutrientes. En este trabajo se utilizaron dos especies de microalgas del género *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*), co-inmovilizadas en esferas de alginato de sodio con la bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense*, para la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas. Como resultado, se tiene que *A. brasilense* Cd incrementó el crecimiento de ambas especies de *Chlorella* significativamente, cuando los microorganismos se encontraban co-inmovilizados y habían crecido en Agua Residual Doméstica. La eliminación de nitrógeno y fósforo fue superior en los sistemas co-inmovilizados de los dos microorganismos, en comparación con la microalga sola. Los porcentajes de eliminación en ARD fueron de, 100% para amonio, 94% para nitrato, y 92% para fósforo en un periodo de seis días (lo que varió con la fuente de ARD); comparado con un 75% de amonio, 84% de nitrato, y 89% de fósforo, eliminados por la microalga inmovilizada sola. Adicionalmente, como una forma de mejorar la eliminación de P, se hicieron experimentos sometiendo a las microalgas a un ayuno previo de 72 horas. Como resultado, se observó que la población de *C. vulgaris* en ayuno creció significativamente menos que la población de *C. vulgaris* sin ayuno. En el caso de *C. sorokiniana*, el crecimiento poblacional no se vió afectado por el ayuno. La eliminación de fósforo fue más eficiente en los cultivos que se encontraban con ayuno y cuando se usaron dos lotes de esferas. La eliminación alcanzó un 50 % a las 48 horas para las dos especies microalga en ayuno y co-inmovilizadas con la bacteria. De acuerdo con lo anterior, se recomienda el uso de dos lotes co-inmovilizados de microalgas y bacterias en ayuno, como una alternativa biotecnológica para el tratamiento de aguas residuales domésticas.

# ASSESSMENT OF A MICROALGAE-BACTERIA SYSTEM FOR REMOVAL OF NUTRIENTS IN DOMESTIC WASTEWATER

## ABSTRACT

Microalgae have been thoroughly studied and used in wastewater treatment to remove nutrients. However, the harvest of the biomass in suspension represents a disadvantage in these biological treatments, due to the use of filters and of chemical compounds. A way to overcome this problem is to use immobilized microalgae in alginate beads. In this work we use two species of microalgae of the genus *Chlorella* (*C. vulgaris* and *C. sorokiniana*), co-immobilized in alginate beads with the Plant Growth Promoting Bacterium *Azospirillum brasilense*, to remove nutrients of domestic wastewaters. *A. brasilense* increased the growth of both *Chlorella* species when the co-immobilized microorganisms were grown in domestic wastewater. Nutrient removal was 100% ammonium, 94% nitrate, and 92% phosphorus in a period of six days (which varied with the source of ARD) co-immobilized with *Chlorella*, compared with 75% ammonium, 84% nitrate, and 89% phosphorus with microalgae alone. Experiments, with previously starved microalgae showed a negative effect in the growth of *C. vulgaris* when compared with the same microalga without starvation. Starvation did not affect the growth of *C. sorokiniana* and no significant differences among the cultures with and without starvation were found. Phosphorus removal was more efficient in the starved cultures and when two batch cultures of beads were used. The removal was 50% at 48 hours for the two microalgae with starvation treatment and co-immobilized with the bacteria. According to this study, it is recommended the use of batch culture of co-immobilized microalgae and bacteria with starvation, as a biotechnological alternative for domestic wastewater treatment.



## 1. INTRODUCCIÓN

Cerca del 97 % del agua del planeta tierra es salada (mares y océanos); alrededor del 2 % está congelada en los casquetes polares y glaciares (agua dulce), y sólo el 1 % está disponible para consumo, irrigación y usos industriales. Se calcula que actualmente 1.200 millones de personas consumen agua contaminada y cerca de 2.500 millones carecen de sistemas apropiados de alcantarillado. Más de cinco millones de personas mueren cada año de enfermedades relacionadas con el agua, tales como cólera y disentería. En todo el planeta, los agricultores y municipalidades han estado extrayendo el agua dulce a una velocidad mayor que la velocidad de reposición. Por todo esto, el tratamiento y reuso de aguas residuales se ha convertido en una necesidad imperiosa, ya que eventualmente sería la única fuente de agua dulce, si exceptuamos la desalinización del agua marina, que resulta aún un proceso muy costoso (de Bashan *et al.*, 2003).

El vertimiento de residuos líquidos contaminantes de la industria y el desmesurado crecimiento de las ciudades constituye en la actualidad un grave problema a escala mundial. No todas las industrias cuentan con un sistema eficiente de tratamiento de sus efluentes que contribuya a evitar o reducir la degradación y eutroficación de los cuerpos de agua receptores, o los sistemas que se utilizan, muchas veces, no son suficientemente eficientes para reducir la carga de contaminantes que se vierten a los cuerpos de agua; por otra parte, la tecnificación creciente hace prever que el vertimiento de nutrientes, materia orgánica, organismos patógenos y sustancias tóxicas a los ecosistemas naturales irá en aumento (Carrasquillo y Morillo, 1994).

Las aguas residuales son denominadas aguas negras y contienen sustancias y materiales tan diversos como excreta humana, desperdicios alimenticios, aceites, jabones y agentes

químicos. El tratamiento de las aguas residuales es solo una parte del sistema de limpieza del agua, la producción de lodos y el manejo del agua tratada es otro aspecto de esta actividad. Existen varios métodos para el tratamiento de aguas residuales. De acuerdo con el grado de complejidad y del espectro de sustancias, materiales y organismos eliminados, se dividen en los siguientes niveles: primario, el cual elimina el 60 % de los sólidos suspendidos, un 30 % de materia orgánica y entre un 5 a un 15 % de nutrientes; secundario, elimina el 90 % de los sólidos suspendidos y el 90 % de la demanda bioquímica de oxígeno (Garza-Almanza *et al.*, 1999).

La instalación masiva de plantas de tratamientos de aguas residuales en las pequeñas, medianas y grandes industrias mejoraría esta situación, pero los sistemas convencionales son a menudo excesivamente costosos y requieren de altos consumos de energía, mano de obra y personal calificado para su construcción y operación (Metcalf y Eddy, 1995).

Uno de los problemas a resolver en el uso de microalgas para tratar aguas residuales es el de recuperar las microalgas de los efluentes tratados. Diversos trabajos se han desarrollado en este sentido, como es el caso de los métodos de recuperación usando floculantes biológicos como la quitosina (Chevalier y de la Noüe, 1985a).

Los sistemas basados en microalgas tienen un importante futuro en general; por su versatilidad pueden tener diferentes aplicaciones en el mismo proceso, además del tratamiento de aguas residuales, producción de alimentos y de químicos. Una ventaja de las microalgas, es su capacidad fotosintética para convertir energía solar en valores de biomasa con una interesante composición bioquímica, con lo cual las microalgas juegan un papel importante en la biotecnología solar (de la Noüe y De Pauw, 1988).

El efluente secundario está sin embargo, cargado con nitrógeno inorgánico y fósforo, elementos causantes de problemas de eutroficación, y más a largo plazo, problemas por compuestos orgánicos tóxicos y metales pesados descargados. (de la Noüe *et al.* 1992)

Esta situación requiere claramente de un tratamiento terciario que elimine estos iones inorgánicos (de la Noüe *et al.* 1992); el tratamiento terciario o avanzado, consiste en la eliminación de amonio, fósforo y la mayoría de la materia suspendida que queda del tratamiento secundario (Garza-Almanza *et al.*, 1999). Sin embargo, el adicionar un paso más puede incrementar el costo total del tratamiento.

El tratamiento terciario se puede llevar a cabo de dos formas: mediante procesos físicos y químicos que permitan reducir los precursores de los nutrientes, o mediante métodos biológicos en las que microorganismos, como microalgas, incorporan en su metabolismo los nutrientes presentes en el agua.

El bio-tratamiento con microalgas, es particularmente atractivo debido a la capacidad fotosintética, que tienen las microalgas, en convertir la energía solar en biomasa y la incorporación al metabolismo de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo causantes de la eutroficación. Esta idea fue propuesta por Oswald y Gotaas (1957) y ha sido ampliamente probada en muchos países (de la Noüe y De Pauw 1988).

Una alternativa para la cosecha de las microalgas, una vez terminado el tratamiento, es la de contar con sistemas de inmovilización en polímeros, los cuales resultan ser muy promisorios; sin embargo, los sistemas inmovilizados podrían llegar a ser más eficientes si se incrementa la biomasa presente en las esferas. Una manera de aumentar la biomasa

microalgal es co-inmovilizando la microalga con bacterias benéficas que promuevan su crecimiento (González y Bashan, 2000).

Es así como los sistemas co-inmovilizados de bacterias promotoras de crecimiento, con microalgas para el tratamiento de aguas residuales, resultan ser un campo muy amplio de estudio, además el desarrollo de sistemas co-inmovilizados abre un nuevo camino en la biotecnología ya que resultan ser muy eficientes en la eliminación de nutrientes, la producción de biomasa y el aumento en los pigmentos de las microalgas, además que permiten disminuir los costos del tratamiento al eliminar los difíciles procesos de cosecha de las microalgas.

En este estudio se ponen a prueba dos especies de *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*) co-inmovilizadas independientemente con la bacteria promotora de crecimiento de microalgas (BPCM) *Azospirillum brasilense*, con el fin de determinar cual de las dos combinaciones elimina los nutrientes (nitrógeno y fósforo) de manera más eficiente. Así mismo se realizaron pruebas con deficiencia de nutrientes (ayuno) y se determinaron los efectos del Agua Residual Doméstica (ARD) en las esferas de alginato, como una alternativa eficiente para el tratamiento de Aguas Residuales Domésticas.

## **2. ANTECEDENTES**

La utilización de cultivos de microalgas como tratamiento terciario presenta grandes ventajas frente a los sistemas convencionales físicos y químicos, ya que no generan problemas de polución secundaria, una vez que la biomasa es cosechada y, además, permiten un eficiente reciclado de los nutrientes, al incorporarlos a su metabolismo (de la Noüe y De Pauw, 1988). Otras alternativas se han desarrollado usando sistemas de inmovilizados en diferentes matrices, tales como agar, alginato, carragenina y poliuretano, entre otros (Hall y Rao, 1990).

Diferentes estudios se han realizado para probar los efectos de la inmovilización de microalgas en matrices, así como la eficiencia en la eliminación de nutrientes Chevalier y de la Noüe (1985b) midieron la eficiencia de *Scenedesmus quadricauda* inmovilizada en carragenina, la cual elimina el 85 % del amonio presente en el agua. Por su parte, Tam *et al.* (1994) inmovilizaron *Chlorella vulgaris* para determinar la eliminación de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales con una eficiencia de casi el 100% para el amonio y del 71% para el fósforo; Tam y Wong (2000) encontraron que la eliminación de fósforo usando *C. vulgaris*, inmovilizada en alginato, fue del 95%. En otro trabajo, Guoan *et al.* (1996) determinaron el efecto del pH y la temperatura en la eliminación de ortofosfatos con *C. vulgaris*, inmovilizada en alginato, eliminando el 90% del fosfato a pH 3 y con una temperatura de 30°C. De acuerdo con esto, *Chlorella vulgaris* inmovilizada en esferas de alginato de calcio tiene la capacidad de eliminar el fósforo del agua residual con pH bajo y a baja temperatura.

