



**Casa abierta al tiempo**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIDAD IZTAPALAPA**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALIDAD  
EN BIOTECNOLOGÍA**

**“Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual  
municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas”**

**P R E S E N T A**

**Brissia Maribel Hernández Reyes**

**TUTORA:**

**Dra. Patricia Castilla Hernández**

**CO-TUTORA:**

**M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio**

**México D. F., octubre de 2010**

Iztapalapa, D. F., a 26 de octubre de 2010.

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, **aprobó** la tesis

**“Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual  
Municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas”**

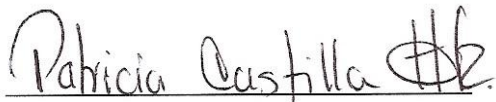
Que presentó

**Brissia Maribel Hernández Reyes**

**Comité Tutorial**

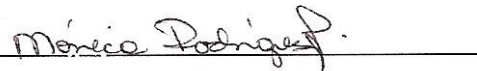
**Tutora:**

Dra. Patricia Castilla Hernández

  
\_\_\_\_\_

**Co-Tutora:**

M. en B. Mónica Cristina Rodríguez Palacio

  
\_\_\_\_\_

**Lectora:**

Dra. Mónica Alicia Meraz Rodríguez

  
\_\_\_\_\_

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a todos y a cada uno de los maestros que han contribuido con mi formación académica.

*Miguel Flores, Santos Velarde<sup>‡</sup>, Efrén García, Sergio Alvares, Mónica Palacios y Patricia Castilla*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Madre Esperanza Reyes, a mis hermanos Brenda Hernández y Jorge A. Ocampo por todo su apoyo.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), por el financiamiento para la realización de este trabajo y por la beca recibida a través del proyecto “Diagnóstico de los niveles de contaminación de la presa Atlangatepec y evaluación de un sistema de tratamiento biológico anaerobio”. Folio UAM-PTC-117.

## RESUMEN

Las microalgas son el primer eslabón de la cadena trófica y se han empleado para la eliminación de nutrientes de aguas residuales de tipo municipal o industrial. En este estudio se evaluó la capacidad para remover amonio y ortofosfato por cultivos libres e inmovilizados de microalgas, utilizando un cultivo Mixto obtenido a partir de agua residual municipal y cultivos puros de *Chlorella* y *Spirulina*. El cultivo Mixto se obtuvo a partir de muestras de agua residual tratada por el reactor anaerobio UASB de la UAM-I, que fueron mantenidas a condiciones ambiente de luz y temperatura. Posteriormente se probó la capacidad de inmovilización de los tres cultivos en dos soportes (lufa y polietileno). Finalmente a los tres cultivos libres o inmovilizados se les realizaron pruebas para evaluar la remoción de ambos nutrientes a dos concentraciones, baja (10 mgNH<sub>4</sub>/L y 5 mgPO<sub>4</sub>/L) y alta (25 mgNH<sub>4</sub>/L y 10 PO<sub>4</sub>/L) concentración. En el cultivo Mixto crecieron Clorofitas (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Pediastrum*), Euglenofitas y Bacilariofitas. Entre los cultivos libres estudiados a baja concentración, la mayor capacidad de remoción la tuvo *Chlorella* con un 50% para amonio y un 74% para ortofosfato; mientras que en alta concentración la mejor remoción se alcanzó con el cultivo Mixto (68 y 76 %, respectivamente). La mayor cantidad de biomasa algal inmovilizada fue alcanzada por *Chlorella*, seguida de *Spirulina* y el cultivo Mixto. Así mismo se encontró que en los cultivos de *Chlorella* y Mixto el consumo de nutrientes se vio favorecido en lufa, y el Mixto presentó el mayor consumo, siendo para amonio del 70 al 99.9% y de ortofosfato del 49.1 al 89.9%.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	7
1.1. Aguas residuales.....	7
1.2. Microalgas.....	10
2. ANTECEDENTES .....	12
3. JUSTIFICACIÓN .....	17
4. OBJETIVOS .....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
5.1 Desarrollo de un cultivo Mixto e identificación.....	19
5.2 Pruebas de remoción de amonio y ortofosfato en cultivos libres .....	20
5.3. Inmovilización de los cultivos en polietileno y lufa.....	21
5.4 Remoción de amonio y ortofosfato en los cultivos Inmovilizados.....	22
5.5 Medio de cultivo .....	22
5.6 Técnicas analíticas.....	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
6.1. Desarrollo del cultivo Mixto e identificación.....	31
6.2. Remoción de amonio y ortofosfato en cultivos libres .....	35

6.3 Inmovilización de cultivos en polietileno y lufa .....	42
6.4 Remoción de amonio y ortofosfato en cultivos inmovilizados .....	46
7. CONCLUSIONES.....	50
8. LITERATURA CITADA.....	51
9. ANEXOS .....	56

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Aguas residuales

El agua residual que se genera de usos municipales o industriales, requiere de atención enfocada hacia los procesos de tratamiento, para que esta pueda ser empleada en distintos usos o simplemente ser descargada a cuerpos receptores, ya sin contaminantes que afecten a la flora y a la fauna de dichos sistemas. Por esto es necesario crear estrategias para su manejo y control. En México estudios realizados por la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) en el 2003, muestran que el caudal de agua residual tratada en el país fue alrededor de  $72.2 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ , de los cuales  $50.8 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  provinieron de aguas municipales y el resto de aguas residuales de origen industrial. Aun con esto, el agua tratada representa sólo cerca del 30% de la generada, mostrando un rezago significativo en esta materia (CONAGUA, 2003).

De acuerdo con la información reportada por este mismo organismo, de las 1132 plantas de tratamiento de agua municipal que existen en México, 936 se encontraban en operación y contaban con una capacidad instalada de  $80.6 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ . Mientras que de las 1,485 plantas para aguas industriales se reporta que el 95% se encontraba en operación, tratando  $25.4 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ , aunque contaban con una capacidad instalada para  $41.9 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  (CONAGUA, 2003). Sin embargo la mayoría de estas plantas producen agua libre de materia carbonada, pero permanecen compuestos como el amonio, nitratos, fosfatos, entre otros.

El deterioro de la calidad del agua, supone un grave problema medioambiental y socioeconómico, que se acentúa en zonas de escasos recursos. Así pues el uso del agua potable para abastecimiento urbano e industrial, debe ir acompañado de una correcta depuración que permita su reutilización para riego agrícola de áreas verdes, aguas recreativas sin contacto directo con el humano, reutilización industrial, piscicultura, etc., o bien como elemento que no perturbe el equilibrio biológico de la zona de vertido y que evite la contaminación de acuíferos subterráneos, masas superficiales de aguas continentales o marinas. Además que las aguas tratadas son un preciado recurso para el riego en épocas de estiaje y zonas desérticas.

Los procesos de tratamiento primario y secundario se emplean en muchos lugares con el propósito de eliminar partículas de fácil sedimentación (primario), y oxidación de la materia orgánica presente en el agua residual (secundario). El resultado final de cada una de estas etapas de tratamiento es un efluente aparentemente limpio. Sin embargo en muchos casos los efluentes secundarios contienen una alta concentración de nitrógeno y fósforo, lo cual puede causar eutroficación de los cuerpos receptores y otros problemas a largo plazo debido a la presencia de metales pesados y compuestos orgánicos de difícil degradación (De la Noüe *et al.*, 1992; Escorihuela *et al.*, 2007).

El nitrógeno puede encontrarse en varias formas, como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) y formando parte de compuestos orgánicos como



proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; en aguas residuales municipales se encuentra en mayor cantidad como amonio. Al igual que el amonio, el fósforo se encuentra en varias formas que van desde inorgánicas particuladas y/o disueltas ( $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{HPO}_4^-$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$  (F, Cl, OH)) y orgánicas ácidos nucleicos (DNA y RNA), etc. El fósforo también es un componente importante en la preparación productos para la limpieza como detergentes, insecticidas y plaguicidas, por lo que se encuentran en aguas residuales industriales y municipales principalmente como ortofosfato ( $\text{PO}_4^-$ ).

Tanto el amonio como el ortofosfato pueden ser incorporados a sistemas acuáticos por arrastre de los suelos fertilizados con abonos nitrogenados y fosfatados, pero también por descargas de aguas residuales industriales sin tratamiento, o por aguas tratadas que no reciben un tratamiento terciario para la eliminación de estos nutrientes (Charles, 1993).

Las concentraciones de amonio en aguas residuales municipales se encuentran entre 12 a 50  $\text{mgNH}_4^+/\text{L}$  (Hoffmann, 1998; Barrera *et al.*, 2008; Dar, 1999), mientras que las concentraciones de fósforo inorgánico pueden estar entre 1 y 5  $\text{mg/L}$ , siendo el fósforo total entre 2 y 20  $\text{mg/L}$  (Dar, 1999); aunque en la Ciudad de México se han reportado niveles que alcanzan los 25  $\text{mg/L}$  (Monroy *et al.*, 1997).

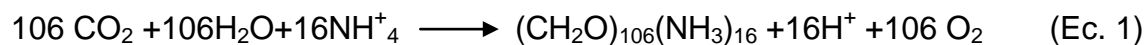
La forma más empleada para la eliminación de materia orgánica y nitrogenada, en los sistemas de tratamiento biológicos, se lleva a cabo mediante dos clases de

organismos: microorganismos heterótrofos y bacterias nitrificantes. Los microorganismos heterótrofos se caracterizan por usar compuestos orgánicos para su crecimiento, tanto en condiciones aerobias (usando oxígeno como agente oxidante) o anóxicas (reduciendo nitrito o nitrato a nitrógeno gaseoso). Las bacterias nitrificantes en condiciones aerobias oxidan parcialmente el amoníaco a nitrito, o totalmente hasta nitrato; estas se caracterizan por tener menor velocidad de crecimiento y menor tasa de producción celular que las bacterias heterótrofas. Sin embargo, en los últimos años los organismos fotosintéticos (microalgas) han recibido mayor atención, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, en donde se emplean como un biosistema alternativo para la remoción de nutrientes de este tipo de aguas (De la Noüe *et al.*, 1992), jugando un papel clave por su acción generadora de oxígeno.

## 1.2. Microalgas

Las microalgas corresponden al primer eslabón en la cadena trófica de los sistemas acuáticos por ser organismos fotoautótrofos obligados, es decir, requieren de la energía proveniente de la luz para realizar sus procesos biológicos (Rosas, 2004). Las microalgas incorporan nitrógeno preferentemente en forma de amonio (Ecuación 1), siendo utilizado para formar aminoácidos por medio de transaminación. Sin embargo también tienen la capacidad de incorporarlo en forma de nitrato (Ecuación 2) (Contreras, 1994).

Asimilación de amonio por fitoplancton

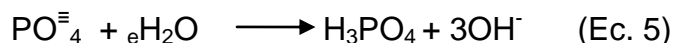
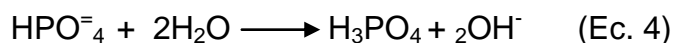
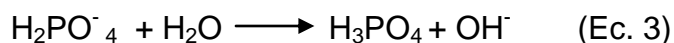


Asimilación de nitratos por fitoplancton

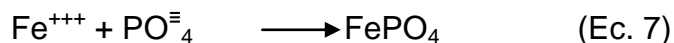
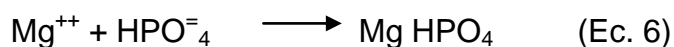


Las microalgas también incorporan fósforo en varias formas (Contreras, 1994), como se muestra en las ecuaciones 3 a 7.

