



TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA

***“Capacidad de remoción de amonio y ortofosfato, a gran
escala, de dos especies de microalgas, en aguas
residuales municipales”***

P R E S E N T A

Diego Antonio Valencia Soto

TUTOR:

M. en B. Mónica C. Rodríguez Palacio
Laboratorio de Ficología Aplicada, UAM-I

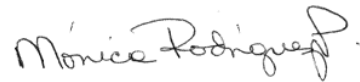
CO-TUTOR:

Dr. Ricardo Vázquez Perales
Programa Interdisciplinario del Medio Ambiente, UIA Puebla

México, D.F., Julio de 2012

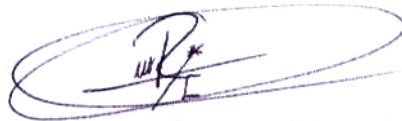
**DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA**

COMITÉ TUTORAL:



M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio

Laboratorio de Fisiología Aplicada, UAM-I



Dr. Ricardo Vázquez Perales

Programa Interdisciplinario del Medio Ambiente, UIA Puebla

LECTOR DE TESIS:



M. en C. Cruz Lozano Ramírez

Laboratorio de Fisiología Aplicada, UAM-I

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a las personas que han creído en mí. Aquellos que sin cuestionar mis fines, me han dado su apoyo. También a aquellos que lo han hecho con el único fin de ayudarme a tomar la mejor decisión. Especialmente lo dedico, y agradezco, a mi madre por su amor, confianza e interminable apoyo y consejo.

Agradezco a mis amigos del laboratorio de psicología de la UAM-I, igualmente a mis compañeros y amigos de la UIA Puebla, que siempre hicieron que cada día fuera más divertido que el anterior, logrando que mi estancia y trabajo en el laboratorio fuera una tarea más fácil y agradable. También por el apoyo brindado ante cualquier dificultad técnica que pudo surgir. Destacando a su vez el apoyo de mi amiga Lolita, por su tiempo, compromiso y profesionalismo con que me ayudo a realizar los análisis químicos, pues su aporte fue invaluable.

Agradecimiento a parte para mis asesores, Mony y Ricardo, por su amistad, el tiempo invertido y su disposición para resolver juntos los retos que se fueron presentando durante mi estancia en la especialidad. También por las llamadas de atención y regaños, que cabe decir, fueron a tiempo y me ayudaron a seguir adelante.

Debo agradecer también a la UAM-I y UIA Puebla, por permitirme trabajar en sus instalaciones y llevar a buen término mi especialidad. Así como a la AESM (Asociación de Estudiantes Sudcalifornianos en México) por darme un techo, alimentación y buenas amistades durante este periodo de tiempo.

Valoro por igual la colaboración de todos, pues no solo me ayudaron a aumentar mis conocimientos, y dejar de ser un poco menos ignorante, sino también me ayudaron a crecer como persona, y al final, eso es lo que más valoro.

A todos ustedes: GRACIAS.

“Bien veo en qué consiste; mi espíritu es un vagabundo que se complace en andar extraviado y que no quiere sufrir que se le retenga en los justos límites de la verdad”

René Descartes

RESUMEN

Las microalgas, desde hace décadas han sido objeto de numerosas investigaciones. Las cuales han ido arrojando cada vez más datos sobre su gran potencial para la solución de problemas de gran impacto, por ejemplo, generación de energías alternativas, limpias y renovables, alimentación humana y tratamiento de aguas residuales, entre otras.

En este trabajo se evaluó la capacidad de remoción de nutrientes del agua residual municipal, particularmente de amonio y ortofosfato. Para esto se trabajó con dos especies microalgales: *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella* sp. La primera, proporcionada por el Laboratorio de Fisiología Aplicada, UAM-Iztapalapa; la segunda, aislada del lago artificial de la Universidad Iberoamericana Puebla. Los experimentos fueron realizados en tres volúmenes diferentes: 3, 15 y 60L, con agua residual municipal esterilizada por luz ultra violeta y como control agua limpia con fertilizante foliar (Bayfoland Forte). Cada cultivo sirvió como inóculo para iniciar el siguiente escalamiento de volumen. Los cultivos de 3 y 15L se llevaron a cabo al interior del laboratorio en condiciones semi-controladas, mientras que, los cultivos de 60L se realizaron en condiciones ambientales semi-controladas en un invernadero. El consumo o remoción de nutrientes se midió mediante toma de muestras al inicio, a la mitad y al final de los cultivos.

La especie *S. quadricauda* presentó remociones de amonio del 71, 96 y 67%, en cultivos de 3, 15 y 60L; mientras que con la especie *Chlorella* sp. la remoción fue de 30, 18 y 6%, en los mismos volúmenes de cultivo. La remoción de ortofosfato para *S. quadricauda* fue de 71, 80 y 99%, en cultivos de 3, 15 y 60L; y de 74, 97 y 97%, en los mismos volúmenes de cultivo para *Chlorella* sp.

De acuerdo con los resultados, la remoción general y eficiente de nutrientes, la realizó la especie *S. quadricauda*. Sin embargo, *Chlorella* sp. se destacó en la remoción de ortofosfato. Por otro lado, el sistema de cultivo más eficiente para la remoción resultó ser el de 60L pues en él se produce un mayor número de células potenciando la remoción. En este caso, *Chlorella* sp. se destacó en la producción de biomasa (cel/ml) y la remoción de ortofosfato en tiempos más cortos que *S. quadricauda*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Disponibilidad del agua.....	1
1.2. Problemática del N y P.....	1
1.3. Depuración.....	3
1.4. Fitorremediación.....	3
2. ANTECEDENTES	6
3. JUSTIFICACIÓN	9
4. OBJETIVOS	10
4.1. Objetivo general.....	10
4.2. Objetivos específicos.....	11
5. METODOLOGÍA	11
5.1. Aislamiento con pipeta pasteur.....	11
5.2. Pruebas con <i>Scenedesmus quadricauda</i>	11
5.2.1. Conteo celular.....	12
5.3. Preparación de material.....	12
5.4. Esterilización de agua.....	12
5.4.1. Hipoclorito de sodio.....	12
5.4.2. Autoclave.....	13
5.4.3 Luz UV.....	13
5.5. Cultivos microalgales en agua residual.....	13
5.5.1. Montaje de cultivos.....	13
5.5.1.1. Volúmen de 3L.....	13
5.5.1.2. Volúmen de 15L.....	14
5.5.1.3. Volúmen de 60L.....	14
5.5.2. Escalamientos.....	15
5.6. Crecimiento celular.....	15
5.6.1. Toma de muestra.....	15
5.7. Parámetros de cultivo.....	15
5.7.1. Condiciones de cultivo.....	15
5.7.1.1. Laboratorio.....	15
5.7.1.2. Planta piloto (exterior).....	15
5.8. Análisis de agua residual.....	16

5.8.1. Amonio (NH_4^+).....	16
5.8.1.1. Curva de calibración.....	16
5.8.1.2. Rango medio.....	16
5.8.2. Ortofosfato (PO_4^{-3}).....	17
5.8.2.1. Curva de calibración.....	17
5.8.2.2. Rango medio y Rango Alto.....	17
5.8.3. Demanda química de oxígeno (DQO).....	18
5.8.3.1. Rango medio.....	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1. Aislamiento con pipeta pasteur.....	19
6.2. Prueba de adaptación de <i>S. quadricauda</i> en agua residual municipal, en volúmenes de 250ml.....	20
6.3. Características del agua residual de la planta de tratamiento de la UIA Puebla.....	21
6.4. Crecimiento de <i>S. quadricauda</i> en agua residual y controles (3, 15 y 60l).....	22
6.5. Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. en agua residual y controles (3, 15 y 60l).....	28
7. DISCUSIÓN.....	35
8. CONCLUSIONES.....	40
9. REFERENCIAS.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes en la investigación del cultivo de microalgas en agua residual como etapa terciaria de tratamiento.....	6
Tabla 2. Parámetros para la realización de la curva de calibración de amonio (NH_4^+).....	16
Tabla 3. Parámetros para la realización de la curva de calibración de ortofosfato (PO_4^{3-}).....	17
Tabla 4. Microalgas aisladas del la laguna de oxidación de la UIA Puebla.....	19
Tabla 5. Concentración celular de de <i>S. quadricauda</i> en 250ml, con agua residual esterilizada (ARE).....	20
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del agua esterilizada, de la laguna de oxidación de la UIA Puebla.....	21
Tabla 7. Concentraciones iniciales de nutrientes del agua residual esterilizada recolectada del la laguna de oxidación de la UIA Puebla.....	21
Tabla 8. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>S. quadricauda</i> en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). $25.0\pm 5^\circ\text{C}$	23
Tabla 9. Remoción de nutrientes de <i>S. quadricauda</i> en agua residual esterilizada (ARE), en 3L.....	23
Tabla 10. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>S. quadricauda</i> en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). $24.0\pm 1^\circ\text{C}$	24
Tabla 11. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>S. quadricauda</i> en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C), en fase estacionaria. $24.0\pm 1^\circ\text{C}$	25
Tabla 12. Remoción de nutrientes de <i>S. quadricauda</i> en agua residual esterilizada (ARE), en 15L.....	25
Tabla 13. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>S. quadricauda</i> en 60L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). C hasta fase estacionaria. $5-36^\circ\text{C}$	26
Tabla 14. Remoción de nutrientes de <i>S. quadricauda</i> en agua residual esterilizada (ARE), en 60L.....	27
Tabla 15. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>Chlorella</i> sp. en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). $25.0\pm 3^\circ\text{C}$	29
Tabla 16. Remoción de nutrientes de <i>Chlorella</i> sp. en agua residual esterilizada (ARE), en 3L.....	29

Tabla 17. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>Chlorella</i> sp. en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). 25.0±3°C.....	30
Tabla 18. Remoción de nutrientes de <i>Chlorella</i> sp. en agua residual esterilizada (ARE), en 15L.....	31
Tabla 19. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de <i>Chlorella</i> sp. en 60L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). 15-40°C.....	32
Tabla 20. Remoción de nutrientes de <i>Chlorella</i> sp. en agua residual esterilizada (ARE), en 60L.....	33
Tabla 21. Cuadro comparativo de la producción de biomasa y la eficiencia de remoción de nutrientes (amonio y ortofosfato) de <i>S. quadricauda</i> y <i>Chlorella</i> sp. en ARE.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Simbiosis microalga-bacteria en el tratamiento de aguas residuales.....	4
Figura 2. Colecta de muestra de agua de la laguna de oxidación de la UIA Puebla.....	11
Figura 3. Sistema casero de esterilización con luz UV.....	13
Figura 4. Cultivos de 60L, de <i>S. quadricauda</i> , con agua residual esterilizada y controles...	14
Figura 5. Curva de calibración para amonio (NH_4^+).....	16
Figura 6. Curva de calibración para amonio (PO_4^{-3}).....	17
Figura 7. Curvas de crecimiento de <i>S. quadricauda</i> en 250ml, en agua residual esterilizada (ARE).....	20
Figura 8. Curva de crecimiento de <i>S. quadricauda</i> en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $25.0\pm 5^\circ\text{C}$	22
Figura 9. Curvas de crecimiento, promedio, de <i>S. quadricauda</i> en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $24.0\pm 1^\circ\text{C}$	23
Figura 10. Curvas de crecimiento de <i>S. quadricauda</i> en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar), en fase estacionaria. $24.0\pm 1^\circ\text{C}$	24
Figura 11. Curvas de crecimiento, de <i>S. quadricauda</i> en agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar), en 60L. $5-36^\circ\text{C}$	26
Figura 12. Curvas de crecimiento, de <i>S. quadricauda</i> en agua blanda y fertilizante foliar, en fase estacionaria, en 60L. $5-36^\circ\text{C}$	27
Figura 13. Imagen de <i>S. quadricauda</i> tomada con microscopio óptico a 40X, correspondiente a cultivos con ARE.	28
Figura 14. Curvas de crecimiento, promedio, de <i>Chlorella</i> sp. en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $25.0\pm 3^\circ\text{C}$	28
Figura 15. Curvas de crecimiento, promedio, de <i>Chlorella</i> sp. en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $25.0\pm 3^\circ\text{C}$	30
Figura 16. Curvas de crecimiento, de <i>Chlorella</i> sp. en agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar), en 60L. $15-38^\circ\text{C}$	31

Figura 17. Curvas de crecimiento, de <i>Chlorella</i> sp. en ARE, hasta fase estacionaria, en 60L. 13-40°C.....	32
Figura 18. Imagen de <i>Chlorella</i> sp. tomada con microscopio óptico a 40X, correspondiente a cultivos de ARE.....	33

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Disponibilidad del agua

El agua es un recurso natural, vital. Juega un papel principal en múltiples actividades industriales, higiénicas y recreativas. Si bien es un recurso renovable, la variedad de usos que el hombre le da, a menudo transforma este vital líquido en un recurso inutilizable, por el riesgo que representa para la salud y el ambiente. Por otro lado, la demanda global del agua sigue aumentando, principalmente como causa del aumento poblacional y las actividades socioeconómicas, por ello, una de las opciones para mejorar la disponibilidad del vital líquido, es el tratamiento de las aguas residuales, con el fin de obtener efluentes reusables.

En el ámbito nacional, la distribución de los recursos hídricos es muy desigual. Mientras el Sureste mexicano tiene una disponibilidad natural de $13,097\text{m}^3/(\text{hab} \cdot \text{año})$, el resto del país tiene sólo un promedio de $1,734\text{m}^3/(\text{hab} \cdot \text{año})$.

El 69% del agua disponible se encuentra en regiones donde vive sólo el 23% de la población, y se genera el 13% del producto interno bruto, PIB, mientras que el 31% restante, se encuentra en regiones donde se concentra el 77% de la población y se genera el 87% del PIB, según datos del INEGI [1]. Existe, por tanto una considerable presión sobre los recursos hídricos en amplias regiones de México, más aún, la concentración de la población en áreas metropolitanas conduce localmente a fuertes presiones sobre los recursos hídricos, como en el caso del Valle de México [2].

En términos de las aguas residuales municipales, en 2008 se generaron en México $235.8\text{m}^3/\text{s}$, de las cuales se colectaron $208\text{m}^3/\text{s}$. En el mismo año, las 1,833 plantas municipales en operación dieron tratamiento a $83.6\text{m}^3/\text{s}$, que representan 40.2% de los $208\text{m}^3/\text{s}$ recolectados en los sistemas de alcantarillado. Aunque en los últimos 11 años el volumen de agua tratada casi se ha triplicado, 61.7% del caudal recolectado aún es depositado en los cuerpos receptores sin tratamiento alguno [1]. Estas prácticas, provocan efectos negativos, tales como [3]:

- a) aumenta el consumo del oxígeno disuelto que tiene el cauce por descomposición de la materia orgánica y compuestos amoniacales del agua residual;
- b) generación de malos olores por agotamiento del oxígeno disuelto en el cauce;
- c) fomento del crecimiento de grandes cantidades de microorganismos entre los que pueden haber elevado número de patógenos;
- d) contaminación por compuestos químicos tóxicos o inhibidores de otros seres vivos (dependiendo de los vertidos industriales);
- e) aumenta la eutroficación por las grandes cantidades de fósforo (P) y nitrógeno (N).

1.2. Problemática del N y P

Debido al efecto perjudicial que causan el exceso de N y P, el término *eutroficación*, pasó de ser estudiado como un proceso natural para conocer el transcurso del “envejecimiento” de los lagos inducido por procesos autóctonos [4], a ser utilizado para definir el fenómeno provocado por los vertidos de los desechos de actividades humanas (*eutroficación cultural* o simplemente *eutroficación*); por lo que la eutroficación inicialmente se definió como “el abastecimiento excesivo de los nutrientes N y P a los cuerpos de agua, con el consecuente

crecimiento acelerado de microalgas, (y bacterias) que puede producir la muerte de peces al despojarlos del oxígeno que necesitan para vivir” [5].

En la composición de las aguas residuales tratadas, el N y el P son los principales nutrientes de importancia, por ser causantes de la eutroficación. Por su parte, el N minimiza la acción desinfectante del cloro, lo que implica un riesgo para la salud pública, disminuyendo así la posibilidad de reutilizar esta agua [6].

En México, la mayoría de las plantas para tratamiento biológico de aguas residuales operan solo removiendo sólidos suspendidos y sustratos carbonosos del agua de desecho, permitiendo que los de P y N, permanezcan intactos. El resultado ha sido un creciente deterioro de las aguas superficiales y subterráneas que constituyen las fuentes principales de abastecimiento de agua potable [7]. Este es el caso de la costa de Puerto Escondido y Puerto Ángel, en Oaxaca [8] y de las costas de Yucatán [9], donde el vertido de efluentes con un tratamiento ineficiente o nulo, ha sido la causa de la eutroficación de estos cuerpos de agua. Los efectos de la eutroficación se han asociado también con enfermedades como el cólera y la ciguatera por el consumo de mariscos y peces contaminados por toxinas del fitoplancton [10].

Las fuentes de N en el agua residual urbana son principalmente de excrementos humanos, de los que el 75% es urea y el resto N orgánico [11] procedente de la materia celular, donde se encuentra principalmente como proteínas y urea [12].