Otra forma de hacer más eficiente la eliminación de fósforo es la de poner a las microalgas en ayuno. Es así como, Aitchison y Butt (1973) registraron una asimilación más rápida de fósforo por *Chlorella vulgaris* puesta en ayuno de fósforo, ya que la síntesis de los polifosfatos es una consecuencia de la estimulación de toma de fósforo inducida por los periodos de ayuno. En otro estudio, Jeanjean (1973) encontró que la absorción de fósforo por *Chlorella pyrenoidosa*, fue mayor cuando la microalga fue puesta en ayuno de fósforo. Los periodos de ayuno de fósforo, activan mecanismos de almacenamiento de fósforo en forma de polifosfatos, y disminuye su actividad en la medida que la concentración de fósforo se incrementa. A esta capacidad de las células para acumular un nutriente, más allá de sus necesidades inmediatas, se le aplica el término de consumo innecesario (Darley, 1987). Esta acumulación puede llegar a

ser utilizada como una forma de incrementar las necesidades de las microalgas por los nutrientes y por consiguiente, la eliminación de los mismos del agua residual.

Otra forma que permitiría aumentar la eficiencia de eliminación de nutrientes, en el tratamiento de aguas residuales con microalgas, es aumentar la biomasa microalgal proporcionando a dicho organismo dióxido de carbono, ácido acético o glucosa (Kaplan *et al.*, 1986). Para incrementar la población algal, dentro del tratamiento, se puede inocular la microalga con otros organismos que promuevan su crecimiento, como es el caso de cultivos de importancia alimenticia en la agricultura (Lippi *et al.*, 1992; Hartmann y Zimmer, 1994; Bashan y Holguín, 1997). El co-inmovilizado tiene como fin el utilizar la actividad biocatalítica de dos o mas organismos o incrementar la reacción biocatalítica de un microorganismo (O'reilly y Scott, 1995). Para tal fin, el microorganismo candidato es la bacteria promotora de crecimiento en plantas (PGPB) *Azospirillum brasilense* (Bashan y Holguín, 1998; Glick, 1995; Khang *et al.*, 1988; Kloepper *et al.*, 1980)

Estudios realizados por de-Bashan *et al.* (2002) reportaron eliminación de amonio del 93 % y más del 75% en la eliminación de fósforo, cuando *C. vulgaris* se encontraba co-inmovilizada con *Azospirillum brasilense*. En otro estudio, González-Bashan *et al.* (2000) registraron un incremento de los pigmentos de *C. vulgaris* al ser co-inmovilizada con *Phyllobacterium myrsinacearum*, en tanto que González y Bashan (2000) observaron un incremento del crecimiento poblacional de *C. vulgaris*, cuando se co-inmoviliza con la bacteria promotora de crecimiento, *Azospirillum brasilense*. Lebsky *et al.* (2001) realizaron estudios de la estructura y la interacción de *C. vulgaris* co-inmovilizada en esferas de alginato con *Phyllobacterium myrsinacearum* y con *Azospirillum brasilense* y observaron que la microalga permanecía en

fase de crecimiento en presencia de *A. brasilense*, mientras que en presencia de *Phyllobacterium myrsinacearum* entraba en una fase de envejecimiento. Con base en lo anterior se plantean el uso de dos especies de microalgas del genero *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*) y la bacteria promotora de crecimiento de microalgas *Azospirillum brasilense* Cd como un sistema de eliminación de nutrientes del agua residual doméstica.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Si bien es cierto que la encapsulación de microalgas para el tratamiento de aguas residuales ha venido siendo utilizada con éxito, el co-inmovilizar la microalga con bacterias promotoras de crecimiento podría llegar a mejorar significativamente el crecimiento poblacional de la microalga y por consiguiente la eliminación de los nutrientes. Por otro lado, el mantener las microalgas en ayuno permite realizar este tratamiento en menor tiempo, disminuyendo los costos y aumentando la eficiencia del tratamiento terciario.

En este trabajo se pretende mostrar que los sistemas co-inmovilizados de microalgas con bacterias, en esferas de alginato, resultan ser una alternativa buena que permite aumentar la eficiencia en la eliminación de nutrientes de las aguas residuales y disminuir los costos de los tratamientos.

De esta forma, se plantea la siguiente hipótesis: se sabe que los sistemas co-inmovilizados de bacterias y microalgas son eficientes en la eliminación de nutrientes de las aguas residuales sintéticas y que la población algal aumenta cuando se encuentra inmovilizada con la bacteria, entonces, los sistemas de bacterias y microalgas, co-inmovilizados en una matriz de alginato, aumentarán su eficiencia en la eliminación de nutrientes de las aguas residuales domésticas.

## **4. OBJETIVOS:**

### **4.1. General**

Evaluar la eficiencia en la eliminación de N y P de un sistema co-inmovilizado de microalgas y bacterias en agua residual natural.

### **4.2. Específicos.**

Comparar la eficiencia en la eliminación de N y P entre *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana*, inmovilizadas y co-inmovilizadas en esferas de alginato en ARD.

Determinar el tiempo de degradación y el efecto de las ARD en las esferas de alginato.

Determinar el tiempo máximo en el que un mismo inóculo, co-inmovilizado, mantiene la eficiencia en la eliminación de N y P

Determinar el efecto de ayuno de las microalgas en la eliminación de nutrientes de las ARD.

## **5. MÉTODO:**

### **5.1. Microorganismos y condiciones de crecimiento:**

#### **5.1.1. *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714) y *Chlorella sorokiniana* (UTEX 1602)**

Los cultivos se mantuvieron en medio mineral C<sub>30</sub> estéril; cada 168 horas se hicieron recambios de medio nutritivo manteniendo la relación 10% V/V, en agitación y luz constante y temperatura ambiente.



## **5.2. *Azospirillum brasilense* (Cd DMS 1843)**

La bacteria se mantuvo en congelación en Nitrógeno líquido hasta el momento de iniciar el experimento. El cultivo de esta bacteria se reactivó en caldo nutritivo con 16 horas de anticipación, se dejó a una temperatura de 30°C con agitación constante a 120 r.p.m..

## **5.3. Inmovilización de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* en esferas de alginato de sodio**

La inmovilización de las microalgas se llevó a cabo en alginato siguiendo el método descrito por Bashan (1986) de la siguiente forma: se preparó una mezcla de alginato de sodio tomando 1.5 gramos de alginato de media densidad (3500 cps, SIGMA) y mezclándolo con 0.5 gramos de alginato de alta densidad (14000 cps, SIGMA); luego, se disolvieron en 80 ml de solución salina al 0.85%; una vez disuelto el alginato se esterilizó en autoclave por 25 minutos a 20 psi y una temperatura de 121°C. Los inóculos de las microalgas se hicieron sembrando 10 ml del preinóculo en 100 ml de medio mineral C<sub>30</sub>, manteniendo una proporción del 10 % V/V. Se dejaron en agitación a 150 r.p.m., bajo una irradiación de 60  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , durante 120 horas. Los 100 ml de cultivo se lavaron de dos a tres veces, centrifugando a 2000g por 15 minutos y se resuspendieron en 20 ml de solución salina al 0.85%; estos se mezclaron con el alginato por un periodo de 20 a 30 minutos. Se tomaron los 100 ml de la mezcla y se adicionaron gota a gota con una jeringa estéril de 10 ml sobre 100 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> al 2%, estéril, dejando en agitación por una hora las esferas formadas. Las esferas se lavaron tres veces con solución salina al 0.85%

#### 5.4. Co-inmovilización de *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sorokiniana* en esferas de alginato con *Azospirillum brasilense*.

La bacteria se reactivó inoculando 5 ml del cultivo en 50 ml de caldo nutritivo (Sigma) por 16 horas, se mantuvo en agitación constante a una temperatura de  $\pm 30^{\circ}\text{C}$ . Para la co-inmovilización se realizó el mismo procedimiento utilizado para la inmovilización de las microalgas. Cada cultivo se resuspendió en 10 ml de solución salina para obtener así una mezcla de 20 ml de bacteria y microalgas que luego se mezclaron con 80 ml de alginato. El cultivo de *A. brasilense*, después de ser centrifugado, se ajustó a una densidad óptica de 1 a 540 nm (aproximadamente  $10^9$  cfu/ml).

Tanto los co-inmovilizados como los inmovilizados se dejaron en caldo nutritivo al 50% por 24 horas, debido a que durante el proceso de inmovilización se reduce el número de microorganismos dentro de las esferas (Bashan, 1986)

### 6. CONDICIONES EXPERIMENTALES:

#### 6.1. Toma de muestra del Agua Residual Doméstica (ARD).

El ARD se tomó de la salida del sedimentador secundario de la Planta de Tratamientos de Aguas Residuales (PTAR) de la ciudad de La Paz, B.C.S., México. El agua se caracterizó en un laboratorio de la Ciudad de La Paz usando una muestra compuesta, con los siguientes valores:

PARÁMETRO	UNIDAD DE MEDIDA	VALOR	METODO	L.P.M.	
				P.M	P.D.
PH	Unidad	7.9	NMX-AA-008-1980	5.5 A 10	
Materia flotante	Malla 3 mm <sup>2</sup>	Ausente	NMX-AA-006-1973	No aplica	
Sólidos sedimentables	ml/l	0.3	NMX-AA-004-1977	No aplica	
Sólidos suspendidos totales	mg/l	18	NMX-AA-034-1981	No aplica	

Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/l	113	NMX-AA-028-1981	No aplica	
Nitrógeno total	mg/l	54.9	NMX-AA-026-1980	No aplica	
Fósforo total	mg/l	4.98	NMX-AA-029-1981	No aplica	
Coliformes fecales	NMP/100ml	70,000	NMX-AA-042-1987	1.000	2.000

**L.M.P.** Límites Máximos Permisibles de contaminantes en descargas de aguas residuales para Promedio Diario y Mensual, otorgados por la Comisión Nacional del Agua.

**Tabla 1** Caracterización química del agua residual de la planta de tratamiento de La Paz B.C.S.

## 6.2. Pruebas de eliminación de nutrientes en ARD:

Para las pruebas de eliminación de nutrientes se usaron matraces de 1000 ml, puestos de manera invertida (Figura 1) a los cuales se les agregaron 26 gramos de las esferas y 650 ml de ARD; se mantuvieron con aireación constante, usando difusores de aire para acuario, bajo una irradiancia de  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  y temperatura promedio de  $30^\circ\text{C}$ . Se realizaron recambios del ARD, cada 48 horas, dejando en los biorreactores las mismas esferas iniciales. A esta ARD se le practicaron análisis de fósforo mediante la técnica del molibdo vanadato de amonio; de amonio por la técnica de salicilato; de nitrato usando la técnica de reducción de cadmio y pH, siguiendo las técnicas propuestas por APHA - AWWA - WPCF (1992).

### 6.2.1. Determinación del Crecimiento de organismos:

Para determinar el crecimiento de las microalgas, se hicieron recuentos directos al microscopio óptico cada 48 horas de la siguiente forma: se tomaron cinco esferas de cada matraz y se disolvieron en 5 ml de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) al 4% durante media hora. Una vez disueltas las esferas se realizó el conteo de las microalgas en cámara de Neubauer.

El recuento de las bacterias se realizó por extensión en superficie, en placas con agar nutritivo (Sigma), haciendo diluciones sucesivas en tubos eppendorf con 900  $\mu\text{l}$  de solución salina al 0.85%, hasta alcanzar una dilución de  $10^6$ ; las cajas de petri se incubaron a  $30^\circ\text{C}$  por

48 horas; pasado este tiempo, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC).