Asimilación de formas fosfatada sin iones acompañantes



Asimilación de formas fosfatadas con iones acompañantes



Las microalgas de acuerdo a estas capacidades de incorporación de nutrientes pueden emplearse como una alternativa en la depuración de aguas residuales.

## 2. ANTECEDENTES

La utilización de microalgas para remoción de nutrientes ha sido estudiada por más de 50 años (Lavole y De la Noüe, 1992). El cultivo masivo de microalgas en aguas residuales tiene el propósito de reeditar en costo-efectividad, debido a la tecnología simple que envuelve, aunado a que los nutrientes son reciclados, es decir, conservados como un valioso material representado por el alto contenido proteínico en biomasa (Nuñez *et al.*, 2001). La efectividad del sistema dependerá del medio de cultivo que se emplee y del propósito del cultivo, por ejemplo como formación de productos de alto valor agregado (obtención de vitamina, pigmentos para acuicultura, etc). Una alternativa es el uso de aguas residuales como medio de crecimiento, lo que podría disminuir los costos de producción, debido a los grandes volúmenes generados y a las altas concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) naturalmente presentes.

A pesar de que existe poca aceptación sobre el uso del agua residual para el cultivo de microalgas, atribuido principalmente al carácter estético y de salud pública (Becker,1994), estudios realizados por Sandbank y Hopher (1978) han comprobado la factibilidad de usar estas aguas para cultivo de microalgas y poder emplear la biomasa como alimento para peces. Asimismo, los desechos animales pueden ser tratados por sistemas con microalgas, obteniendo una producción de biomasa con alto contenido de proteínas. Por lo tanto, los esfuerzos para cultivar este tipo de microorganismos en aguas residuales han buscado conseguir un

doble beneficio, la producción de biomasa y un efluente limpio (Schelef *et al.*, 1980).

El uso de las microalgas, como biosistema alternativo ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a que además de incorporar nutrientes, tienen la capacidad de absorber metales y acelerar la inactivación de bacterias patógenas (Abalde *et al.*, 1995, Lau *et al.*, 1995, Tam *et al.*, 2001).

Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como algunas especies del grupo de las cianobacterias, se han reportado para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, destacando las provenientes de plantas de tratamiento convencionales (Lavole y De la Noüe, 1992) de origen industrial (González *et al.*, 1997), urbano (Jonte *et al.*, 2002). Por otra parte también se ha evaluado el uso de excretas de cerdo y de aves sobre el crecimiento de microalgas (Baumgarten *et al.*, 1999; Bermúdez *et al.*, 2003).

No obstante a la gran cantidad de estudios realizados uno de los problemas es que la mayoría utiliza algas en suspensión (cultivos libres), donde los procesos de cosecha requieren de métodos caros o complicados. En la Tabla 1, se presentan estudios que han empleado este tipo de cultivos.

Medina *et al.* (2004), reportan que un co-cultivo bacterioalgal en una primera alimentación removieron un 88 y 94% de amonio y fósforo total y en una segunda

un 90 y 96%, respectivamente, siendo más eficiente en esta última ya que en la primera alimentación los microorganismos se estaban adaptando al medio.

Tabla 1. Concentraciones de nutrientes y eficiencias de remoción alcanzadas en cultivos libres.

Tipo de agua	Microalgas	NH <sup>+</sup> <sub>4</sub> (mg/L)	PO <sup>-</sup> <sub>4</sub> (mg/L)	Referencia
Residual	Cianofitas	16.9	ND	Vargas <i>et al.</i> (2004)
	Clorofitas	(36.4 %)		
Municipal	<i>Chlorella sp.</i>	30.1	7.5	Chacón <i>et al.</i> (2004)
	<i>Scenedesmus sp.</i>	(44%)	(48%)	
Municipal	Bacterias-	*90	**10	Medina <i>et al.</i> ( 2003)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	(73%)	(42%)	

(%) = Eficiencia de remoción; ND = No reportado; \*Nitrógeno total; \*\*Fósforo total.

Como una medida alternativa para revertir los problemas que presentan los procesos de cosecha para cultivos libres, se han realizado estudios en donde se inmovilizan las microalgas en soportes de diversos tipos. Chevelier y De la Noüe (1985), propusieron el uso de carragenina como soporte para *Scenedesmus*, obteniendo buenos resultados en cuanto a la remoción de nutrientes de efluentes secundarios (Tabla 2). En este mismo tipo de soporte, la cianobacteria *Spirulina maxima* utilizada para el tratamiento terciario de desechos de cerdo, alcanzó una

remoción de amonio y ortofosfato alrededor del 90%, cuando el agua residual fue diluida al 25% (Cañizares *et al.*, 1994).

Tabla 2. Microalgas empleadas, concentraciones de nutrientes y eficiencias de remoción alcanzadas en cultivos inmovilizados.

Tipo de agua	Microalgas	Soporte	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/L)	PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	Referencia
Sintética	<i>S. obliquus</i> (pH 7.7)	Carragenina	15.8 (70%)	4.8 (100%)	Chevalier y De la Noüe (1985)
Sintética porcina	<i>S. maxima</i>	K-Carragenina	28.0 (92%)	*23.0 (91%)	Cañizares <i>et al.</i> (1994)
Sintética	<i>C. vulgaris</i>	Alginato de calcio	38.6 (100%)	18.4 (95%)	Tam y Wong (2000)
Sintética secundaria	<i>C. vulgaris</i> <i>S. rubescens</i>	Doble capa sobre nitrocelulosa	25.7 (94 y 96%)	9.2 (88 y 90%)	Shi <i>et al.</i> (2006)
Sintética	<i>C. vulgaris</i> <i>co-inmovilizada</i> <i>con A.</i> <i>brasiliense</i>	Alginato	15 (100%)	3.5 (92%)	Bashan y Bashan (2002)

(%) = Eficiencia de remoción; ND = No reportado; \*Fósforo total.

La inmovilización en alginato también ha sido explorada, Jeanfils *et al.* (1993), reportaron velocidades de incorporación de nitrato para cultivos de *Chlorella vulgaris* libre e inmovilizada, no encontrando diferencias importantes entre ambos cuando se alimentaron a una concentración de 2 mM (0.37 y 0.36 d<sup>-1</sup>) y ligeras cuando se alimentaron a 4 mM (0.39 y 0.36 d<sup>-1</sup>). Por otra parte Tam y Wong (2000), inmovilizaron *Chlorella vulgaris* en alginato de calcio y observaron una elevada eficiencia en la remoción de N-NH<sub>4</sub> (100%) y P-PO<sub>4</sub><sup>-</sup> (95%) en 24 horas de tratamiento en biorreactores. Shi *et al.* (2006) reportaron que después de la inmovilización las células, estas se adaptaron y crecieron en una doble capa, donde *Chlorella vulgaris* removió el 94% y 88% de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, respectivamente.

Posteriormente Travieso *et al.* (1996), inmovilizan en alginato *Chlorella vulgaris* y *Chlorella kessleri*, y las mantuvieron en biorreactores de lecho suspendido y lecho fijo, alcanzando una eficiencia de remoción de amonio del 69.7 al 81.7% y de 60.5 al 71.9%, respectivamente.

Aunque también se han realizado estudios donde se utilizan bacterias como *Azospirillum brasilense* para promover el crecimiento de microalgas (de-Bashan y Bashan, 2003) ver Tabla 2.

Como se mostró el empleo de soportes resulta una alternativa promisorio en este campo, con vías a mejorar las eficiencias de eliminación de nutrientes, en donde también las microalgas producidas del tratamiento de aguas residuales, pueden



utilizarse como suplemento alimenticio en acuicultura (alimentación de peces, moluscos y crustáceos), como un aporte de materias primas para industrias (química, cosmética, entre otras) y biofertilizantes.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Las aguas residuales urbanas pueden representar un medio viable de cultivo para la producción de la biomasa algal. Así mismo, se deben considerar los beneficios que este tipo de cultivos proporcionarían, ya que México, requiere de la implementación de sistemas de postratamiento, y como se ha presentado la utilización de microalgas puede tener beneficios como la obtención de aguas con valores de nutrientes permisibles para ser liberadas a cuerpos de agua, o para emplear estos efluentes para diversos fines (riego de áreas verdes, aguas recreativas sin contacto directo con el humano, reutilización industrial, piscicultura, etc.). Además la biomasa algal inmovilizada y recuperada representa una fuente potencial de alimentos, para fines de acuicultura o productos industriales de alto valor agregado, entre otras importantes aplicaciones.

Por otra parte, como se mostró anteriormente la capacidad de incorporación de nutrientes por estos organismos se ha realizado en cultivos libres o inmovilizados en soportes orgánicos. En este estudio se pretende utilizar dos soportes, polietileno de baja densidad (inerte) y esponja vegetal del género *Luffa* (estropajo, zacate o lufa) que es orgánico. Así también se pretende seleccionar especies de microalgas con capacidad para ser retenidas en los soportes (inmovilización), que

puedan presentar altas tasas de crecimiento y una alta producción de biomasa, que probablemente pudieran tener mayor capacidad de asimilar, acumular y remover nutrientes. Lo anterior con la finalidad de utilizarlos en estudios posteriores, en biorreactores, para proponer tecnologías que presenten ventajas en los procesos de cosecha y tiempo de reacción. Por lo anterior se plantearon los objetivos que se mencionan en el siguiente apartado.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar la capacidad de remoción de ortofosfato y amonio presentes en aguas residuales municipales por cultivos de microalgas (dos puros y uno Mixto) libres e inmovilizados.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Promover el desarrollo de un cultivo Mixto a partir de agua residual tratada, en varias condiciones e identificarlo taxonómicamente.

- Determinar la capacidad de remoción de ortofosfato y amonio en cultivos libres, dos puros (*Chlorella* y *Spirulina*) y uno Mixto.
- Inmovilizar los cultivos (*Chlorella*, *Spirulina* y Mixto) en dos soportes (polietileno y lufa).
- Evaluar la capacidad de remoción de ortofosfato y amonio en los cultivos inmovilizados (*Chlorella* y Mixto).

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Desarrollo de un cultivo Mixto e identificación

Se colectaron muestras de agua residual municipal cruda (sin tratamiento) y tratada proveniente de un reactor UASB ubicado en la UAM-I. Dichas muestras se colocaron en bidones de 4 litros de volumen y se incubaron por 23 días a condiciones ambiente de luz y temperatura. Cada tercer día se tomaron 30 mL de muestra y se les determinó la concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^-$ . Además para la identificación de las microalgas presentes se tomó un mililitro de la muestra y fue fijada con lugol, posteriormente fue observada en un microscopio óptico.

Por otra parte, a otras muestras de agua residual tratada se les realizaron diluciones al 10, 30, 50 y 100%, utilizando agua destilada estéril, se incubaron por 23 días en matraces de 1L a las condiciones de luz y temperatura antes mencionadas. Finalmente se identificaron las microalgas que crecieron en cada dilución.

Todos los experimentos realizados en este estudio se llevaron a cabo por triplicado.