El N total presente en las aguas residuales puede clasificarse en tres grandes grupos: amoniacal (NH_3), oxidado (NO_2^- y NO_3^-) y orgánico (proteínas, ácidos nucleicos, urea, ácido úrico, aminas, bases orgánicas, ácido murámico y azúcares aminados). De todas estas formas las que tienen una mayor importancia desde el punto de vista de la depuración de aguas son el NH_3 y el N orgánico (proteína y urea) [12].

La concentración de N orgánico comúnmente encontrada en el agua residual municipal, varía entre 5 y 35mg/L [12], pudiendo observarse una disminución en su concentración con el paso del tiempo debido a su transformación en NH_3 por acción microbiana. Mientras que la concentración del NH_3 en esta agua, oscila entre 10 y 50mg/L [12].

El P en las aguas residuales proviene principalmente de los desechos humanos, actividades industriales, detergentes sintéticos y productos de limpieza [12]. El fósforo total presente puede dividirse en las siguientes fracciones [13,14]:

- a) Ortofosfato inorgánico soluble: pertenecen PO_4^{-3} y sus formas protonadas (HPO_4^{-2} , H_2PO_4^- y H_3PO_4). Los compuestos de este grupo se encuentran disponibles para el metabolismo biológico. Su concentración en el agua urbana es de 7mg/L.
- b) Fosfatos condensados o polifosfato inorgánico soluble: estos compuestos por hidrólisis se transforman en ortofosfatos. Su concentración es de 3mg/L, apareciendo en el agua residual debido a su presencia en algunos productos de limpieza.
- c) Fósforo orgánico, soluble y en suspensión: tienen poca importancia en aguas residuales urbanas, donde su concentración total es de 1mg/L. Están presentes en el agua residual asociados a residuos de origen tanto animal como alimenticio.

1.3. Depuración

Diferentes métodos de tratamiento se han usado con la finalidad de eliminar la materia orgánica y la carga excesiva de nutrientes, principalmente N y P, con el fin de mejorar la calidad del agua residual tratada. Si bien, todos los tratamientos tienen en el mismo objetivo, en muchos casos el tipo de tratamiento a aplicar se verá determinado por la calidad exigida al efluente y los condicionantes económicos y ambientales [15].

En México y países industrializados, el método estándar para el tratamiento del agua residual es de lodos activados [16]. Por su compactibilidad y por la calidad del efluente, el proceso de lodos activados resulta especialmente adecuado para plantas en zonas urbanas. Sin embargo, los costos de inversión y operación son altos, derivados de los grandes requerimientos de energía eléctrica. Los procesos que requieren alta energía incluyen el tratamiento biológico de lodos activados, bombeo y equipos para el secado y deshidratado de los lodos. Además, el proceso de eliminación del N, añade durante la nitrificación, del 20 al 30% más a los costos en el sistema de lodos activados [17]. Otro de los costos económico-ambientales es el uso de cloro como desinfectante. El uso de cloro presenta, entre otras, las siguientes desventajas: el cloro residual, aun a bajas concentraciones es tóxico a los organismos acuáticos; oxida ciertos tipos de materia orgánica generando compuestos más peligrosos (tales como los metanos trihalogenados) y todas las formas de cloro son muy corrosivas y tóxicas [18].

Aunado a esto, se genera un impacto ambiental considerable, derivado de las emisiones de gases de efecto invernadero (CO₂) asociadas a la generación eléctrica necesaria para accionar los sistemas de aireación y recirculación [15].

1.4. Fitorremediación

Una mejor aproximación que las tecnologías convencionales, para el tratamiento de los recursos naturales es la biorremediación, la cual es una alternativa mucho más económica, de mayor facilidad de aplicación, tecnológicamente más simple y de mayor aceptación por la opinión pública [19].

Una especie de biorremediación, que desde hace varios años ha llamado la atención, es la fitorremediación de aguas residuales. Esta puede ser definida en un sentido amplio como: el uso de macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, xenobióticos y CO₂ del agua residual [20].

El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es una vieja idea, y muchas investigaciones y técnicas han sido desarrolladas para aprovechar su rápido crecimiento y su capacidad para remover nutrientes. Hace ya más de 50 años, que Caldwell (1946), y más tarde Oswald (1953), sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y producción de proteína simultáneamente [21].

En la actualidad, son bien conocidas las ventajas que el uso de microalgas ofrece para el tratamiento de aguas residuales y que no tienen las tecnologías actuales de tratamiento. Por ejemplo, se ha demostrado que es una forma más rentable para reducir la demanda bioquímica de oxígeno, los agentes patógenos, y el N y P de lodos activados [22].

En cuanto al consumo de nutrientes, el N es el segundo más importante para las microalgas, ya que abarca más del 10% de la biomasa [23]. Las formas del N que prefieren

las microalgas son el amonio (NH_4^+) y NO_3^- [24]. Además de estos compuestos del N, la urea (NH_2CONH_2) y NO_2^- se pueden utilizar como fuentes de N [23]. Como se vio antes, todas estas son las principales formas de N presentes en los efluentes de aguas residuales. El P es otro macronutriente esencial para el crecimiento de las microalgas, este es asimilado como PO_4^{3-} . Las microalgas son capaces de asimilar el P en exceso, que se almacena dentro de las células en forma de gránulos de polifosfatos, conocidos como "volutin" [25].

Por otro lado, las microalgas son capaces de proporcionar, a través de la fotosíntesis, el oxígeno necesario para sustentar a las bacterias aerobias durante la degradación de la materia orgánica [26], lo que se traduce en una disminución de los costos en energía, derivados de la inyección mecánica de oxígeno en los procesos convencionales. El impacto al ambiente también se reduce; alrededor de 1Kg de DBO (demanda bioquímica de oxígeno) removido en un proceso de lodos activados, requiere 1kWh de electricidad para la aireación, lo que produce 1Kg de CO_2 de origen fósil de la generación de energía. Por el contrario, 1Kg de DBO removido con oxigenación fotosintética no requiere insumos de energía y produce biomasa microalgal suficiente para generar metano que puede producir 1kWh de energía eléctrica [27].

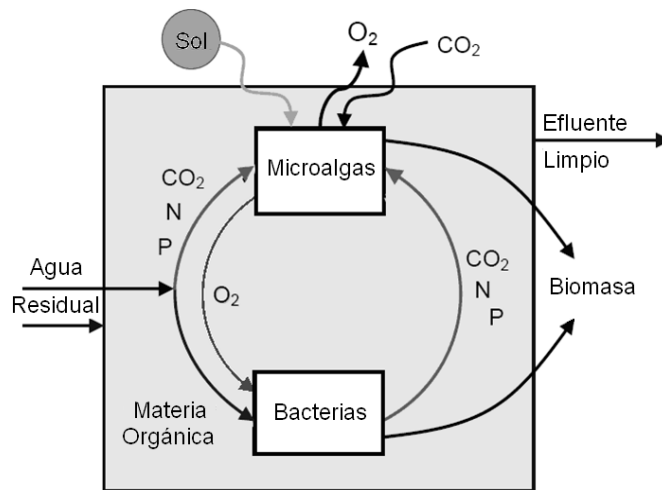


Figura 1. Simbiosis microalga-bacteria en el tratamiento de aguas residuales [28].

Otras de sus bondades, es la capacidad que tienen para llevar a cabo la biorremoción de metales pesados, altamente tóxicos, por incorporación a la pared celular [29].

El proceso integral de tratamiento de aguas residuales usando cultivos de microalgas, presenta ventajas tan importantes como son: el mejoramiento de la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético con el aprovechamiento de nutrientes que estaban siendo desechados y que son incorporados a la biomasa; la cual puede llegar a tener un alto valor comercial. Esta biomasa según su composición química, puede convertirse en fuente productora de fertilizantes, alimentos animales (avicultura, ganado porcino, ganado vacuno y acuicultura), energía, además de otras aplicaciones en la industria química, biomedicina y farmacología [30,31].

Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como algunas especies del grupo de las cianobacterias, se han usado en el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, destacando las provenientes de plantas de tratamiento convencionales [32,33], de origen industrial [34] urbano [35] y las derivadas de excretas animales [36,37].

A pesar de todas las ventajas que ofrece la ficorremediación para mejorar la calidad de los efluentes, la eficiencia de este proceso, depende de varios factores que afectan la composición de la biomasa restringiendo las aplicaciones, tales como: tipo de efluente (doméstico, agrícola e industrial), profundidad de los estanques y de los mecanismos de agitación, temperatura, intensidad luminosa, contaminantes (organismos depredadores), entre otras [21].

Además, de la dificultad para cosechar la biomasa producida de esta manera [28]. Por lo que, queda mucho trabajo por hacer para mejorar el cultivo de microalgas en el tratamiento de aguas residuales y para el aprovechamiento de la biomasa, pues el potencial de las microalgas en la remediación de aguas residuales es mucho más amplio en su alcance que su función actual.

2. ANTECEDENTES

La investigación sobre el uso de microalgas para la depuración de aguas residuales ha sido desarrollada desde hace ya más de cinco décadas. Uno de los pioneros en este campo fue el doctor William Oswald y otros colaboradores, quienes desde 1953, estudiaban el papel que desarrollaban las microalgas en las lagunas de oxidación [26]. A partir de entonces, la investigación en este campo se ha incrementado y muchos trabajos al respecto han sido publicados:

Tabla 1. Antecedentes en la investigación del cultivo de microalgas en agua residual como tratamiento terciario.

Artículo	Especie estudiada	Condiciones y sistema de cultivo	% de remoción de nutrientes
<i>Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility</i> [38].	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>C. vulgaris</i> es nativa del efluente Cultivos en efluente sin tratar: - Escala de laboratorio (2L) - Escala piloto (1000L) a cielo abierto Cultivos con sólidos de efluente tratado: - Escala piloto (1000L)	Efluente sin tratar: * Escala de laboratorio: - 80% de amonio - 94% de fosfatos * Escala piloto: - 82% de amonio - 99% de fosfatos Sólidos de efluente tratado: * Escala piloto: - 29% de amonio - 99% de fosfatos
<i>Producción de biomasa de la microalga Scenedesmus sp. utilizando aguas residuales de pescadería</i> [39].	<i>Scenedesmus</i> sp.	El volumen de cultivo: 150L a cielo abierto No se controlan parámetros Cultivo control con medio Nitrofoska Foliar (5ml/L, en agua potable) Cultivos a cielo abierto en tanques de asbesto de 600L	Nitrógeno amoniacal: - Agua residual de pescadería: 100% de remoción. - Control: 100% de remoción. Fosfatos (PO ₄): - Agua residual de pescadería: 77.54% de remoción. Control: 97.64% de remoción.
<i>Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae Chlorella vulgaris and Scenedesmus dimorphus</i> [34].	<i>Chlorella vulgaris</i> <i>Scenedesmus dimorphus</i>	Microalgas aisladas de una laguna de oxidación Medio de cultivo: agua residual de industria lechera y de granja de cerdos. Cultivos en birreactores cilíndricos de vidrio (2L) <i>C. vulgaris</i> cultivada también en un birreactor triangular (30L) Experimentos por triplicado (216h de duración)	Birreactores cilíndricos: - Amonio (NH ₃): 90% (aprox.) para ambas especies - Fosfatos: 55% para ambas especies Birreactores triangulares (solo <i>C. vulgaris</i>): - Amonio (NH ₃): 98% (aprox.) - Fosfatos: no hubo remoción

<p>Crecimiento de <i>Scenedesmus quadricauda</i> en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina [40].</p>	<p><i>Scenedesmus quadricauda</i></p>	<p><i>Scenedesmus quadricauda</i> obtenida de un cepario</p> <p>Medio: agua residual doméstica cruda (filtrada)</p> <p>Volumen de los cultivos. 1000ml</p> <p>Densidad inicial: 2.5×10^4 cel/ml</p>	<p>Remoción NH₃:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Día 0: 63.07mg/L - Día 12: 3.5mg/L <p>Remoción PO₄:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Día 0: 16.725mg/L - Día 12: 1.045mg/L
<p>Efectos de las microalgas en la remoción de los compuestos nitrogenados presentes en la laguna facultativa de una planta de tratamiento de aguas residuales [41].</p>	<p><i>Cianophytas</i> <i>Clorophytas</i></p>	<p>Muestras a la entrada y a la salida de la laguna facultativa durante tres meses</p> <p>Las microalgas de los grupos <i>Cianophytas</i> y <i>Clorophytas</i> son nativas de la laguna facultativa</p> <p>Presencia: 54% <i>Cianophyta</i>; 27% <i>Clorophytas</i>; 19% otros géneros</p>	<p>Remoción nitrógeno amoniacal: 36.42%</p>
<p>Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas [42].</p>	<p>Cultivo mixto <i>Chlorella</i> sp. <i>Spirulina</i> sp.</p>	<p>Cultivo mixto obtenido de la planta de tratamiento de la UAM-I</p> <p>Composición cultivo mixto: Clorofitas (<i>Chlorella</i> sp., <i>Chlamydomonas</i> sp., <i>Scenedesmus</i> sp. y <i>Pediastrum</i> sp.), Euglenofitas, Bacilariofitas</p> <p>Soportes p/inmovilización: polietileno y lufa</p> <p>Experimento a escala de laboratorio (1L)</p> <p>El estudio se realizó con dos concentraciones de nutrientes: - alta (25 y 10mg/ml); baja (15 y 5mg/ml de NH₄ y PO₄ respectivamente)</p>	<p>Cultivos libres:</p> <p>* Concentración baja:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>C. vulgaris</i>: 50% NH₄ y 74% PO₄ - <i>S. subsalsa</i>: 16% NH₄ y 96% PO₄ - Mixto: 23% NH₄ y 23% PO₄ <p>* Concentración alta:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>C. vulgaris</i>: 37% NH₄ y 45% PO₄ - <i>S. subsalsa</i>: 26% NH₄ y 24% PO₄ - Mixto: 68% NH₄ y 76% PO₄ <p>Cultivos inmovilizados:</p> <p>* Polietileno:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>C. vulgaris</i>: 99.0% NH₄ y 49.2% PO₄ - Mixto: 70.0% NH₄ y 70.8% PO₄ <p>* Lufa:</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>C. vulgaris</i>: 99.9% NH₄ y 72.1% PO₄ - Mixto: 99.9% NH₄ y 89.9% PO₄
<p>Comparison of nutrients removal by free and immobilized cells of microalga <i>Scenedesmus quadricauda</i> [43].</p>	<p><i>Scenedesmus quadricauda</i></p>	<p><i>S. quadricauda</i> fue aislada del efluente</p> <p>Se usaron 3 biorreactores tubulares verticales (D1, D2 y D3)</p> <p>Características de los cultivos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - D1: cultivo libre; 5L; 39614 lumen; iluminación externa 	<p>Remociones:</p> <ul style="list-style-type: none"> - D1: 100% de N-NH₄ (día 3); 100% de P-PO₄ (día 2) - D3: 100% de N-NH₄ (día 5); 100% de P-PO₄ (día 1) - D1: 100% de N-NH₄ (día 3); 100% de P-PO₄ (día 2) - D2: 100% de N-NH₄ (día 4);

		- D2: cultivo libre; 5L; 2100 lumen; iluminación interna D3: cultivo inmovilizado (alginato); 1.5L; no específica intensidad; iluminación externa	90% de P-PO ₄ (día 4)
A comparative study of four wastewater treatment by <i>Scenedesmus bicellularis</i>: New technology for immobilization [44].	<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Microalga aislada de agua residual tratada Microalga sometida a un proceso de inanición (medio Dauta, N y P). por 36, 54, 72 y 96h Sistemas de cultivo: - Libre con aireación (NCA) - Inmovilizado en bolitas de alginato (CBW) - Inmovilizado en pantalla de alginato (CSW) - Inmovilizado en pantalla de alginato; aireación con 100% humedad relativa (CSA) Temperaturas: 6, 13 y 18°C	* NCA: no se muestran resultados. Menos eficiente * CBW: no se muestran resultados. Menos eficiente * CSW: 100% de NH ₄ -N con 54h de inanición (minuto 75); 100% de PO ₄ -P con 72h de inanición (minuto 120) * CSA: 100% de NH ₄ -N con 54h de inanición (minuto 75); 100% de PO ₄ -P con 72h de inanición (minuto 120)
Ammonia–nitrogen and orthophosphate removal by immobilized <i>Scenedesmus sp.</i> isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment [45].	<i>Scenedesmus sp.</i>	Microalga aislada de aguas residuales municipales Microalga inmovilizada en láminas de alginato Efluente secundario de agua residual real y artificial La composición del agua residual real y artificial fue similar (15.5mg/L de NH ₄ – N y 1.5mg/L de PO ₄ -P) Volúmen de cultivo: 350ml	La mejor remoción se observó en aguas residual real en los siguientes intervalos de tiempo: NH ₄ -N - 105min: 99.1% - 135min: 100% PO ₄ -P - 15min: 100%
Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water [46].	<i>Clorofitas</i> <i>Cianofitas</i> <i>Euglenofitas</i>	75 reactores (bolsas de plástico) de 15L fueron usados para los experimentos El agua fue pretratada para eliminar sólidos por sedimentación Cloroficeae fue el grupo dominante	61.4% de remoción amonio - Concentración inicial: aprox. 45mg/L - Concentración final: aprox. 16.55mg/L

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, la demanda por productos y servicios provenientes de la biotecnología es cada vez mayor y la sustitución de tecnologías convencionales, por otras más amigables con el ambiente, es no solo más aceptada, sino necesaria y provechosa.

