



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN *in situ* DEL SISTEMA
INMOVILIZADO *Chlorella vulgaris*-*Azospirillum*
brasilense EN EL TRATAMIENTO TERCIARIO DE
AGUA RESIDUAL

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

IVONNE CRUZ SANTANDER

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2012.

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 11:00 horas del día 16 del Mes de Febrero del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“EVALUACIÓN *in situ* DEL SISTEMA INMOVILIZADO *Chlorella vulgaris*-*Azospirillum brasilense* EN EL TRATAMIENTO TERCIARIO DE AGUA RESIDUAL”

Presentada por el alumno:

Ivonne Cruz Santander

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biotecnología**

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

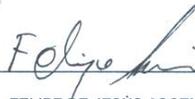
LA COMISION REVISORA



YOAV BASHAN
DIRECTOR DE TESIS



GUSTAVO HERNÁNDEZ CARMONA
CO-TUTOR



FELIPE DE JESÚS ASCENCIO VALLE
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Conformación de Comité

Dr. Yoav Bashan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Director de Tesis

Dr. Gustavo Hernández Carmona

Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, IPN

Asesor

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Jurado en la defensa de Tesis:

Dr. Yoav Bashan

Dr. Gustavo Hernández Carmona

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Suplente:

Dra. Luz Estela González de Bashan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Resumen

El uso de microorganismos inmovilizados en diferentes soportes, es una técnica ampliamente utilizada en el tratamiento avanzado de agua residual. Uno de los soportes más comunes es el alginato, el cual es permeable a los nutrientes al mismo tiempo que restringe el paso de otros microorganismos. De igual forma, es posible una distribución homogénea de los microorganismos dentro y facilita su recuperación. El uso de la bacteria promotora del crecimiento, *Azospirillum brasilense*, inmovilizada en conjunto con la microalga *Chlorella vulgaris*, tiene una influencia favorable en el aumento de la población de esta, al mismo tiempo que le otorga mayor eficiencia en la eliminación del contaminantes nitrógeno y fósforo. Por otro lado, se ha reportado que la matriz de alginato es susceptible a degradación debido a la presencia de cationes y/o microorganismos en sistemas abiertos, lo cual es una de las principales limitantes al emplear esta tecnología *in situ*. El presente trabajo examinó el potencial para disminuir la concentración de contaminantes durante el tratamiento terciario de Agua Residual Secundaria (ARS) usando la microalga *C. vulgaris* y la bacteria *A. brasilense*, inmovilizados en conjunto en esferas de alginato. Se evaluó la estabilidad del alginato como matriz inmovilizante, usando como parámetros la fuerza de gel y el diámetro. Se evaluaron diferentes proporciones de alginato de sodio y se evaluaron combinaciones de este con otros agentes (polímeros y compuestos). La concentración óptima para la elaboración de la matriz inmovilizante es el 2 % p/v de alginato de sodio, gelificándolo en 2% de CaCl_2 . La eficiencia del sistema se evaluó en función de la eliminación de nutrientes, y el aumento de biomasa. Por otro lado, se determinó que el sistema el sistema co-inmovilizado *C. vulgaris* – *A. brasilense*, es eficiente en la eliminación de más del 90 % de fosfatos y cerca del 50 % de amonio en 24 horas bajo el régimen fotoautotrófico tiempo durante el cual la matriz aun es estable, usando una proporción de 10 g de esferas por cada 100 mL de ARS. Las esferas de alginato sin microorganismos inoculados, también son capaces de eliminar nutrientes del ARS cerca de un 60 % de fosfatos y alrededor del 30 % de amonio, ya que la presencia de las esferas de alginato favorece el crecimiento de microorganismos residentes del ARS capaces de asimilar nutrientes (N y P).

Palabras clave: Tratamiento terciario, biorremediación de aguas, inmovilizado celular, *Chlorella vulgaris*, *Azospirillum brasilense*

Abstract

The use of microorganisms immobilized in various supports for the bioremediation of wastewater is a technique widely used in the advanced treatment of wastewater. One of the most matrix used is alginate, which is permeable to nutrients while providing a protection against other microorganisms. At the same time, it is possible a homogeneous distribution of the microorganism inside the matrix and also their recovery is easier. The use of growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* jointly immobilized with *Chlorella vulgaris* has influence on the increase in biomass in the microalgae, at the same time immobilization gives greater efficiency for removal nitrogen and phosphorus pollutants (N and P). Furthermore, it has been reported that the alginate matrix is susceptible to degradation due to the presence of cations and/or microorganisms in open systems. That is a major limitation in using this technology *in situ*.

This study evaluated the potential for removing pollutants (N and P) by tertiary treatment of Secondary Wastewater (SW) using the microalga *C. vulgaris* and bacteria *A. brasilense*, jointly immobilized in alginate beads. Stability of the immobilizing alginate matrix was evaluated and also, we explored different options for maintain the stability of the matrix. The stability of the alginate beads was determined using the parameters gel strength and diameter of the formed bead. The efficiency of the system was evaluated according to the removal of nutrients, and increased biomass. The effects of different concentrations of sodium alginate, and combinations with other curing agents were evaluated. It was determined that the optimal concentration for the preparation of the immobilizing matrix is 2% w/v alginate and gelation in 2% CaCl₂. Furthermore, it was determined that the co-immobilized system *C. vulgaris* - *A. brasilense*, is efficient for remove over 90% of phosphates and about 50% of ammonia in photoautotrophic bioreactor containing 25 L of wastewater in 24 hours during which the matrix is stable. Alginate beads without inoculated microorganisms are also capable of eliminating nutrients in wastewater, since the presence of the alginate spheres promotes the growth of resident microorganisms capable of assimilating nutrients (N and P).

Keywords: Tertiary treatment, bioremediation of wastewater, immobilization, *Chlorella vulgaris*, *Azospirillum brasilense*.

DEDICATORIA

*A Eduardo Cruz Vizacaya y
Matilde E. Santander Parra*

*El observador no es quien crea la inestabilidad o
la imprevisibilidad con su ignorancia: ellas existen de por sí...*

Ilya Prigogine

Premio novel de química, 1977

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la Beca con registro 236058.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste por las facilidades otorgadas.

Al financiamiento del Proyecto SEMARNAT-23510 “Escalamiento de una novedosa estrategia combinada para el biotratamiento de agua residual, recuperación de suelos erosionados y producción de etanol, usando bacterias promotoras de crecimiento en microalgas (MGPB) y microalgas co-inmovilizadas en polímeros”.

Al departamento de posgrado por el apoyo para la asistencia al “4th Congress of the International Society for Applied Phycology” en Halifax, Canadá.

A la Bashan Foundation por las becas otorgadas.

Al comité tutorial, Dr. Yoav Bashan (director), Dr. Gustavo Hernández Carmona y Dr. Felipe Ascencio (tutores).

A la Dra. Luz González de-Bashan por sus comentarios al presente escrito, por haber estado siempre a mi lado durante el desarrollo de esta investigación, por su amistad y por los cumpleaños compartidos.

A la Dra. Blanquita Romero por su valiosa ayuda en la identificación de cepas, por todos sus comentarios y asesoría; y por compartirme su visión y experiencia como investigadora.

Al Dr. Mendoza por sus comentarios al presente escrito, y por recordarme usar el coraje para alcanzar nuestras metas.

Al M. en C. Manuel Moreno Legorreta por el apoyo brindado en tantas actividades del laboratorio, su asesoría en los análisis estadísticos, manejo de nuevos softwares, dibujo del cartel, su ayuda en el transporte de agua, y por brindarme su amistad.

Al M. en C. Juan Pablo Hernández por su enseñanza en las técnicas de cultivo de microalgas y bacterias, en elaboración de co-inmovilizados y sobre todo por sus

consejos oportunos y su gran amistad.

Al M. en C. Diego Ramón Briceño Domínguez, por su apoyo en la medición de fuerza de gel en esferas de alginato, en el Laboratorio de Química de Algas del CICIMAR-IPN.

Al técnico M. en C. Manuel Salvador Trasviña Castro por su asesoría y entrenamiento técnico para el desarrollo del análisis de fosfatos en alginato, en el Laboratorio de Edafología.

A los técnicos M. en C. Ibán Murillo Murillo y la IBQ. Celina Beltrán Camacho por su apoyo en la realización de análisis de muestras de agua en el Laboratorio de Análisis Químico de Agua.

Al Dr. Amaury Cordero Tapia, responsable del Bioterio del CIBNOR por su apoyo en el uso de las instalaciones del Bioterio, por su amistad y las galletitas.

Al Dr. Arturo Pedro Sierra Beltrán por permitirme el uso de las instalaciones y equipo del Laboratorio de Especialidades Microbiológicas.

A Alfonso Alvares Casilla, Jorge Cobos Anaya y Guillermo García Cortés por la construcción de los biorreactores.