### **6.2.2. Diseño experimental y estadístico:**

Para las pruebas de eliminación de nutrientes se llevaron a cabo de 4 a 5 ciclos de cultivos semi-continuos de 48 horas; las esferas permanecieron de 192 a 240 horas; para cada ciclo se realizaron los siguientes tratamientos:

1. *C. vulgaris* inmovilizada sola.
2. *C. sorokiniana* inmovilizada sola.
3. *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense*.
4. *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense*.
5. Control: esferas de alginato sin microorganismos.
6. Control: ARD sin esferas.

Se hicieron 3 réplicas para cada uno de los tratamientos. Para el análisis estadístico se realizaron pruebas de normalidad de los datos y, posteriormente, se llevó a cabo un análisis de varianza de una vía a  $P \leq 0.05$ , y un análisis a posteriori de Tukey, usando el programa Statistica para Windows versión 5.0.

### **6.3. Pruebas de eliminación de fósforo en agua residual sintético (ARS) usando microalgas en ayuno:**

Como una forma de hacer más eficiente el proceso de eliminación de fósforo por el sistema co-inmovilizado, las microalgas se sometieron a una prueba de ayuno de nutrientes, incubándolas en solución salina al 0.85% por tres días inmediatamente después del crecimiento secundario y antes de inocularse en el ARS. De esta manera, las microalgas

tendrán un mayor requerimiento de fósforo. Pasado este tiempo de ayuno, se adicionaron 20 gramos de esferas en 300 ml de ARS en matraces de un litro. Se mantuvieron bajo una irradiancia de  $60 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , temperatura promedio de  $30^\circ\text{C}$ . y agitación constante a 150 r.p.m. Se tomaron 25 ml del ARS cada 48 horas, para hacer análisis de fósforo mediante la técnica de molibdovanadato de amonio, propuesto por APHA - AWWA - WPCF (1992).

### 6.3.1. Eliminación de fósforo usando microalgas en ayuno

Las pruebas de ayuno se realizaron de cuatro formas diferentes;

Tratamiento inicial		Periodo de ayuno (NaCl al 0.85%) (Horas)	Tratamiento final	
Tipo de Agua	Tiempo de incubación (horas)		Tipo de agua	Tiempo de incubación (horas)
	Ninguno	120	Nueva ARS	240
	Ninguno	72	Nueva ARS	240
ARS	240	72	Nueva ARS	240
ARS	240	72	Misma ARS	240
ARS	240	72	Nuevas esferas misma ARS	240

Tabla 2 Pruebas de ayuno con microalgas

En el primer experimento, las microalgas tuvieron tres días de ayuno antes de ser puestas en el ARS; en el segundo experimento las microalgas se inocularon en el ARS por un periodo de 192 a 240 horas; posterior a esto se sacaron las esferas y se dejaron en ayuno en solución salina por tres días, una vez pasado el ayuno se volvieron a poner en nueva ARS y se dejaron por un periodo de 192 a 240 horas. El tercer experimento se llevó a cabo poniendo las esferas en ARS por un periodo de 192 a 240, se sacaron y se dejaron en ayuno por tres días luego se pasaron a la misma ARS y se dejaron por un periodo de 194 a 240 horas. El último experimento se llevó a cabo poniendo las esferas en ayuno por tres días; se pasaron a ARS por un periodo de 192 a 240 horas; luego de este tiempo se cambiaron las esferas por un nuevo lote de esferas que habían pasado por un ayuno de tres días; de igual forma se dejaron las esferas en la misma ARS por un periodo de 192 a 240 horas.

### 6.3.2. Diseño experimental y estadístico

Se llevaron a cabo cultivos en lote de 192 a 240 horas, incluyendo 3 réplicas para cada uno de los tratamientos; los tratamientos fueron:

<i>Chlorella vulgaris</i>	Co-inmovilizada	Con ayuno
		Sin ayuno
	Inmovilizada	Con ayuno
		Sin ayuno
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Co-inmovilizada	Con ayuno
		Sin ayuno
	Inmovilizada	Con ayuno
		Sin ayuno

Tabla 3 Diseño experimental con microalgas en ayuno

Los controles fueron las esferas de alginato sin microorganismos en ARS. Se realizaron pruebas de normalidad de los datos, los cuales se ajustaron a una distribución normal, posteriormente, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANDEVA) a  $P \leq 0.05$ , así como análisis a posteriori de Tukey, usando el programa Statistica para Windows versión 5.0.

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Pruebas en Agua Residual Doméstica (ARD)

#### 7.1.1. Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional, tanto de *C. sorokiniana* como de *C. vulgaris*, aumentó significativamente cuando éstas se encontraban co-inmovilizadas con *Azospirillum brasilense* Cd, en comparación con los cultivos inmovilizados solos. Para *C. vulgaris* los valores pasaron de  $2.1 \times 10^6$  a  $4.8 \times 10^6$  cels/ml en los cultivos co-inmovilizados, mientras que los cultivos inmovilizados solo llegaron a tener una densidad celular de  $4.1 \times 10^6$  cels/ml (Fig. 1A).

El cultivo de *C. sorokiniana* co-inmovilizada mostró valores de crecimiento que variaron de  $2.8 \times 10^6$  a  $4.0 \times 10^6$  cels/ml, después de cuatro ciclos (Fig. 1B), comparado con los cultivos inmovilizados solos, los cuales mostraron valores de  $3.6 \times 10^6$  cels/ml. El cultivo de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* presentó una mayor densidad poblacional al compararse con los cultivos de *C. vulgaris* inmovilizada sola y los cultivos de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* y el cultivo de *C. sorokiniana* sola.

### 7.1.2 Eliminación de nutrientes

En la figura 2 se muestra como *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd eliminó el 100% de amonio en el segundo ciclo (Fig. 2A); este valor es significativamente mayor comparado con el cultivo de *C. vulgaris* inmovilizada sola, mientras que con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* (Fig. 2B) la eliminación del 100% de amonio se dió en el primer ciclo, siendo significativamente más alto al ser comparado con los sistemas inmovilizados. Por otro lado, hasta el quinto ciclo, los cultivos de *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* inmovilizados solos, no habían alcanzado el 100% de eliminación de amonio (Figs. 2A y 2B).

La eliminación de los nitratos se llevó a cabo bajo dos condiciones: 1) cuando el ARD llegó de la planta de tratamientos con una alta concentración de nitratos, (aproximadamente 6 mg/L) y, 2) cuando la concentración de nitratos fue muy baja (menos de 4 mg/L). Para el primer caso la eliminación de nitratos es mayor con *C. sorokiniana* co-inmovilizada, de 5.9 mg/L a 4 mg/L en tanto que para *C. vulgaris* co-inmovilizada la eliminación pasó de 5.9 mg/L a 5 mg/L. los tratamientos de las microalgas inmovilizadas solas la eliminación fue menor (Fig. 3A, B). Para el segundo caso se observa un incremento en los nitratos durante los primeros 3 ciclos y para el cuarto ciclo se observa una ligera disminución con *C. vulgaris* co-inmovilizada (11.5 mg/L a 9 mg/L de  $\text{NO}_3$ ) en tanto que *C. sorokiniana* presentó un incremento menor de nitratos (apenas

10 mg/L ) y durante el cuarto ciclo se observa una disminución de 10 mg/l a 9 mg/L de NO<sub>3</sub>, mayor a la eliminación que presentaron los sistemas inmovilizados de ambas especies de microalgas (Fig. 3C, D). Los tratamientos que sirvieron como control (esferas sin microorganismos y ARD) no eliminaron nitratos durante los cuatro ciclos de prueba (Fig. 3E).

La eliminación de fosfato de las ARD siempre fue mejor cuando las microalgas estaban co-inmovilizadas con *A. brasilense* Cd; sin embargo, el cultivo de *C. sorokiniana* co-inmovilizado con *A. brasilense* fue significativamente más eficiente eliminando el 40% del fósforo presente comparado con el cultivo de *C. vulgaris* co-inmovilizado con *A. brasilense* el cual eliminó el 25% del fósforo presente (Fig. 4A, B).

Los controles, tanto el ARD sin esferas, como el ARD con esferas sin microorganismos, no mostraron una diferencia significativa en la eliminación de nitrógeno y fósforo, comparados con los cultivos co-inmovilizados de *C. vulgaris* con *A. brasilense*, y *C. vulgaris* inmovilizada sola y con los cultivos co-inmovilizados de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* y *C. sorokiniana* inmovilizada sola. Sin embargo, el control de ARD sin esferas mostró una eliminación muy baja de amonio (de 0.08 a 0.07 mg/L después del tercer ciclo y hasta el quinto ciclo). Los cultivos inmovilizados y co-inmovilizados mostraron diferencias significativas al ser comparados con los controles.

## **7.2. Efectos del ARD en las esferas**

Durante los diferentes experimentos no se observaron efectos de degradación sobre las esferas por acción de la microflora indígena o por los compuestos que se pudieran encontrar en el ARD.



### **7.3. Pruebas con microalgas puestas en ayuno:**

#### **7.3.1. Microalgas inmovilizadas y co-inmovilizadas puestas en ayuno e inoculadas en el Agua Residual Sintética (ARS).**

##### **7.3.1.1. Crecimiento poblacional**

El crecimiento poblacional de *C. vulgaris* inmovilizada sola y puesta en ayuno, fue significativamente menor al ser comparada con el crecimiento poblacional de *C. vulgaris* inmovilizada sola y sin ayuno. El conteo poblacional de *C. vulgaris* inmovilizada sola y puesta en ayuno pasó de  $5 \times 10^3$  a  $6 \times 10^3$  cels/ml, en tanto que el cultivo de la misma microalga inmovilizada y sin ayuno alcanzó una densidad celular de  $16 \times 10^3$  (Fig. 5A). Para *C. sorokiniana* el crecimiento poblacional no presentó diferencias significativas al final del tratamiento con un promedio de  $20 \times 10^3$  cels/ml (Fig. 5B). Solo se observaron diferencias significativas en los dos cultivos de *C. sorokiniana* a las 96 y a las 144 horas, siendo significativamente menor el crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y puesta en ayuno. Por otro lado, el conteo poblacional de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* y puesta en ayuno bajó de  $2.9 \times 10^6$  a  $0.6 \times 10^6$  cels/ml, fue significativamente menor al cultivo de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* sin ayuno, la cual aumentó su crecimiento de  $2.9 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  (Fig. 5C). La densidad poblacional de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* y puesta en ayuno fue significativamente menor a la densidad de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* sin ayuno; la densidad celular de la microalga puesta en ayuno pasó de  $2.4 \times 10^6$  a  $3.9 \times 10^6$ , mientras que, para el cultivo de la misma microalga sin ayuno, alcanzó una densidad celular de  $4.9 \times 10^6$  (Fig. 5D).

### 7.3.1.2. Eliminación de fósforo

La eliminación de fósforo en el cultivo de *C. vulgaris* inmovilizada sola y puesta en ayuno, no mostró diferencias significativas con el cultivo de *C. vulgaris* inmovilizada sola y sin ayuno (Fig. 6A). El cultivo de *C. sorokiniana* inmovilizada y puesta en ayuno, alcanzó el máximo de eliminación a las 192 horas, eliminó el 35% del fósforo, siendo significativamente mayor al cultivo de la misma microalga sin ayuno, la cual solo eliminó el 15% del fósforo a las 192 horas (Fig. 6B).

La eliminación de fósforo para *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y puesta en ayuno, eliminó el 41 % del fósforo presente a las primeras 48 horas siendo significativamente mayor al del cultivo de la misma microalga co-inmovilizada y sin ayuno, (Fig. 6B), sin embargo el cultivo de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* sin ayuno, continuó la eliminación de fósforo alcanzando el máximo de eliminación hasta las 240 horas (53%), siendo significativamente mayor que el cultivo de la misma microalga puesta en ayuno (Fig. 6C).