## **5.2 Pruebas de remoción de amonio y ortofosfato en cultivos**

### **libres**

Se utilizaron las cepas de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Spirulina subsalsa* que fueron aisladas del lago de origen volcánico Los Tuxtlas en Veracruz, Ver., y una cepa Mixta desarrollada a partir de agua residual tratada de la UAM-I. A matraces de 1L se les adicionó medio F/2 modificado (Tabla 3, 4 y 5) y se inocularon con estas cepas. El inóculo para *Chlorella* consistió de  $1.23 \times 10^{10}$  células/L, para *Spirulina* s. de 8 filamentos de entre 23-30  $\mu\text{m}$  y de  $12.3 \times 10^9$  células/L para el Mixto, este último a su vez estuvo integrado por 40.5% de *Chlorella*, 35.8% de *Scenedesmus* sp. y 23.6% *Chlamydomonas*. Posteriormente fueron adicionados amonio y ortofosfato en dos concentraciones, la primera denominada “baja” que consistió de 15 y 5 mg/L de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^-$ , respectivamente, y “alta” de 25 y 10 mg/L de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^-$ , respectivamente. Los cultivos se incubaron a una temperatura de

$20\pm 1^\circ\text{C}$ , una irradianza de  $90.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un ciclo luz-oscuridad de 12:12 horas. Para evaluar la remoción de ambos nutrientes y el crecimiento se tomó una muestra de 30 mL cada tercer día.

### **5.3. Inmovilización de los cultivos en polietileno y lufa**

En matraces de 1L se adicionó medio de cultivo F/2 modificado, y se le agregaron los correspondientes soportes. Como soportes se utilizó polietileno de baja densidad con un tamaño de partícula entre 0.7 y 0.9 mm, a cada cultivo se le agregaron 30 g. La lufa fue cortada en cuadros aproximadamente de 2.25 cm y a cada matraz se le adicionaron 11.2 g. Ambos soportes fueron previamente esterilizados por luz ultravioleta y calor húmedo, respectivamente. Posteriormente los matraces se inocularon con las cepas de *Chlorella v.*, *Spirulina s.* y la Mixta; se les adicionaron el amonio y el ortofosfato en concentraciones baja y alta. Se incubaron durante 20 días en las mismas condiciones que los cultivos libres. Para la remoción de nutrientes se tomó una muestra al inicio y al final del experimento, así mismo para el crecimiento, que en esta ocasión se determinó por peso seco (anexo 3).

## **5.4 Remoción de amonio y ortofosfato en los cultivos**

### **Inmovilizados**

Estas pruebas se realizaron en matraces de 1 litro, utilizando los dos soportes (polietileno y lufa) anteriormente inmovilizados. Para esto se determinó la biomasa inmovilizada inicial en cada uno de los soportes (se determinó por peso seco) y su correspondiente cepa. Se les adicionaron el amonio y el ortofosfato en concentraciones baja y alta. Se incubaron en las mismas condiciones que los cultivos libres y se les tomaron muestras cada tercer día para determinar la remoción de ambos nutrientes.

### **5.5 Medio de cultivo**

Para las pruebas se utilizó el medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962, Guillard, 1975) modificado, en el que la modificación consistió en retirar cualquier fuente de nitrógeno diferente al amonio. La preparación del medio se llevó a cabo de la siguiente manera, a 950 mL de agua filtrada se le adicionaron la cantidad indicada de cada compuesto (Tabla 3), y se llevó a un volumen de 1L con agua destilada previamente esterilizada.

Tabla 3. Fórmula para preparar el medio de cultivo F/2.

<b>Cantidad (mL/L)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Solución Stock</b>
1	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.5 g/100mL
	Soluciones de metales traza	Ver formulación en la Tabla 4
	Solución de vitaminas	Ver formulación en la Tabla 5

Para prepara la solución de metales traza, a 950 mL de agua destilada se le adicionaron la cantidad indicada de cada compuesto (Tabla 4) y se llevó a un volumen de 1L con agua destilada y se esterilizó.

Tabla 4. Formulación para la soluciones de metales traza.

<b>Cantidad (mL/L)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Solución Stock</b>
1	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.98 g/100 mL
1	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.63 g/100 mL
1	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.2 g/100 mL
1	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1.0 g/100 mL
	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	18.0 g/100 mL

Para preparar la solución stock, a 950 mL de agua destilada se le adicionaron las cantidades adecuada de cada compuesto y se llevó a un volumen final de 1L con agua destilada. Se esterilizó por filtración y se guardó en viales de plástico estériles en el congelador.

Tabla 5. Formulación para la solución de vitaminas.

Cantidad (mL)	Compuesto	Solución stock
0.1	Vitamina B <sub>12</sub> (cianocobalamina)	0.1 g/100mL
1.0	Biotina	0.1 g/100mL
200mg	Tiamina/HCl	

## 5.6 Técnicas analíticas

La determinación de la concentración de amonio y ortofosfato se realizó por espectrofotometría (Contreras, 1994).

### 5.6.1 Determinación de amonio

Se preparó una solución patrón I, pesando 0.1 g de sulfato de amonio  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ , y se aforó con 1000 mL de agua destilada, la concentración de esta solución fue de 27.2 mg  $\text{NH}_4^+$ /L.



Posteriormente se realizó una solución patrón II, para la que se tomaron 18.4 mL de la solución patrón I y se aforó a 100 mL con agua destilada.

A partir de la solución patrón II se prepararon seis soluciones de concentración conocida y un blanco, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Diluciones para la curva de calibrado de  $\text{NH}_4^+$ .

<b>Concentración (<math>\mu\text{gNH}_4^+/\text{L}</math>)</b>	<b>Solución patrón (mL)</b>	<b>Agua destilada (mL)</b>
0	0	*50
100	1	49
200	2	48
300	3	47
400	4	46
500	5	45
600	6	44
*Blanco		

Una vez preparadas las soluciones de concentración conocida, de cada matraz se tomaron 5 mL y se agregaron las soluciones que se muestran en la Tabla 7 (ver preparación en el anexo 1), se dejaron reaccionar en la obscuridad durante 90 minutos y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 640 nm en un espectrofotómetro.

Tabla 7. Soluciones para la determinación de amonio.

Solución	Volumen (mL)
Fenol	0.2
Nitroprusiato	0.2
Oxidante fresca	0.5
Oxidante fresca	
• Reactivo alcalino	• 10
• Hipoclorito de sodio	• 3

Finalmente por el método de mínimos cuadrados y a partir de las concentraciones (X) y absorbancias (Y), se obtuvieron los parámetros de la ecuación de la recta ( $m$  = pendiente,  $b$  = ordenada al origen y  $R^2$  = coeficiente de determinación) ver Figura 1a y b.

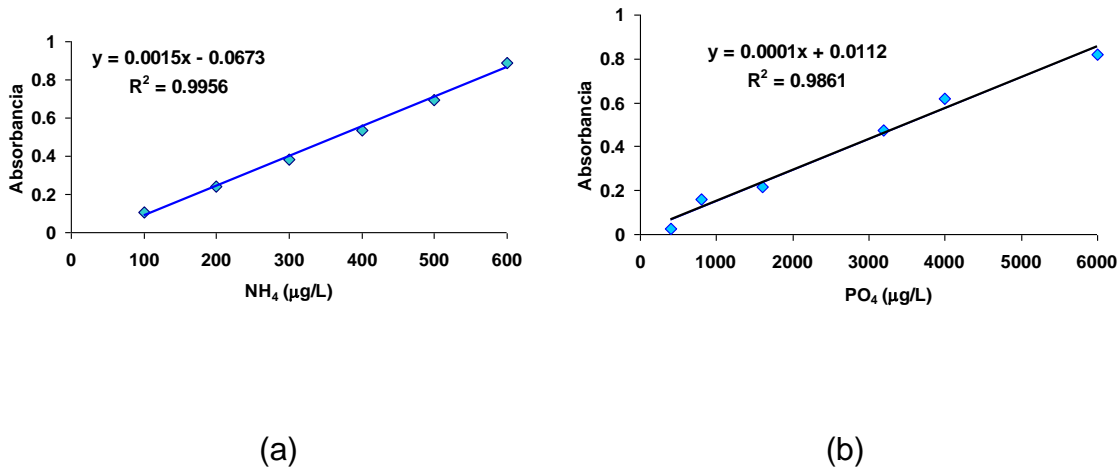


Figura 1. Curvas de calibrado para amonio (a) y ortofosfato (b).

Las muestras obtenidas de los experimentos fueron filtradas en papel Whatman de  $0.45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro, posteriormente se tomaron 5 mL y se le adicionaron las soluciones descritas en la Tabla 7. Pasados los 90 minutos de reacción las muestras se leyeron a 640 nm y con la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibrado, se calculó la concentración de amonio presente en éstas.

### 5.6.2. Determinación de ortofosfato.

Para la solución patrón I, se pesaron 0.2039g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se aforaron a 250 mL con agua destilada. A continuación de la solución patrón anterior, se tomaron 4.4 mL y se aforaron con agua destilada hasta 250 mL (solución patrón II). Posteriormente a partir de la solución patrón II se prepararon seis soluciones de concentración conocida y un blanco (Tabla 8)

Tabla 8. Soluciones para la curva de calibrado de  $\text{PO}_4^-$ .

<b>Concentración</b> <b>(<math>\mu\text{gPO}_4^-/\text{L}</math>)</b>	<b>Sol. Patrón II</b> <b>(mL)</b>	<b>Agua</b> <b>destilada(mL)</b>
0	0	*50
400	1	49
800	2	48
1600	3	47
3200	4	46
4000	5	45
6000	6	44
*Blanco		

De cada solución se tomaron 5 mL, agregándoseles 0.5 mL de la mezcla de reactivos (Tabla 9), se dejaron reaccionar durante 15 minutos y se leyó la absorbancia a 885 nm.

En la Figura 1(b), se muestran los parámetros de la recta obtenidos para la curva de calibración de ortofosfato, para esto se siguió el mismo procedimiento descrito para la determinación de amonio.

Las muestras obtenidas de los experimentos también se filtraron en papel Whatman de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, posteriormente se tomaron 5 mL y se

les adicionaron 0.5 mL de la mezcla de reactivos (Tabla 8), después de 15 minutos las muestras se leyeron a 885 nm y con la ecuación de la recta obtenida en la curva de calibrado, se calculó la concentración de ortofosfato de cada una de estas.

Tabla 8. Mezcla de reactivos para la determinación de  $\text{PO}_4^-$ .

<b>*Solución</b>	<b>Mezcla (mL)</b>
Molibdato	2
Ácido sulfúrico	5
Ácido ascórbico	2
Tartrato antimonil potásico	1
*ver preparación en el anexo 2.	

### 5.6.3 Determinación de biomasa por conteo celular

La determinación de la biomasa en los cultivos libres se llevó a cabo por la cuantificación de microalgas encontradas en un microlitro de cada muestra y se hizo por duplicado.

#### **5.6.4. Determinación de biomasa por peso seco**

En los cultivos inmovilizados la biomasa se determinó por el método de peso seco. Para esto inicialmente se colocaron filtros Whatman de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (GF/F) en charolas de aluminio y se metieron en la mufla a 550 °C durante 30 minutos, después se sacaron, se colocaron en un desecador por 15 minutos y se pesaron hasta obtener un peso constante.