A la Lic. Esther Ojeda Castro por su apoyo en la obtención de artículos por medio de la biblioteca del CIBNOR.

Al grupo de Microbiología Ambiental, por los momentos de trabajo y sobre todo por los momentos de diversión y los días de comilera.

A todos y cada uno de mis compañeros de generación de la maestría, ya que cada uno ha sido pieza importante en este proceso.

A Alvin y Nat por su apoyo incondicional desde mi primer visita a la Paz.

A mi esposo Diego por estar siempre a mi lado, por su paciencia, su ayuda incansable, sus palabras de aliento y por no dejarme caer un solo instante.

Por último al calidoscopio de emociones que me acompañó a lo largo de la maestría, creando una perfecta armonía dentro de este caos insaciable.

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN _____	1
2	ANTECEDENTES _____	3
2.1	Agua Residual _____	3
2.2	Biotratamiento de aguas _____	4
2.2.1	Tratamiento terciario _____	5
2.2.2	Asimilación de nitrógeno en las microalgas _____	7
2.3	Inmovilización de microorganismos _____	9
2.4	Alginato _____	9
2.4.1	Fuentes y aplicaciones _____	9
2.4.2	Composición y secuencia molecular _____	11
2.4.3	Degradación fisicoquímica _____	12
2.4.4	Degradación biológica _____	13
2.5	Uso del sistema co-inmovilizado <i>Chlorella vulgaris</i> - <i>Azospirillum brasilense</i> _____	15
3	JUSTIFICACIÓN _____	17
4	OBJETIVOS _____	18
4.1	Objetivo general _____	18
4.2	Objetivos particulares _____	18
5	HIPÓTESIS _____	19
6	MATERIALES Y MÉTODOS _____	20
6.1	Estabilidad de la matriz inmovilizante (esferas de alginato) Durante el proceso de eliminación de nutrientes (N y P) del agua residual _____	20
6.1.1	Estabilidad en diferentes concentraciones de alginato y diferentes concentraciones de CaCl ₂ _____	23
6.1.2	Evaluación de diferentes agentes endurecedores en combinación con alginato _____	25
6.1.3	Influencia de microorganismos nativos del ARS _____	26
6.2	Proporción óptima de esferas que contienen el inmovilizado microalga-bacteria para una remoción eficiente de nutrientes en ARS _____	28
6.3	Evaluación de la eficiencia del sistema en la eliminación de	

nutrientes, en biorreactor de 25 L	29
6.4 Conteo de bacterias viables por Diacetato de Fluoresceina	32
6.5 Adsorción de Fosfato en las esferas de alginato	33
6.6 Cuantificación, aislamiento e identificación de bacterias con posible capacidad alginolítica.	35
7 RESULTADOS	38
7.1 Estabilidad de la matriz inmovilizante (esferas de alginato) durante el proceso de eliminación de nutrientes (N y P) del agua residual	38
7.1.1 Estabilidad en diferentes concentraciones de alginato y diferentes concentraciones de CaCl_2 .	38
7.1.2 Evaluación de diferentes agentes endurecedores en combinación con alginato.	40
7.1.3 Influencia de microorganismos nativos del ARS	42
7.2 Proporción óptima de esferas contenidas en el sistema microalga-bacteria, para remover con mayor eficiencia los nutrientes del agua residual.	45
7.3 Evaluación de la eficiencia del sistema en la eliminación de nutrientes, en un biorreactor de 25 L	48
7.4 Conteo de bacterias viables por Diacetato de Fluoresceina	49
7.5 Adsorción de fosfato en las esferas de alginato.	51
7.6 Cuantificación, aislamiento e identificación de bacterias con posible capacidad alginolítica	53
8 DISCUSIÓN	56
9 CONCLUSIONES	64
10 LITERATURA CITADA	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Asimilación de fosfatos disponibles en agua residual para las microalgas en lagunas de estabilización.	7
Figura 2.- Ruta de asimilación de nitrógeno de organismos eucariotas fotosintéticos.	8
Figura 3.- Estructura química del alginato. (a) Formulas de los dos monómeros. M = β -D ácido manurónico y G = α -L- ácido gulurónico. (b) Composición bloque. (c) Conformación en la cadena de alginato	12
Figura 4.- Modelo de biorreactor para tratamiento terciario de agua residual. Modelo air-lift triangular, indicando sus principales componentes.	31
Figura 5.- a) Fuerza de gel en esferas de alginato elaboradas con diferentes concentraciones de alginato, gelificadas en diferentes concentraciones de CaCl_2 , con su variación respecto al tiempo de exposición en ARS; b) Fuerza de gel relativa expresada en %; c) Análisis estadístico de la fuerza de gel relativa.	39
Figura 6.- a) Variación en la fuerza de gel de las diferentes combinaciones de alginato con polímeros o compuestos y su variación con respecto al tiempo de exposición en ARS. b) Fuerza de gel relativa expresada en %. c) Análisis estadístico de la fuerza de gel relativa.....	41
Figura 7.- a) Variaciones de la fuerza de gel en agua residual estéril y agua residual cruda; b) fuerza de gel relativa de cada tratamiento a través del tiempo; c) diámetro de las esferas de alginato.	43

Figura 8.- Remoción de nutrientes (N y P) del ARS cruda y estéril, empleando esferas de alginato sin microorganismos (control) y con el sistema <i>A. brasilense</i> - <i>C. vulgaris</i> a) Concentración de fósforo;	
b) Concentración de NH_4^+	45
Figura 9.- Porcentaje de eliminación de PO_4^{3-} en ARS empleando diferentes proporciones de esferas contenidas en el sistema microalga-bacteria compuesto de un co-inmovilizado <i>C. vulgaris</i> - <i>A. brasilense</i>	46
Figura 10.- Porcentaje de eliminación de NH_4^+ en ARS empleando diferentes proporciones de esferas que contiene el sistema microalga-bacteria del sistema co-inmovilizado <i>C. vulgaris</i> - <i>A. brasilense</i>	47
Figura 11.- Porcentaje de eliminación de nutrientes del ARS en biorreactor de 25 L, usando 10 % de esferas de alginato. a) Eliminación de fosfatos;	
b) eliminación de amonio.	49
Figura 12.- Bacterias viables en el agua (ARS) durante 48 horas del experimento con el sistema co-inmovilizado <i>C. vulgaris</i> - <i>A. brasilense</i> para tratamiento terciario de aguas.....	50
Figura 13.- Variación en la concentración de P-total ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en esferas de alginato, al ser expuestas en ART estéril y no estéril.....	52
Figura 14.- Variación en la concentración de PO_4^{3-} -total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en ART estéril y no estéril, al ser tratada con esferas de alginato.	53

LISTA DE TABLAS

Tabla I.- Origen y localización de algunas algas marinas.....	14
Tabla II.- Análisis de agua residual secundaria (ARS).....	21
Tabla III.- Medio de cultivo ALGIMED, para aislamiento de bacterias con posible capacidad de degradar alginato.....	36
Tabla IV.- Medio propuesto por Tang <i>et al.</i> (2009) para aislamiento de bacterias con capacidad de degradar alginato.....	37
Tabla V.- Cepas identificadas con posible capacidad alginolítica, aisladas del ARS.....	54

1 INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos inmovilizados en diferentes soportes para la biorremediación de aguas en la eliminación de contaminantes, principalmente fósforo y nitrógeno, es una técnica ampliamente utilizada en el tratamiento avanzado de agua residual (Moreno-Garrido, 2008; Moreira *et al.*, 2006). Uno de los más comunes es la inmovilización en matriz de alginato (Mallik, 2002), el cual es permeable a los nutrientes, al mismo tiempo que restringe el paso de otros microorganismos (Covarrubias *et al.*, 2011). De igual forma es posible una distribución homogénea de la biomasa y fácil recuperación de ésta. La bacteria promotora del crecimiento *Azospirillum brasilense*, al estar inmovilizada en conjunto con la microalga *Chlorella vulgaris* ejerce una influencia favorable en el aumento poblacional de esta última, al mismo tiempo que le otorga mayor eficiencia en la eliminación de nutrientes (de-Bashan y Bashan, 2010). Por otro lado, se ha reportado que la matriz de alginato es susceptible a degradación debido a la presencia de cationes en sistemas naturales (Becker, 1994; Moreira *et al.*, 2006) lo cual es una de las principales limitantes para emplear esta tecnología *in situ* por lo que se valoró la estabilidad de las esferas durante el tratamiento.