En México, se necesita realizar más investigación en biotecnología para desarrollar y aplicar sistemas de biorremediación que puedan resolver, exitosamente, problemas prioritarios como lo es el tratamiento del agua residual utilizando especies nativas y experimentando con las variables medioambientales, geográficas, culturales y económicas que el país ofrece. En este aspecto, la biotecnología de microalgas se destaca por ofrecer una variedad de opciones para resolver problemas ambientales, como es el caso del agua residual, ya que la descarga de esta sin tratamiento, en nuestro país, es muy común y las consecuencias de ello son irreparables para los ecosistemas acuáticos.

Las microalgas tienen gran potencial para generar efluentes limpios, en asociación con las bacterias aerobias, reduciendo los costos asociados al consumo de energía eléctrica, a la vez que se generan altas cantidades de biomasa, aprovechable como alimento animal, como fuente de energéticos (biodiesel) o antioxidantes (carotenoides, ficocianinas) entre muchas otras aplicaciones. Ante tales evidencias, el tratamiento de aguas residuales, utilizando microalgas, promete ser un proyecto viable y autosustentable.

Es por esto, que este proyecto atendió dos demandas importantes:

- a) Aplicar la biotecnología microalgal en la depuración de los contaminantes (amonio y ortofosfato) de un efluente de agua residual municipal, utilizando para este fin, dos especies de microalgas (*Scenedesmus quadricauda*, proporcionada por el cerapio de la UAM Iztapalapa, y una especie nativa, aislada de la laguna de tratamiento de la UIA Puebla).
- b) Obtener una biomasa microalgal susceptible a ser utilizada con fines industriales, ecológicos y/o energéticos.

Adicionalmente, se contribuye en la investigación de biotecnología microalgal, para apoyar al desarrollo en el país, de tecnologías viables, que aplicadas adecuadamente, sean autosustentables y redituables.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de remoción de ortofosfato (PO_4^{-3}) y amonio (NH_4^+), de aguas residuales de la planta de tratamiento de la Universidad Iberoamericana (UIA), Puebla, de dos especies microalgales (*Scenedesmus quadricauda* y una especie nativa aislada de la laguna de tratamiento de la UIA Puebla).

4.2. Objetivos específicos

- Aislar e identificar una cepa de microalga nativa de la laguna de tratamiento de aguas residuales de la UIA Puebla y obtener un cultivo clonal.
- Determinar parámetros fisicoquímicos en muestras del agua de la planta de tratamiento de la UIA Puebla.
- Determinar la capacidad de remoción de ortofosfato, amonio y DQO (Demanda Química de Oxígeno), de dos especies microalgales, en aguas residuales de la planta de tratamiento de la UIA Puebla, en cultivos de 3, 15 y 60L.
- Determinar la tasa de crecimiento de los cultivos establecidos en agua residual en volúmenes de 3, 15 y 60L.

5. METODOLOGÍA

5.1. Aislamiento con pipeta pasteur

Para realizar el aislamiento de una especie microalgal nativa de la laguna de oxidación ubicada en la Universidad Iberoamericana Puebla, se tomó una muestra de agua de dicho lugar. La muestra fue refrigerada y transportada al laboratorio de Ficología Aplicada UAM-I para mantenerla en condiciones ideales de luz y temperatura (22°C) hasta proceder al aislamiento.



Figura 2. Colecta de muestra de agua de la laguna de oxidación de la UIA Puebla.

Para el aislamiento se utilizó la técnica de aislamiento con micropipeta de punta adelgazada, en medio F/2 [47]. Este método permite separar microalgas mayores a 10µm de diámetro en forma de quistes, células vegetativas, dinoflagelados, formas coloniales o filamentosas [48-50].

Se midieron simultáneamente parámetros fisicoquímicos *in situ*, con una sonda multiparamétrica (Hanna Instruments HI-9828).

Las microalgas se incubaron y se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura, con ciclo de luz:oscuridad de 12:12h. Se realizaron escalamientos periódicamente, hasta lograr establecer los cultivos en volúmenes de 3, 15 y 60L.

5.2. Pruebas con *Scenedesmus quadricauda* al agua residual

Con el fin de comprobar la adaptabilidad de la microalga *S. quadricauda* a las condiciones del agua residual, se realizó este experimento preliminar.

La microalga *S. quadricauda* fue obtenida de la Colección de Cultivos del Laboratorio de Ficología Aplicada, UAM-I. Esta se inoculó en matraces de 250ml con agua de la laguna de oxidación de la UIA Puebla, esterilizada por autoclave (121°C/115lb/15min). Los cultivos se realizaron por triplicado y fueron mantenidos en condiciones semi-controladas:

- Fotoperiodo 12:12h (luz:oscuridad)
- Luz blanca
- Sin aireación/Sin inyección CO₂
- Agitación manual
- Temperatura ambiente (22-29°C)

Diariamente, durante 7 días, se tomó 1ml de muestra, en condiciones estériles, para realizar la curva de crecimiento. La curva se realizó por conteo en cámara Neubauer.

5.2.1. Conteo celular.

A partir de los conteos celulares se obtiene la tasa de crecimiento (μ_2), y la tasa de crecimiento acumulado ($\Sigma\mu_2$), usando la cámara de Neubauer [47].

5.3. Preparación de material

Un factor importante para el desarrollo de los cultivos microalgales, es la selección y preparación del material, esto consiste en una limpieza y desinfección, previa al montaje de los cultivos. Los recipientes más utilizados y económicos, para cultivos en laboratorio y masivos, son de materiales no tóxicos como matraces Erlenmeyer, garrafones de vidrio (carboys), recipientes de plástico, madera y concreto, incluyendo los estanques rústicos en áreas rurales [51].

La limpieza y desinfección se realizó el mismo día que el material iba a ser usado. Para lavar garrafones de plástico y vidrio, bolsas de 60L, tubos de PVC, mangueras, tapas, piedras, bombas y otros accesorios, se utilizó detergente neutro concentrado, libre de fosfatos (HYCLIN-PLUS) y agua limpia. Para desinfectarlos se uso hipoclorito de sodio diluido en agua; después se removió el cloro con enjuagues de agua limpia.

5.4. Esterilización de agua

La esterilización consiste en la destrucción de todos los microorganismos, incluidas las formas resistentes como esporas bacterianas, virus sin envoltura (no lipídicos) y hongos [52]. Ya sea química o física, la esterilización de materiales y medios de cultivo es un paso importante para reducir el riesgo de contaminación por microorganismos no deseados en los cultivos microalgales, que de otra manera, representarían para las microalgas una competencia por el sustrato.

5.4.1. Hipoclorito de sodio

Este método se uso para cultivos de 3, 15 y 60L. Sólomente para esterilizar agua limpia. Se adiciono 3ml de NaClO/L. A las 24 horas se agregó tiosulfato de sodio en la siguiente proporción: 2.85g/18L. Se dejó actuar de 2 a 3h, para neutralizar por completo el cloro presente.

5.4.2. Autoclave

Este método se utilizó solamente para agua residual de cultivos de 3L.

El agua residual se vertió en matraces Erlenmeyer, estos se colocaron dentro del Autoclave y se esterilizaron durante 15min a 121°C y una presión de 115lb.

5.4.3. Luz UV

Este método se utilizó para agua residual en cultivos de volúmenes mayores, 15 y 60L.

El agua residual se vertió en un contenedor de plástico con un sistema de esterilización utilizando una lámpara de luz Ultravioleta, y se recirculó el agua residual durante 2h. Pasado ese tiempo, sin apagar el sistema, se tomó el volumen de agua esterilizada necesario para los cultivos.



Figura 3. Sistema casero de esterilización con luz UV.

5.5. Cultivos microalgales en agua residual

El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales no es una idea nueva, a lo largo de varias décadas se han desarrollado muchas investigaciones y técnicas para aprovechar su rápido crecimiento y su capacidad para remover nutrientes. Hace ya más de 50 años que Caldwell (1946) y más tarde Oswald (1953), sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y la producción de proteína, simultáneamente [21].

En la actualidad, son conocidas las ventajas que ofrece el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales en comparación con las tecnologías convencionales de tratamiento.

5.5.1. Montaje de cultivos

5.5.1.1. Volúmen de 3L

Se llenaron primero los garrafones con el medio de cultivo (agua limpia o agua residual esterilizada) según el volúmen requerido. Al agua limpia, que

corresponde a los controles, se le agregó fertilizante foliar, Bayfoland Forte de Bayer, en la relación de 1ml/L, se homogenizó y se colocaron los accesorios de aireación (piedra, manguera). En el caso de los garrafones con agua residual, se colocaron los accesorios de aireación sin añadir fertilizante ni ningún otro complemento. Se agregó, también, un inóculo de concentración (cel/ml) suficiente para obtener un cultivo con mayor expectativa de supervivencia. Por último se les proporcionó aireación y se colocaron en un espacio acondicionado con luz artificial. Experimentos realizados bajo techo y por triplicado.

5.5.1.2. Volúmen de 15L

El procedimiento para montar los cultivos de 15L es el mismo empleado para cultivos de 3L (apartado 5.5.1.1.).

5.5.1.3. Volúmen de 60L

Por su mayor volumen, estos cultivos difieren de los de 3 y 15L porque ocupan más espacio y materiales adicionales.

Estos cultivos se montaron en una estructura vertical con base de fibra de vidrio y estructura cilíndrica vertical de malla metálica, en la que se colocó una bolsa que tomó la forma de una columna cilíndrica o biorreactor. El sistema de aireación consiste de un dispositivo implementado con un tubo de PVC, manguera para aire y una piedra circular que se coloca en la parte baja del biorreactor.

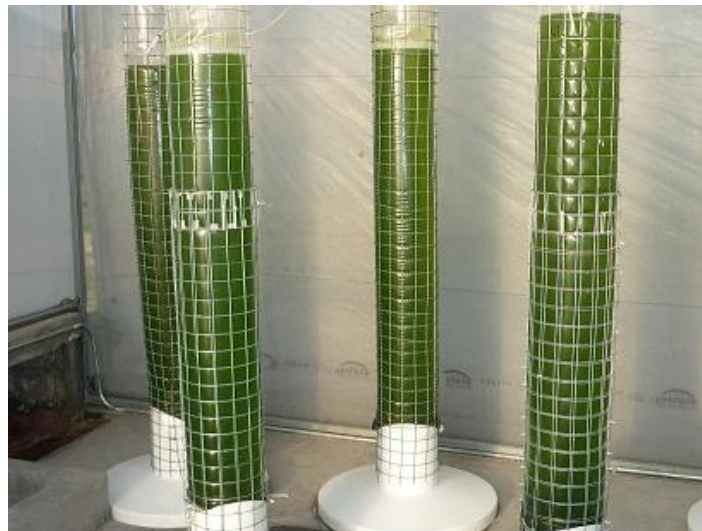


Figura 4. Cultivos de 60L, de *S. quadricauda*, con agua residual esterilizada y controles.

En el caso de las réplicas de control (controles), se llenaron las bolsas con agua blanda hasta el nivel requerido. Una vez montadas las columnas con el agua y el dispositivo aireador, se procedió a esterilizar el agua con hipoclorito de sodio. Se dejó airear por una noche para que el hipoclorito se volatilizara. Posteriormente el cloro fue neutralizado con tiosulfato de sodio y se procedió a añadir el fertilizante foliar. Se inició la aireación para homogenizar. Al final, se inoculó con

el cultivo de microalgas que se desarrollo en los garrafones (15L). Las bolsas permanecieron selladas con velcro.

El mismo procedimiento se realiza para los experimentos con agua residual, excepto que, evidentemente, no se agrega agua limpia ni fertilizante foliar.

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y en el exterior, en un invernadero.

5.5.2. Escalamientos

Los escalamientos se realizaron inoculando una relación del 10% de cultivo en fase exponencial, así de los cultivos de 3L se inoculó 1.5L para establecer los cultivos de 15L. Cuando fue posible, algunos cultivos se mantuvieron hasta su fase estacionaria.

5.6. Crecimiento celular

5.6.1. Toma de muestra

Antes de proceder a tomar una muestra, los cultivos, en el caso de 3 y 15L, se homogenizaron por medio de aireación y agitación manual. Una vez hecho esto, se tomó una muestra de 50ml para análisis de nutrientes al inicio, mitad y final de los experimentos, y 1ml cada tercer día para conteo celular, esto último se hizo utilizando una micropipeta. Las muestras se almacenaron en tubos eppendorf, fijándose con 2 gotas de acetato de lugol.

5.7. Parámetros de cultivo

5.7.1. Condiciones de cultivo

5.7.1.1. Laboratorio

- Luz: blanca. provista por 4 lámparas de 40W, 2 en la parte posterior y 2 en la parte frontal.
- Fotoperíodo: 12:12h (luz:oscuridad).
- Aireación: provista por una bomba de 3.5 PSI.
- CO₂: provisto por la aireación.
- Parámetros (pH, temperatura): no controlados.

5.7.1.2. Planta Piloto (exterior)

- Luz: natural (solar).
- Fotoperíodo: no controlado. Según la duración del día y la noche.
- Aireación. provista por un compresor de aire de 4.93 PSI.
- CO₂: provisto por la aireación.
- Parámetros (pH, temperatura): no controlados.

5.8. Análisis de agua residual

Las muestras colectadas se centrifugaron a 3500rpm para eliminar la biomasa. El sobrenadante se refrigeró. Los tubos se cubrieron de la luz con papel aluminio.

5.8.1. Amonio (NH_4^+)

5.8.1.1. Curva de calibración

La curva de calibración se realizó a partir de una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de concentración $1,136\mu\text{M/L}$. De esta solución se tomó una alícuota de $1000\mu\text{L}$ que se aforó a 50ml. A partir de esta se prepararon 5 soluciones de concentración conocida, que caen dentro del rango de 0.0 a 10.0mg/L NH_4^+ , (rango medio) que puede medir el equipo.

Concentración	Solución patrón	Agua destilada
mg/L	ml	ml
3.0	10	0
2.40	8	2
1.80	6	4
1.20	4	6
0.01	2	8

Tabla 2. Parámetros para la realización de la curva de calibración de amonio (NH_4^+).

Por el método de mínimos cuadrados y a partir de la concentración leída (X) y la concentración teórica (Y), se obtuvo la ecuación de la recta y su R^2 (Fig. 5).

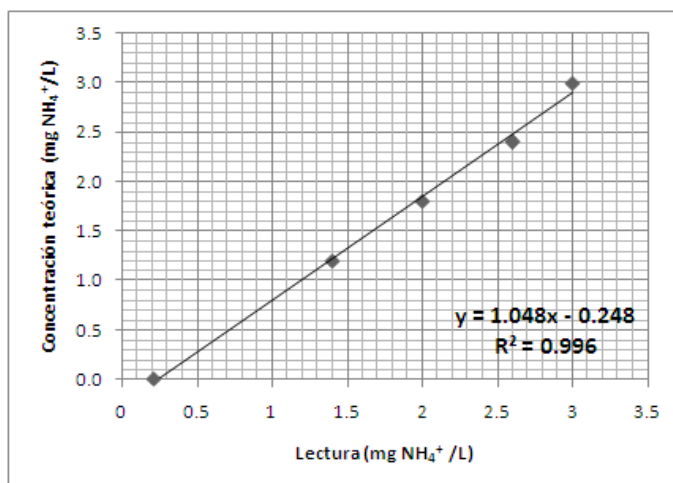


Figura 5. Curva de calibración para amonio (NH_4^+).

5.8.1.2. Rango medio

Para la medición del amonio se utilizó un espectrofotómetro múltiparamétrico modelo HI 83099 (marca Hanna Instruments) y el kit de reactivos que viene con el equipo (reactivo HI 93715A-0 y reactivo HI 93715B-0), con el procedimiento especificado por el fabricante.

5.8.2. Ortofosfato (PO_4^{-3})

5.8.2.1. Curva de calibración

La curva de calibración se realizó a partir de una solución de KH_2PO_4 de concentración $5000\mu\text{M/L}$. De esta solución se tomó una alícuota de $800\mu\text{L}$ que se aforó a 50ml . A partir de esta segunda solución se prepararon 5 soluciones de concentración conocida, que caen dentro del rango de 0.0 a $30.0\text{mg/L PO}_4^{-3}$ (rango bajo y alto) que puede medir el equipo.

Concentración	Solución patrón	Agua destilada
mg/L	ml	ml
10.88	10	0
8.70	8	2
6.53	6	4
4.35	4	6
2.18	2	8

Tabla 3. Parámetros para la realización de la curva de calibración de ortofosfato (PO_4^{-3}).

Por el método de mínimos cuadrados y a partir de la concentración leída (X) y la concentración teórica (Y), se obtuvo la ecuación de la recta y su R^2 (Fig. 6).