Para *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* y puesta en ayuno la máxima eliminación de fósforo se logró a las 48 horas (41%), valor significativamente mayor al cultivo de la misma microalga sin ayuno, que tuvo su máxima eliminación a las 240 horas y solo alcanzó a eliminar el 29% del fósforo (Fig. 6D).

Los cultivos de *C. vulgaris* fueron afectados por el ayuno, aun cuando se encontraban co-inmovilizados con la bacteria, lo cual se en el poco crecimiento poblacional y baja eficiencia en la eliminación de fósforo del ARS. Debido a esto, los experimentos de ayuno se siguieron con *C. sorokiniana*.

### **7.3.2.C. *sorokiniana* inmovilizada y co-inmovilizada inoculada en el ARS y luego puesta en ayuno e inoculada nuevamente en la misma ARS.**

#### **7.3.2.1. Crecimiento poblacional**

El crecimiento poblacional de *C. sorokiniana*, inoculada en el ARS y sin ponerse en ayuno, aumentó de manera significativa cuando se encontraba co-inmovilizada con *A. brasilense*, la cual alcanzó una densidad celular de  $2 \times 10^4$  células/ml a las 240 horas mientras que en el cultivo de *C. sorokiniana* inmovilizada sola se obtuvo, al final, una densidad celular de  $1.2 \times 10^4$  (Fig. 7A). El crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* no presentó diferencias significativas después de ponerse en ayuno y ser nuevamente inoculada en la misma ARS, durante el período de incubación. De igual forma, el cultivo de *C. sorokiniana* inmovilizada sola tampoco presentó diferencias significativas durante el periodo de incubación (Fig. 7B). El cultivo de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* mantuvo la diferencia significativa al ser comparado con el cultivo de *C. sorokiniana* inmovilizada sola (Fig. 7B)

#### **7.3.2.2. Eliminación de fósforo.**

El cultivo de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* y sin ayuno eliminó el 39% del fósforo a las 240 horas mientras que el cultivo de *C. sorokiniana* inmovilizada sola eliminó el 25% del fósforo a las 240 horas (Fig. 8A).

El cultivo de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* no presentó diferencias significativas en la eliminación de fósforo, después de ser puestas en ayuno e inoculadas en la misma ARS, durante el tiempo de incubación. Por su parte, en el cultivo de *C. sorokiniana*

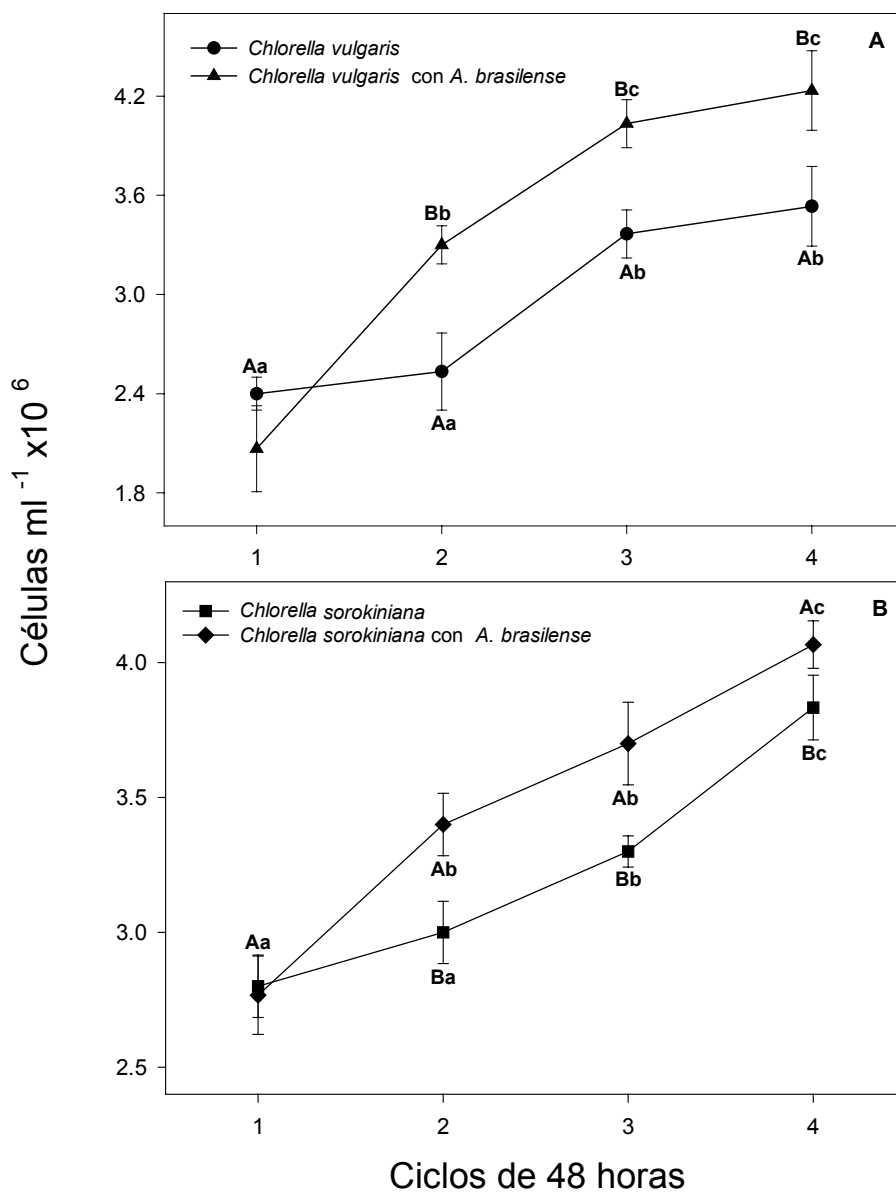
inmovilizada sola, se observó una eliminación de fósforo durante el tiempo de incubación después de haber puesto el cultivo en ayuno y luego inoculado en la misma ARS (Fig. 8B).

#### **7.4. Eliminación de fósforo con *C. sorokiniana* inoculada en ARS, luego puesta en ayuno e inoculada en nueva ARS.**

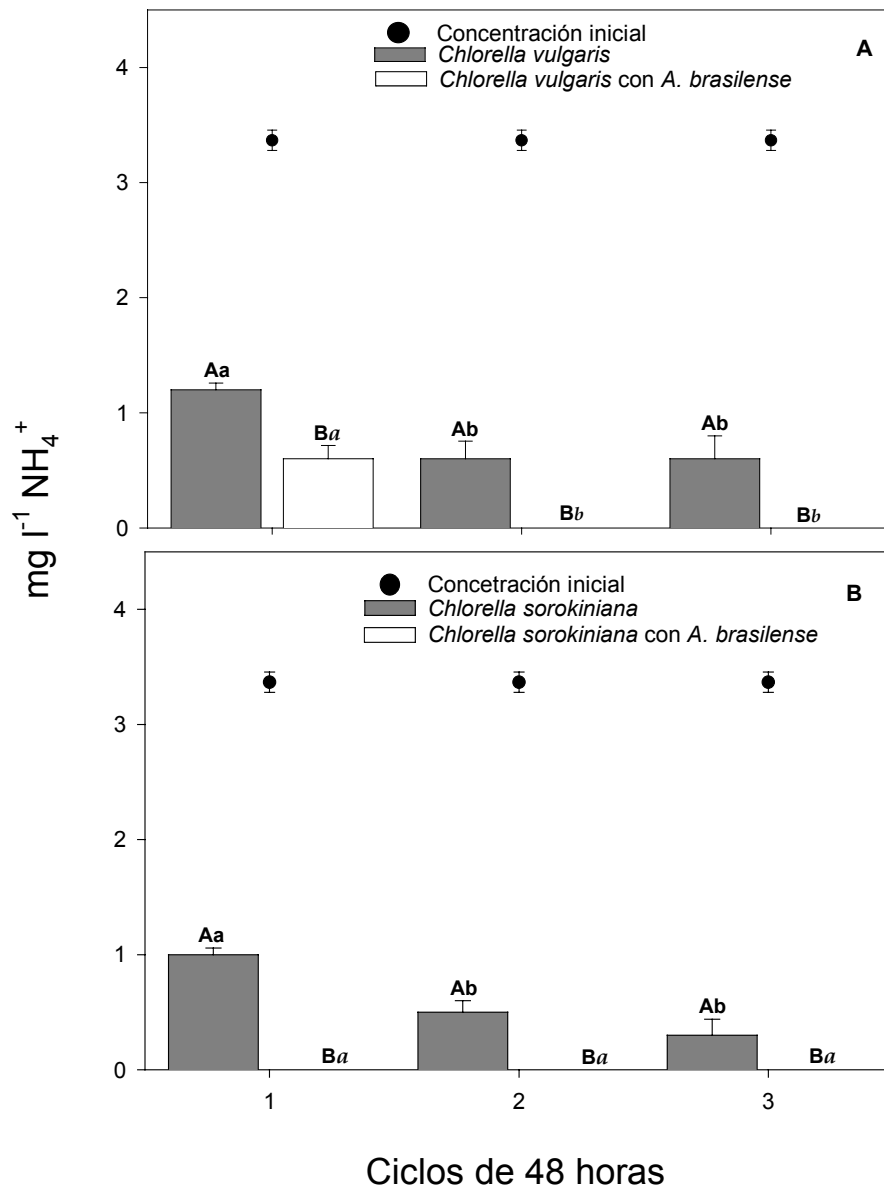
La eliminación de fósforo por la microalga co-inmovilizada fue significativamente mayor en comparación con la microalga inmovilizada sola. La microalga co-inmovilizado eliminó un 38% del fósforo presente en un periodo de 96 horas, mientras que la microalga inmovilizada solo alcanzó a eliminar el 14% de la concentración total de fósforo del ARS (Fig. 9A). Después del primer tratamiento las microalgas se pusieron en ayuno durante tres días, luego se pusieron en nueva ARS. En este punto la microalga que se encontraba co-inmovilizada con la bacteria eliminó el 16% del fósforo, mientras que la microalga inmovilizada sola no mostró diferencias durante cada uno de los días del tratamiento, eliminando el 5% del fósforo presente en el agua. (Fig. 9B).