En el presente trabajo se estudió la posibilidad de disminuir la concentración de nutrientes (N y P) durante el tratamiento avanzado en Agua Residual Secundaria (proveniente del efluente del tratamiento secundario) usando a la microalga *Chlorella vulgaris* y a la bacteria promotora del crecimiento en plantas, *Azospirillum brasilense*, inmovilizados ambos microorganismos en esferas de alginato. Para el desarrollo de este trabajo, se empleó Agua Residual Secundaria (ARS), tomada del efluente de los sedimentadores secundarios de la “Planta de Tratamiento de Agua Residual del Municipio de La Paz, Baja California Sur, México”. Se empleó un fotobiorreactor triangular air-lift junto con el sistema microalga-bacteria inmovilizados en conjunto, para el tratamiento terciario. La

eficiencia del sistema se evaluó en función de la eliminación de nutrientes nitrógeno y fósforo y el aumento de biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*. Las tasas de absorción de nutrientes y tiempos de retención se midieron con el fin de determinar el diseño más eficiente para reducir significativamente el contenido de nutrientes. La finalidad de esta investigación es que sirva como modelo para el diseño de sistemas biológicos a gran escala, para el tratamiento del tratamiento de aguas residuales. Es por esto que este trabajo de investigación evaluó la susceptibilidad de la matriz de alginato al ser expuesta *in situ* ante factores biológicos y fisicoquímicos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Agua Residual

Con el desarrollo de la sociedad y la economía, la explotación de los recursos naturales se ha incrementado rápidamente teniendo como resultado contaminación y deterioro de los mismos (Zhou *et al.*, 2008).

Dado que cualquier actividad humana debe finalmente regresar sus desechos líquidos a un cuerpo de agua receptor, la contaminación de los cuerpos de agua (subterráneos o de superficie) se produce cuando las descargas de aguas residuales alcanzan los cuerpos naturales de agua, mediante el drenaje o a través del alcantarillado. De esta manera el término contaminación del agua puede ser definido como “la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto, impliquen una alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores o con su función ecológica” (Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002).

Por lo tanto, es crucial mantener la calidad de las aguas naturales lo mejor posible, con el fin de conservar su función ecológica o para darle un uso posterior.

La falta de tratamiento de las aguas residuales urbanas, agrícolas e industriales ha hecho que la forma más simple de deshacerse de ellas sea por disposición en cuerpos de agua o empleándolas para riego. Según datos del INEGI, (publicados en el 2011), para el 2009, únicamente el 41.2% del caudal de aguas residuales recolectado es tratado y el resto es depositado en los cuerpos receptores sin tratamiento alguno. Por otro lado, de las 2,186 plantas de tratamiento de aguas residuales industriales en operación que hay en México, el 54.5% emplean el tratamiento secundario, el cual consiste en la remoción de materiales orgánicos coloidales y disueltos. La deficiente calidad del agua empleada para irrigación

puede ser una fuente de problemas de salud humana. Por otro lado, la descarga de efluentes secundarios de plantas de tratamiento de aguas residuales en cuerpos de agua naturales, puede causar serios problemas debido a que estos se encuentran enriquecidos de sustancias como amonio (NH_4^+), nitratos (NO_3^-) y fosfatos (PO_4^{3-}), causantes de eutrofización (Lavoie y de La Noüe, 1985). Para cambiar esta situación es necesario incrementar el tratamiento de las aguas residuales y tecnificar su reutilización con un criterio sanitario, coherente con el entorno socioeconómicos de las regiones (Bartone, 1991).

Los elevados niveles de nutrientes dentro del medio ambiente, causan un impacto desfavorable en la calidad del agua, principalmente en cuerpos de agua que se utilizan como sitios de desecho, tales como ríos, estuarios, playas, lagos y océanos. Los cuerpos de agua expuestos a la carga de nutrientes puede producir eutrofización y zonas de hipoxia; tal exposición al enriquecimiento de nutrientes causa disturbios en las funciones naturales del ecosistema, alterando la biodiversidad de las especies, pudiendo causar problemas de salud humana.

2.2 Biotratamiento de aguas

El tratamiento biológico de aguas de desecho, es un área que ha tenido un amplio desarrollo en varios países durante los últimos 50 años. Los trabajos dentro de esta especialidad han dedicado sus esfuerzos principalmente al estudio del uso potencial de bacterias, microalgas y cianobacterias (Lincoln y Earle, 1990).

Los procesos de tratamiento primario y secundario se emplean en muchos lugares con el propósito de eliminar partículas de fácil sedimentación (tratamiento primario) y oxidación de materia orgánica presente en el agua residual (tratamiento secundario). El resultado final de cada una de las etapas de tratamiento es un efluente aparentemente limpio, el cual es, por lo general, descargado a cuerpos de agua naturales (ríos, lagos y mar). Sin embargo, los

efluentes secundarios contienen aún una alta concentración de nitrógeno inorgánico (N) y fósforo (P), lo cual puede causar, como ya se mencionó anteriormente, eutrofización y otros problemas a largo plazo debido a la presencia de metales pesados y compuestos orgánicos persistentes (de la Nouë *et al.*, 1992).

2.2.1 Tratamiento terciario

El tratamiento terciario o avanzado, según Metcalf y Eddy (Inc. *et al.*, 2002) consiste en la remoción de sólidos suspendidos residuales, usualmente por filtración granular o micro cribas. La desinfección es típica en el tratamiento terciario. La eliminación de nutrientes (principalmente Fósforo y Nitrógeno) es usualmente incluida en este nivel.

2.2.1.1 Eliminación de Fósforo

Existen dos formas principales de eliminación de fosforo en las lagunas de estabilización en las plantas de tratamiento. Una de las opciones más comunes es la adición de productos químicos, tales como el alumbre, cloruro férrico y algunos polímeros, que al ser agregados precipitan los iones fosfato; los precipitados se retiran a través de la sedimentación. Sin embargo, esta opción no ofrece una eliminación eficaz de fósforo, y aumenta significativamente el costo y la complejidad del sistema de tratamiento del estanque y las grandes cantidades de lodos químicos que se producen son difíciles de eliminar (Powell *et al.*, 2009).

Otra tecnología que puede lograr la eliminación de fósforo, es la eliminación biológica de fósforo mejorada (EBPR, por sus siglas en inglés) el cual forma parte del proceso de lodos activados y la biomasa bacteriana utiliza la absorción de fosfato, mayor a la requerida por la célula. A este efecto de acumular más fósforo

del que se necesita para la subsistencia se le denomina “asimilación en exceso” (*Luxury uptake*). Sin embargo, esta tecnología, requiere cantidades relativamente grandes de energía, personal capacitado y los costos de operación son elevados (Powell *et al.*, 2009). Una solución similar se puede encontrar empleando la dinámica de absorción de fósforo que se produce naturalmente en las microalgas.

2.2.1.2 Asimilación de fósforo en las microalgas

Entre las sustancias asimiladas por los seres vivos, carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno el fósforo tiene una función especial, todos estos son los elementos de principales componentes biológicos, sin embargo, el fósforo es el instrumento de su fabricación. (Pautard, 1978). Muchas de las formas del fósforo son importantes metabólicamente y estructuralmente en el fitoplancton, tales formas como ADN, azúcar-fosfato, fosfolípidos. En las algas, la asimilación en exceso de polifosfatos es bien conocida (Cade-Menun y Paytan, 2010). El fósforo intracelular puede ser utilizado por las microalgas en una serie de procesos definidos de los cuales, las principales dos vías son la producción de polifosfato y la producción de sustancias como los fosfolípidos o ARN, que son necesarios para el metabolismo (**Figura 1**). Esto significa que el importe neto de fósforo disponible para la producción de polifosfato depende de la tasa de absorción de fosfato a través de la pared celular y el posterior uso de fósforo para su crecimiento (Powell *et al.*, 2009).

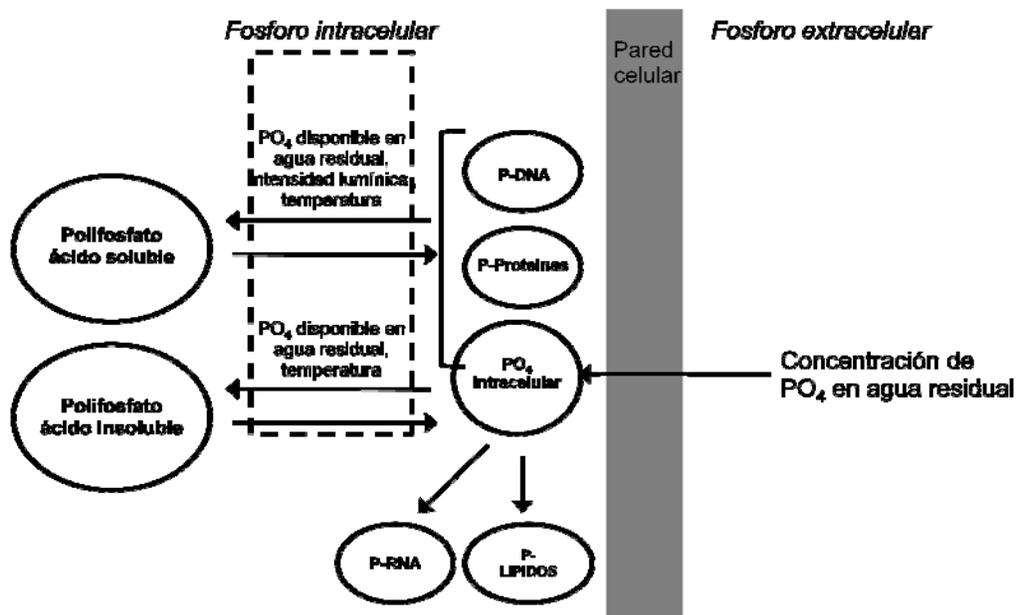


Figura 1.- Asimilación de fosfatos disponibles en agua residual para las microalgas en lagunas de estabilización (Powell *et al.*, 2009).