Por otro lado, las muestras con soporte colonizado con las microalgas (5.0 mL de polietileno o 5 cuadros de lufa), se colocaron en botellas serológicas de 60 mL, se les adicionaron 20 mL de agua destilada, se sellaron con tapones de aluminio y se sonicaron por intervalos de 2 min para desprender del soporte la biomasa de microalgas; pasado este tiempo con una jeringa se sacaron los 20 mL de agua y se pasaron por los filtros anteriormente puestos a peso constante, nuevamente se adicionaron 20 mL de agua destilada y el procedimiento se repitió hasta que el agua estuvo libre de biomasa. Una vez concluido este procedimiento los filtros fueron colocados en una estufa a 100 °C por 24 horas, se sacaron y se mantuvieron en el desecador por 15 minutos, para después pesarse.

Cuando los soportes quedaron libres de biomasa algal se pusieron en una estufa a 60°C durante 2 días para eliminar la humedad y a continuación se pesaron. Por último la biomasa algal en cada muestra se calculó con los gramos de sólidos totales inmovilizados en el soporte, entre los gramos de soporte seco utilizados en la determinación, y se expresó como g biomasa algal/g soporte seco.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Desarrollo del cultivo Mixto e identificación

Como se muestra en la Figura 2, las microalgas que crecieron en el cultivo a partir de agua residual cruda después de 20 días fueron del grupo de las Clorofitas, Euglenofitas y Bacilariofitas.

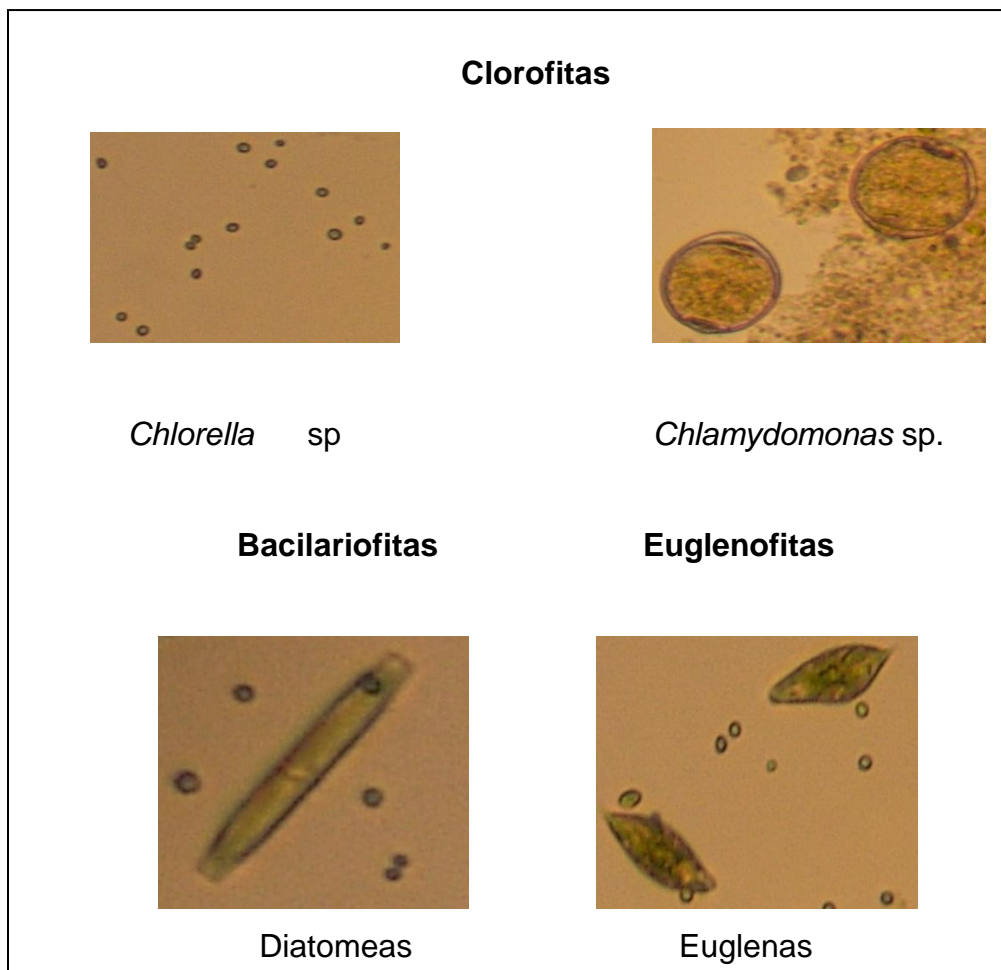


Figura 2. Microlagas identificadas en el agua residual cruda de la UAM-I.

En el cultivo a partir de agua residual tratada y que se denominó como Mixto (Figura 3), se encontraron los grupos: Clorofitas (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Pediastrum*), Bacilariofitas (*Diatomea* sp.) y Euglenofitas (*Euglena* sp.), encontrando con mayor abundancia *Chlamydomonas*. Por el contrario Escorihuela *et al.*, (2007), reportan que predominaron las Cianofitas en agua tratada por una laguna aerobia. Por lo que en este estudio probablemente los nutrientes del efluente anaerobio del reactor UASB marcaron esta diferencia.

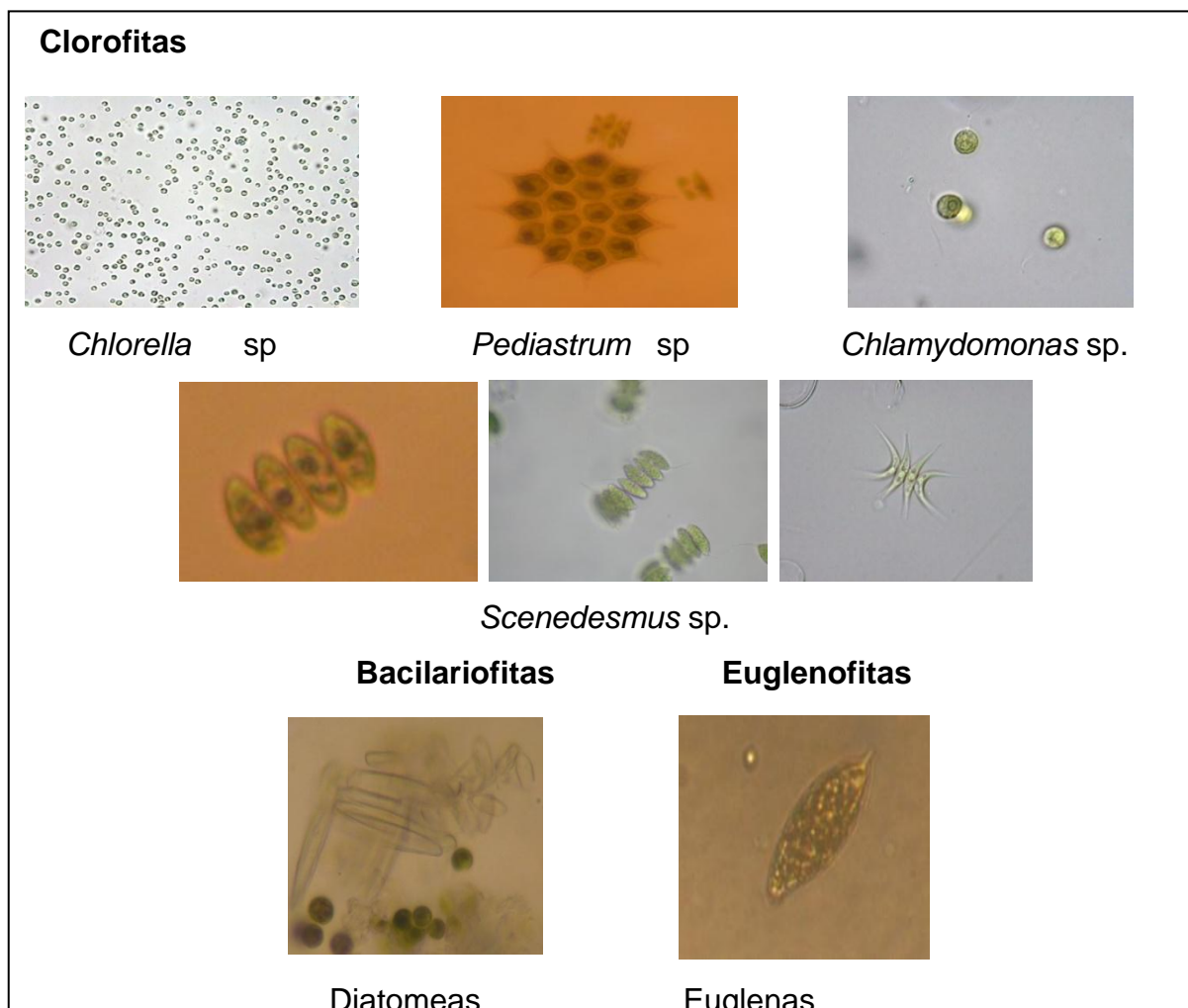




Figura 3. Microlagas encontradas en agua tratada por un reactor UASB (cultivo Mixto).

### 6.1.1. Consumo de nutrientes en el agua residual cruda y tratada durante el desarrollo del cultivo Mixto

En el agua cruda a los 13 días se empezó a mostrar un consumo, tanto para amonio como para ortofosfato (Figura 4). De una concentración inicial de 102.5 mg/L de  $\text{NH}_4^+$ , a los 23 días alcanzó un consumo de 20.3 mg/L mientras que para  $\text{PO}_4^-$  en este mismo lapso de tiempo el consumo fue de 0.9 mg/L, de los 5.8 mg/L iniciales. El nulo consumo durante los primeros 13 días pudo deberse a que las microalgas requieren un periodo para adaptarse a las condiciones del cultivo y a las altas concentraciones de nutrientes.

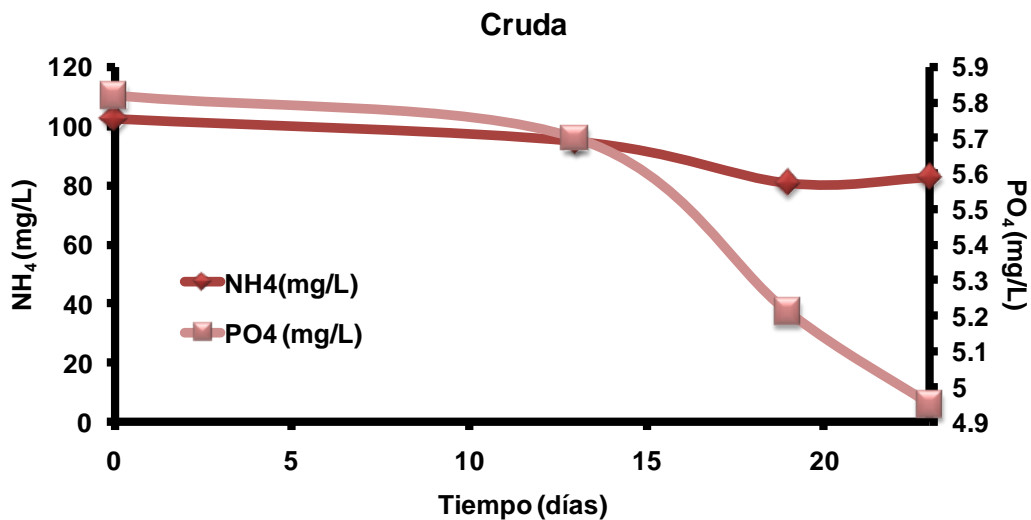


Figura 4. Consumo de amonio y ortofosfato durante el desarrollo del cultivo Mixto en agua residual cruda.