#### **7.5. Eliminación de fósforo en secuencia con dos lotes de *C. sorokiniana* inmovilizada y co-inmovilizada puestos en ayuno en la misma ARS.**

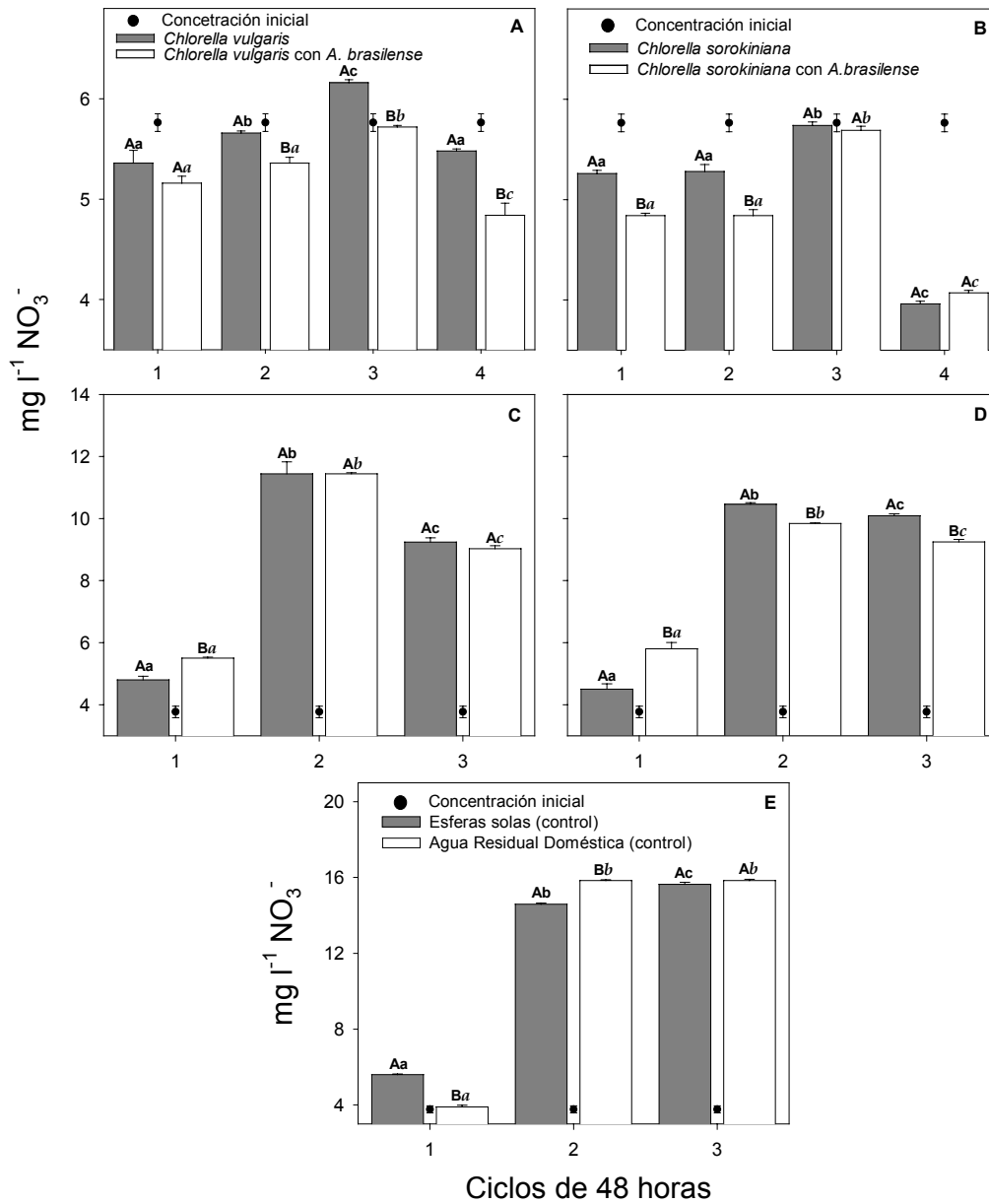
En la primera etapa del tratamiento, la microalga co-inmovilizada sola eliminó el 28% del fósforo presente, en tanto que el inmovilizado solo alcanzó a eliminar el 5% del fósforo; pasadas 48 horas de incubación se pusieron microalgas nuevas que venían de ayuno; de manera similar, la microalga co-inmovilizada con *A. brasilense* eliminó el 52% del fósforo del ARS, alcanzando una eliminación total del 80% del fósforo total (Fig. 10)



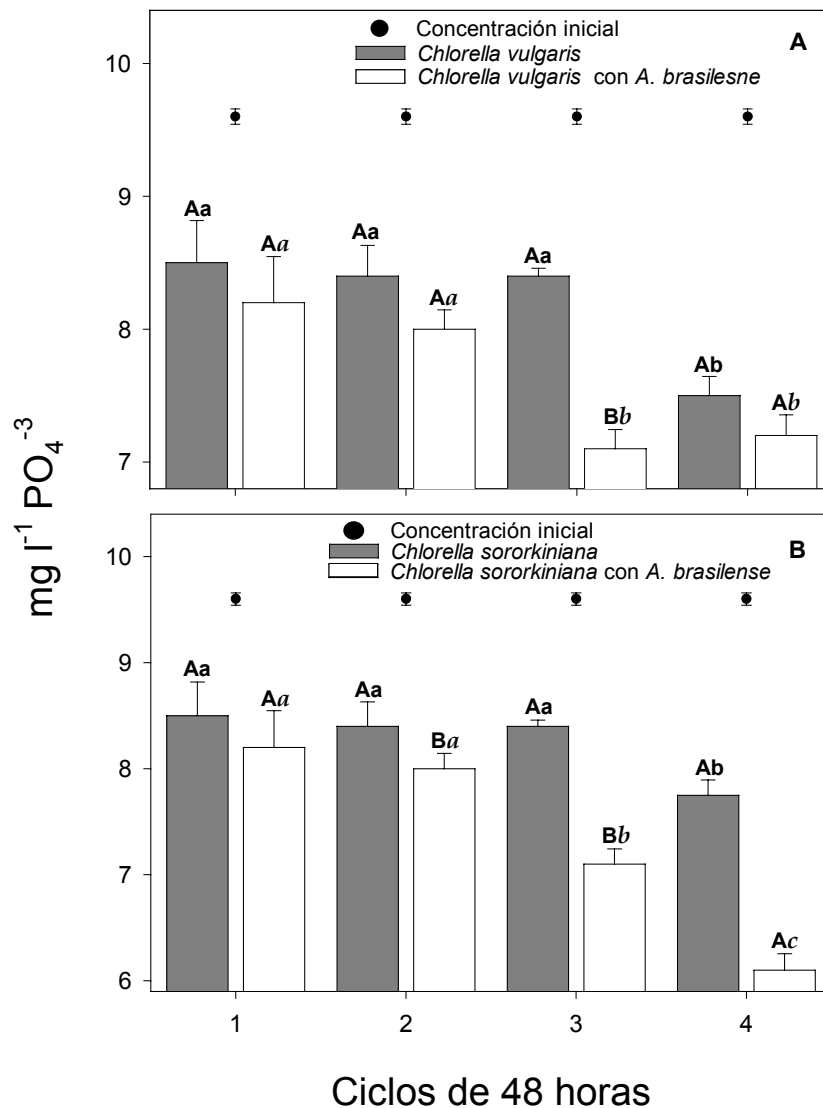
**Figura 1.** (A) Crecimiento de *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd en agua residual doméstica. (B) crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd en aguas residual doméstica. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a P <0.05. Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a P <0.05.



**Figura 2.** Concentración final de amonio del Agua Residual Doméstica con (A) *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. y con (B) *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$ .

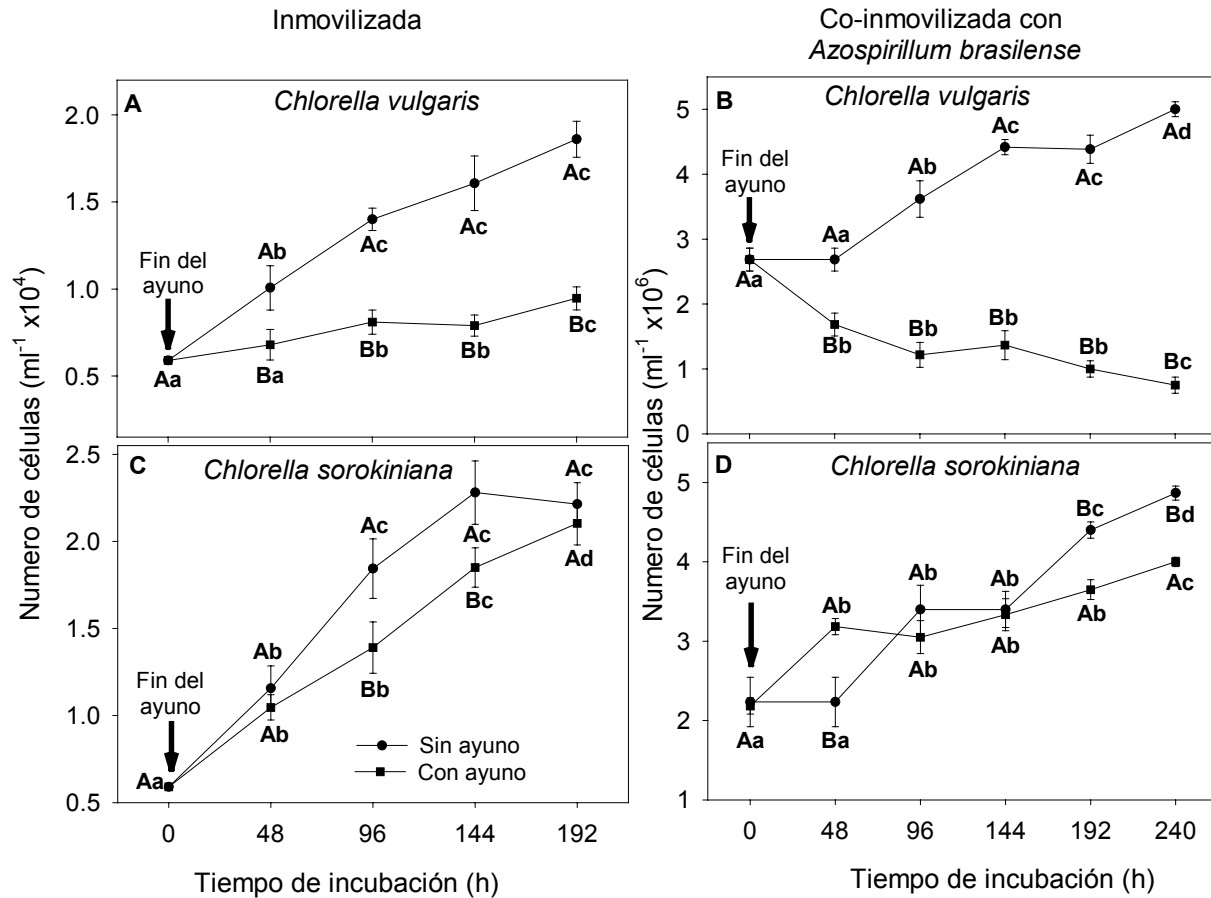


**Figura 3.** Concentración final de nitratos del agua residual doméstica con (A) *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. y con (B) *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$