Las microalgas que crecen en las lagunas de estabilización consumen fósforo, el cual como ya se mencionó, es un elemento esencial que se requiere para la formación de constituyentes celulares como los fosfolípidos, nucleótidos y ácidos nucleicos (Miyachi *et al.*, 1964). Por lo general, las microalgas contienen aproximadamente 1% de fósforo en peso seco (Borchardt y Azad, 1968; Kaplan *et al.*, 1986), sin embargo, bajo ciertas condiciones las microalgas se pueden activar para tomar mucho más fósforo de lo necesario para la supervivencia. Este fósforo extra se almacena en forma de polifosfato para su uso como un recurso interno, cuando la concentración externa de fósforo es limitante (Powell *et al.*, 2009).

2.2.2 Asimilación de nitrógeno en las microalgas

El nitrógeno (N) es un elemento esencial incorporado en muchas macromoléculas, incluyendo proteínas (aminoácidos y ácidos nucleicos). Pigmentos, tales como clorofila α , ficobiliproteínas y aminoácidos tipo micosporina también requieren N (Lobban y Harrison, 1994). Básicamente no hay diferencia entre las rutas de

asimilación de amonio en algas y plantas superiores (Inokuchi *et al.*, 2002).

La asimilación de N está regulada principalmente por reacciones enzimáticas. El metabolismo del nitrógeno se lleva a cabo en el citosol, en los cloroplastos y en las mitocondrias (**Figura 2**), e involucra dos rutas enzimáticas (de-Bashan *et al.*, 2008; Kyun, 2008). La ruta más importante es la que involucra las reacciones secuenciales de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT) (Vanony y Curti, 2005). En esta reacción el amonio es incorporado a la glutamina (Gln), la glutamina dona una de sus aminas a oxoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (Glu) mediante la transferencia de aminas, catalizada por la glutamato sintasa (GGOAT) (Inokuchi y Okada, 2001). La otra es una ruta auxiliar que consiste en una reacción reversible, en la que se desamina el glutamato y es catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Lu *et al.*, 2005).

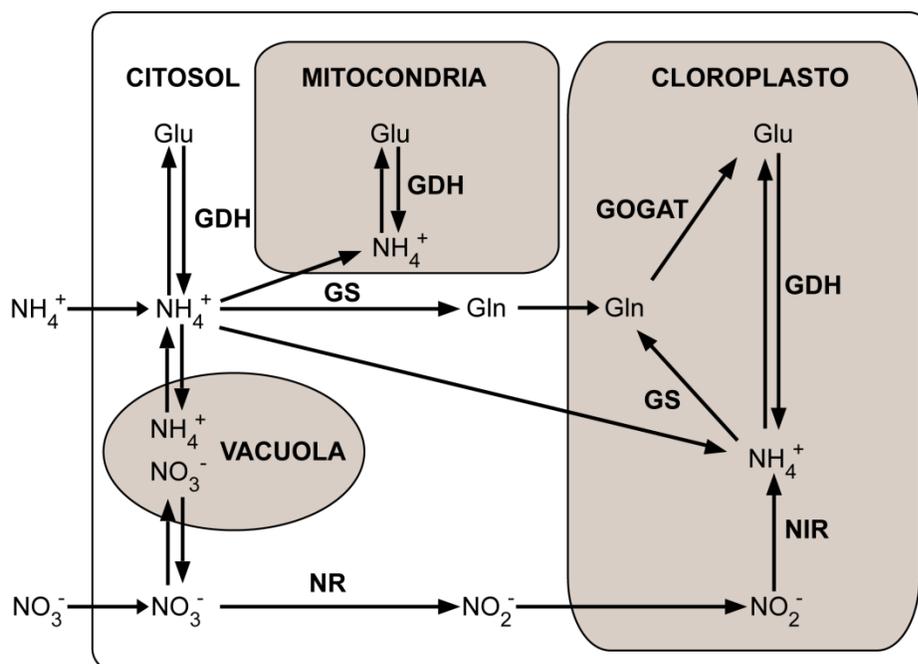


Figura 2.- Ruta de asimilación de nitrógeno de organismos eucariotas fotosintéticos (Inokuchi y Okada, 2001).

2.3 Inmovilización de microorganismos

La aplicación de técnicas de inmovilización de células en procesos de tratamiento de agua residual recientemente ha ganado mucha atención. Estas técnicas no solo ofrecen una elevada concentración celular en el tanque de reactor para incrementar la eficiencia, sino que además, facilita la separación de la biomasa producida (Rezae *et al.*, 2008). El Inmovilizado de células se define como la confinación o localización física de células intactas a una región especial definida en el biorreactor con la preservación de la actividad catalítica deseada (Karel *et al.*, 1985). Existe una gran cantidad de polímeros sintéticos (acrilamida, poliuretano, polivinilo, resinas) y naturales derivados de polisacáridos de macroalgas (alginato, carragenina, agar, agarosa) y quitosano, un amino polisacárido derivado de la quitina, dentro de los cuales los polímeros más comúnmente usados son los polímeros naturales como la carragenina y el alginato (de-Bashan y Bashan, 2010).

2.4 Alginato

El término “alginato” generalmente es empleado para designar las sales del ácido algínico, sin embargo, también puede ser usado para referirse tanto a los derivados del ácido algínico, como al alginato por sí mismo (McHugh, 2003).

2.4.1 Fuentes y aplicaciones

El alginato se encuentra como un componente estructural de las algas pardas marinas (Phaeophyta) en forma de un polisacárido el cual fue descrito por primera vez por Stanford en 1881 (Draget *et al.*, 2001). En las algas pardas, el alginato es el polisacárido más abundante, el cual puede llegar a comprender hasta el 40% de la materia seca (Draget *et al.*, 2006). Se produce principalmente en las paredes celulares y espacios intercelulares en los que se compone de una mezcla

insoluble de calcio, magnesio, sodio y sales de potasio (Haug *et al.*, 1967). Su función principal es contribuir a la fuerza y la flexibilidad de las algas marinas, y la composición del alginato varía tanto dentro de las diferentes especies de algas como en diferentes partes de la planta. Además del alginato producido por las algas marinas, un material polimérico semejante a este, puede ser producido como componente de la cápsula en las bacterias del suelo, tales como *Azotobacter vinelandii* (Gorin y Spencer, 1966) y diferentes especies de *Pseudomonas* (Govan *et al.*, 1981; Linker y Jones, 1966).

El uso de los alginatos se basa en tres principales propiedades. La primera es su habilidad de incrementar la viscosidad de soluciones acuosas. La segunda, es su habilidad de formar geles, los cuales se forman cuando se añade una sal de calcio a una solución acuosa de alginato de sodio. Estos geles se forman mediante una reacción química, en la que los iones de calcio desplazan los iones de sodio del alginato, manteniendo las moléculas de alginato juntas, y obteniendo como resultado un gel. Estos geles son estables a diferentes temperaturas. La tercer propiedad de los alginatos es la capacidad para formar películas de alginato de sodio o de calcio y fibras de alginato de calcio (McHugh, 2003). Los alginatos son ampliamente usados en la industria alimenticia, imprenta textil, inmovilización de biocatalizadores (se puede utilizar enzimas o células completas, manteniendo su capacidad catalítica) con fines farmacéuticos y médicos, entre muchas otras aplicaciones. Los alginatos también han sido utilizados en la eliminación de metales pesados y compuestos tóxicos de los residuos industriales por biosorción (Davis *et al.*, 2003).