A diferencia del agua residual cruda donde se inició el consumo de estos nutrientes hasta los trece días, en el agua tratada el consumo se presentó desde el inicio y a lo largo del experimento; para  $\text{PO}_4^-$  este fue de 0.7 mg/L, con una concentración inicial y final de 6.9 y 6.2 mg/L, respectivamente. Por su parte el amonio inicial fue de 119.0 mg/L, quedando sin consumirse 61.9 mg/L a los 23 días, esto representó un consumo de 57.1 mg/L. Lo anterior indicó que el agua tratada proporcionó las mejores condiciones para una mayor diversidad de este tipo de microorganismos.

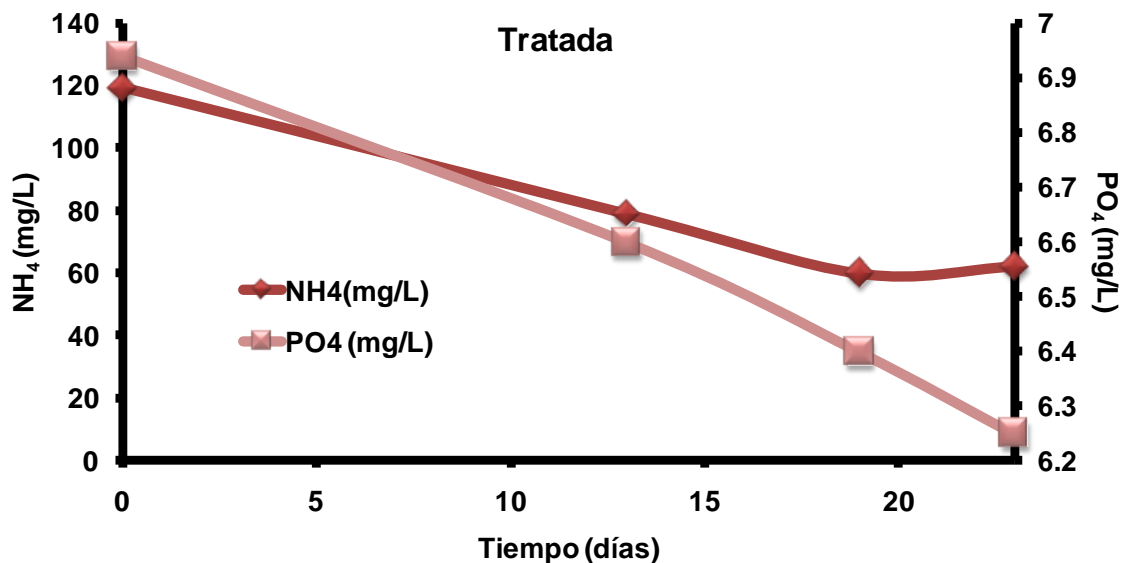


Figura5. Consumo de ortofosfatos y amonio por el cultivo desarrollado en el agua residual tratada.

Comparando entre ambos cultivos y aunque el de agua cruda presentó un retraso de 13 días para el consumo de estos nutrientes, en términos de la remoción de amonio y fósforo esta fue similar, siendo para el agua cruda del 15% para  $\text{PO}_4^-$  y 25% para  $\text{NH}_4$ , mientras que para agua tratada fueron del 10 y 29%, respectivamente.

### **6.1.2. Desarrollo de cultivos en agua residual a diferentes diluciones**

La diversidad en los cultivos en las diferentes diluciones mostró que conforme fue incrementando la concentración, los cultivos se fueron haciendo mono específicos, por ejemplo a una dilución del 30% se encontraron *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*, mientras que en 50% predominaron *Chlorella* y *Chlamydomonas*, y en 100% los géneros más abundantes fueron *Chlorella* y *Scenedesmus*. Cabe señalar que en todas las diluciones predominó *Chlorella*, esto debido a que esta microalga tiene una amplia capacidad de adaptación a aguas con concentraciones variadas de nutrientes.

## **6.2. Remoción de amonio y ortofosfato en cultivos libres**

### **6.2.1. Baja concentración**

La remoción de amonio y ortofosfato a baja concentración ( $15 \text{ mgNH}_4^+/\text{L}$  y  $5 \text{ mgPO}_4^-/\text{L}$ ), como se muestra en la Figura 6a, el cultivo de *Chlorella* fue el que presentó mejor remoción de amonio, a partir del día 8 presentó un mayor consumo a pesar de que tuvo una concentración inicial ligeramente superior, alcanzando a los 20 días un consumo de  $8.3 \text{ mgNH}_4^+ / \text{L}$ . Seguido del cultivo Mixto que consumió 3.4 de los  $12.1 \text{ mg/L}$  iniciales. Por último el cultivo de *Spirulina* mostró una constante incorporación, consumiendo  $2.2 \text{ mg/L}$  de los  $13.7 \text{ mg/L}$  iniciales. Así la remoción de amonio para los cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y Mixto fue de 50, 16 y 23%.

En la Figura 6b, se muestra como el  $\text{PO}_4^-$  es consumido de forma preferente por *Spirulina*, a los 16 días este nutriente fue casi nulo y a los 20 días se alcanzó un consumo de  $6.17 \text{ mg/L}$  de los  $6.4 \text{ mg/L}$  iniciales. Por su parte *Chlorella* exhibió un consumo de  $3.96 \text{ mg/L}$ , con una concentración inicial de  $5.3 \text{ mg/L}$  y una final de  $1.38 \text{ mg/L}$ . Finalmente el cultivo Mixto presentó un consumo menor ( $1.8 \text{ mg/L}$ ), con una concentración inicial de  $7.85 \text{ mg/L}$ . La remoción de ortofosfato fue del 74, 96 y 23% para los cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y Mixto, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 6c, el crecimiento de las células en el cultivo de *Chlorella* fue mayor y presentó una fase lag de sólo 8 días, lapso de tiempo en el que no se observó un cambio significativo en el consumo de ambos nutrientes, considerándose que en este tiempo las microalgas se adaptaron al medio.

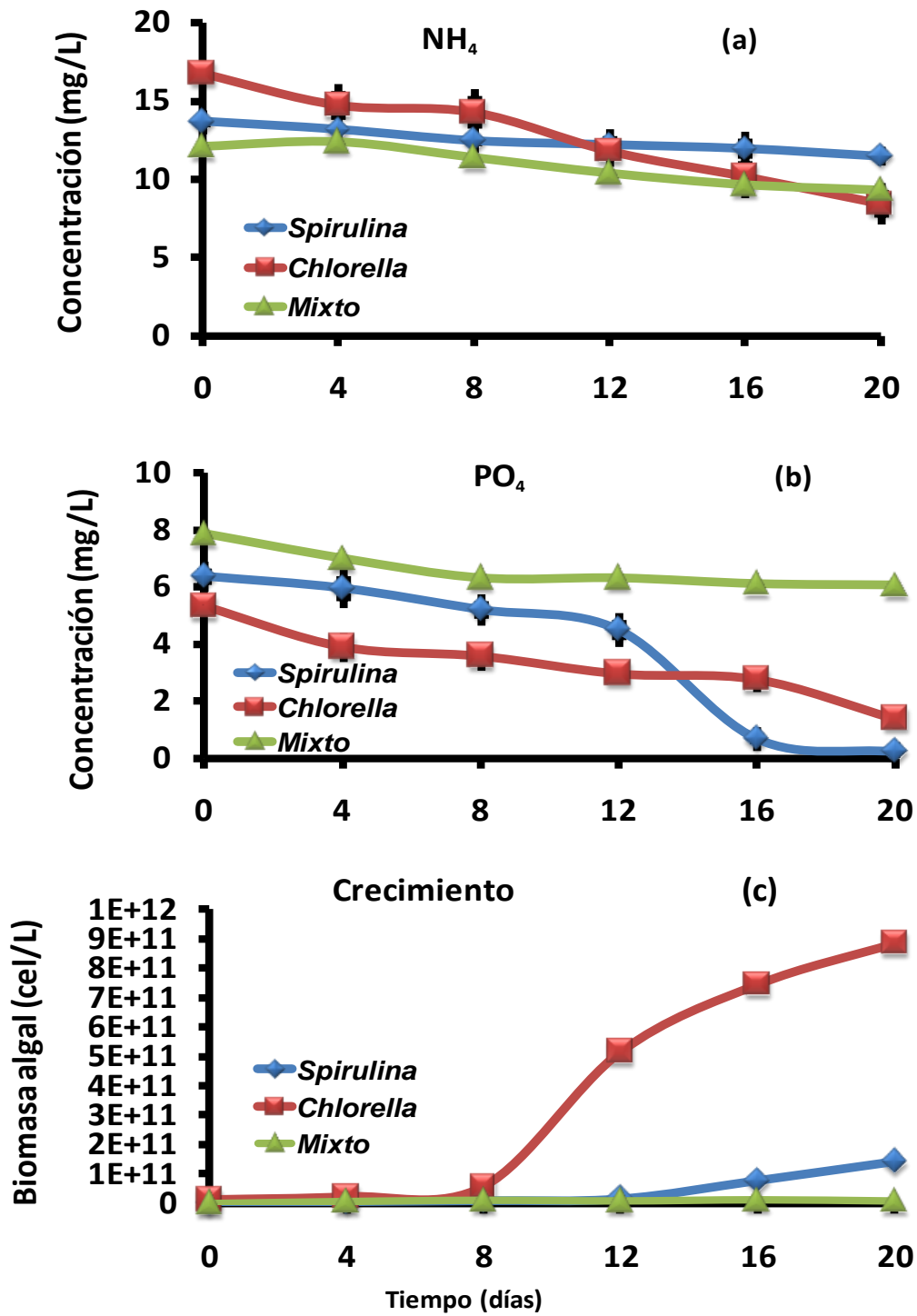


Figura 6. Perfil de remoción de amonio (a), ortofosfato (b) y crecimiento (c) a baja concentración, con cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y Mixto.

A partir de ese día se observó una fase exponencial alcanzando un crecimiento de  $8.9 \times 10^{11}$  cel/L. El crecimiento fue seguido por el cultivo de *Spirulina* quien mostró una fase lag de 12 días, en los días posteriores exhibió un ligero crecimiento hasta alcanzar  $1.4 \times 10^{11}$  filamentos/L. Por último el cultivo Mixto, no mostró una fase lag, manteniéndose constante para alcanzar a los 20 días  $7.7 \times 10^{10}$  cel/L.

Respecto a los nutrientes el cultivo Mixto fue el que presentó los niveles menores de consumo, esto podría ser debido a que por su origen (agua residual) estas microalgas están adaptadas a concentraciones de nutrientes más elevadas, en comparación con las concentraciones probadas en este experimento. Por otra parte, a pesar de que *Spirulina* tuvo un consumo casi cercano al 100% de  $\text{PO}_4^-$ , se consideró que *Chlorella* mostró una mejor capacidad de consumo de nutrientes ya que removió ambos. Comparando con otros estudios, Vargas *et al.* (2004), reportan que en una laguna facultativa cultivos de cianofitas y clorofitas alcanzaron una remoción de amonio del 36.4% a partir de una concentración de 16.9 mg/L, que fue menor a la alcanzada en este estudio por *Chlorella* (50%), y mayor a la de los cultivos de *Spirulina* y Mixto (16 y 23%).