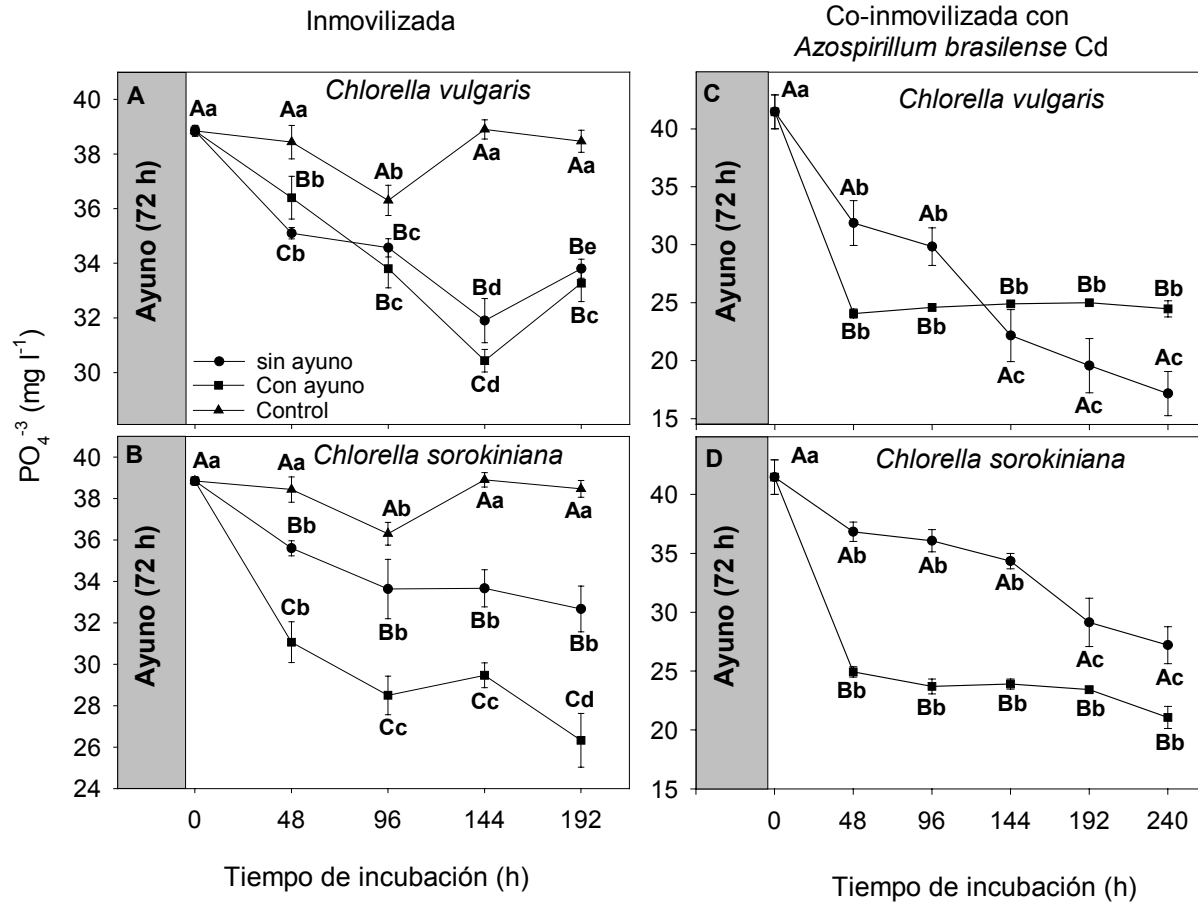


**Figura 4.** Concentración final de fósforo del agua residual doméstica con (A) *C. vulgaris* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. y con (B) *C. sorokiniana* inmovilizada sola y co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$ .

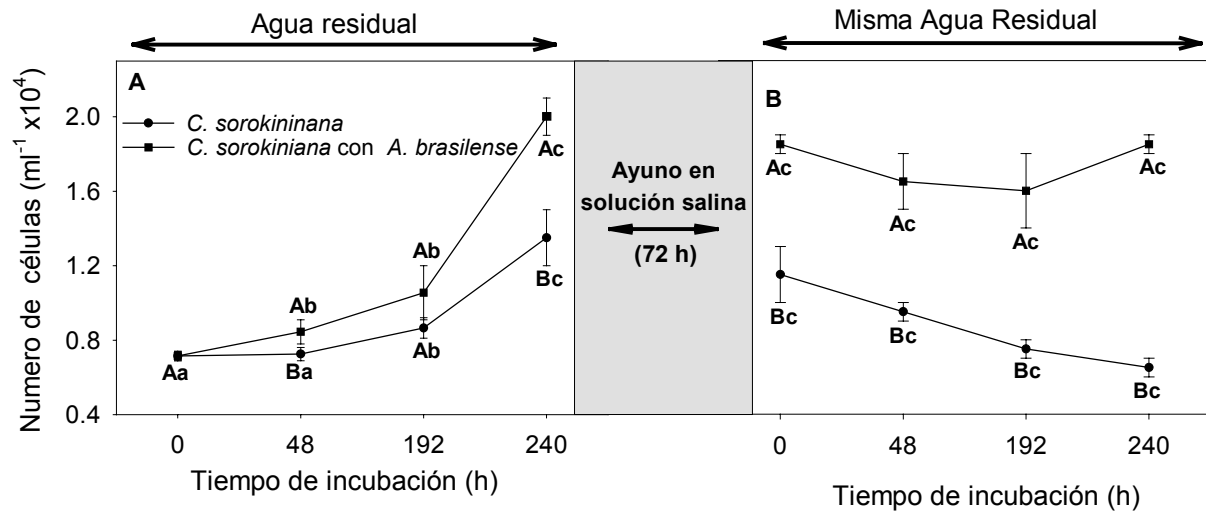




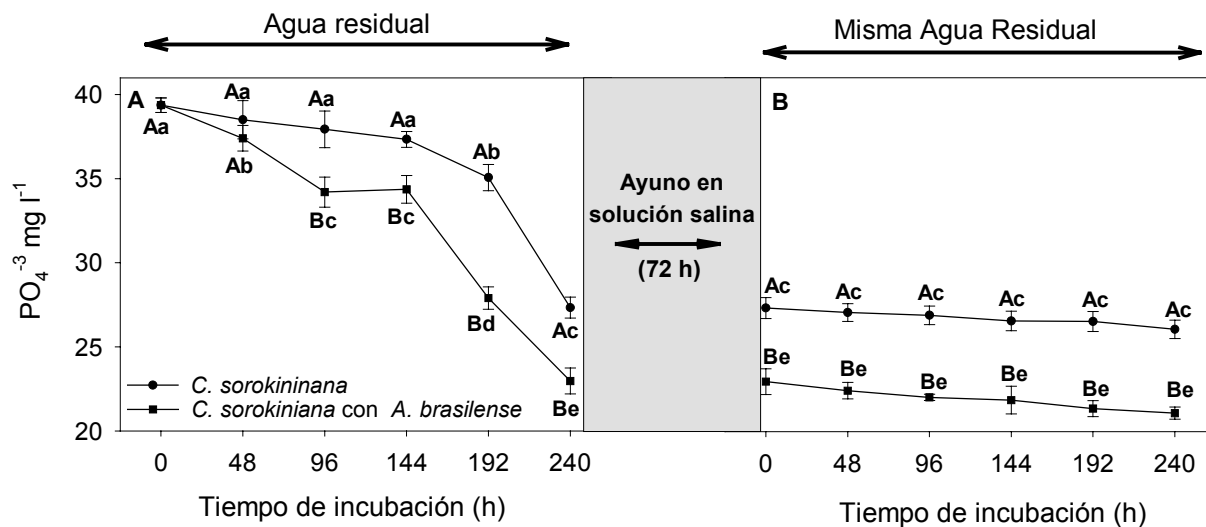
**Figura 5.** (A) Crecimiento de *C. vulgaris* inmovilizada sola, (B) crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada sola, (C) crecimiento de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd, (D) crecimiento de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$ .



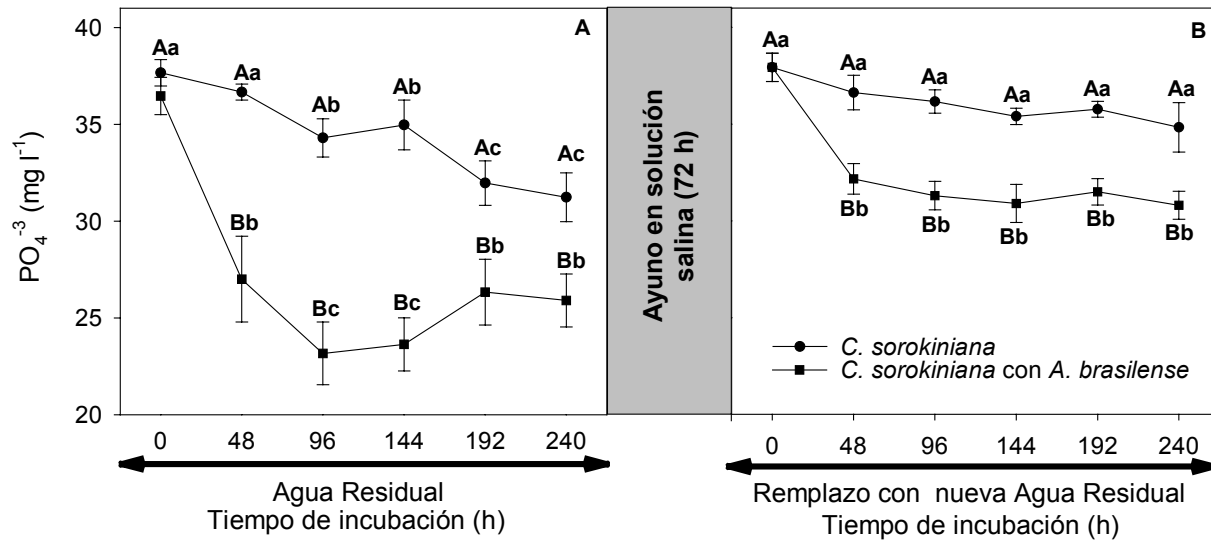
**Figura 6.** Concentración final de fósforo del agua residual sintética con (A) *C. vulgaris* inmovilizada sola con tres días de ayuno, (B) *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd, (C) *C. sorokiniana* inmovilizada con y (D) *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd con tres días de ayuno. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$



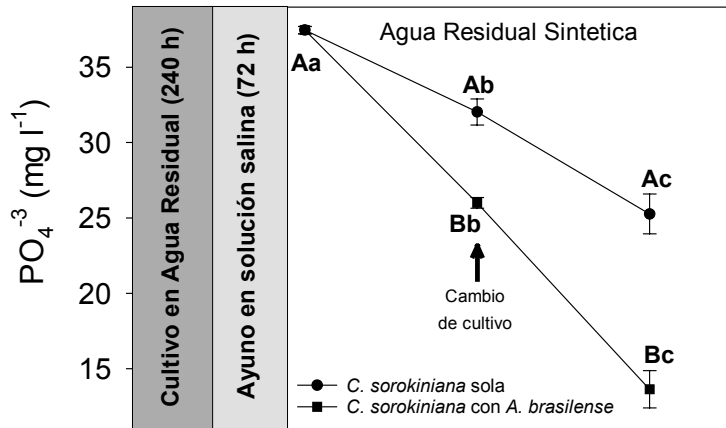
**Figura 7.** Crecimiento de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y *C. sorokiniana* inmovilizada sola. (A) sin ayuno y (B) dejando la misma agua residual y poniendo las mismas esferas después de tres días de ayuno. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$



**Figura 8.** Concentración final de fósforo con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y *C. sorokiniana* inmovilizada sola. (A) sin ayuno y (B) dejando la misma agua residual y poniendo las mismas esferas después de tres días de ayuno. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$



**Figura 9.** Concentración final de fósforo con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd y *C. sorokiniana* inmovilizada sola. (A) sin ayuno y (B) cambiando el agua residual y poniendo las mismas esferas después de tres días de ayuno. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$ .



**Figura 10.** Concentración final de fósforo del agua residual doméstica con *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* Cd con tres días de ayuno y *C. sorokiniana* inmovilizada sola con tres días de ayuno. Dejando la misma agua residual y cambiando las esferas a las 48 horas. Las letras en mayúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un análisis t-student a  $P < 0.05$ . Las letras en minúscula representan las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza a  $P < 0.05$ .