2.4.2 Composición y secuencia molecular

Los alginatos son las sales del ácido algínico, las cuales forman polisacáridos lineales constituidos por dos unidades monoméricas de ácido urónico, el ácido β -D-manurónico (M) y el ácido α -L-gulurónico (G) (**Figura 3a**). Estos se agrupan en bloques de secuencias MM, MG, unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) y bloques GG, GM, unidos por enlaces glucosídicos α (1-4) (Espín *et al.*, 2000). Los monómeros (M y G) están distribuidos a lo largo de la cadena del polímero en un patrón de bloques, donde los bloques GG, MM y los bloques MG coexisten (**Figura 3b**). La cantidad relativa de los dos monómeros, así como su disposición secuencial a lo largo de la cadena del polímero varía ampliamente, dependiendo del origen del alginato. En los bloques M, los residuos de manuronato se enlazan mediante enlace ecuatorial formando una estructura plana tipo cinta, mientras que en los bloques G, los enlaces entre dos unidades de guluronato se dan en forma diaxial y por lo tanto son más cortos, generando una estructura más unida y menos flexible, mientras que los bloques MG contienen ambos enlaces ecuatorial-axial y axial-ecuatorial, con lo que se obtiene una mayor flexibilidad (**Figura 3c**). Por lo tanto la rigidez en los bloques de la cadena va en incremento en el orden $MG < MM < GG$ (Mørch, 2008).

por mecanismos de degradación ácida o alcalina, así como por la oxidación de radicales libres. En función del pH, la degradación de alginato está en su mínimo a la neutralidad y aumenta a un pH bajo debido a la hidrólisis catalizada por protones (Haug *et al.*, 1963), y a un pH alto debido a la β -eliminación (Haug *et al.*, 1967). La degradación de los radicales libres se debe principalmente a las reacciones oxidación-reducción de despolimerización causado por la contaminación de agentes reductores como los polifenoles de las algas pardas (Draget *et al.*, 1997). El alginato también puede ser degradado por radiación o tratamiento térmico (Nagasawa *et al.*, 2000; Said y Hassan, 1993).

2.4.4 Degradación biológica

La degradación biológica, es generalmente llevada a cabo por una enzima, una alginato liasa (EC 4.2.2.3, EC 4.2.2.11) que actúa sobre el enlace 1-4 glucosídico vinculados en el alginato generando un ácido urónico insaturado en el extremo no reducido de la molécula (Iwamoto *et al.*, 2001; Moen *et al.*, 1997). Las alginato liasas obtenidas de bacterias varían en su especificidad sobre el sustrato (dependiendo del tipo de bloque, ya sean bloques polimanuronatos, poliguluronatos o combinaciones de estos) y su modo de acción (Gómez, 1993). Las alginato liasas se han aislado de una amplia gama de organismos, incluyendo algas, invertebrados marinos y terrestres y microorganismos procariotas y eucariotas terrestres y marinos, así como bacteriófagos (Wong *et al.*, 2000). La mayoría de las bacterias degradantes de alginato fueron encontradas básicamente en una asociación estrecha con algas marinas o moluscos. Estas liasas, también han sido encontradas en especies de bacterias que producen alginato, tales como *Azotobacter vinelandii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todas las liasas son endolasas y pueden exhibir especificidad entre residuos M o G (Draget *et al.*, 2002).

Es importante considerar que las características físicas de las esferas de alginato parecen depender de una variedad de factores. El incremento en pH y concentraciones de fosfato muestran una tendencia general a la inestabilidad de

las esferas. La concentración de fosfato en el medio juega un papel importante en la estabilidad. A valores por encima de 5.5 de pH las esferas de alginato se pueden disolver en pocos días (Becker, 1994).

Tabla I.-Origen y localización de algunas alginato liasas (Draget *et al.*, 2002).

Fuente	Localización	pH óptimo
<i>Klebsiella aerogenes</i>	Extracelular	7.0
<i>Enterobacter cloacae</i>	Extracelular	7.8
	Intracelular	7.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AlgL)	Periplasma	7.0
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Periplasma (AlgL)	8.1-8.4
	Extracelular (AlgE7)	6.3-7.3
<i>Pseudomonas alginovora</i>	Extracelular	7.5
	Intracelular	-
<i>Halotia tuberculata</i>	hepatopancreas	8
<i>Sphingomonas</i> sp. ALYI-III	Citoplasma	5.6-7.8
<i>Littorina</i> sp.	Hepatopancreas	5.6
<i>A. vinelandii</i> fago	Extracelular	7.7

En general, el pH óptimo para la mayoría de las alginato liasas parece estar entre 7.2 y 7.8. Sin embargo, en algunos casos las actividades parecen aumentar al hacerlo los valores de pH como en el caso de *A. depilans* (8.0) y *H. Tuberculata* (9.6) (Boyen *et al.*, 1990). La actividad alginato liasa óptima se ha descrito en un amplio intervalo de temperatura que va de 20 a 40°C (Gómez, 1993).

Una de las principales desventajas de uso de microorganismos inmovilizados en la matriz de alginato *in situ* es su pérdida de estabilidad en ambientes naturales, lo cual es atribuido principalmente a la presencia de iones monovalentes

(principalmente Na^+), los cuales son capaces de sustituir iones divalentes (Ca^{2+} y Sr^{2+}) resultando en la pérdida de estructura de la matriz (Moreira *et al.*, 2006; Moreno-Garrido, 2008).

2.5 Uso del sistema co-inmovilizado *Chlorella vulgaris*-*Azospirillum brasilense*

Los experimentos realizados con agua residual sintética han demostrado el aumento de células y una mayor absorción de nitrógeno y fósforo por *Chlorella vulgaris*, cuando se encuentra inmovilizada con la bacteria *Azospirillum brasilense* (González y Bashan, 2000).

Por otro lado, existe una mayor remoción de N y P por *C. vulgaris*, *Chlorella sorokiniana* inmovilizadas con *Azospirillum brasilense* en condiciones de ayuno en agua residual sintética (Hernández *et al.*, 2006).

Se ha evaluado el sistema de microalga-bacteria bajo diferentes regímenes de cultivo en agua residual doméstica, encontrando que bajo condiciones heterotróficas se obtiene la mayor adsorción de amonio con *C. vulgaris* inmovilizada, alcanzando una remoción del 44% a los 3 días del tratamiento y después se estabiliza el sistema. La mayor remoción de fosfato se alcanza con el sistema *C. vulgaris* + *A. brasilense* bajo el régimen fotoautotrófico, alcanzando valores de $3.05 \pm 0.31 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, lo cual representa un porcentaje de eliminación de $31.59 \pm 2.27\%$, entre los valores más bajos se encuentra el tratamiento con *C. vulgaris* sola (Perez-Garcia *et al.*, 2010).

Los resultados hasta ahora obtenidos han sido desarrollados a nivel laboratorio, empleando biorreactores con capacidad de 1L con medio residual sintético (MRS) (Perez-Garcia *et al.*, 2010). Sin embargo ante la necesidad de tratar grandes volúmenes de agua provenientes de los efluentes de la planta de tratamiento, es

necesario evaluar la eficiencia de la biotecnología a volúmenes mayores en condiciones lo más parecido posible a las reales, en las cuales aun sea posible controlar la mayoría de las variables.

3 JUSTIFICACIÓN

El tratamiento terciario de aguas residuales es una operación necesaria para garantizar la calidad del agua. En los últimos años, el desarrollo y uso de biotecnologías con microorganismos ha permitido una remoción de nutrientes de los efluentes de agua residual secundaria, sin generar contaminantes subsiguientes. La microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada en conjunto con la bacteria *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato, ha demostrado ser eficiente para remoción de los nutrientes del agua residual.

Antes de llevar a cabo un escalamiento, es necesario conocer los diferentes factores que están involucrados en este proceso. En trabajos anteriores de investigación se han definido los factores ambientales, fisicoquímicos y químicos; tales como las fluctuaciones de temperatura, luminosidad, el pH, conductividad eléctrica, salinidad y concentraciones de macronutrientes, entre otros. Sin embargo, además de éstos, es importante tener conocimiento de: a) la microbiota que pudiera interactuar *in situ* con el sistema que se está intentando implementar y b) la estabilidad de la matriz inmovilizante a emplear. Por lo tanto, es de suma importancia conocer los alcances y limitaciones que tiene esta tecnología, para poder diseñar adecuadamente las herramientas que permitan su desarrollo.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar el sistema inmovilizado *C. vulgaris* - *A. brasilense* bajo condiciones fotoautotróficas, para eliminación de N y P en el tratamiento terciario de agua residual secundaria analizando la resistencia de la matriz inmovilizante para su empleo *in situ*.

4.2 Objetivos particulares

- ✓ Determinar las características que permitan al alginato (usado como base de la matriz inmovilizante), mayor estabilidad durante su exposición en agua residual secundaria.
- ✓ Establecer una proporción óptima del sistema inmovilizado microalga-bacteria (*Chlorella vulgaris* - *Azospirillum brasilense*) que remueva eficientemente los nutrientes N y P del agua residual secundaria durante el tratamiento terciario.
- ✓ Analizar la eficiencia del sistema inmovilizado *C. vulgaris* - *A. brasilense*, una vez determinadas las características y proporciones, en la eliminación de nutrientes N y P, en fotobiorreactor de 25 L, bajo un régimen fotoautotrófico.
- ✓ Detectar la presencia de microorganismos nativos del agua que tengan alguna influencia sobre el sistema *C. vulgaris* - *A. brasilense* o sobre la matriz inmovilizante.