Además, las células cuantificadas en el cultivo Mixto correspondieron en un 83.7, 14.3 y 1.9% a *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*, respectivamente. Escorihuela *et al.* (2007), reportan que en la entrada y salida de una laguna de

pulimiento predominó una población perteneciente a las cianofitas, con 99.5 y 97.45%, respectivamente, siendo el género más frecuente *Synechocystis* con un 96.25%. Comparando con este estudio la diferencia de divisiones (clorofitas y cianofitas) podría ser porque crecieron en efluentes distintos, ya que un tratamiento es aerobio (laguna de pulimiento) y el otro es anaerobio (reactor UASB).

### 6.2.2 Alta concentración

La remoción de amonio y ortofosfato a concentración alta (25 mgNH<sub>4</sub><sup>+</sup>/L y 10 mgPO<sub>4</sub><sup>-</sup>/L), como se puede observar en la Figura 7a, la menor remoción de amonio la obtuvo *Spirulina* con un 26%, seguida de *Chlorella* con un 37% y la mayor por el cultivo Mixto con un 68%. De igual manera este comportamiento se presentó para el ortofosfato con 24, 45 y 76%, respectivamente (Figura 7b). El crecimiento para *Chlorella* como se muestra en la Figura 7c, presentó una fase lag corta y entre el día 8 y 12 obtuvo su máximo crecimiento (1.4x10<sup>12</sup> cel/L), para posteriormente, pasar a la fase de muerte. *Spirulina* tuvo una fase lag y en un lapso de 12 días mostró un crecimiento exponencial alcanzando 1.9x10<sup>11</sup> filamentos/L. El cultivo Mixto presentó una fase lag de 12 días alcanzando 3.4x10<sup>10</sup> cel/L.

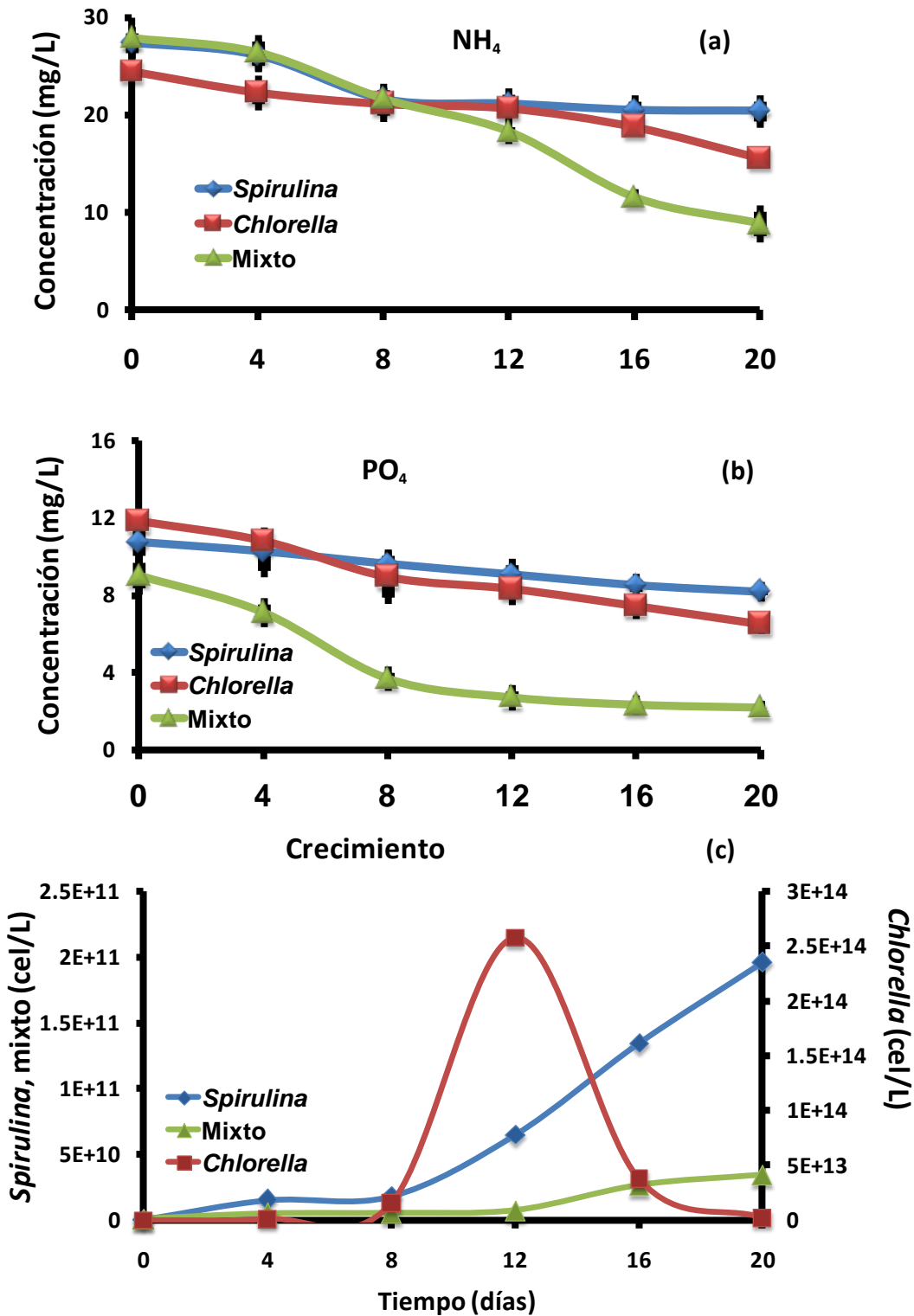


Figura 7. Perfil de remoción de amonio (a), ortofosfato (b) y crecimiento (c), a alta concentración, con los cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y Mixto.



Medina *et al.* (2003), en un co-cultivo bacterioalgal alimentado a concentraciones de 90 mgNt/L y 10 Pt/L, alcanzaron eficiencias de remoción del 73 y 42%, que son similares a las obtenida en este estudio por el cultivo Mixto, esto podría ser porque la diversidad de algas en este cultivo contribuye a la incorporación de nutrientes, además por el origen del cultivo este pudiera tener capacidad para incorporar concentraciones más elevadas de nutrientes.

Comparando la producción de biomasa de *Chlorella*, en este estudio se obtuvo un mayor número de células en 20 días, en comparación con Chacón *et al.* (2006), que alcanzaron  $6.62 \times 10^{10}$  cel/L en 27 días.

La diversidad final en el cultivo Mixto a alta concentración fue del 16.8%, 3.9% y 79.3% de *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*, respectivamente.

En la curva de crecimiento de la especie *Chlorella*, observamos que las fases lag y exponencial son muy cortas, no se presenta fase estacionaria, sino una fase de muerte; aunado a esto, al realizar los análisis de consumo de nutrientes observamos que no hubo buena remoción de los mismos y el cultivo decreció aunque todavía tenía nutrientes.

Los microorganismo fotosintéticos utilizan la energía luminosa y CO<sub>2</sub> (Bermúdez *et al.*, 2003), pero cuando los cultivos se someten a una alta carga de nutrientes y no se les suministra una fuente externa de CO<sub>2</sub> o de carbonato, se inhibe la

fotosíntesis y ya no pueden asimilar dichos nutrientes (Abalde *et al.*, 1995). Un suministro de CO<sub>2</sub> ya sea como gas puro o adicionado por una corriente de aire, aumenta enormemente la productividad de los cultivos masivos de microalgas y actúa como fuente de carbono para la fotosíntesis (Abalde *et al.*, 1995).

También es de considerar que los gradientes gaseosos imponen restricciones a las tasas de crecimiento de los cultivos, ya que una alta densidad de células fotosintéticamente activas provocan concentraciones extremadamente altas de oxígeno disuelto, que llevan a una sobre saturación de oxígeno por encima de 400%; ante esto se produce inhibición de la fotosíntesis y los cultivos tienden a caer (Abalde *et al.*, 1995).

En este estudio ambos factores podrían haber afectado el consumo total de nutrientes, debido a las condiciones en las que se realizaron las pruebas (matraces cerrados y sin agitación).

### **6.3 Inmovilización de cultivos en polietileno y lufa**

La biomasa inmovilizada en cada uno de los soportes y para cada uno de los tres cultivos ensayados se muestra en la Tabla 11. En esta se observa que tanto en polietileno como en lufa la mayor biomasa la obtuvo el cultivo Mixto, posteriormente *Chlorella* y por último *Spirulina*. También se muestra que en lufa los tres cultivos alcanzaron mayor concentración de biomasa. En las Figuras 9 y

10 se muestran algunas imágenes de los soportes antes y después de la inmovilización. En remoción de nutrientes, en ambos soporte se encontró el mismo comportamiento, mostrando la mejor remoción el cultivo Mixto, seguida de *Chlorella* y finalmente *Spirulina*.

Tabla 11. Biomasa inicial y final de los cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y Mixto, y porcentaje de remoción de nutrientes, durante la Inmovilización en los soportes.

Soporte	Polietileno			Lufa		
	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)
<b><i>Chlorella</i></b>						
<sup>a,b</sup> Biomasa	<sup>a</sup> 1.3 x 10 <sup>9</sup>	<sup>b</sup> 0.0037	-	<sup>a</sup> 1.3 x 10 <sup>9</sup>	<sup>b</sup> 0.0061	-
NH <sub>4</sub> (mg/L)	40.5	27.2	32.8	40.5	11.1	72.6
PO <sub>4</sub> (mg/L)	4.9	0	100	3.6	1.1	69.4
<b><i>Spirulina</i></b>						
<sup>a,b</sup> Biomasa	1.3x10 <sup>10</sup>	0.0004	-	1.3x10 <sup>10</sup>	0.0033	-
NH <sub>4</sub> (mg/L)	81.4	63.3	22.2	84.3	77.8	7.71
.PO <sub>4</sub> (mg/L)	5.9	1.2	79.6	6.4	3.4	46.8
<b>Mixto</b>						
<sup>a,b</sup> Biomasa	1.2x10 <sup>7</sup>	0.0058	-	1.2x10 <sup>7</sup>	0.0173	-
NH <sub>4</sub> (mg/L)	63.2	19.8	68.6	64.4	15.7	75.6
PO <sub>4</sub> (mg/L)	6.8	1.2	82.4	6.5	1.2	81.5

<sup>a</sup>células/L; <sup>b</sup>g biomasa algal/g soporte seco.