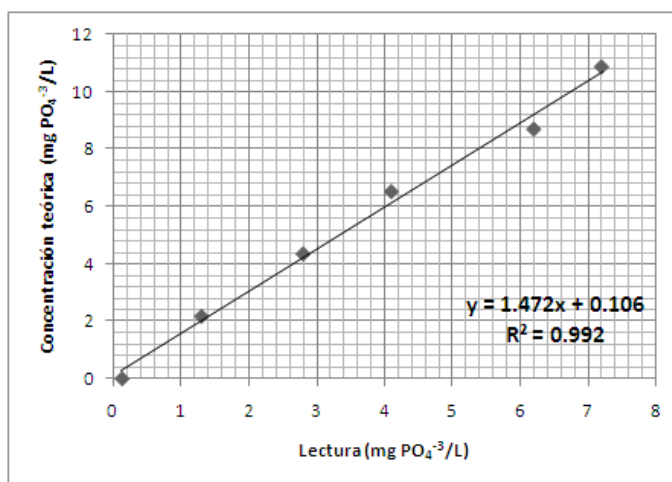


Figura 6. Curva de calibración para ortofosfato (PO_4^{-3}).

5.8.2.2. Rango medio y rango alto

Para la medición del ortofosfato rango medio y alto, se utilizó un espectrofotómetro multiparamétrico modelo HI 83099 (marca Hanna Instruments) y el kit de reactivos que viene con el equipo (reactivo HI 93713-0), con el procedimiento especificado por el fabricante.

5.8.3. Demanda química de oxígeno (DQO)

5.8.3.1. Rango medio

Para la medición del la DQO, se utilizó un termoreactor modelo HI 839800 y espectrofotómetro multiparamétrico modelo HI 83099 (marca Hanna Instruments) y el kit de reactivos que viene con el equipo (reactivo HI 93754B-25), con el procedimiento especificado por el fabricante.

6. RESULTADOS

6.1. Establecimiento de cultivos clonales

De la muestra tomada de la laguna de oxidación, se aislaron todos los tipos de microalgas que se encontraron, logrando establecer 15 cultivos clonales.

Los resultados son los siguientes:

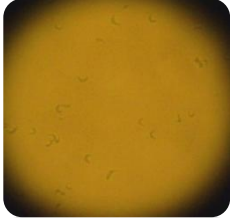
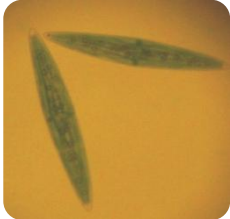
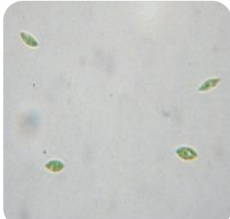

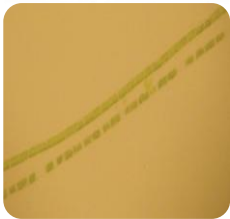
<i>Selenastrum gracile</i>	2 cepas	
<i>Closterium moniliferum</i>	7 cepas	
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	1 cepa	
<i>Chlorella</i> sp.	1 cepa	
<i>Geminella interrupta</i>	4 cepas	

Tabla 4. Microalgas aisladas de la laguna de oxidación de la UIA Puebla.

6.2. Prueba de adaptación de *S. quadricauda* en agua residual municipal, en volúmenes de 250 ml.

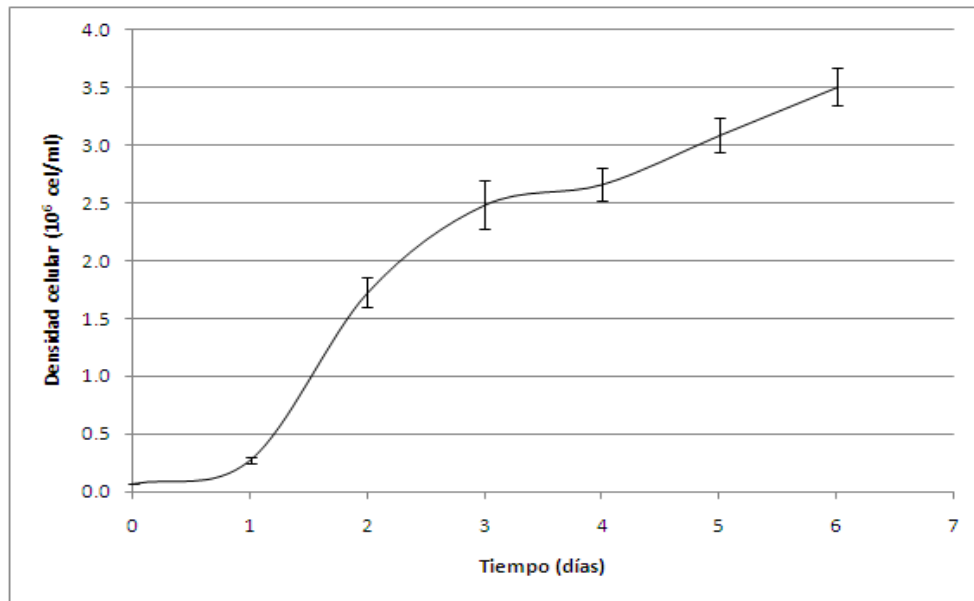


Figura 7. Curva de crecimiento de *S. quadricauda* en 250ml, en agua residual esterilizada (ARE).

Durante el experimento de adaptación de *S. quadricauda*, se obtuvo la curva representada en la Fig. 7. En esta se observa una fase lag (adaptación) de 1 día de duración. A partir del día 1 se acelera el crecimiento hasta el día 3, después del cual se empieza a desacelerar, como puede observarse en la Tabla 5. El cambio en la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) indica que el término de la fase exponencial es el día 3. Los días siguientes, aunque aún hay crecimiento, se consideran en una fase de desaceleración que da entrada a la fase estacionaria.

<i>Tiempo</i>	<i>Celulas/ml</i>	μ_2	$\Sigma\mu_2$
<i>días</i>	10^6		
ARE			
0	0.07 [±0.00]	-	-
1	0.27 [±0.03]	1.95	1.95
2	1.72 [±0.13]	2.67	4.62
3	2.29 [±0.21]	0.53	5.15
4	2.66 [±0.14]	0.10	5.25
5	3.09 [±0.15]	0.22	5.46
6	3.51 [±0.16]	0.18	5.65

Tabla 5. Concentración celular de de *S. quadricauda* en 250ml, con agua residual esterilizada (ARE).

La mayor concentración celular se alcanzó el día 6, con 3.51×10^6 cel/ml. Se observa la fase exponencial claramente marcada del día 1 al 2.

No se realizó análisis de remoción de nutrientes a estos cultivos.

Los parámetros del agua usada para los cultivos se muestran en la Tabla 6. La muestra proviene de la laguna de oxidación de la UIA Puebla.

Parámetro	Valor	Unidad
Oxígeno disuelto (OD)	5.56	ppm
pH	8.66	-
Temperatura	19.52	°C
Resistividad	0.001	MΩ·cm
Conductividad	1012	μS/cm
Sólidos disueltos totales	505	ppm
Salinidad	0.5	PSU
Potencial óxido-reducción	74.7	mV
% Oxígeno disuelto	71.4	-

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del agua esterilizada, de la laguna de oxidación de la UIA Puebla.

6.3. Características del agua residual de la planta de tratamiento de la UIA Puebla

Parámetro	Método de prueba	Estándar o Norma	Resultado	Unidad
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO)	NMX-AA-28-SCFI2001	150.00	66.83	mg/L
Demanda química de oxígeno (DQO)	NMX-AA-30-SCFI2001	320.00	142.00	mg/L
Sólidos suspendidos totales	NMX-AA-34-SCFI2001	150.00	26.00	mg/L
Sólidos sedimentables	NMX-AA-04-SCFI2000	2.00	<0.10	ml/L
Grasas y aceites **	NMX-AA-05-SCFI2001	25.00	14.88	mg/L
Nitrógeno TOTAL	NMX-AA-26-SCFI-2001	60.00	86.44	mg/L
Fosforo TOTAL	NMX-AA-29-SCFI2001	30.00	<0.071	mg/L
Temperatura*	NMX-AA-07-SCFI2000	40.00	22.30	°C
pH*	NMX-AA-08-SCFI2000	5.5-10	6.55	-
Coliformes fecales 100ml*	NMX-AA-42-1981	2000.00	240.00	NMP
Materia flotante	NMX-AA-06-SCFI2000	Ausente	Ausente	-

*valor de la media geométrica; **valor de la media ponderada.

Tabla 7. Análisis de una muestra compuesta de agua residual de descarga final proveniente de la planta de tratamiento de la UIA Puebla.

Los análisis presentados en la Tabla 7, corresponden a una muestra compuesta de agua residual de descarga final, realizados por el Laboratorio de Análisis Químicos, Alimentos y Aguas Bio-Indu, S.C.

6.4. Crecimiento de *S. quadricauda* en agua residual y en controles (3, 15 y 60L)

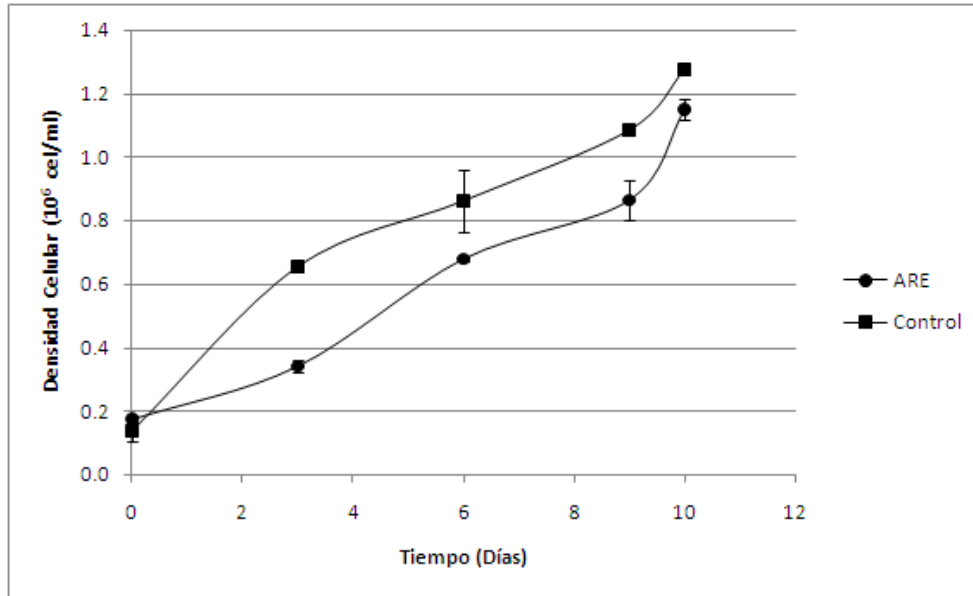


Fig. 8. Curvas de crecimiento, promedio, de *S. quadricauda* en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $25.0 \pm 5^\circ\text{C}$.

Las concentraciones finales de *S. quadricauda*, en cultivos de 3L fueron: 1.15×10^6 cel/ml, para ARE, y 1.28×10^6 cel/ml, para los controles.

Se observa ausencia de fase lag en los cultivos control, mientras que esa misma fase no es tan marcada en los cultivos de ARE. La pendiente de las curvas descritas, no distingue tampoco la fase exponencial en ambos cultivos (Fig. 8).

En la Tabla 8, se presentan los valores de la tasa de crecimiento (μ_2), y tasa de crecimiento acumulado ($\Sigma\mu_2$) de cultivo de *S. quadricauda* en ARE y controles. Observando $\Sigma\mu_2$ se puede decir que la velocidad de crecimiento fue lenta, tanto para ARE como para los controles. Observándose una duplicación en cultivos de ARE del día 3 al 6

El pH se mantuvo entre 8 y 7 en los cultivos de ARE, y entre 6 y 7 en los controles.

Tiempo días	Celulas/ml 10^6		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	0.18 [±0.01]	0.16 [±0.01]	-	-	-	-
3	0.34 [±0.02]	0.65 [±0.01]	0.31	0.67	0.31	0.67
6	0.68 [±0.01]	0.86 [±0.10]	0.33	0.13	0.64	0.81
9	0.86	1.09	0.11	0.11	0.75	0.92

	[±0.06]	[±0.01]				
10	1.15	1.28	0.42	0.23	1.17	1.15
	[±0.03]	[±0.01]				

Tabla 8. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *S. quadricauda* en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). 25.0±5°C.

La remoción de nutrientes del agua residual se muestra en la Tabla 6. Hubo poca reducción de DQO, mientras que el amonio y el ortofosfato descendieron a más de la mitad de su concentración inicial, en los 10 días que duraron los cultivos (Tabla 9).

Día	ARE		
	mg/L		
	DQO	NH ₄	PO ₄
0	109 [±4]	136.50 [±0.30]	12.60 [±0.43]
6	-	50.52 [±5.93]	8.06 [±0.41]
10	94 [±4]	39.26 [±2.49]	3.64 [±0.78]

Tabla 9. Remoción de nutrientes de *S. quadricauda* en agua residual esterilizada (ARE), en 3L.

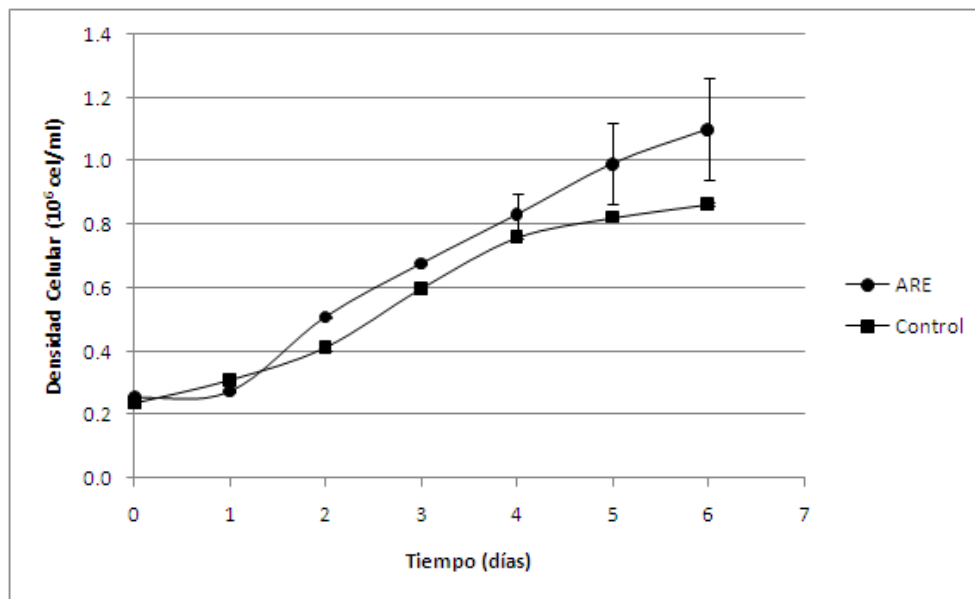


Figura 9. Curvas de crecimiento, promedio, de *S. quadricauda* en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). 24.0±1°C.

Los cultivos representados en la Fig. 9 se escalaron a 60L el día 6. Estos alcanzaron una máxima concentración celular de 1.10x10⁶ cel/ml en ARE, y de 0.87x10⁶ cel/ml en los controles, en el último día de cultivo. Mientras que, valores muy cercanos se obtuvieron en cultivos de 3L pero hasta el día 10. Considerando que la diferencia entre inóculos, fue menor de 1x10⁵ cel/ml. En estos, la fase estacionaria es más clara que en los cultivos antecesores (de 3L).

En cuanto a la velocidad de crecimiento, se observa cómo la tasa de crecimiento, $\Sigma\mu_2$, disminuye a partir del día 2 (Tabla 10). La velocidad de crecimiento es mayor para ARE que la registrada en los controles. Aunque no se observan duplicaciones.

Tiempo días	Celulas/ml 10^6		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	0.25 [±0.0]	0.24 [±0.0]	-	-	-	-
1	0.27 [±0.0]	0.31 [±0.01]	0.11	0.37	0.11	0.37
2	0.51 [±0.0]	0.41 [±0.01]	0.92	0.40	1.03	0.77
3	0.68 [±0.0]	0.60 [±0.01]	0.42	0.55	1.44	1.32
4	0.83 [±0.07]	0.76 [±0.01]	0.29	0.34	1.73	1.66
5	0.99 [±0.13]	0.82 [±0.01]	0.25	0.11	1.99	1.77
6	1.10 [±0.16]	0.87 [±0.01]	0.15	0.09	2.14	1.86

Tabla 10. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *S. quadricauda* en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). $24.0\pm 1^\circ\text{C}$.

Un cultivo de ARE y un control se mantuvieron hasta la fase estacionaria (Fig. 10), alcanzada hasta el día 18. Se observó que la velocidad de crecimiento se mantuvo lenta, hasta el día 14 (Tabla 11), cuando el cultivo entró en fase estacionaria. Después de 8 días de cultivo, se alcanzó una concentración de 1.38×10^6 cel/ml en ARE, y 1.25×10^6 cel/ml en controles, mientras que en 3L, esta concentración se alcanzó en 10 días.