5 HIPÓTESIS

El empleo de *Chlorella vulgaris* en la eliminación de nutrientes N y P, durante el tratamiento terciario de agua residual, es eficiente y su eficiencia aumenta cuando se inocula junto con *Azospirillum brasilense*. El uso de alginato como matriz inmovilizante, permite que estos dos microorganismos se mantengan en conjunto, generando una barrera ante algunos depredadores, al mismo tiempo que permite una recuperación menos costosa de la biomasa generada.

El sistema inmovilizado *C. vulgaris-A. brasilense*, es adecuado para emplearse *in situ* durante el tratamiento terciario de aguas residuales, si la matriz inmovilizante es capaz de resistir a las condiciones adversas del ambiente natural en agua residual durante el período de máxima eliminación de nutrientes.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

Se planteó una estrategia de 4 etapas para cumplir con los objetivos de la investigación: i) búsqueda de una mejora en la estabilidad de la matriz inmovilizante durante su exposición al agua residual; ii) determinar la proporción óptima de esferas del sistema inmovilizado microalga-bacteria, que remueva eficientemente nutrientes del agua residual; iii) evaluación de la eficiencia del sistema en la eliminación de nutrientes, en biorreactor de 25 L; y iv) valoración e identificación de microorganismos nativos del agua residual con capacidad alginolítica.

6.1 Estabilidad de la matriz inmovilizante (esferas de alginato) durante el proceso de eliminación de nutrientes (N y P) del agua residual

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas en las que la matriz de alginato es capaz de mantener su estabilidad durante el proceso de eliminación de nutrientes (N y P) en el que el sistema microalga-bacteria llevan a cabo este proceso, se llevaron a cabo tres experimentos en los que se evaluó la estabilidad de las esferas en función de: i) la concentración de alginato y la concentración de cloruro de calcio; ii) la combinación de alginato con diferentes agentes endurecedores y iii) la influencia de microorganismos nativos del agua residual. Para el desarrollo de estos tres experimentos, se recurrió a los materiales y procedimientos que a continuación se describen.

Colecta de agua residual tratada

La muestra de agua residual tratada empleada para este estudio, fue tomada de la “Planta de Tratamiento de Agua Residual del Municipio de La Paz, Baja California Sur, México”. Esta planta tiene un flujo promedio de $300 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$ de agua residual cruda, proveniente de la red de alcantarillado de la ciudad de La Paz, en la cual

habitan 215,178 personas (INENGI, censo poblacional 2010). El agua residual generada en la ciudad de La Paz es principalmente de origen doméstico (OOMSAPAS, 2008). La planta de tratamiento opera con un sistema convencional de lodos activados (OOMSAPAS, 2008). Las muestras fueron tomadas en la “caja receptora” de los efluentes provenientes de los sedimentadores secundarios, antes de recibir la inyección de cloro para su desinfección, la cual en esta tesis será referida como agua residual secundaria (ARS) cuyas características se muestran en la **Tabla II**.

Tabla II.- Análisis de agua residual secundaria (ARS), realizado por el Laboratorio de Análisis Químico de Aguas del CIBNOR (Hernández, 2011).

Parámetro	Concentración
pH 7-10	7.59
Conductividad eléctrica mS/m	236.33
Salinidad UPS	1.1
Amonio μM	2630
Nitritos μM	1.18
Nitratos μM	3.01
Fosfatos μM	100.38
Fósforo total μM	101.40
Silicatos μM	1205
Dureza total $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	669.59
Alcalinidad CaCO_3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	422.37
Acidez CaCO_3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	63.92
Cloruros $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	391.40
Sulfatos $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	92.42
Sólidos suspendidos totales $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	12.64
Sólidos disueltos $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	994
Sólidos sedimentables $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	<0.100

Donde:

μM = micromoles por litro.

mS m^{-1} = mili Siemens por metro.

UPS = Unidades Practicas de Salinidad.

mg L^{-1} = miligramos por litro.

Cepas utilizadas

Microalga

Se utilizó la microalga, *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714). Para el mantenimiento de esta microalga, fue sembrada en placas de agar-caldo nutritivo SIGMA-ALDRICH® y puesta refrigeración a 4 °C durante un periodo no mayor a 30 días, también puede ser mantenida en medio líquido mineral C30 cuya composición y descripción a detalle se puede consultar en de-Bashan *et al.* (2004) a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $90 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y 150 rpm durante 5 días.

Bacteria

Para los experimentos fue usada la α -proteobacteria, *Azospirillum brasilense* Cd (DMS 1843, Braunschweig, Germany) también conocida como bacteria promotora de crecimiento de microalgas (MGPB, por sus siglas en inglés; de-Bashan *et al.*, 2002a). El mantenimiento de este microorganismo se lleva a cabo en refrigeración a 4°C en placas de agar-caldo nutritivo SIGMA-ALDRICH®. Antes de ser usado para los experimentos es cultivada en 50 mL de medio líquido estéril TYG (Trypticase-yeast extract-glucose) con la siguiente composición (en g L^{-1}): NaCl, 1.2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; K_2HPO_4 , 0.13; CaCl_2 , 0.22; K_2SO_4 , 0.17; NH_4Cl , 1; Na_2SO_4 , 2.4; NaHCO_3 , 0.5; Na_2CO_3 , 0.09; Fe(III)EDTA, 0.07; Triptona, 5; Glucosa, 5; Extracto de levadura, 5, durante 24 horas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ en agitación a 150 rpp, y resembrado (3 mL de inóculo) en 50 mL frescos del mismo medio durante 24 horas bajo las mismas condiciones de temperatura y agitación para mayores detalles consultar de-Bashan *et al.* (2004).

Matriz inmovilizante de base (alginato de sodio)

Se emplearon dos tipos de alginato de sodio: ALGIMAR® y la marca comercial SIGMA®, el primero, fue proporcionado por el laboratorio de Química de Algas, elaborado en la planta piloto del Centro de Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del IPN.

Inmovilizado de microorganismos

La inmovilización de los microorganismos se realizó siguiendo la técnica descrita por de-Bashan *et al.* (2004). La cual consiste brevemente en mezclar 20 mL de cultivo axénico de *C. vulgaris* con una concentración aproximada de 6×10^6 células mL^{-1} con 80 mL de una solución estéril de alginato de sodio al 2% de 6000 mPa·s de viscosidad (una mezcla hecha con alginato de 14,000 y 3500 mPa·s) esta solución se agita hasta la homogenización. La solidificación del gel se realizó vertiendo gota a gota la solución alginato-células en una solución estéril de CaCl_2 al 2% mediante una bomba peristáltica, Master Flex® (Mod. No. 7523-30. Barnant Co, Barrington U.S.A.). Se procedió de manera similar en el caso de *A. brasilense* partiendo de una concentración inicial de 1×10^9 UFC· mL^{-1} . Para la preparación de los co-inmovilizados (*C. vulgaris* y *A. brasilense*) se utilizó la misma concentración de estos que la utilizada en los inmovilizados individuales, mezclada en una proporción del 10 % v/v de cada una con respecto al volumen total de alginato.

6.1.1 Estabilidad en diferentes concentraciones de alginato y diferentes concentraciones de CaCl_2

Se evaluaron diferentes concentraciones de alginato ALGIMAR®. Las concentraciones evaluadas fueron: 2, 4 y 6 % p/v, y para la gelificación (conversión de alginato de sodio a alginato de calcio) se utilizaron dos concentraciones de CaCl₂, las cuales fueron 2 y 4 % p/v, con lo cual se obtuvieron seis tratamientos diferentes. Para este experimento se siguió el procedimiento de inmovilización de microorganismos antes descrito. En todos los tratamientos se utilizó el co-inmovilizado de *C. vulgaris* + *A. brasilense*.

Una vez obtenido el sistema inmovilizado en las esferas de alginato, se inoculó en Agua Residual Secundaria (ARS) bajo las siguientes condiciones: cultivos en lote en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de ARS y 4 g en peso fresco de esferas con los organismos co-inmovilizados. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación continua, con agitador orbital a 150 rpm, dentro de una cámara ambiental BIOTRONETTE Mark III de Lab-Line Instruments Inc. equipada con lámparas fluorescentes, se mantuvo iluminación continua de 90 $\mu\text{E m}^2 \text{ s}^{-1}$ a temperatura controlada de 28 $\pm 2^\circ\text{C}$.