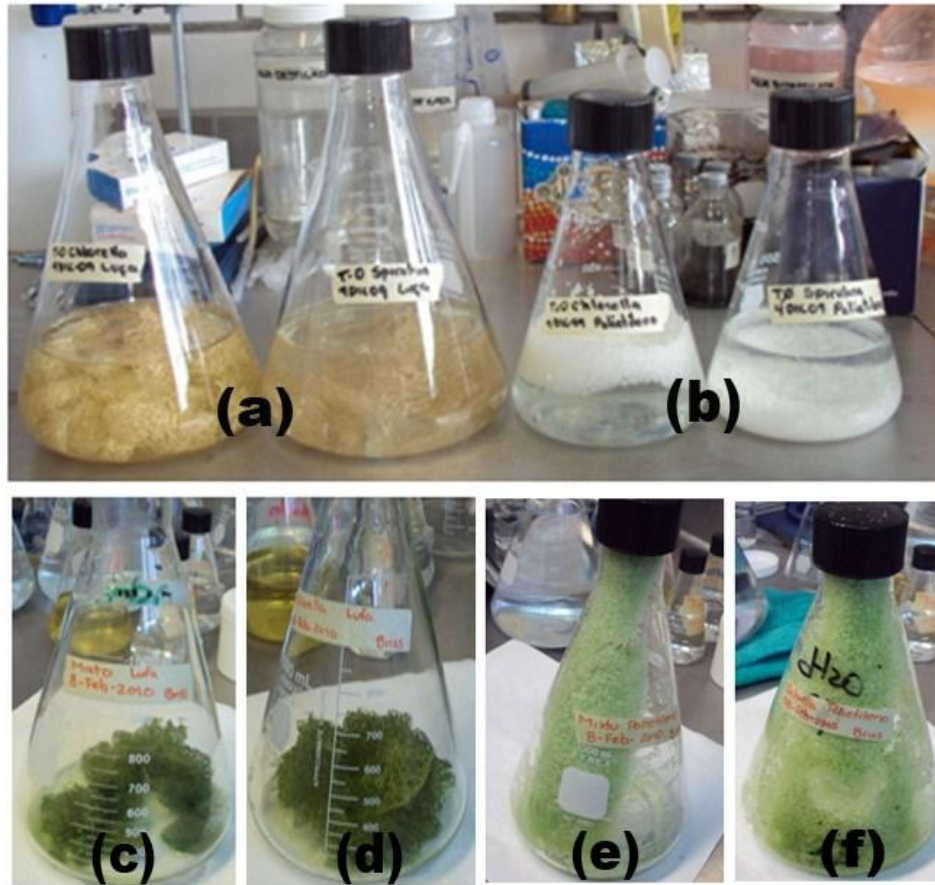


Figura 9. Muestra los soportes lufa (a) y polietileno (b) en el tiempo cero y los inmovilizados durante 20 días en lufa con cultivo Mixto (c) y *Chlorella* (d), así como polietileno con cultivo Mixto (e) y con *Chlorella* (f).

Respecto a los nutrientes durante el periodo de inmovilización, el cultivo Mixto tanto para polietileno como para lufa fue el que obtuvo una mejor capacidad de remoción, lo anterior podría deberse al origen del cultivo, ya que fue desarrollado a partir de agua residual tratada y como tal tiene mejor adaptabilidad a las condiciones de cultivo en comparación con los cultivos puros de *Chlorella* y *Spirulina*.

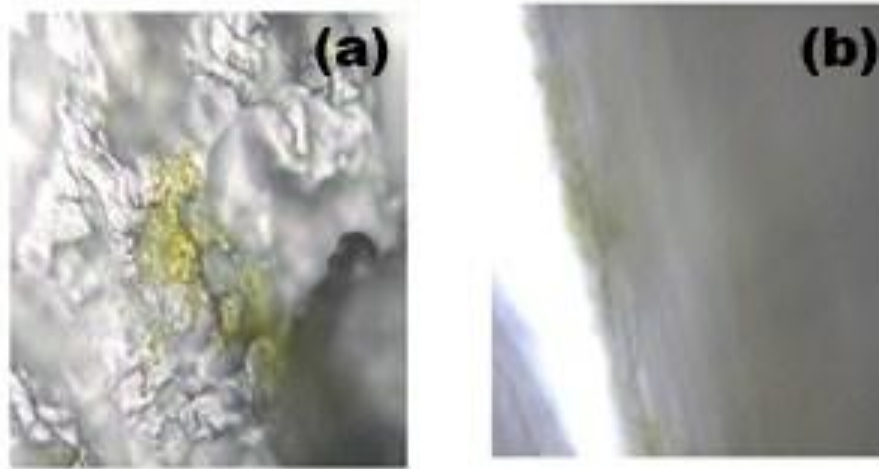


Figura 10. Fotografías de microscopio de luz, polietileno con cultivo Mixto (a) y con *Chlorella* (b).

El cultivo de *Chlorella* tuvo mayor capacidad para remover amonio cuando se inmovilizó en lufa, esto pudo ser debido a que también la cantidad de biomasa fue duplicada, no obstante la remoción de ortofosfato fue ligeramente menor. El cultivo de *Spirulina* en ambos soportes y para ambos nutrientes presentó las menores eficiencias de remoción. En el cultivo Mixto la remoción de amonio y ortofosfato fue similar para ambos soportes a pesar de que en lufa la biomasa inmovilizada fue mayor.

## 6.4 Remoción de amonio y ortofosfato en cultivos inmovilizados

En la Figura 11a y Tabla 12, se observa que el cultivo de *Chlorella* y Mixto inmovilizados en lufa mostraron un mejor consumo del amonio, alcanzando una remoción del 99.9% en 12 días, mientras que *Chlorella* en polietileno presentó un ligero consumo en los primeros 12 días, alcanzando a los 16 días el 99%. Por el contrario el cultivo Mixto en polietileno a los 20 días, sólo alcanzo una remoción del 70% dado que quedaron sin consumirse 6.5 mg/L.

Como se puede observar en la Figura 11b y Tabla 12, el cultivo Mixto inmovilizado en lufa a los 12 días tuvo un mejor consumo de ortofosfato, alcanzado a los 20 días una remoción del 89.9%; de igual forma el mismo cultivo pero en polietileno a los 12 días presentó un consumo más marcado, para alcanzar una remoción del 70.8% durante los siguientes 8 días. Para *Chlorella* en polietileno a los 8 días se observó un ligero consumo, teniendo finalmente una remoción del 49.1%. Mientras que *Chlorella* en lufa alcanzó un 72.1% de remoción.

Como se puede ver en la Tabla 12, la mayor biomasa se obtuvo en el cultivo de *Chlorella* en lufa, seguido del Mixto en lufa, posteriormente Mixto en polietileno y por último *Chlorella* en polietileno. Como ya se mencionó los cultivos en lufa presentaron una mejor remoción de ambos nutrientes, entre el 70 y 100%, esto debido a que las microalgas se adhirieron y crecieron mejor sobre lufa que en polietileno.

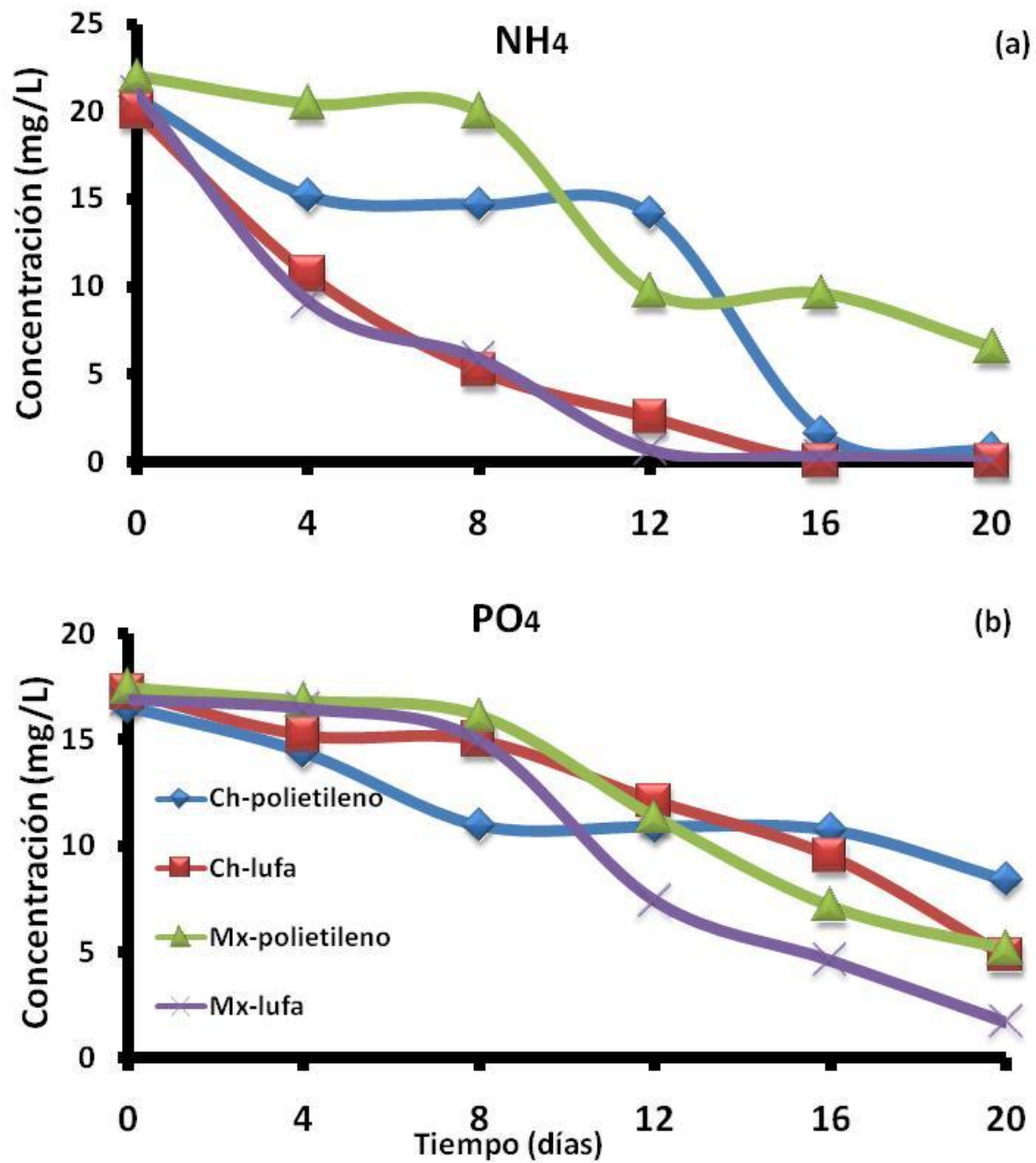


Figura 11. Consumo de NH<sub>4</sub> (a) y ortofosfato (b) por los cultivos de *Chlorella* y Mixto inmovilizados en polietileno y lufa. Ch: *Chlorella* y Mx: Mixto.

Tabla 12. Producción de biomasa y remoción de nutrientes por los cultivos de *Chlorella* y Mixto inmovilizados en los soportes.

Soporte	Poliétileno			Lufa		
	Cultivo	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final
<b><i>Chlorella</i></b>						
<sup>a</sup> Biomasa	0.0037	0.0057	-	0.0061	0.1539	-
NH <sub>4</sub> (mg/L)	20.8	0.06	99.0	19.9	0.006	99.9
PO <sub>4</sub> (mg/L)	16.5	8.4	49.2	17.2	4.8	72.1
<b>Mixto</b>						
<sup>a</sup> Biomasa	0.0058	0.0098	-	0.0173	0.1073	-
NH <sub>4</sub> (mg/L)	22.0	6.5	70.0	21	0.008	99.9
PO <sub>4</sub> (mg/L)	17.5	5.1	70.8	16.9	1.7	89.9

<sup>a</sup>g biomasa algal/g soporte seco.

Comparando con lo reportado por Shi *et al.* (2007), con cultivos inmovilizados de *Chlorella v.* y *Scenedesmus r.* alimentados con 25.7 mg/L de amonio y 9.2 mg/L de ortofosfato, obtuvieron en 9 días eficiencias de remoción de amonio de 94 y 96% y para ortofosfato de 88 y 90%, respectivamente, mientras que en este estudio en 20 días, el cultivo de *Chlorella* alcanzó un remoción del 99 y 49.2% en polietileno y del 99.9 y 72.1% en lufa, para NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, respectivamente, esto podría ser debido al tipo de soporte que utilizaron. Bashan y Bashan (2003), reportan una remoción del 100 y 92%, con un cultivo co-inmovilizado empleando alginato. Así también Cañizares *et al.* (1994), reportan una buena capacidad de



inmovilización por *Spirulina*, que fue contrario a los resultados obtenidos en este estudio, donde el cultivo de *Spirulina* no tuvo una buena adherencia al soporte de polietileno ni en la lufa. Por otra parte con *S. obliquas* alcanzaron una remoción del 70 y 100% de nutrientes en 4 hrs, lo contrario en este estudio, en el que el tiempo de remoción fue de 20 días a pesar de que son similares las concentraciones de nutrientes iniciales (Chevalier y De la Noüe, 1985).