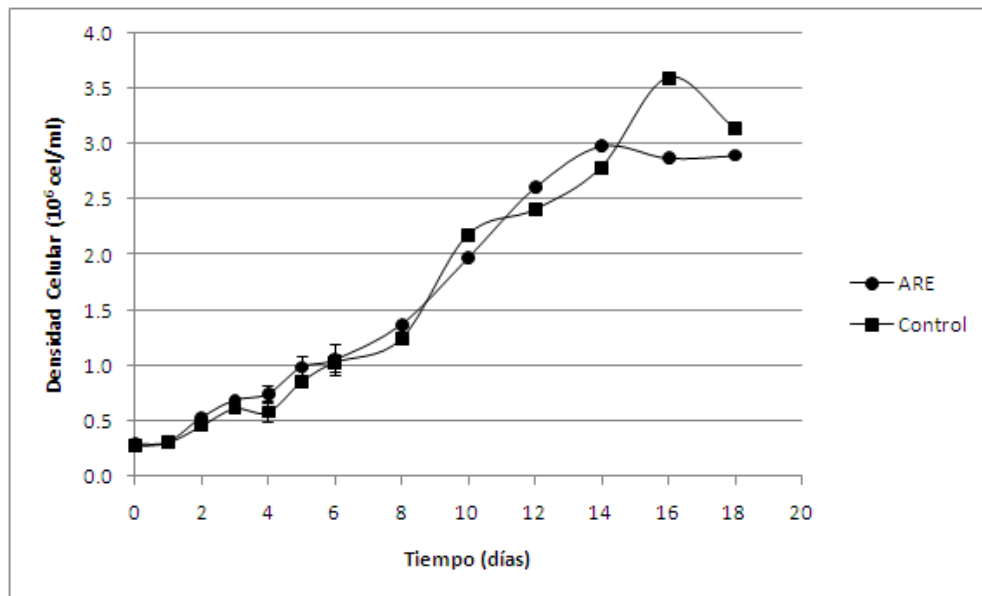


Figura 10. Curvas de crecimiento de *S. quadricauda* en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar), en fase estacionaria. $24.0\pm 1^\circ\text{C}$.

El pH de estos cultivos fluctuó entre 6 y 8 en cultivos de ARE, y 6 y 7 en los controles.

En cultivos de ARE, la mayor concentración celular alcanzada fue de 2.99×10^6 cel/ml, el día 14. Los controles tuvieron su máximo el día 16, con 3.60×10^6 cel/ml (Tabla 11).

Tiempo días	Celulas/ml 10^6		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	0.30	0.28	-	-	-	-
1	0.31	0.31	0.08	0.16	0.08	0.16
2	0.54	0.46	0.77	0.57	0.85	0.72
3	0.69	0.62	0.37	0.43	1.22	1.15
4	0.75	0.58	0.11	-0.08	1.34	1.07
5	0.99	0.85	0.40	0.55	1.74	1.62
6	1.06	1.03	0.10	0.27	1.84	1.89
8	1.38	1.25	0.19	0.14	2.03	2.03
10	1.98	2.18	0.26	0.40	2.29	2.43
12	2.61	2.41	0.20	0.07	2.49	2.50
14	2.99	2.79	0.10	0.11	2.58	2.61
16	2.88	3.60	-0.03	0.18	2.56	2.79
18	2.90	3.15	0.00	-0.10	2.56	2.70

Tabla 11. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *S. quadricauda* en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C), en fase estacionaria. $24.0\pm 1^\circ\text{C}$.

La remoción de ortofosfato en ARE, en el día 10, fué mayor que la registrada en 3L. En ambos casos la concentración inicial fue similar. El 100% de remoción de ortofosfato fue registrada el día 18. La remoción de DQO fue significativa (Tabla 12).

Día	ARE mg/L		
	DQO	NH_4	PO_4
0	137 [± 14]	86.00 [± 1.66]	11.7 [± 1.10]
2	-	92.08 [± 0.05]	1.49 [± 0.27]
10	-	26.53 [± 0.29]	2.37 [± 0.05]
18	14 [± 3]	3.35 [± 0.88]	0

Tabla 12. Remoción de nutrientes de *S. quadricauda* en agua residual esterilizada (ARE), en 15L.

Los cultivos en 60L presentan un crecimiento diferente a lo observado en cultivos en 3 y 15L, debido a que se trata de cultivos en el exterior, expuestos a los cambios ambientales bruscos, como la temperatura, esta fluctuó en un mismo día, como se observa en la Fig. 8, de $10-5^\circ\text{C}$, en las mañanas (8:00am), hasta $25-36^\circ\text{C}$ por las tardes (3:00pm). El pH se mantuvo entre 6 y 7, cercano al rango óptimo (7-8) [30], por lo que no se considera que haya influido significativamente en el experimento.

Es evidente, la diferencia existente entre las curvas de crecimiento de los cultivos en ARE y los controles; estos parecen haber sido afectados de manera diferente por las variables ambientales; sin embargo cuando se observan las réplicas de un experimento, se evidencia una misma tendencia en el crecimiento de *S. quadricauda* (Fig. 11).

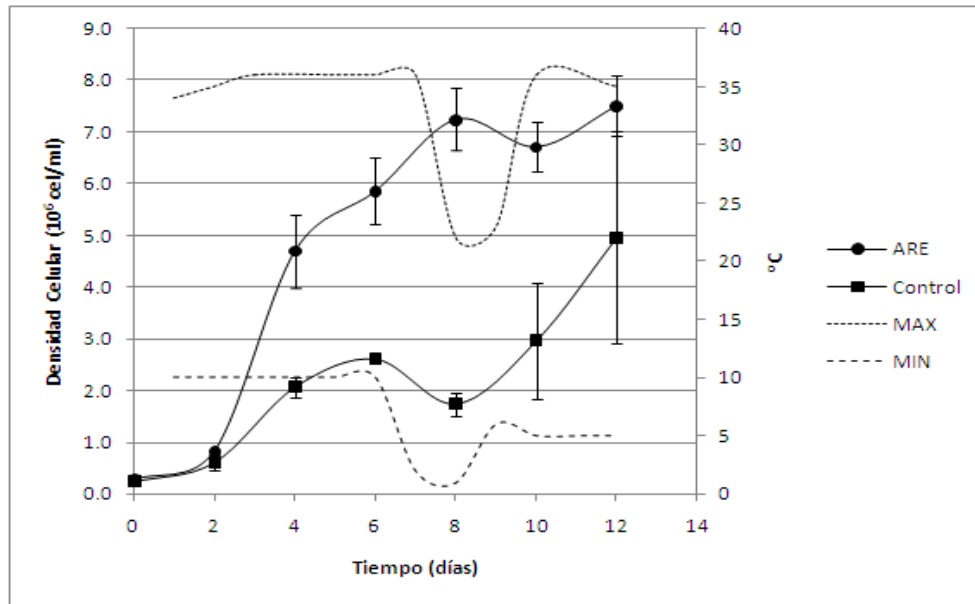


Figura 11. Curvas de crecimiento, de *S. quadricauda* en agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar), en 60L. 5-36°C.

La fase lag es más evidente en este experimento, que la observada en los cultivos de menor volumen. También las fases exponencial y estacionaria, en ARE. Los controles presentaron un crecimiento lento durante la primera semana, para después presentar una fase exponencial muy marcada (Fig. 11).

En los datos de la Tabla 13 podemos ver una mayor concentración celular, que la apreciada en los cultivos antecedentes. En 4 días, se superó el máximo registrado anteriormente en ARE, observado en los cultivos de 15L. Por otro lado, los controles superaron también, el día 10, el máximo registrado anteriormente en los cultivos de 15L.

Tiempo Días	Celulas/ml 10^6		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	0.26 [±0.01]	0.27 [±0.05]	-	-	-	-
2	0.82 [±0.02]	0.75 [±0.15]	0.83	0.73	0.83	0.73
4	4.70 [±0.70]	1.85 [±0.21]	1.26	0.65	2.09	1.38
6	5.86 [±0.64]	2.52 [±0.08]	0.16	0.22	2.25	1.61
8	7.25 [±0.60]	1.96 [±0.23]	0.15	-0.18	2.40	1.42
10	6.72 [±0.48]	4.08 [±1.12]	-0.05	0.53	2.35	1.95
12	7.52 [±0.58]	7.01 [±2.05]	0.08	0.39	2.43	2.34
14	-	10.28 [±3.19]	-	0.28	-	2.62
16	-	13.97 [±2.93]	-	0.22	-	2.84
18	-	20.97 [±6.08]	-	0.29	-	3.13
20	-	18.43 [±6.13]	-	-0.09	-	3.04
22	-	20.43 [±7.35]	-	0.07	-	3.12

Tabla 13. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *S. quadricauda* en 60L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). C hasta fase estacionaria. 5-36°C.

El pH en los cultivos con ARE se mantuvo mayormente en 7. En los controles el pH varió entre 6 y 7.

La concentración máxima para ARE fue de 7.52×10^6 cel/ml (día 12); ese mismo día, los controles alcanzaron una concentración de 7.01×10^6 cel/ml. El valor máximo para controles fue de 20.97×10^6 (día 22) (Tabla 13).

La concentración inicial fue prácticamente la misma que se tuvo en los cultivos de 15L, y cercanas a las de cultivos de 3L, pero los resultados en concentración celular fueron mayores en 60L.

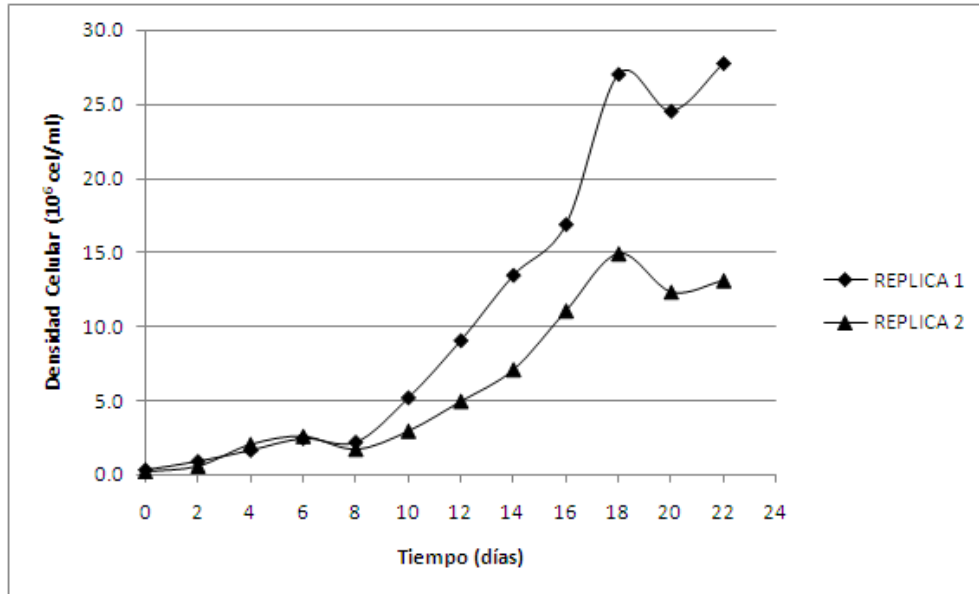


Figura 12. Curvas de crecimiento, de *S. quadricauda* en agua blanda y fertilizante foliar, en fase estacionaria, en 60L. 5-36°C.

Los mejores porcentajes de remoción de ortofosfato se presentaron en estos cultivos, pues ambas réplicas (las de ARE), removieron prácticamente el 100%. Con respecto al amonio, las remociones bajas se presentaron en estos cultivos. La DQO también disminuyó de manera importante, llegando a ser del 100% en la réplica 2 (Tabla 14).

Día	Replica 1			Replica 2		
	mg/L			mg/L		
	DQO	NH ₄	PO ₄	DQO	NH ₄	PO ₄
0	127 [±5]	92.25 [±0.45]	15.70 [±1.07]	127 [±5]	92.25 [±0.45]	15.70 [±1.07]
2	-	91.05 [±0.21]	3.15 [±0.15]	-	59.87 [±1.70]	3.33 [±0.25]
12	69 [±1]	34.27 [±0.90]	0.20 [±0.05]	0	27.33 [±0.74]	0.22 [±0.01]

Tabla 14. Remoción de nutrientes de *S. quadricauda* en agua residual esterilizada (ARE), en 60L.

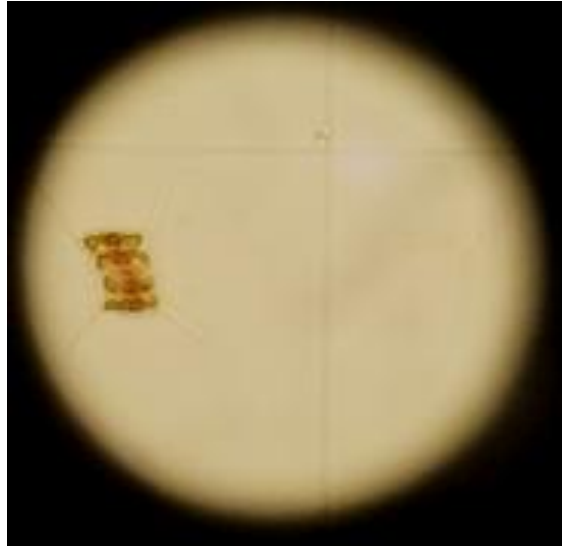


Figura 13. Imagen de *S. quadricauda* tomada con microscopio óptico a 40X, correspondiente a cultivos con ARE.

6.5. Crecimiento de *Chlorella* sp. en agua residual y en controles (3, 15 y 60L)

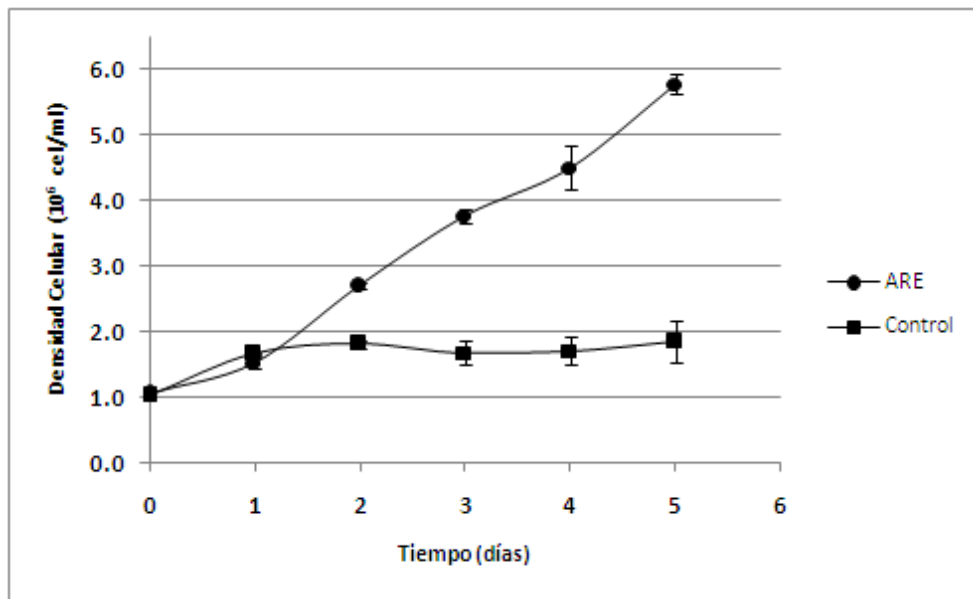


Figura 14. Curvas de crecimiento, promedio, de *Chlorella* sp. en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $25.0 \pm 3^\circ\text{C}$.

La mayor concentración celular se presentó en los cultivos con ARE, en el día 6 de cultivo, siendo esta de 5.79×10^6 cel/ml. Una breve fase lag (día 0-1) se observa (Fig. 14). En los controles la concentración más alta fue de 1.85×10^6 cel/ml, en el día 6. No se observa fase lag en cultivos de ARE. Las concentraciones celulares se encuentran en la Tabla 15.

El pH de los cultivos con ARE se mantuvo en 9 durante los 5 días de cultivo. El pH de los controles inició en 8 y disminuyó hasta 7 al final de los cultivos.

Tiempo días	Celulas/ml 10^6		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	1.06 [±0.01]	1.02 [±0.03]	-	-	-	-
1	1.53 [±0.09]	1.67 [±0.03]	0.53	0.71	0.53	0.71
2	2.71 [±0.04]	1.82 [±0.06]	0.82	0.12	1.35	0.84
3	3.78 [±0.11]	1.68 [±0.18]	0.48	-0.12	1.83	0.72
4	4.51 [±0.33]	1.72 [±0.22]	0.25	0.03	2.09	0.75
5	5.79 [±0.16]	1.85 [±0.31]	0.36	0.11	2.45	0.86

Tabla 15. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *Chlorella* sp. en 3L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). $25.0\pm 3^\circ\text{C}$.

En la Tabla 15, se observan las velocidades de crecimiento ($\Sigma\mu_2$) de *Chlorella* sp. En cultivos con ARE ocurrió una duplicación del día 1 al 2, y después el crecimiento se desacelera hasta el final del cultivo. En los controles la velocidad de crecimiento fue lenta e incluso decayó durante el día 3 al 4.

Día	ARE		
	mg/L		
	DQO	NH_4	PO_4
0	31 [-]	29.0 [±0.80]	1.55 [±0.35]
4	-	28.16 [±2.39]	0.67 [±0.03]
5	57 [±18]	20.18 [±1.33]	0.40 [±0.20]

Tabla 16. Remoción de nutrientes de *Chlorella* sp. en agua residual esterilizada (ARE), en 3L.