Se evaluaron 6 tratamientos diferentes, con 5 réplicas cada uno, obteniendo un total de 30 unidades experimentales, los cuales fueron distribuidos aleatoriamente.

1. Alginato al 2% + CaCl₂ al 2%
2. Alginato al 2% + CaCl₂ al 4%
3. Alginato al 4% + CaCl₂ al 2%
4. Alginato al 4% + CaCl₂ al 4%
5. Alginato al 6% + CaCl₂ al 2%
6. Alginato al 6% + CaCl₂ al 4%

Se tomaron 10 esferas de cada unidad experimental, a las 0, 48 y 96 horas del experimento. Las esferas fueron tomadas con una espátula de metal esterilizada, la toma de muestra se realizó bajo condiciones de asepsia. Posteriormente a cada esfera se le midió el diámetro y la fuerza de gel como parámetro de firmeza, para

estos fines, se emplearon un vernier digital y un analizador de texturas TA.XTPlus, del laboratorio de Química de Algas en el Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas (CICIMAR) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

Se realizaron pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguido de un análisis Post-Hoc de Tukey con un valor de significancia $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

6.1.2 Evaluación de diferentes agentes endurecedores en combinación con alginato

Debido a que la estabilidad de las esferas de alginato no fue mejorada al incrementar las concentraciones de alginato y CaCl_2 , se procedió a realizar diferentes combinaciones de alginato con materiales endurecedores, polímeros y compuestos.

Se evaluó la estabilidad de las esferas de alginato al combinarlo con diferentes agentes endurecedores, los cuales fueron: polivinilpirrolidona (PVP) k90, PoliVinil Alcohol (PVA), y carboximetil-celulosa, así como compuestos: carbonato de calcio (CaCO_3) ácido bórico (H_3BO_3) y cloruro de estroncio (SrCl_2); los dos últimos se utilizaron como agente gelificante en sustitución del CaCl_2 .

Las esferas de alginato-polimero se obtuvieron siguiendo el mismo procedimiento empleado en la inmovilización de microorganismos, sin la adición de microorganismos. En todos los tratamientos se usó el 2 % de alginato; se realizaron 6 diferentes combinaciones, las cuales se muestran a continuación:

1. Alginato al 2% + SrCl_2 al 2%
2. Alginato al 2% + CaCl_2 al 2%

3. Alginato al 2% + Polivinil Pirrolidona (PVP), 2%, + CaCl₂ al 2%
4. Alginato al 2% + Polivinil alcohol (PVA) 3% + CaCl₂ al 2% + H₃BO₃, 2%
5. Alginato al 2% + Carboximetil-celulosa, 1% + CaCl₂ al 2%
6. Alginato al 2% + (CaCO₃), 2% + CaCl₂ 2%

Cada tratamiento, se llevó a cabo por triplicado. Los experimentos se desarrollaron en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 mL de ARS y 4 g en peso fresco de esferas. Todos los tratamientos se mantuvieron en agitación continua, con agitador orbital a 150 rpm, dentro de una cámara ambiental con temperatura controlada de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminación continua de $90 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ durante 96 horas.

El análisis de muestras se realizó igual al descrito en la sección 6.1.2.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía combinado con análisis de post hoc de Tukey con $P < 0.05$. Las letras mayúsculas denotan diferencias significativas entre tratamientos por el ANDEVA y las letras minúsculas denotan diferencias significativas entre tiempos.

6.1.3 Influencia de microorganismos nativos del ARS

A pesar de los esfuerzos realizados, ninguna combinación logró mejorar la estabilidad de las esferas con ninguna de las combinaciones, ni de concentración, ni de agentes endurecedores, que permitieran mantener su resistencia a la deformación durante los experimentos, motivo por el cual, se tomó la decisión de usar una concentración de alginato al 2 % sin la adición de agentes endurecedores para los siguientes experimentos

Se procedió a examinar cuales son los factores que influyen en esta pérdida de fuerza mecánica, principalmente comparando las concentraciones de fosfatos y la

carga microbiana natural del ARS.

Por lo tanto, se valoró la estabilidad de las esferas de alginato durante el período de tratamiento (96 horas) empleando dos sistemas: a) ARS sin esterilizar (cruda); y b) ARS estéril. La esterilización del ARS se llevó a cabo en autoclave a 121°C a 1 atm de presión durante 15 minutos.

Como medida de estabilidad de las esferas de alginato nuevamente, se midió la fuerza de gel y el diámetro a las 0, 48 y 96 horas. De igual forma se llevaron a cabo mediciones de iones fosfato y de pH.

Se emplearon cuatro tratamientos, los cuales son:

- 1.- Esferas sin microorganismos (Control 1) en ARS estéril,
- 2.- Esferas sin microorganismos (Control 2) en ARScruda,
- 3.- Esferas con *C. vulgaris* y *A. brasilense* inmovilizadas conjuntamente, en ARSestéril
- 4.- Esferas con *C. vulgaris* y *A. brasilense* inmovilizadas conjuntamente, en ARS cruda.

El análisis de muestras se realizó igual al descrito en la sección 6.1.2.

Medición de iones fosfato e iones amonio

La concentración de iones fosfato fue analizada a partir de 5 mL de muestra tomada de cada unidad experimental, se realizó una dilución 1:5 con agua desionizada y la determinación de la concentración se realizó por el método del ácido ascórbico (FosVer 3, técnica estandarizada para HACH). La concentración de iones amonio se realizó a partir de 1 mL de muestra, diluido 1:10 con agua desionizada. Para esta determinación se empleó el método colorimétrico del fenato (Solorzano, 1969) adaptado a microplaca por Hernández-López y Vargas-Albores (2003). En ambos casos se hizo uso de técnicas estandarizadas para

análisis de agua (APHA, AWWA, WEF 2005).

Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguido de un análisis Post-Hoc de Tukey con un valor de significancia $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

6.2 Proporción óptima de esferas que contienen el inmovilizado microalga-bacteria para una remoción eficiente de nutrientes en ARS

Considerando los resultados de los experimentos anteriores, y al constatar que la pérdida de estabilidad se debe en gran medida a la carga microbiana natural del sistema, se procedió a evaluar la posibilidad de eliminar la mayor cantidad de nutrientes (N y P) en el menor tiempo posible, por lo que redujo el tiempo de experimentación de 96 hrs a 48 hrs y se comparó la variación en la remoción de nutrientes al incrementar la concentración de esferas de alginato con el sistema co-inmovilizado.

Para el desarrollo de éste objetivo, se evaluaron diferentes proporciones de esferas de alginato. Las proporciones de esferas de alginato empleadas fueron 0, 4, y 10 g en peso fresco por cada 100 mL de ARS.

Los tratamientos evaluados fueron;

- 1.- **0** = ARS sin esferas (control),
- 2.- **4s** = ARS con 4 % de esferas sin microorganismos inmovilizados,
- 3.- **4Ch** = ARS con 4 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense* inmovilizadas en conjunto,
- 4.- **4Ch-Az** = ARS con 4 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense* inmovilizadas en conjunto ARS con 10 % de esferas con *Chlorella*

vulgaris inmovilizada y

5.- **10s** = ARS con 10 % de esferas sin microorganismos inmovilizados,

6.- **10Ch** = ARS con 10 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense*

inmovilizadas en conjunto y

7.- **10Ch-Az** = ARS con 10 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense*

inmovilizadas en conjunto.

Al igual que los experimentos anteriores, estese desarrolló en cultivos por lote en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Las condiciones de agitación, luminosidad, y temperatura, en las que se llevó a cabo el experimento, fueron las mismas que en las secciones anteriores, a diferencia de que este se desarrolló durante 48 horas. Cada tratamiento se realizó por quintuplicado, generando un total de 25 unidades experimentales. Se realizaron tres repeticiones del experimento completo.

Se tomaron muestras de cada unidad experimental; 5 mL de para el análisis de concentración de fosfatos y 1 mL para el análisis de concentración de amonio. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24 y 48 horas. Se emplearon las mismas técnicas descritas en la sección 6.1.3

6.3 Evaluación de la eficiencia del sistema en la eliminación de nutrientes, en biorreactor de 25 L

Para el desarrollo de este objetivo se determinó usar una proporción de esferas de alginato (SIGMA®) de 10 g de peso fresco por cada 100 mL de ARS y en un tiempo de retención hidráulica de 24 horas, ya que en estas condiciones es posible eliminar la mayor cantidad de nutrientes, y durante este tiempo, las esferas de alginato aun mantienen cierta estabilidad.

La inmovilización de los microorganismos se realizó siguiendo la técnica

anteriormente descrita. Para el desarrollo de este objetivo, se evaluó la eliminación de nutrientes PO_4^{3-} y NH_4^+ , en un biorreactor de 25 L, bajo régimen autotrófico, usando 10 g en peso fresco de esferas por cada 100 mL de ARS.