Respecto a la concentración de biomasa Akhtar *et al.* (2003) en un estudio sobre remoción de metales pesados por *Chlorella sorokiniana* inmovilizada en lufa, alcanzan una biomasa de  $0.0392 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$  en un biorreactor de columna de lecho fijo. Por otro lado en cultivos en lote con agitación obtienen una biomasa de  $0.263 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$  en 24 días, con un remoción de cadmio del 97%, en este estudio se alcanzaron valores entre 0.0057 y 0.1539  $\text{g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$ , lo que indicaría que la agitación y el tipo de compuesto a remover tienen un efecto sobre el crecimiento de la biomasa. Con *Synechococcus sp* inmovilizada alcanzaron una biomasa de  $0.0094 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{g}_{\text{soporte seco}}$  cuando fue empleada para la depuración de cadmio (Saeed y Iqbal, 2006), que fue igual a la encontrada en el cultivo Mixto con polietileno y 16 veces menor a la máxima encontrada para *Chlorella* en lufa en este estudio. Los dos autores coinciden en que la utilización de microalgas inmovilizadas en lufa son un método viable para la remoción de metales pesados de las aguas residuales y al igual que en el presente estudio la lufa resultó un mejor soporte para la inmovilización y remoción de nutrientes de este tipo de aguas. Saeed y Iqbal (2006), mencionan que esto puede ser debido a

que las microalgas tienen más superficie para la inmovilización por lo largo de los hilos de la fibra de este soporte.

En este estudio el polietileno no se descarta como un buen soporte para la inmovilización, dado que se observó que aunque las eficiencias de remoción fueron menores que con la lufa, estas se alcanzaron con una menor cantidad de biomasa inmovilizada y tal vez sólo se requiere tener los cultivos en agitación para que exista un mayor contacto entre los nutrientes y las microalgas adheridas al polietileno.

## 7. CONCLUSIONES

El cultivo Mixto creció en agua residual municipal tratada encontrándose los grupos: Clorofitas (*Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Pediastrum*), Euglenofitas y Bacilariofitas, sin embargo la mayor diversidad se desarrolló en agua residual diluida al 10 y 30%, encontrando que conforme aumentó la proporción de ésta agua, los cultivos se volvieron mono específicos, predominando *Chlorella*

En los cultivos libres a baja concentración (10 mgNH<sub>4</sub>/L y 5 mgPO<sub>4</sub>/L), la mayor capacidad de remoción la tuvo *Chlorella* por remover ambos nutrientes (50 y 74%, respectivamente). A alta concentración (25 mgNH<sub>4</sub>/L y 10 PO<sub>4</sub>/L) la mejor

remoción se alcanzó con el cultivo Mixto (68 y 76%), respectivamente. En ambas concentraciones la mayor biomasa algal fue alcanzada por *Chlorella*, seguida de *Spirulina* y el cultivo Mixto.

Los cultivos de *Chlorella* y Mixto se inmovilizaron favorablemente en ambos soportes y se alcanzó una buena remoción de los nutrientes, particularmente del  $\text{NH}_4$  del 70 al 99.9% y del  $\text{PO}_4$  del 49.1 al 89.9%.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abalde J., Cid A., Fidalgo J.P., Torres E. y Herrero C. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicación. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Coruña. 210 pp.
- Akhtar N., Iqbal J. y Iqbal M. (2003). Microalgal-luffa sponge immobilized disc: a new efficient biosorbent for the removal of Ni (II) from aqueous solution. *Letters in Applied Microbiology*. 37, 149–153.
- Barrera B. C., Vázquez G. Barceló Q. I. y Bussy L. (2008). Microalgal dynamics in batch reactors for municipal Wastewater treatment containing dairy sewage water. *Water Air Soil Pollution*. 190, 259–270.
- Baumgarten E. Ángel M. y Tischnel R. (1999). Reduction of the nitrogen and carbon content in a swine waste with algae and bacteria. *Environmental Geology*. 52 (2), 281-284.

- Becker E.W. 1994. *Microalgae, Biotechnology and Microbiology*. Ed. Cambridge University Press. New York. 291pp
- Bermúdez J., Sánchez G. y Fuenmayor G. (2003). Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de la microalga marina *Chroomonas Sp.* *Ciencia*. 11(4), 263-269.
- Cañizares R., Rivas L., Montes C., Dominguez A. R., Travieso L. y Benítez F. (1994). Aerted swine wasterwater treatment with k-carrageenan immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technology*. 47 (1), 89-91.
- Chacón C., Andrade C., Cárdenas C., Araujo I. y Morales E. (2004). Uso de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Resolution. J. Plant. Physiol.* 144, 307-313.
- Charles M. (1993). Remoción de los compuestos nitrogenados en un sistema piloto de estabilización. Tesis de Posgrado Facultad de Ingeniería. División de posgrado Universidad de Zulia. Venezuela. 200 pp.
- Chevalier P. y De La Noüe J. (1985). Wastewater nutrient removal with microalgae unmobilized in carreegeenan. *Enzime and Microbial Technology*. 7, 621-625.
- CONAGUA. Comisión Nacional del Agua (2003). Estadísticas del Agua en México. Primera Edición. Ed. Comisión Nacional del Agua. México, D.F. 62-66 pp
- Contreras E. F. (1994). *Manual de técnicas hidrobiológicas*. Ed. Trillas. México. 141 pp.
- Dar L. S. (1999). Wastewater engineering. *En: Handbook of environmental engineering calculations*. (ed) Lee C. C. y Dar L. S. Ed. McGraw-Hill, New York.

- De la Noüe J., G. Laliberte y D. Prouls. (1992). Algae and waste water. *J. Appl. Phycol.* 4, 247-254.
- De-Bashan L. E. y Bashan Y., Moreno M., Vladimir K. y Bustillo J. (2002). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population sized of the microalgae *Chlorella* spp. when co-inmovilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Microbiology.* 48, 514-521.
- De-Bashan L. E. y Bashan. Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales. *Revista Colombiana de Biotecnología.* 5 (2), 85-90.
- Escorihuela M., Núñez N., Rosales R. y Morales E. (2007). Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. *Rev. Fav. Agron.* 24 (1), 225-230.
- González L. E., Cañizares R. O. y Baena S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology.* 60 (3), 259-262.
- Guillard R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. *In:* Culture of marine invertebrates animals. Smith W. L. y Chanley M. H. Ed. Plenum Publishing. New York. 29-60 pp.
- Hoffmann P. J. (1998). Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *J. Phycol.* 34, 757–763.

- Jeanfilms J., Canisius M.F. y Burlion N. (1993). Effect of high nitrate concentration on growth and nitrate up take by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *Journal of Applied Phycology*. 5(3), 369-374.
- Jonte L., Gaudeca L., Cardenas C. Arroyo I., Ortega J. y Morales E. (2002). Aguas residuales urbanas de un sistema de lagunas de estabilización para el cultivo de la cianobacteria *Synechocystis* sp. Libro Resumen De La LII Congreso Anual De La ASO. VAC. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto. Venezuela.
- Lau P., Tam N. y Wong Y. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*. 89(1), 59-66.
- Lau P.S., Tam F.Y. y Wong Y. S. (1998). Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. 63 (2), 15-117.
- Lavole A. y De La Noue J. (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water Resources*. 19, 1437-1442.
- Monroy O., Cervantes F., Viniegra G., Castilla P. y Meraz M. (1997). Biotecnologías para el tratamiento de las aguas residuales de la Ciudad de México. XII Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. 4-7 de Noviembre. Zacatecas, México.
- Nestror L. R., Bermúdez J., Moronta R. y Morales E. (2007). Fracción soluble de gallinaza como fuente de nutrientes para el cultivo de la microalga marina *Chroomonas* sp. 9 (1), 41-48.

- Nuñez J., Voltonia D., Nieves M., Piña P., Medina A. y Guerrero M. (2001). Nitrogen budget in *Scenedesmus obliquus* cultures with artificial wastewater. *Bioresources Technology*. 77 (2), 161-164.
- Rosas I. (2004). Microbiología Ambiental. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. UNAM. 34 pp.
- Saeed A. y Iqbal M. (2006). Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22, 775-782.
- Sandbank E. y Hopher B. (1978). The utilization of microalgae as a feed for fish. *Arch. Hydrobiol.* 11, 86-97
- Schelef G., Azov R. M. y Oron. G. (1980). Algal mass production as an integral part of a waste water treatment and reclamation system. Algae biomass production and use. (eds) Shelef y Soeder C. J. Ed. North-Holland Biomedical Press.163-189 pp.
- Shi J., Podola B. y Melkonian M. (2007). Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *J. Appl. Phycol.* 19 (5), 417–423.
- Tam N.F. y Wong Y.S. (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental pollution*. 107 (1), 145-151.
- Tam N.F., Wong J. P. y Wong Y. S. (2001). Repeated use of two *Chlorella* species, *C. Vulgaris* and ww1 for cyclic nickel bioadsorption. *Environmental pollution*. 114 (1), 85-92.

Travieso L., Benítez F., Weiland P., Sánchez E., Dupeyón R. y Domínguez R. (1996). Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Technology*. 55 (3), 181-186.

## **9. ANEXOS**

### **9.1. Preparación de las soluciones para la determinación de amonio**

#### Solución de fenol

Pesar 2.5 gr de fenol puro aforar con 50 ml de alcohol etílico o etanol.

#### Solución de nitroprusiato

Pesar 0.25 gr de nitroprusiato de sodio aforar con 50 mL de agua destilada.

#### Reactivo alcalino

Pesar 20 gr de citrato de sodio, disolverlo en 50 mL de agua destilada y agregar 1gr de hidróxido de sodio y aforar a 100 mL.

### **9.2. Preparación de las soluciones para la determinación de ortofosfato.**

#### Molibdato de amonio

Pesar 3 gr de molibdato de amonio, disolverlo en 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.



Ácido sulfúrico

A 90 mL de agua destilada agregarle 14 mL de ácido sulfúrico.

Ácido ascórbico

Disolver 4 gr de ácido ascórbico en 50 mL de agua destilada y aforar a 100 mL.

**9.3. Descripción detallada para la determinación de biomasa por peso seco**

Colocar los filtros en las charolas de aluminio (20 piezas).

Poner en la mufla a 550° C durante 30 min, sacar y poner en un desecador durante 15 min.

Pesar en la balanza analítica y registrar el peso.

Sonicar el soporte por intervalos de 2 minutos.

Sacar la botella y con una jeringa de 10 mL sacarle el agua.

Nuevamente introducir agua destilada y sonicar 2 minutos, volver a filtrar.

Repetir la operación las veces que sea necesario.

Una vez que ya se tienen todos los filtros con la muestra, colocarlos en un horno a 100 °C por 24 hrs.

Colocar los filtros en el desecador por 15 min y pesar.

Poner a secar los soportes a 60 °C durante 2 días y pesar.