La remoción de nutrientes de *Chlorella* sp. se observa en la Tabla 16. La remoción de amonio fue baja después de 5 días, comparada con la obtenida con *S. quadricauda* en el mismo volumen. La remoción de ortofosfato fue buena, casi del 100% después de 5 días. No se removió la DQO.

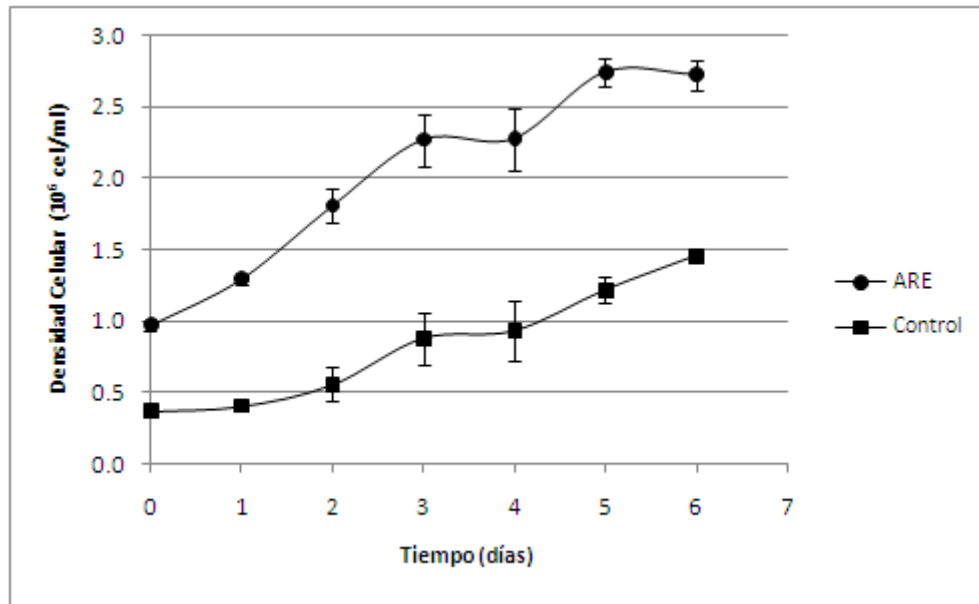


Figura 15. Curvas de crecimiento, promedio, de *Chlorella* sp. en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar). $25.0 \pm 3^\circ\text{C}$.

En cultivos de 15L las máximas concentraciones celulares fueron inferiores a las obtenidas en los cultivos de 3L, para ARE se observó el día 5, con 2.74×10^6 cel/ml, para los controles se observó el día 6, con 1.46×10^6 cel/ml.

No se observa una fase lag en los cultivos con ARE, sino que presenta un aparente crecimiento exponencial ininterrumpido desde el día 0 hasta el 3 (Fig. 15). Hubo presencia de cilios en los cultivos que pudieron influir en el crecimiento.

Tiempo días	Células/ml 10^6		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	0.97 [±0.03]	0.37 [±0.01]	-	-	-	-
1	1.29 [±0.04]	0.41 [±0.01]	0.41	0.15	0.41	0.15
2	1.80 [±0.12]	0.56 [±0.02]	0.48	0.45	0.89	0.60
3	2.27 [±0.18]	0.88 [±0.07]	0.33	0.65	1.23	1.25
4	2.28 [±0.21]	0.94 [±0.16]	0.01	0.10	1.23	1.35
5	2.74 [±0.10]	1.22 [±0.21]	0.27	0.38	1.50	1.72
6	2.72 [±0.11]	1.46 [±0.13]	-0.01	0.26	1.49	1.98

Tabla 17. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *Chlorella* sp. en 15L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). $25.0 \pm 3^\circ\text{C}$.

La Tabla 17 nos muestra un crecimiento sostenido entre los días 1 al 3 y después la velocidad decayó, esto se observó tanto en cultivos con ARE como en los controles.

El pH de los cultivos con ARE se mantuvo entre 8.5 y 9 durante los 6 días de cultivo. El pH de los controles inició en 8.5 y disminuyó hasta 8 al final de los cultivos.

Día	ARE		
	mg/L		
	DQO	NH ₄	PO ₄
0	154 [±9.5]	103.75 [±7.05]	8.69 [±0.48]
2	-	91.73 [±2.78]	2.61 [±0.06]
6	51 [±6.5]	84.85 [±0.25]	0.25 [±0.05]

Tabla 18. Remoción de nutrientes de *Chlorella* sp. en agua residual esterilizada (ARE), en 15L.

La remoción de nutrientes, igual que en cultivos de 3L, es lenta en cuanto al amonio. Mientras que la remoción de ortofatos es casi del 100%, en cuestión de 6 días. En general, la tendencia de remoción es similar a los cultivos de 3L (Tabla 18)

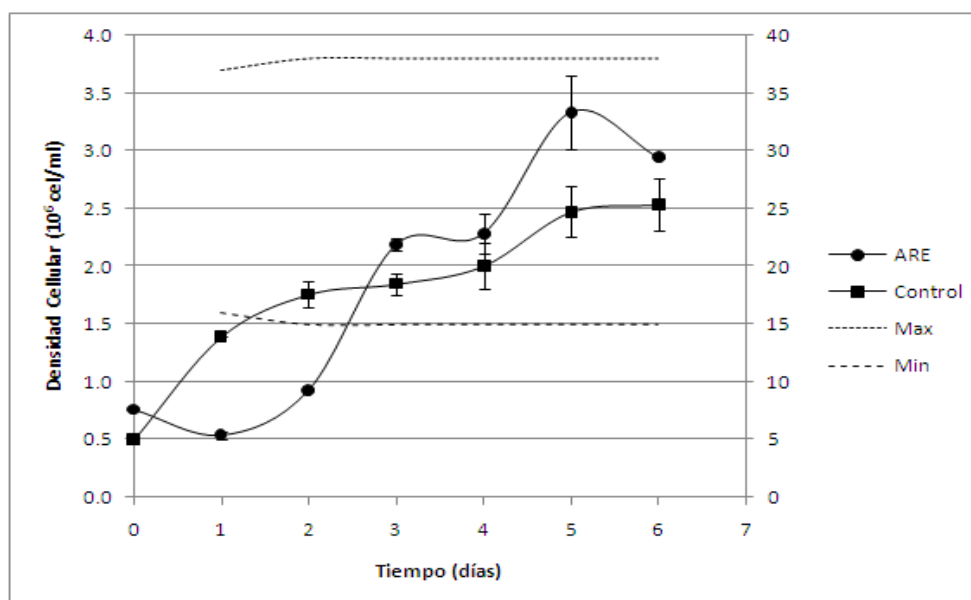


Figura 16. Curvas de crecimiento, de *Chlorella* sp. en agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda (c/ fertilizante foliar), en 60L. 15-38°C.

En la Fig. 16 se observa una diferencia entre las curvas de ARE Y controles, durante los primeros 3 días. Los controles no presentan fase lag a diferencia de los cultivos con ARE que tuvieron 2 días de adaptación. Se observó sedimentación durante los cultivos de ARE.

Comparando con cultivos de 3 y 15L, en 60L los cultivos con ARE presentaban una concentración celular mayor que en los de 15L (2.72×10^6 cel/ml) pero menor que la obtenida en los cultivos de 3L (5.79×10^6 cel/ml), esto en el día 6; sin embargo, con el paso del tiempo la concentración fue aumentando, como se ve en la Tabla 19.

Tiempo	Celulas/ml		μ_2		$\Sigma\mu_2$	
días	10^6					
	ARE	C	ARE	C	ARE	C
0	0.76 [±0.00]	0.50 [±0.01]	-	-	-	-

1	0.54 [±0.03]	1.39 [±0.00]	-0.49	1.48	-0.49	1.48
2	0.93 [±0.01]	1.76 [±0.11]	0.78	0.34	0.29	1.82
3	2.19 [±0.05]	1.85 [±0.09]	1.24	0.07	1.53	1.89
4	2.29 [±0.18]	2.01 [±0.20]	0.06	0.12	1.59	2.01
5	3.34 [±0.32]	2.47 [±0.22]	0.54	0.30	2.14	2.30
6	2.95 [±0.01]	2.54 [±0.23]	-0.18	0.04	1.96	2.34
7	2.93 [±0.58]	-	-0.01	-	1.95	-
8	3.56 [±0.72]	-	0.28	-	2.23	-
9	5.51 [±0.90]	-	0.63	-	2.86	-
10	6.39 [±1.13]	-	0.21	-	3.07	-
11	6.66 [±0.94]	-	0.06	-	3.13	-
12	6.76 [±1.01]	-	0.02	-	3.15	-

Tabla 19. Tasa de crecimiento (μ_2) y tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu_2$) de *Chlorella* sp. en 60L, con agua residual esterilizada (ARE) y agua blanda c/ fertilizante foliar (C). 15-40°C.

La Tabla 19 muestra que hay una velocidad de crecimiento lenta, sin una fase exponencial definida, tanto en ARE como en los controles.

El pH de los cultivos hasta el día 6, fue de mayoritariamente de 9 tanto para los cultivos con ARE como en los controles.

Los cultivos con ARE alcanzaron su fase exponencial el día 12, como se muestra en la Fig. 17. Aunque la curvas de cada réplica se desfazaron a partir del día 6. Llegando a un máximo de 7.77 y 5.75×10^6 cel/ml, en la réplica 1 y 2, respectivamente. Se observa también, a pesar del desfase, cómo reacciona de manera similar a los factores que inciden en ellas.

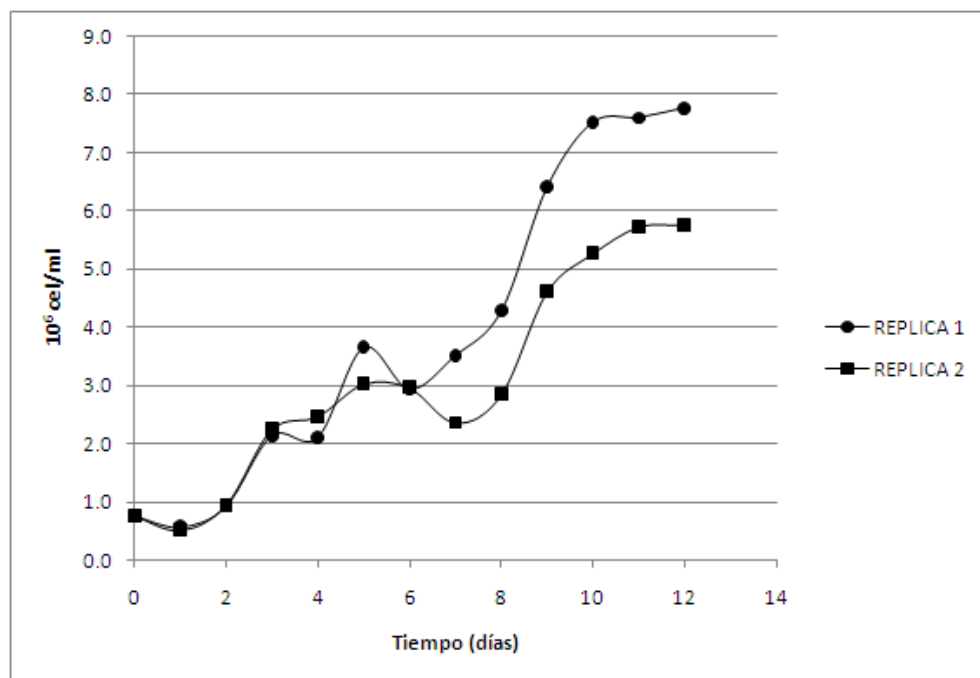


Fig. 17. Curvas de crecimiento, de *Chlorella* sp. en ARE, hasta fase estacionaria, en 60L. 13-40°C.

Día	ARE		
	mg/L		
	DQO	NH ₄	PO ₄
0	64 [±7.5]	62.35 [±0.45]	3.70 [±0.30]
4	-	58.45 [±6.15]	0.30 [±0.10]
8	85 [±1.5]	61.40 [±0.20]	0.23 [±0.08]
10	-	58.75 [±1.15]	0.10 [±0.05]

Tabla 20. Remoción de nutrientes de *Chlorella* sp. en agua residual esterilizada (ARE), en 60L.

La remoción de nutrientes presenta el mismo patrón que en los otros cultivos; removiendo muy poco amonio y más de la mitad del ortofosfato (Tabla 20).

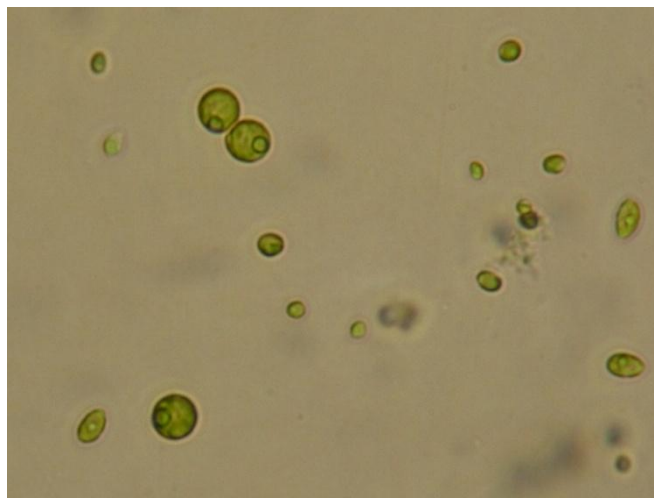


Figura 18. Imagen de *Chlorella* sp. tomada con microscopio óptico a 40X, correspondiente a cultivos con ARE.

<i>Scenedesmus quadricauda</i>			<i>Chlorella sp.</i>			
VOLUMEN: 3L	<i>T 0</i>	<i>T 10</i>	<i>Remoción</i>	<i>T 0</i>	<i>T 5</i>	<i>Remoción</i>
Biomasa (10 ⁶ cel/ml)	0.18	1.15	-	1.06	5.79	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	136.50	39.26	71%	29.0	20.18	30%
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	12.60	3.64	71%	1.55	0.40	74%
VOLUMEN: 15L	<i>T 0</i>	<i>T 18</i>	<i>Remoción</i>	<i>T 0</i>	<i>T 6</i>	<i>Remoción</i>
Biomasa (10 ⁶ cel/ml)	0.30	2.90	-	0.97	2.72	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	86.0	3.35	96%	103.75	84.85	18%
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	11.7	2.37	80%	8.69	0.25	97%
VOLUMEN: 60L	<i>T 0</i>	<i>T 12</i>	<i>Remoción</i>	<i>T 0</i>	<i>T 10</i>	<i>Remoción</i>
Biomasa (10 ⁶ cel/ml)	0.26	7.52	-	0.76	6.39	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	92.25	34.27* 27.33**	63%* 70%**	62.35	58.75	6%
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	15.70	0.21	99%	3.70	0.10	97%

*Replica 1 de ARE **Replica 2 de ARE

Tabla 21. Cuadro comparativo de la producción de biomasa y la eficiencia de remoción de nutrientes (amonio y ortofosfato) de *S. quadricauda* y *Chlorella sp.* en ARE.

Como se puede observar en la Tabla 21, la mayor eficiencia de remoción se presentó en cultivos con *S. quadricauda*, con más del 50% removido en todos los casos. La remoción de ortofosfato siempre fue eficiente con ambas especies.

7. DISCUSIÓN

Tanto en los cultivos con ARE, como en los controles, de ambas especies, se observó que, aunque hay una diferencia en la velocidad de crecimiento y en la concentración celular, las curvas de crecimiento presentan la misma tendencia, y cambios similares en sus pendientes, lo cual refleja una variabilidad poco significativa entre las replicas de un mismo cultivo y replicas de cultivos diferentes.

En los 3 sistemas de cultivo, 3, 15 y 60L, con las dos especies en estudio, el crecimiento celular se caracterizó por un crecimiento lento, aunque constante. Los parámetros que más influyeron en el buen desarrollo de los cultivos microalgales, y por tanto en la generación de biomasa, fueron: luz, temperatura, y nutrientes. La temperatura es fundamental para el crecimiento de las microalgas, que en combinación con la intensidad luminosa, afecta la fisiología de la células y por lo tanto el funcionamiento del cultivo [30].

Temperaturas muy por debajo de la óptima pueden provocar mayor sensibilidad a la luz y provocar fotoinhibición, deteniendo el crecimiento [25]. También, incrementos en la temperatura propician un mayor crecimiento microalgal, hasta alcanzar una temperatura óptima, que ronda entre 15 y 25°C para la mayoría de las microalgas [53].

En este trabajo no se atribuye un efecto significativo a la temperatura, sobre crecimiento microalgal en cultivos interiores (3 y 15L), ya que la temperatura se mantuvo en 25.0±5°C, para 3L, y 24.0±1°C, para 15L, en los cultivos de *S. quadricauda*; y en 25.0±3°C durante los cultivos de *Chlorella* sp. Es decir, la temperatura no subió lo suficiente, por arriba del valor óptimo, como para influir en el crecimiento. Además, se sabe que las microalgas son más tolerantes a temperaturas por encima del valor óptimo, viéndose más facetadas por las caídas de esta [30]. En los cultivos exteriores de *S. quadricauda* (60L) se detectó una variación de temperatura mucho mayor, entre 2 y 36°C, por lo que pudo haber un efecto sobre la tasa de crecimiento. Sin embargo, fue en este sistema donde se obtuvo una mayor concentración microalgal que en cultivos de menor volumen, e incluso, en menor tiempo que estos. Lo que refleja la adaptación de la cepa a condiciones ambientales fluctuantes.