## 8. DISCUSIÓN

El uso de muchas especies de microalgas para el tratamiento terciario de aguas residuales a sido propuesto por décadas (de la Noüe *et al.* 1988) y muchos tratamientos potenciales continúan siendo evaluados hoy en día (González *et al.* 1997, Tang *et al.* 1997). Por otra parte, la microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada ha sido utilizada para el tratamiento de aguas residuales (Chevalier y de la Noüe, 1985, Tam *et al.*, 1994, Lau *et al.*, 1997, de Bashan *et al.*, 2002,) y la combinación de la microalga con la bacteria promotora de crecimiento de microalgas (MGPB por sus siglas en Inglés) para el tratamiento de aguas residuales ha sido recientemente estudiada (de Bashan *et al.*, 2002, de Bashan y Bashan, 2003, González y Bashan, 2000, de Bashan *et al.*, 2002).

Este estudio muestra que en ARD la densidad poblacional de dos especies de *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*) aumenta cuando se encuentran co-inmovilizadas con la MGPB *Azospirillum brasilense*. El crecimiento de *C. vulgaris* inmovilizada sola, y después de cuatro ciclos de incubación de 48 horas cada uno, fue de  $3.5 \times 10^6$  células/ml, valor más alto que el reportado por González y Bashan (2000) después de cinco días de incubación en un cultivo continuo, en Agua Residual Sintética (ARS) (aprox.  $1.6 \times 10^6$  células/esfera) y que el reportado por de-Bashan *et al.* (2002) después de seis días de incubación en ARS ( $1.4 \times 10^6$  células/esfera). En un trabajo realizado por Valderrama *et al.* (2002), en agua residual industrial, encontraron que la población de *Chlorella vulgaris* en suspensión, alcanzó un valor de  $2 \times 10^6$  células/ml, después de cuatro días de incubación, siendo menor al valor encontrado en este trabajo: con base en estos resultados podemos considerar que el encapsulado, en esferas de alginato, ofrece una protección a la microalga, de compuestos químicos y además de la flora bacteriana presente en el agua, permitiendo su crecimiento.

Por otro lado, González y Bashan (2000) encontraron que el cultivo de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* alcanzó una densidad celular de aproximadamente  $7 \times 10^6$  células/ml después de 9 días de incubación en agua residual sintética y con cultivos en lote, valor mucho mas alto que el reportado en este trabajo. Posteriormente, de-Bashan *et al.* (2002b) registraron un crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense* y cultivada en ARS, de  $3 \times 10^6$  células/ml, después de ocho días de incubación, valor similar al observado en este trabajo, el cual fue de  $3.6 \times 10^6$  células/ml. Esto muestra que al co-inmoviliza la microalga *Chlorella* con la bacteria promotora de crecimiento en plantas, *Azospirillum brasilense* en la misma esfera, da como resultado un incremento de la biomasa cultivada, similar a lo que se da en las plantas terrestres que se inocularon con esta bacteria (de-Bashan y Bashan 2003). Se han propuesto diversos mecanismos de acción que explican el efecto de *Azospirillum* en el crecimiento de las plantas tales como, la actividad hormonal, la fijación de nitrógeno, señales moleculares no definidas que interfieren con el metabolismo de las plantas, producción de nitritos y el incremento en el crecimiento de las raíces (Bashan y Holguín, 1997). La aplicación de hormonas sintéticas o de fitohormonas extraídas de bacterias imitan el efecto positivo de *Azospirillum* en el desarrollo y morfología de las raíces, una de las fitohormonas que *Azospirillum* puede producir es el Ácido Indol Acético (AIA). (Bashan y Holguín, 1997). En un trabajo realizado con *Chlorella vulgaris* por González y Bashan (2000) observaron que era capaz de usar el AIA, cuando éste se adicionó al medio de cultivo. Estos estudios con plantas y con microalgas sobre el efecto de la bacteria en el crecimiento poblacional, son consistentes con los resultados observados en este trabajo, ya que cuando la microalga se encuentra co-inmovilizada con la bacteria, la biomasa microalgal se incrementa, seguramente por la producción de la fitohormona AIA.

Ogbonna *et al.* (2000) realizaron un estudio con *C. sorokiniana*, cultivando la microalga en agua residual sintética y en oscuridad, en donde la microalga mantuvo su crecimiento y su



eficiencia en la eliminación de nutrientes, sin embargo, no existen muchos datos de crecimiento.

Por otro lado, los datos obtenidos en este trabajo, y con *C. sorokiniana*, pueden ser comparados con los trabajos realizados con otras especies de *Chlorella*. En un estudio realizado por Travieso *et al.* (1996) observaron que el crecimiento poblacional de *C. kessleri* fue significativamente mayor cuando se hallaba inmovilizada que cuando está en suspensión. En otro estudio, Semenenko y Rudova (1976) cultivaron *C. pyrenoidosa* en un medio libre de nitrógeno sin que se observara un efecto en el crecimiento de dicha microalga. Orosa *et al.* (2001) cultivaron *C. zofingiensis* en condiciones de ayuno de nitrógeno y alta irradiancia sin que se observara un efecto sobre el crecimiento de dicha microalga. Estos datos confirman que para *Chlorella*, la inmovilización o la co-inmovilización y un ayuno de tres días, no afectan la fisiología de la microalga ni se presenta un efecto negativo en el crecimiento poblacional y, por el contrario, permite incrementar la eficiencia de la biorremediación con microalgas.

La mayoría de las algas pueden utilizar el  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o el  $\text{NH}_4^+$  como fuentes de nitrógeno. El nitrato no es tan abundante en las aguas naturales como las formas de nitrógeno fijado. En general, las algas prefieren el  $\text{NH}_4^+$  que el nitrato, al grado que concentraciones de amonio por arriba de 0.5 a 1  $\mu\text{moles/L}$  inhiben la absorción de  $\text{NO}_3^-$ . Quizá esto sea una forma de conservar energía debido a que el  $\text{NO}_3^-$  debe ser reducido a  $\text{NH}_4^+$  antes de incorporarlo a los aminoácidos (Darley, 1987). Con base en esto, se han realizado diversos trabajos para la eliminación de amonio de las aguas residuales usando microalgas. de-Bashan *et al.* (2002a) reportaron una eliminación de amonio del 93% con *C. vulgaris* co-inmovilizado con *A. brasilense* después de dos días de incubación; en otro trabajo, Valderrama *et al.* (2002) encuentran que la eliminación de amonio, usando un cultivo en suspensión de *C. vulgaris*, incubada en agua residual industrial, fué del 78% después de cinco días de tratamiento. Por su

parte Lau *et al.* (1998) encontraron que *C. vulgaris* inmovilizada en carragenina eliminó el 95% del amonio presente, después de 3 días de incubación en cultivos continuos. Valores similares a los reportados en este trabajo, cuando usamos *C. sorokiniana* co-inmovilizada con *A. brasilense*, eliminando el 100% del amonio a las 48 horas de incubación. Por otro lado *C. vulgaris* resulta tener una eficiencia menor en la eliminación de amonio comparada con los trabajos citados.

En este trabajo, la forma de eliminar los nitratos resulta ser evidente cuando la concentración de amonio presente en el agua residual fue muy baja (menos de 1 mg/L) la microalga usó como fuente de nitrógeno el nitrato del agua. Por otro lado, puede verse que el aumento en la concentración de amonio, arriba de 1 mg/L, se presenta una producción de nitratos, sin embargo el co-inmovilizado de las microalgas con la bacteria resultó ser más eficiente ya que la producción de nitratos no fue tan alta como la que presentó la microalga inmovilizada sola.

Los valores de eliminación de fósforo obtenidos en los co-inmovilizado de *C. vulgaris* con *A. brasilense* y de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* resultan ser más bajos que los reportados por González *et al.* (1997) con cultivos de *C. vulgaris* en suspensión (97%). Lau *et al.* (1998) y Tam y Wong (2000), reportaron una eliminación del 90% para inmovilizados de *C. vulgaris* inmovilizada sola; se sabe incluso que la eliminación de fósforo puede llegar hasta un 70% (Tam *et al.*, 1994).

La eliminación de fósforo en ARS reportada para *C. vulgaris* co-inmovilizada con *P. myrsinacearum* es de 50% (González-Bashan *et al.*, 2000), valor mayor al obtenido en este trabajo para *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* (25%) y el co-inmovilizado de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* (40%). En algunos caso la eliminación puede ser menor, de

acuerdo a los datos obtenidos por González-Bashan *et al.* (2000) en donde, después de cuatro ciclos de prueba la eficiencia en la eliminación de fósforo en ARS, para *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* fue del 33% y para los cultivos de *C. vulgaris* inmovilizada sola, fueron del 20%. El hecho de que en los cultivos de *C. vulgaris* co-inmovilizada con *A. brasilense* no se observe una mayor eliminación, puede deberse a la acumulación de fósforo intracelular, por razones no determinadas aun; sin embargo, se puede sugerir que es el resultado de un intercambio iónico entre el medio y el alginato que impide que el fósforo esté disponible para la microalga, ya que se sabe que el alginato es capaz de absorber en su superficie los iones de fósforo como lo reportaron Tam *et al.* (1994) y Proulx y de la Noüe (1988).

En el co-inmovilizado de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* se presentó una eliminación superior que en los otros cultivos, lo cual puede deberse a que dicha microalga no acumula tanto fósforo, como lo hace *C. vulgaris*, permitiendo de esta forma que asimile el fósforo que se encuentra en el agua de manera constante.

Como consecuencia del ayuno, las microalgas eliminan una mayor cantidad de fósforo debido probablemente a que estas se encuentran bajo condiciones donde existe una deficiencia de fósforo en el medio de ayuno. Darley (1987) propone que la actividad de la fosfatasa alcalina aumenta, en general, de forma dramática (de 10 a 100 veces más), como una estrategia adaptativa evidente ante la limitación de fósforo. Las fosfatasas constituyen un grupo de enzimas que juega un papel importante en la hidrólisis del fósforo orgánico y por ende en el ciclo biogeoquímico de este elemento y en la nutrición de las plantas (Contreras *et al.* 1996). Estas enzimas se encuentran localizadas en la periferia de las células de las algas y de las bacterias y se ha calculado que las fosfatasas disueltas pueden proveer del fósforo inorgánico necesario para el crecimiento de las algas si está presente el fósforo orgánico

(Spijkerman y Coesel, 1998). La mayoría de las microalgas almacenan el exceso de  $\text{PO}_4^{-3}$  como polifosfatos; estos actúan como un reservorio de fósforo que disminuye en las células como una función de la tasa de crecimiento limitada por el fósforo, en forma similar a como disminuye la cuota celular total de este elemento (Darley, 1987). Las plantas mantienen una excelente característica de respuesta bioquímica cuando están en ayuno de fósforo. Las dos principales respuestas a nivel celular al ayuno de fósforo en plantas es la inducción de la fosfatasa ácida o alcalina tanto intra como extra celular y la inducción de transportadores de alta afinidad de fosfatos (Mackay, 2001). El incremento en la actividad de la fosfatasa alcalina puede acelerar la descomposición de moléculas largas de fósforo orgánico disuelto en el medio (Huang *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos en este trabajo reflejan, por un lado, las condiciones de crecimiento de las microalgas y por otro la eliminación de amonio como fuente principal de nitrógeno. Cuando se presenta una escasez de amonio, si bien la asimilación de nitratos no fue tan eficiente como con el amonio, si eliminó una porción de estos. Por otra parte, la asimilación de fósforo con las dos especies de microalgas, muestra que *C. vulgaris* eventualmente podría tener una actividad menor de la fosfatasa alcalina, lo que hace que la asimilación de fósforo después del ayuno no sea tan eficiente; contrario a lo que sucede con *C. sorokiniana*, la cual parece tener una actividad mas alta de la fosfatasa alcalina lo que hace más eficiente a dicha microalga en la asimilación del fósforo, después del ayuno. De esta forma, tenemos un sistema mucho más eficiente en el tratamiento biológico terciario con una eliminación de fósforo en menor tiempo.