Durante los cultivos de *Chlorella* sp. la temperatura fluctuó entre 15 y 38°C. Moronta *et al.* (2006) reportó crecimiento de *Chlorella sorokiniana* a 37°C aunque con una disminución con respecto de su temperatura óptima (30°C) [54], por lo que, al igual que en nuestro trabajo, la temperatura seguramente limitó el máximo desarrollo de *Chlorella* sp. pero como es evidente, no lo detuvo por completo.

Cabe mencionar que los cultivos exteriores se encontraban en un invernadero; este factor proporciona protección a los cultivos de las bajas temperaturas (en el caso de *S. quadricauda*). El uso de invernaderos para cultivar microalgas en agua residual, han reportado tener efectos positivos en climas muchos más adversos que los presentes en esta región, como lo son los climas nórdicos [53].

Por otro lado, como ya se mencionó, la luz constituye un factor fundamental en todo cultivo microalgal. Representa la fuente de energía para la fotosíntesis y se sabe que tiene efectos marcados sobre el crecimiento y varios procesos metabólicos que pueden afectar también la composición bioquímica [30].

La luz utilizada para los cultivos en interior (3, 15L) fue artificial. La fuente de luz empleada fueron lámparas tubulares fluorescentes, consideradas como las preferidas para este tipo de

cultivos (3L), con fotoperiodo 12:12. En cultivos exteriores (60L), se aprovechó la luz solar. Estos cultivos se montaron en columnas transparentes, por lo que la incidencia de luz al cultivo es mucho mayor. Además, no se presentaron días nublados durante el tiempo que se mantuvieron los cultivos. Por otro lado, la turbulencia que proporciona la aireación de los cultivos es importante no sólo para mejorar las tasas de intercambio de nutrientes y metabolitos entre las células y el medio, sino también para aumentar las frecuencias de luz/oscuridad, resultando en una mayor productividad y eficiencia fotosintética [55]. Sin embargo, para entender mejor el efecto de la luz sobre la velocidad de crecimiento, se podrían complementar, los conteos celulares, con un análisis de clorofila.

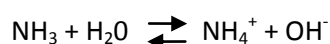
En este caso, el crecimiento pudo ser limitado por los nutrientes. Un óptimo crecimiento de los cultivos algales ocurre cuando los nutrientes están en la proporción correcta. En una proporción entre nitrógeno (N) y fósforo (P), de 30:1, el P es considerado limitante, mientras que proporciones bajas, de 5:1, el N es considerado limitante [56]. De acuerdo a las proporciones encontradas en el agua residual, el P es raramente limitante del crecimiento microalgal, pero el Nitrógeno podría serlo [56]. Sin embargo, en cultivos con agua residual, el alga está expuesta a concentraciones de nutrientes mayores a los tres órdenes de magnitud que las encontradas en la naturaleza, el crecimiento es mayormente limitado por el carbón (C) y la luz [57].

La fuente principal de C en los cultivos fue CO₂ fue suplementado a través de la inyección de aire atmosférico dentro del cultivo. El CO₂ y el HCO₃⁻ (se requiere la enzima anhidrasa carbónica) son las formas en que la mayoría de las especies microalgales consumen el C [56,58]. Durante los cultivos de 60L de *S. quadricauda*, los controles presentaron, durante los primeros 8 días de cultivo, un crecimiento muy lento (Fig. 12), comparado con las replicas de ARE, que a partir del día 2 entraron en fase exponencial (Fig. 11). Fue en el día 8 cuando se notó una deficiente agitación en los controles, por lo tanto un menor suministro de CO₂ al medio, lo que se traduce en deficiencia de C y limitación del crecimiento. Después del ajuste, se observó cómo, casi de manera inmediata, *S. quadricauda* se recuperó y el cultivo entró en su fase exponencial. Becker (1994) [23] y Oswald (1988) [58], sugieren un suplemento extra de CO₂, dado que la concentración ambiental de este (0.033%) está muy por debajo la óptima para el crecimiento algal. Sin embargo, otros factores que intervienen en mayor o menor medida, son la temperatura y la luz, pues evidentemente son diferentes las condiciones dentro del laboratorio (3 y 15L) de las que podemos encontrar en el exterior (invernadero).

En cuanto al consumo de nutrientes, los resultados de remoción, obtenidos en cultivos de *S. quadricauda* con ARE eran esperado ya que las aguas residuales municipales contienen, como característica especial, una gran carga de nitrógeno y fósforo, provenientes principalmente de los desechos humanos, actividades industriales, detergentes sintéticos y productos de limpieza [12], y los cuales son, junto con el carbono, macronutrientes esenciales para el crecimiento microalgal [25].

El nitrógeno, en aguas residuales, se encuentra como NH₃, NO₂⁻ y NO₃⁻. Durante el proceso de descomposición aeróbica el nitrógeno de los compuestos orgánicos es convertido en nitrógeno amoniacal (N-NH₄⁺). El amoniacal en el agua puede estar bajo la forma NH₃ no ionizado o como ion NH₄⁺ [59].

La concentración de nitrógeno amoniacal en el efluente y el pH están relacionados por la siguiente ecuación de equilibrio [38,60]:



Si el pH es mayor a 7, se movería el equilibrio hacia la izquierda, produciéndose un incremento en la concentración de NH_4^+ [60]. Según Hanumantha Rao *et al.* (2011) [38], el pH debe ser mayor a 9 para eso ocurra.

Las microlagas, como se mencionó antes, necesitan del nitrógeno y fósforo para su crecimiento y desarrollo. Ellas consumen el nitrógeno, preferentemente como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-) [24]; sin embargo, siempre consumirán primero el NH_4^+ , ya que la incorporación del NO_3^- supone un gasto de energía pues debe ser reducido a NH_4^+ por la célula, mientras que el NH_4^+ es un compuesto reducido y entra a formar parte directamente de las moléculas orgánicas, incorporándose en aminoácidos [61].

Los resultados obtenidos en los cultivos de *S. quadricauda* con ARE muestran lo mencionado anteriormente, pues se presentaron altos porcentaje de reducción de NH_4^+ y PO_4^{3-} en los tres volúmenes de cultivo estudiados, aunque la eficiencia de remoción varió de un sistema a otro. Por otro lado, en cultivos de 3 y 15L el porcentaje de remoción de amonio, en 10 días, fue de 71% y 69%, respectivamente. En 60L, la remoción alcanzó un 63 y 70% en el día 12, para la réplica 1 y 2, respectivamente.

La concentración inicial de NH_4^+ parece no haber producido una inhibición en el desarrollo de *S. quadricada*, ya que la concentración de NH_4^+ en cultivos de 3L fue cerca de dos veces mayor que la presente en 15 y 60L, no obstante, en este volumen de cultivo se presentó la mayor remoción. Un estudio sobre la tolerancia de algunas microalgas, como *Chlorella* sp., a concentraciones extremas de NH_3 , ha sido reportada por Tam *et al.*, (1996) [62], concluyendo que concentraciones entre 20 y 250mg/L no han tenido efectos importantes sobre la tasa de crecimiento y concentración celular.

Además del consumo por parte de las microalgas, la remoción de NH_4^+ puede verse favorecida por la evaporación al ambiente del NH_3 ("stripping") como consecuencia del incremento del pH que normalmente suceden en los cultivos microalgales [63]. A este respecto, Hanumantha Rao *et al.*, (2011) [38], considera pérdidas de NH_3 a pH entre 7.1 y 8.15, en cultivos de *C. vulgaris*. En este experimento valores de pH semejantes (7-8) fueron registrados. La intensidad de la aireación del medio también influye en este fenómeno [32]. Este efecto de evaporación de NH_3 y la relación aireación/volumen podría explicar la diferencia observada en los porcentajes de remoción de NH_4^+ en los tres cultivos (3, 15 y 60L), ya que la agitación de un volumen pequeño, produce más turbulencia que en un volumen mayor, y posiblemente, resultar en mayor "Srtipping" (desorción).

Aunque los resultados obtenidos son prometedores, el porcentaje de remoción fue menor al 94% reportado por Méndez Suaza *et al.*, (1996) [40], que cultivó *S. quadricauda* por 12 días, en agua residual cruda filtrada. Pero mayores a los reportados por Hernández-Reyes (2010) [42], que obtuvo remociones de 50%, o menos, en cultivos libres de *C. vulgaris* y *Spirulina platensis*, y de 68% en un cultivo mixto que incluía, entre otras especies, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. Cabe anotar que al filtrar el agua elimina los sólidos suspendidos presentes en el AR y si este proceso se quiere hacer a gran escala como una alternativa ambiental no resultaría redituable.

En el caso de *Chlorella* sp. la remoción de amonio no fue la esperada, registrando como máximo, 30% de remoción en cultivos de 3L. Según Yeoung-Sang *et al.*, (1997) [64], el fósforo en bajas concentraciones, actúa como limitante, ralentizando la tasa de consumo de amonio. Como se observa en la Tabla 21, todos los experimentos con *Chlorella* sp. iniciaron con concentraciones bajas de fósforo, a diferencia de lo observado con *S. quadricauda*, y donde la remoción de amonio fue, como ya se mencionó, buena. Otro factor que pudo tener influencia, es que las células de *Chlorella* sp. sedimentaron más que las de *S. quadricauda*, y por lo tanto

con menos contacto con los nutrientes. Esto, debido probablemente a que los sólidos suspendidos del agua residual se adhirieron a las células. Lo que no pasó tan evidentemente con *S. quadricauda*, probablemente por su morfología, pues estas células presentan unas “espinas” que evitarían el contacto de la membrana celular con las partículas de sólidos suspendidos.

Por otro lado está el fósforo, este se encuentra presente como PO_4^{-3} en el agua residual. Es esencial porque interviene en la mayoría de los procesos celulares de transferencia de energía, síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos [23,30]. Es asimilado como ortofosfato inorgánico, preferentemente como H_2PO_4 o HPO_4 , en un proceso activo (requiere de energía) [23,25].

La remoción de PO_4^{-3} por *S. quadricauda*, nos brindó resultados favorables. A diferencia de lo ocurrido con el NH_4^+ , las concentraciones iniciales de PO_4^{-3} fueron similares en los tres experimentos. Un dato interesante es que se observa una tendencia en la eficiencia de remoción, inversa a la observada en la remoción de NH_4^+ , ya que el PO_4^{-3} se consumió más rápidamente en los cultivos de mayor volumen. Los porcentajes de remoción fueron: 3L, 71% (día 10); 80% (día 10) 15L; y 60L, 99% (día 12). En el caso de *Chlorella* sp. la remoción de PO_4^{-3} también fue satisfactoria, alcanzando casi el 100% en cultivos de 15 y 60L, y en mucho menor tiempo que lo observado con *S. quadricauda*. Esto podría encontrar una explicación, como en el caso del NH_4^+ , en la agitación, ya que además de ser acumulado por las células, el PO_4^{-3} puede precipitar como fosfato de calcio debido al incremento del pH producido por la actividad fotosintética [65], por lo tanto, cultivos de menor volumen, como los de 3L, cuando se agitaron manualmente, se produjo más turbulencia y por lo tanto, una re-suspensión y homogenización del PO_4^{-3} precipitado, a diferencia que en volúmenes mayores donde el único medio de agitación fue la aireación.

Tam *et al* (1989) [32], reportaron que el uso de inóculos iniciales, más concentrados, de *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. ofrecen mejores eficiencias en la remoción de fósforo de aguas residuales. En la Tabla 21, se observa la diferencia de inóculos iniciales entre *S. quadricauda* y *Chlorella* sp. Siendo mayores los de *Chlorella* sp.

En este caso, los resultados obtenidos son mucho mayores a los reportados por Chacón *et al.*, (2006) [66], que en cultivos de agua residual esterilizada y filtrada, obtuvieron remociones de 39.23% y 48.68%, respectivamente, con *Scenedesmus* sp., y de 39.23% y 19.11%, respectivamente, con *Chlorella* sp, en cultivos de 27 días.

Sobre la reducción de la demanda química de oxígeno (DQO), se sabe que las microalgas pueden hacerlo. La medida de la DQO es una estimación de las materias oxidables presentes en el agua, cualquiera que sea su origen orgánico o mineral (hierro, ferroso, nitritos, amoníaco, sulfuros y cloruros) [67]. Por lo anterior, la reducción del DQO sucede mientras el alga consume los nutrientes. Esto concuerda con lo sucedido en los cultivos de *S. quadricauda* que permanecieron hasta la fase estacionaria, es decir, se mantuvieron por más tiempo y consumieron más nutrientes, los que redujeron la DQO. El cultivo que tuvo mayor remoción fue el de 60L, aunque no fue el que duró más tiempo (12 días), fue el que más alta concentración celular tuvo. El cultivo de 15L se mantuvo por 18 días, y casi removió el 100% de DQO. Finalmente, el cultivo de tres litros fue el de menor duración (10 días) y el que menos concentración celular tuvo, por lo que su remoción de DQO fue la más baja. La remoción, entonces, es atribuible al crecimiento algal y la actividad fotosintética [68]. En cuanto a *Chlorella* sp. la concentración de DQO fue un poco más caótica, pues en cultivos de 3 y 60L, lejos de reducirse, esta aumentó. Wang *et al.*, atribuyen este evento a la dualidad metabólica que presenta *Chlorella* sp., heterotrofia y autotrofia, pudiéndose activar una u otra vía dependiendo de las condiciones del medio [69]. De este modo, cuando la vía autótrofa es

activada, *Chlorella* sp. consume CO₂ como única fuente de carbono, excretando pequeñas cantidades de moléculas orgánicas, como el ácido glicólico, al medio como producto de la reducción del carbono (ciclo de Calvin) [70] por lo que la DQO aumenta en vez de disminuir. Otro factor que puede aumentar la DQO es la presencia de Fe⁺² y cloruros pues consumen dicromato durante la oxidación de la muestra [71].

En lo que respecta a la contaminación por ciliados, observada en cultivos de *Chlorella* sp., la presencia de estos es normal, y hasta deseable, en aguas residuales, con cerca de 175 especies reportadas. El papel que desempeñan es el de remover las bacterias, del agua tratada, por depredación [72].

Otra cuestión con la que hemos relacionado a los ciliados, en este trabajo, es el crecimiento irregular de *Chlorella* sp. en cultivos control (Fig. 13-15). Sin embargo, no es debido a una depredación como tal, sino a una simbiosis entre estos dos organismos, como lo han reportado anteriormente Dolan (1992) [73], Queimaliños *et al.* (1999) [74], y Summerer *et al.* (2007) [75]. Durante este proceso simbiótico, *Chlorella* sp. es engullida por el ciliado y retenida dentro de él. Sin embargo, más del 80% de las células son digeridas y solo algunas pocas logran formar vacuolas perialgales y sobreviven como simbiositos [76,77]. Especies de ciliados, tales como, *Ophrydium naumanni* [74] y *Paramesium bursaria* [73,75] han sido reportadas con este comportamiento, cuyo fin es combinar las ventajas de la nutrición heterotrófica con la obtención autotrófica de energía [75].

Por lo anterior, a reserva de realizar mayores indagaciones sobre la especie del ciliado y si es posible que presente este comportamiento, se puede asumir, que el lento crecimiento de *Chlorella* sp., reflejado en las curvas de crecimiento de cultivos control (Fig. 13-15) se debe a la puesta en marcha de esta simbiosis, donde muchas células algales fueron digeridas por los ciliados. Recordando nuevamente que esta suposición aun debe ser comprobada.

Ante estos resultados, se concluye que, en general, *Scenedesmus quadricauda* tuvo un buen desempeño en la remoción de nutrientes del agua residual. *Chlorella* sp. tuvo un desempeño excelente en la remoción de ortofosfato, no así en la remoción de amonio y DQO.

8. CONCLUSIONES

- El establecimiento de cultivos de microalgas provenientes del agua residual, dió muy buenos resultados, con un total de 15 cepas clonales.
- Las especies nativas aisladas, particularmente *Scenedesmus dimorphus* y *Chlorella* sp. pueden ser utilizadas para experimentos de biorremediación de aguas residuales municipales.
- La variabilidad de la temperatura y pH, en cultivos masivos, es inherente a este tipo de sistemas y deben ser considerados sus efectos en los resultados finales
- *Scenedesmus quadricauda* mostró gran capacidad de remoción de amonio del agua residual municipal, en volúmenes de 3, 15 y 60L.
- *S. quadricauda* se desempeñó mejor en la remoción de ortofosfato y DQO del agua residual municipal, en volúmenes de 15 y 60L.
- Las altas concentraciones de amonio no produjeron un efecto negativo significativos en el desarrollo de *S. quadricauda* ($136.50 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$).
- *Chlorella* sp. tuvo un mejor desempeño que *S. quadricauda*, en la remoción de ortofosfato del agua residual en volúmenes de 3, 15 y 60L.
- Los cultivos de 60L con *S. quadricauda* y *Chlorella* sp. fueron los mejores en la generación de células con 7.52×10^6 y 6.76×10^6 , respectivamente, comparado con los otros cultivos de agua residual.
- El uso de *S. quadricauda* y *Chlorella* sp. no provoca gran variabilidad en el pH del agua residual municipal, manteniéndose este dentro de los rangos permitidos para descarga de efluentes en México.
- El cultivo de 60L de *S. quadricauda* resultó ser la mejor opción para reducir los nutrientes del agua residual municipal y generar más biomasa, y en un tiempo corto (12 días).
- Los cultivos con *Chlorella* sp. fueron mejores para producir un mayor número de células por mililitro y remover más ortofosfato en menor tiempo que *S. quadricauda*.
- *S. quadricauda* se desempeño mejor que *Chlorella* sp. en la remoción de amonio.
- Ambas especies microalgales presentaron resistencia y adaptabilidad a los cambios ambientales extremos de temperatura e intensidad de luz.

9. REFERENCIAS

1. INEGI. (2010). "Estadísticas a propósito del día mundial del agua". INEGI (México). Recuperado el 17 de enero de 2011, de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2010/agua10.asp?s=inegi&c=2754&ep=30>
2. NRC, AIC, ANI (1995). "El suministro de agua en la Ciudad de México". National Research Council, Academia de la Investigación Científica, Academia Nacional de Ingeniería. National Academy Press, Washington DC. Recuperado el 17 de enero de 2011, de: <http://lanic.utexas.edu/la/Mexico/water/libro.html>
3. Mainstone, C. & Parr, W. (2002). "Phosphorus in rivers. Ecology and management". *The Science of the Total Environment* 282-283, 25-47.
4. NAS (National Academy of Sciences). (1969). "EUTROPHICATION: Causes, Consequences, Correctives". Washington, D.C. 661 pp.
5. US-EPA. (1997). "Protecting Coastal Waters from Nonpoint Source Pollution". In: U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C. USA. 841-F 96-004E.
6. Metcalf & Eddy, Inc. (1995). "Ingeniería de aguas residuales: tratamiento, vertido y reutilización". (3ª ed). Madrid: McGraw-Hill/ Interamericana de España.
7. Muñoz A. & S., González. (sin año). "Remoción biológica de fósforo: condiciones de operación". UNAM. México, D.F. Recuperado el 17 de enero de 2011, de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/mexico/01388e14.pdf>
8. Chapa-Balcorta, C. & R. Guerrero-Arenas. (2010). "Abundancia que mata: la eutrofización". *¿Cómo Ves?* 134: 22-25.
9. Aranda, N. (2004). "Eutrofización y calidad del agua de una zona costera tropical". Tesis doctoral. Universidad de Barcelona. Barcelona, España.
10. Aranda, N. (2001). "Alimentando al mundo, envenenando al planeta: eutrofización y calidad del agua". *Avance y perspectiva*. Vol. 20. Recuperado el 17 de enero de 2011, de: <http://www.cinvestav.mx/Portals/0/Publicaciones%20y%20Noticias/Revistas/Avance%20y%20perspectiva/septoct01/3%20NANCY.pdf>
11. Straub, C. P. (1989). "Practical handbook of environmental control". CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. Visto en: Villaseñor, J. (2001). "Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas". Universidad de Castilla-La Mancha, España. 13 pp.
12. Villaseñor, J. (2001). "Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas". Universidad de Castilla-La Mancha, España. 13-15 & 20-21 pp.
13. Henze, M.; Harremore, P.; Jansen, J. L. C. & Arvin, E. (1995). "Wastewater treatment: biological and chemical processes". Springer-Verlag, Berlin. Visto en: Villaseñor, J. (2001). "Eliminación biológica de fósforo en aguas residuales urbanas". Universidad de Castilla-La Mancha, España. 15 pp.
14. Sedlak, R. I., (1991). "Phosphorus and nitrogen removal from municipal wastewater. The soap and detergent association". Lewis Publishers, New York. 91 pp.
15. Morato, J. & Peñuela, G. (eds.) (2009). "Manual de tecnologías sostenibles en tratamiento de aguas". Red ALFA TECSPAR. Comisión Europea.
16. Escalas, A. (2006). "Tecnologías y usos de las aguas residuales en México. Tecnologías Sostenibles para el tratamiento de aguas y su impacto en los sistemas acuáticos". Curso académico impartido en la Universidad de Chile. Concepción, Chile. Recuperado el 18 de enero de 2011, de: http://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CFMQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.agua.org.mx%2Findex.php%3Fopcion%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26Itemid%3D%26gid%3D344&ei=p1TvT_3jFojk2wWJzs3ICg&usg=AFQjCNGo3SrDRTp74bfeiAyR7--B785Rbg&sig2=dtG2pQHTzHxkrrgeveXWhw
17. Asano, T.; Burton, F.L.; Leverenz, H.L., Tsuchihashi, R., & Tchobanoglous, G. (2007). "Water Reuse, Issues, Technologies, and Applications". Metcalf & Eddy | AECOM. 310 pp.

18. Environmental Protection Agency U.S. (EPA). (1999). "Folleto informativo de tecnología de aguas residuales: Desinfección con cloro". Office of Water, Washington, D.C., EPA 832-F99-062, Septiembre.
19. Sánchez, J. (2007). "Potencial biotecnológico de microorganismos en ecosistemas naturales y agroecosistemas". Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia. 303-304 pp.
20. Olguin, E.J. (2003). "Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal process". *Biotechnol. Adv.* 22 8 1-91.
21. González-Salazar, M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*, Vol. 59:64-70.
22. Green, F.B.; Bernstone, L.S.; Lundquist, T.J. & Oswald, W.J. (1996). "Advanced Integrated Wastewater Pond Systems for Nitrogen Removal". *Wat. Sci. Tech.* 33:7, 207-217 pp.
23. Becker, E.W. (1994). "Microalgae, Biotechnology and Microbiology". Cambridge: Cambridge University Press. Visto en: Larsdotter, K. (2006). "Wastewater treatment with microalgae" - a literature review. *Vatten* 62: 31-38.
24. Oliver, R.L. & Ganf, G.G. (2000) *Freshwater blooms*, in *The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space*, B.A. Whitton and M. Potts, Editors. Kluwer: Dordrecht. 149-194 pp.
25. Larsdotter, K. (2006). "Wastewater treatment with microalgae" - a literature review. *Vatten* 62: 31-38.
26. Oswald, W.J.; Gotaas, H.B.; Ludwig, H.F. & Lynch, V. (1953). "Algae symbiosis in oxidation ponds. Photosynthetic oxygenation". *Sewage and Industrial Wastes* 25(6): pp. 692-705.
27. Oswald, W.J. (2003). My sixty years in applied algology. *Journal of Applied Phycology* 15: pp. 99-106.
28. Lundquist, T.; Benemann, J.; Feffer, A. & Woertz, I. (2007). Presentation on nutrient removal and biofuel production through microalgae-based wastewater treatment. First western forum on energy & water sustainability. University of California, Santa Barbara March 22-23.
29. Yan, H.; Pan, G. (2002). "Toxicity and bioaccumulation of cooper I three green microalgal species". *Chemosphere*. 49, p. 471-476.
30. Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Torres, E. & Herrero, C. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones*. Universidad de Da Coruña. España. pp. 27,28.
31. Borowitzka, M. & Borowitzka, L. (1988). Vitamins and fine chemical from microalgae. *Micro-algal Biotechnology*. 153-196.
32. Tam, N. & Y. Wong (1989). "Wastewater Nutrient Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp". *Environmental Pollution* 58: 19-34.
33. Lavoie, A. & J. De la Noue. (1985). "Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment". *Wat. Res.* 19: 1437-1442.
34. González, L.E.; R.O. Cañizares & S. Baena. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 60: 259-262.
35. Jonte L.; L. Gaubeca; C. Cárdenas; I. Araujo; J. Ortega & E. Morales. (2002). Agua residual urbana de un sistema de lagunas de estabilización para el cultivo de la cianobacteria *Synechocystis* sp. Libro de Resúmenes de la LII Convención Anual de la AsoVAC. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto. Venezuela.
36. Baumgarten, E.; M. Nagel & R. Tischnel. (1999). Reduction of the nitrogen and carbon content in a swine waste with algae and bacteria. *Environmental Geology*. 52. 2:281-284.
37. Bermúdez, J. & Morales, E. (2002). Fracción soluble de gallinaza como fuente de nutrientes para el cultivo de la microalga marina *Chroomonas* sp. Libro de Resúmenes de la LII Convención Anual de la AsoVAC. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.

38. Hanumatha Rao, P.; Ranjith Kumar, R; Raghavan, B. G.; Subramanian, V. V.; Sivasubramanian, V. (2011). "Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility". *Water S.A. Vol. 37* No. 1.
39. Charity E. Andrade R., Alexandra L. Vera B., Carmen H. Cardenas L., Ever D. Morales A. (2009). "Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería". *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia. Vol. 32, No. 2*, 126-134.
40. Mendez Suaza, L.; Albarracin, I.; Cravero, M.; Salomón, R. (2011). "Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina". *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras. Enero-junio, vol. 28, No. 1*, 36-41 pp.
41. Vargas, L., Cárdenas, C.H., Hernández, M., Araujo, I., Yabroudi, S. & López, F. (sin año) "Efectos de las microalgas en la remoción de los compuestos nitrogenados presentes en la laguna facultativa de una planta de tratamiento de aguas residuales". Centro de Investigación del Agua, Ciudad Universitaria, Lagunas de Oxidación. Maracaibo-Venezuela. Recuperado el 20 de mayo de 2011, de: <http://www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/cardevene.pdf>
42. Hernández-Reyes, B.M. (2010). "*Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas*". Tesis de grado. UAM Iztapalapa. 36-39 pp.
43. Di Termini, I., Cattaneo, C., Prassone, A. & Povero, P. (sin año) "Comparison of nutrients removal by free and immobilized cells of microalga *Scenedesmus quadricauda*". Department of Chemical and Process Engineering .G.B. Bonino. (DICheP), Department for the Study of Territory and its Resources (DIP.TE.RIS). University of Genoa. Recuperado el 20 de mayo de 2011, de: http://www.laica.net/public/ART_DiTermini/Di%20Termini_Comparison%20of%20Nutrients%20removal.pdf
44. Valentino M. Kaya, Joel de la Noue, Gaston Picard. (1995). "A comparative study of four systems for tertiary wastewater treatment by *Scenedesmus bicellularis*: New technology for immobilization". *Journal of Applied Phycology* 7: 85-95.
45. Zhang Endong, Bing Wang, Qihua Wang, Shubiao Zhang, Budiao Zhao. (2008). "Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment". *Bioresource Technology* 99: 3787-3793.
46. Barrera Bernal C., G. Vázquez, I. Barceló Quintanal, A. Laure Bussy. (2008). "Microalgal dynamics in batch reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water". *Water Air Soil Pollut* 190:259-270.
47. Arredondo-Vega, B.O. & Voltolina, D. (2007). "*Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalga*". Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C., La Paz, B.C.S., México. 2-3 pp.
48. Hoshaw, R.W. & Rosowski, J.R. (1973). "Methods for Microscopic Algae. En: *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*". Stein, J.R. (ed.), Cambridge University Press, UK, 53-68 pp.
49. Matsuoka, K. & Fukuyo, Y. (2000). "Guía Técnica para el Estudio de Quistes de Dinoflagelados Actuales". WESTPAC-HAB/WESTPAC/IOC. Japón, 30 págs.
50. Anderson, R.A. & Kawachi, M. (2005). "Traditional Microalgae Isolation Techniques". En: Andersen, R.A. (ed.), *Algal Culturing Techniques. Elsevier Academic Press. E.U.A.*, 83-100 pp.
51. FAO (1989). "*La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura*". FAO (Brasil). Recuperado el 22 de noviembre de 2011, de: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB473S/AB473S02.htm>

52. Murray, R. Patrick; Rosenthal, Ken S. & Pfaller, Michael A. (2006). "*Microbiología Médica*". 5ta ed. Elsevier España. pp. 89.
53. Larsdotter, K. (2006). "Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate". Doctoral thesis. Royal School of Biotechnology. Stockholm, Sweden. *Environmental Technology* (ISSN 0959-3330) 31:2, 117-123.
54. Moronta, R., Mora, R., Morales, E. (2003). "Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas". *Rev. Fac. Agron.* Enero, vol.23, no.1, 28-43 pp. Recuperado el 28 de marzo de 2012, de: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182006000100003&lng=es&nrm=iso. ISSN 0378-7818.
55. Grobbelaar, J.U. (1994). "Turbulence in mass algal cultures and the role of light/dark fluctuations". *J. Appl. Phycol.*, 6:331-35.
56. Borowitzka, M.A. (1998) "Limits to growth, in Wastewater treatment with algae". Y.-S. Wong and N.F.Y. Tam, Editors. *Springer Verlag*. 203–226 pp.
57. De la Noue, J.; Laliberté, G. & Proulx D. (1992). Algae and waste water. *J. Appl. Phycol.* 4:247-254.
58. Oswald, W.J. (1988) *Micro-algae and waste-water treatment*, in *Micro-algal biotechnology*, M.A. Borowitzka and L. J. Borowitzka, Editors. Cambridge University press: Cambridge. 305–328 pp.
59. García, O. & Caicedo, J. (2000). "Efectos del amonio y del pH sobre el crecimiento de la *Spirodela Polyrhiza* cultivado en efluentes de reactores UASB". *Rev. Biol. Ecol.* 8:7-23.
60. Fernández, E., Monforte, J., Estrany, F., Oliver, R., y Carreras, S. (2008). "Eliminación del nitrógeno amoniacal en aguas residuales sanitarias". *Técnica Industrial* 273 / Enero-Febrero.
61. Bertl, A., Felle, H. & Bentrup, F.W. (1984). "Amine transport in *Ricca fluitans*". *Plant Physiol.* 76:75-78.
62. Tam, N. F. Y. & Wong, Y. S. (1996). "Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media". *Bioresource Technology*, vol. 57, 1:45-50.
63. Nunez VJ, Voltolina V, Nieves M, Pina P, Medina and Guerrero M (2001). "Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater". *Bioresour. Technol.* 78 161-164.
64. Yeoung-Sang, Y., Sun Bok Lee, Jong Moon Park, Choong-II, L. & Ji-Won, Y. (1997). "Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients". *J. Che., Tech. Biotechnol.* 69:451.455.
65. Hammouda, O., Gaber, A., and Abdel-Raouf, N. (1994). "Microalgae and wastewater treatment". *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31 205-210.
66. Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I. & Morales E. (2006). "Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela". *SciELO*, 38: 1-1.
67. Seoanez-Calvo, M. (2003). "*Manual de tratamiento, reciclado, aprovechamiento y gestión de las aguas residuales de las industrias agroalimentarias*". Mundi-Prensa Libros. Barcelona, España. 96 pp.
68. Colak O. and Kaya Z. (1988.) "A study on the possibilities of biological wastewater treatment using algae". *Doga Biyoloji Serisi* 12: 18-29.
69. Liang Wang, Min Min, Yecong Li, Paul Chen, Yifeng Chen, Yuhuan Liu, Yingkuan Wang & Roger Ruan. (2009). "Cultivation of green algae *Chlorella* sp. In different wastewaters from municipal wastewater treatment plant". *Appl. Biochem. Biotechnol.* DIO 10.1007/s12010-009-8866-7.
70. Marrett, M.J., & Lord, J.M. (1973). "Glycollate formation and metabolism by algae". *New Phytologist*, 72(4), 751-767.

71. Gil Rodríguez, M. (2003). "Cálculos avanzados en procesos de descontaminación de aguas". CSIC-Dpto. de Publicaciones, 46 pp.
72. Roberts, D., Warren, A., Curds, R.C., & Salvado, H. (2009). "Predicting effluent quality in biological wastewater-treatment processes using ciliated protozoa: an interactive, 'user-friendly' guide on CD-ROM". October. Recuperado el 22 de junio d 2012, de: <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/wastewater-ciliate/>
73. Dolan, J. (1992). "Mixotrophy in ciliates: A review of *Chlorella* symbiosis and chloroplast retention". *Marine Microbial Food Webs*, 6 (2):115-132.
74. Queimaliños, C.P., Modenutti, B.E. & Balseiro, E.G. (1999). "Symbiotic association of the ciliate *Ophrydium naumanni* with *Chlorella* causing a deep chlorophyll a maximum in an oligotrophic South Andes lake". *Journal of Plankton Research*, vol 21, no. 1, pp 167-178.
75. Summerer, M., Sonntag, B. & Sommaruga, R. (2007). "An experimental test of the symbiosis specificity between the ciliate *Paramecium bursaria* and strains of the unicellular green alga *Chlorella*". *Environmental Microbiology*, 9 (8): 2117-2122.
76. Karakashian, M.W. & Karakashian, S.J. (1973). "Intracellular digestion and symbiosis in *Paramecium bursaria*". *Exp. Cell. Res.*, 81, 111-119.
77. Weis, D.S. & Ayala, A. (1979). "Effect of exposure period and algal concentration on the infection of aposymbiotic ciliates by symbiotic alga *Paramecium bursaria*". *J. Protozool.*, 26, 245-248.