## 9. CONCLUSIONES

El crecimiento poblacional de las microalgas se ve favorecido cuando se encuentran co-inmovilizadas con *A. brasilense*, comparado con el crecimiento de las microalgas inmovilizadas solas.

Los sistemas co-inmovilizados son más eficientes en la eliminación de Nitrógeno y Fósforo de las Aguas Residuales Domésticas, comparado con la eliminación observada en los sistemas inmovilizados.

La eliminación de N y P de las ARD es más eficiente en el co-inmovilizado de *C. sorokiniana* y *A. brasilense*, comparado con el co-inmovilizado de *C. vulgaris* y *A. brasilense*.

Parece no existir un efecto evidente en la degradación de las esferas que fueron puestas en Agua Residual Doméstica.

La especie *C. vulgaris* se ve afectada por el ayuno, aun cuando se encuentra co-inmovilizada con *A. brasilense*, comparado con *C. sorokiniana*, la cual mantiene su crecimiento aún después del ayuno.

Los sistemas co-inmovilizados, con ayuno, eliminan en menor tiempo el fósforo del agua residual sintética y son más eficientes al ser comparados con los inmovilizados con ayuno.

## 10. RECOMENDACIONES

En trabajos futuros se deberían realizar estudios relacionados con la eliminación de fósforo usando dos lotes de microalgas puestas en ayuno y co-inmovilizadas con *Azospirillum brasilense* cultivados en agua residual doméstica.

Buscar diversas alternativas que puedan incrementar la eficiencia en la eliminación de fósforo, cambiando algunos parámetros como la concentración de nitrógeno en el medio.

Realizar pruebas con tiempos de ayuno menores a tres días podrían mejorar la eliminación de fósforo de las aguas residuales.

Profundizar más en la interacción de la microalga con la bacteria cuando se encuentran co-inmovilizados, así como los cambios fisiológicos que se pueden presentar tanto en la bacteria como en la microalga.

El uso de las esferas una vez terminado el tratamiento de las aguas como una alternativa de biofertilizante podría ser estudiado.

## 11. LITERATURA CITADA

1. **Aitchison, P.A. y Butt, V. S.** (1973). The relation between the synthesis of organic polyphosphate and phosphate uptake by *Chlorella vulgaris*. *J. Exp. Bot.* **24**, 497-510
2. **APHA, AWWA, WPCF** (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater. 17th ed. Madrid: Diaz de Santos. 1105 p.

3. **Atlas, R. M.** (1990) Microbiología, fundamentos y aplicaciones. Ed. Continental. México. 887 pp.
4. **Baker , K. H. y Herson, D. S.** (1994) Bioremediation. Ed. McGraw-Hill USA. 375 pp.
5. **Bashan, Y. y Holguín, G.** (1997). *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996) *Can. J. Microbiol.* **43**, 103-121.
6. **Bashan, Y.y Holguín, G.** (1998). Proposal for the division of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* **30**, 1225-1228.
7. **Bashan, Y.** (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 1089-1098.
8. **Carrasquillo M. y Morillo J.** (1994). Contaminación industrial en Colombia. Departamento Nacional de Planeación-Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. Bogotá, Colombia. Pp93-119.
9. **Cassidy M. B., Lee H. y Trevors J. T.** (1996). Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *J. Ind. Microbiol* **16**, 79-101.
10. **Chevalier, P. y de la Noüe, J.** (1985a). Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewater. *Biotechnol. Lett.* **7**, 395-400.
11. **Chevalier P. y de la Noüe J.** (1985b). Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzy. Microbial Technol* **7**, 621-624.
12. **Darley, M.W.** (1987). Biología de las algas. Un enfoque fisiológico. Ed. Limusa. Primera edición. México
13. **de-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernández, J.P. y Bashan, Y.** (2002a). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella*

- vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research* 36: 2941-2948
- 14. de-Bashan L.E., Hernandez J.-P., y Bashan Y.** (2003). Utilidad de las bacterias de uso agrícola, para el crecimiento de algas empleadas en el tratamiento de aguas residuales. *Gaceta Biomédica* 8 (4): 8-9.
- 15. de-Bashan, L.E., Moreno, M. Hernández, J.-P., y Bashan, Y.** (2001). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research* 36: 2941-2948
- 16. de-Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K., y Bustillos, J. J..** (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalga *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 48: 514-521.
- 17. deBashan, L. E., y Bashan, Y.** 2003. Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales (Microalgae growth-promoting bacteria: a novel approach in wastewater treatment). *Revista Colombiana de Biotecnología* 5: 85-90.
- 15. de la Noüe, J. y De Pauw, N.** (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.* 6: 725-770.
- 16. de la Noüe J., Laliberte G. y Proulx D.** (1992). Algae and wastewater *J. Appl. Phycol.* 4: 247-254.
- 17. Diccionario de la Real Academia Española.** (2001) Vigésima segunda edición. Editorial Larousse. España 1614 pp
- 18. Diccionario de biología.** (2000) Edición 2000 Editorial Norma. Colombia 342 pp



- 19. Espitia, S.** (1999) Biotecnología ambiental, tratamiento anaerobio de aguas residuales. Segundo Congreso Nacional de Biotecnología "Tratamiento Biológico de Aguas Residuales" Santafé de Bogotá Colombia
- 20. Garza-Almanza, V., Fernández-Salas, I., Badii M. y Hauad-Marroquin, L.** (1999). Generación, tratamiento y reuso de aguas residuales en América Latina. Biodiversidad. Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ. México. **1**: 43-49
- 21. Glick, B.R.** (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* **41**: 109-117.
- 22. González, L. E., Cañizares, R. O. y Baena, S.** (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Biores. Technol.* **60**: 259-262.
- 23. González, L.E. y Bashan, Y.** (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when co-immobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1527-1531.
- 24. González-Bashan, L. E., Lebsky, V. K., Hernández, J. P., Bustillos, J. J. y Bashan, Y.** (2000). Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when co-immobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Can. J. Microbiol.* **46**: 653-659.
- 25. Guoan, Y., Jianyi, Y. Y. y Yuanxiang, W.** (1996). The effects of pH and temperature on orthophosphate removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Lett.* **18**: 893-896.
- 26. Hall, D.O. y Rao, K.K.** (1990). Immobilized microalgal systems. *British Phycological Journal.* **25**: 89-97.
- 27. Hartmann, A. y Zimmer, W.** (1994). Physiology of *Azospirillum* sp. 15-39. En Y. Okon (ed), *Azospirillum /plant associations*. CRC Press, Boca Raton, Fla.

- 28. Huang, B., Huang, S., Weng, Y. y Hong, H.** (2000). Effect of dissolved phosphorus on alkaline phosphatase activity in marine microalgae. *Acta oceanologica sinica*, **19**: (2) 29-35
- 29. Jeanjean, R.** (1973). The relationship between the rate of phosphate absorption and protein synthesis during phosphate starvation in *Chlorella pyrenoidosa*. *Febs. lett.* **32** (1): 149-151.
- 30. Kaplan, D., Richmond, A. E., Dubinsky, Z. y Aaronson, S.** (1986). Algal nutrition. En: CRC Handbook of microalgal mass culture. (Ed) Richmond A. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla.
- 31. Khang, Y.H., Shankar, H. y Senatore, F.** (1988). Enhanced beta-lactam antibiotic production by coimmobilization of fungus and algae. *Biotechnol. Lett.* **10**: 867-872.
- 32. Kloepper, Y. W., Leong, J., Teintze, M., and Schroth, M.N.** (1980). Enhanced plant grown by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286**: 885-886.
- 33. Lau P.S., Tam N.F.Y. and Wong Y.S.** (1998). Operational optimization of batchwise nutrient removal from wastewater by carrageenan immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Science and Technology* **38** (1): 185-192.
- 34. Lebsky, V. K., González-Bashan, L. E. and Bashan, Y.** (2001). Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalgae *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* **47**: 1-8.
- 35. Lippi, D., Cacciari, I. y Pietrosanti, W.** (1992). Interactions between *Azospirillum* and *Arthrobacter* in diazotrophic mixed culture. *Symbiosis* **13**: 107-114.
- 36. Mackay, A.** (2001) Molecular characterization of a potato gene related to plant purple acid phosphatases, Master thesis, Biology department, Queen's University, Kingston, Ontario Canada, 35 pp.

- 37. Metcalf y Eddy Inc.** (1995) Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. Ed. Mc. Graw-Hill. España. 3 Volúmenes.
- 38. Ogbonna, J.C., Yoshisawa, H. and Tanaka, H.** (2000). Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied Phycology*.**12**: 277-284.
- 39. O'reilly, A. M. and Scott, J.A.** (1995). Defined co immobilization of mixed microorganism cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **17**: 636-646.
- 40. Orosa, M., Valero, J.E., Herrero, C. y Abalde, J.** (2001). Comparison of the accumulation of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* and other green microalgae under N-starvation and high light conditions. *Biotechnol. Lett.* **23**: 1079-1085
- 41. Oswald, W.J.** (1988). Microalgae and wastewater treatment. En; Microbial biotechnology. Borowitzka, M.A. and Borowitzka, L.J. (eds). Cambridge University Press. Pp. 691-707.
- 42. Oswald, W.J. y Gotaas H.B.,** (1957). Photosynthesis in sewage treatment. *Trans. Am. Soc. Civ. Eng.* **122**: 73-105.
- 43. Pelczar, M. J., Reid, R. D. Y Chain, E. C. S.** (1982) Microbiología. 4ª. Edición. McGraw-Hill Ed. México. 826 pp.
- 44. Percy, R.W.** (1991). Radiation and Light Measurements. In: R.W. Percy, J.R. Ehleringer, H.A. Mooney and P.W. Rundel (Eds.). Plant Physiological Ecology. Field Methods and Instrumentation. Chapman and Hall, London. pp. 97-116.
- 45. Proulx D. y de la Noue J.** (1988). Removal of macronutrients from wastewater by immobilized microalgae. *Bioreactor immobilized Enzymes and Cells: Fundaments and Aplications. Elsevier Applied Scinece.* New York. Pp. 301-310.

- 46. Semenenko, V.E. y Rudova, T.S.** (1976). On the mechanism of biosynthesis reorientation in *Chlorella* under the influence of factors limiting cellular division. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **49**: 185-198
- 47. Spijkerman, E. y Coesel, P. F.M.** (1998) Alkaline phosphatase activity in two planktonic desmid species and the possible role of an extracellular envelope. *Freshwater Biology* **39**: 101-111
- 48. Tam, N.F.Y., Lau, P.S. y Wong, Y.S.** (1994). Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Science and Technology* **30**: 369-374
- 49. Tam, N. F. Y y Wong Y. S.** (2000). Effect of immobilized microalga bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollution* **107**: 145-151.
- 50. Tang, N.P.Y., Vincent, W.F., Proulx, D., Lessard, P., y de la Noüe, J.** (1997). Polar cyanobacteria versus green algae for tertiary wastewater treatment in cool climates. *J. Appl. Phycol.* **9**: 371-381.
- 51. Traviesa, L., Benitez, F., Weiland, P., Sanchez, E., Dupeyron, R. y Dominguez, A.R.** (1996). Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresour. Technol* **55**: 181-186
- 52. Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodríguez, C.M., de-Bashan, L.E. y Bashan, Y.** (2002). Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research* **36**: 4185-4192.