Los experimentos se llevaron a cabo en biorreactores de acrílico transparente, en forma de prisma triangular invertido, con dimensiones 70 x 60 x 33 cm (lado x lado x altura) (González *et al.*, 1997) el cual se encuentra representado en la Figura 4. En el biorreactor se colocaron 25 L de agua residual secundaria (ARS). Se suministró aireación continua con un flujo de 30 mL de aire·min⁻¹. Se utilizó iluminación continua equivalente a 90 $\mu\text{moles}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ con lámparas fluorescentes, la temperatura fue mantenida a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

**Bioreactor para el tratamiento terciario de aguas residuales
(modelo airlift triangular)**

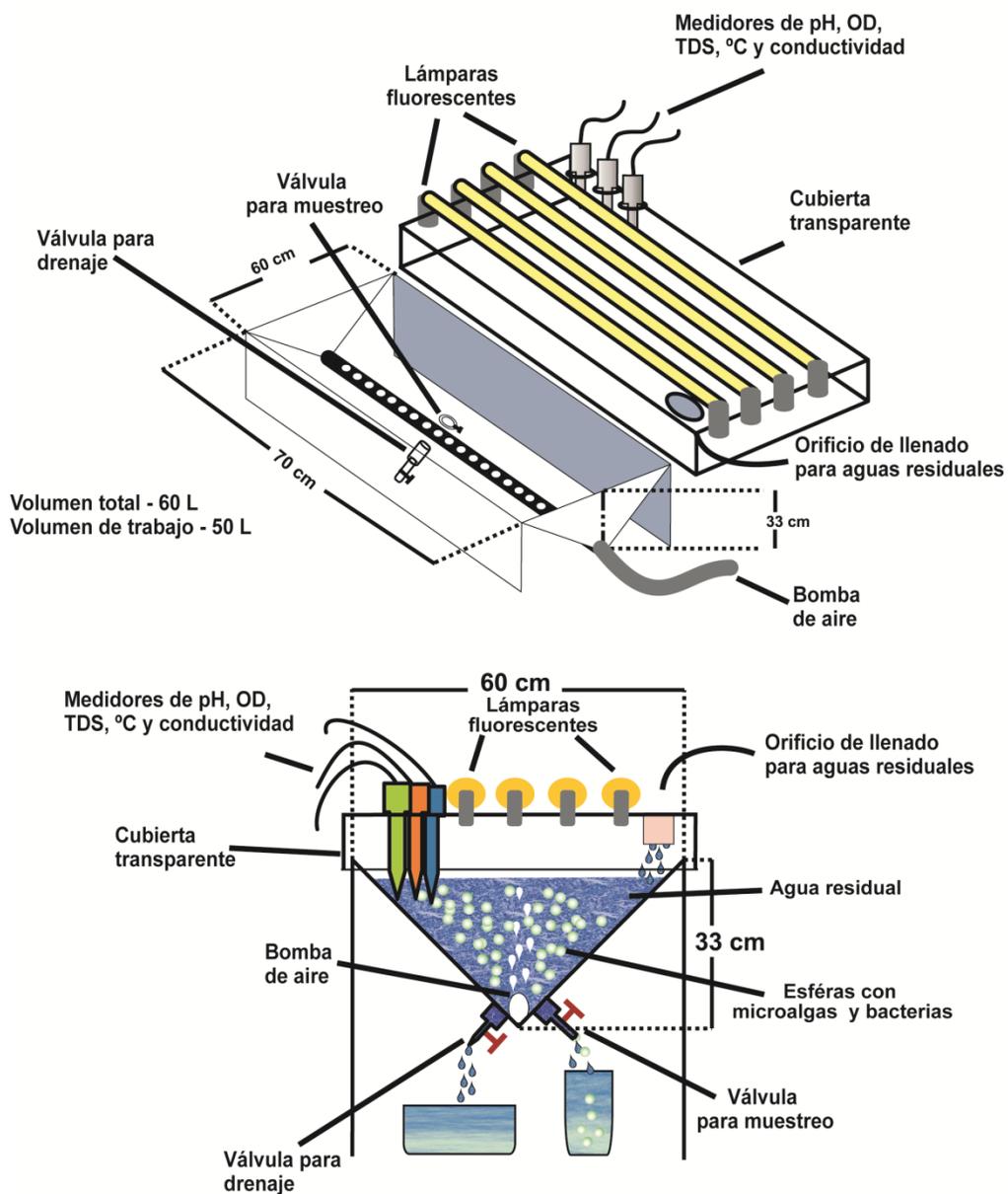


Figura 4.-Modelo de biorreactor para tratamiento terciario de agua residual. Modelo air-lift triangular, indicando sus principales componentes.

Se evaluaron los siguientes tratamientos:

- 1.- ARS sin esferas de alginato (control 1)
- 2.-ARS con esferas de alginato sin microorganismos inmovilizados (control 2)
- 3.- ARS con esferas de alginato con *C. vulgaris* inmovilizada
- 4.-ARS con esferas de alginato con *C. vulgaris* y *A. brasilense* co-inmovilizadas.

Se tomaron muestras de cada unidad experimental; 5 mL de para el análisis de concentración de fosfatos y 1 mL para el análisis de concentración de amonio. Las muestras fueron tomadas a las 0, 24 y 48 horas. Se emplearon las mismas técnicas descritas en la sección 6.1.3

6.4 Conteo de bacterias viables por Diacetato de Fluoresceína

Durante el desarrollo del experimento de eliminación de nutrientes en el biorreactor de 25 litros, se tomaron muestras de agua para realizar conteos de células bacterianas viables presentes en el ARS y poder determinar alguna variación en el tamaño de la población, esto se realizó mediante tinción de Diacetato de Fluoresceína (FDA, por sus siglas en ingles) (Chrzanowski *et al.*, 1984). Las muestras fueron colectadas a las 0, 24 y 48 horas del experimento, tomando 10 mL de agua en tubos para centrifuga CORNING® estériles.

En condiciones asépticas, las muestras de agua fueron filtradas (millipore®, tamaño de poro de 5.0 µm) para eliminar sólidos suspendidos y microorganismos de mayor tamaño al de las células bacterianas. Previo al filtrado, la muestra se homogenizó en vortex durante 1 min al máximo de velocidad, se recuperaron 2 mL del filtrado y se centrifugó a 13,000 *g* durante 2 minutos, el sobrenadante fue retirado y se realizó un primer lavado; re-suspendiendo el precipitado con 500 µL de solución Buffer de fosfato (KH₂PO₄ y K₂HPO₄: pH 7.2) y homogenizando nuevamente en el vortex durante 1 min al máximo de velocidad. Seguido a esto, se centrifugó por segunda vez la muestra con las mismas condiciones

anteriormente descritas, y el sobrenadante fue retirado, lo cual se podría considerar como un segundo lavado. A continuación, se llevó a cabo la tinción. Se agregaron 250 μL de una solución de trabajo compuesta por Diacetato de Fluoresceína (20 mg de FDA en 10 mL de acetona, a 4°C) y Buffer de fosfato (relación FDA/Buffer, 1:10) esta solución se mezcló con el precipitado celular, homogenizando con un vortex y posteriormente se dejó reposar durante 2 minutos. Después de este tiempo se centrifugó nuevamente la muestra para retirar la solución de tinción. El precipitado celular se re-suspendió en 100-500 μL de agarosa (0.5 %, diluida en Buffer de fosfato filtrado con un tamaño de poro de 0.2 μm) y se mezcló hasta homogenizar. Finalmente, 20 μL de la muestra fueron tomados para colocarse en un portaobjetos. Se colocó un cubreobjetos encima de la muestra y se procedió a realizar el conteo de células con el apoyo de un microscopio óptico de epifluorescencia (OLYMPUS BX41). La fluorescencia emitida se logró detectar con un filtro verde (FITC) el cual tiene un rango de excitación de luz de 460-490nm y un máximo de emisión de luz de 520IF. Los conteos celulares se realizaron directamente al microscopio, usando el objetivo de 100X, se tomando diez campos al azar, y se cuantificaron las unidades celulares, cabe mencionar que se consideró la profundidad de la muestra. Cada muestra fue tratada por triplicado.

Para determinar la concentración celular (células $\cdot\text{mL}^{-1}$) se realizaron los siguientes cálculos: el promedio por campo de los diez campos, dividido entre 12,732.39 (esta constante corresponde al total de campos posibles con el objetivo de 100X usando cubreobjetos 22 x 22 mm) el resultado es multiplicado por el factor de dilución o concentración.

6.5 Adsorción de Fosfato en las esferas de alginato

Con la finalidad de poder cuantificar el fosfato que es adsorbido en las esferas de alginato, y poder discernir si esto se debe a mecanismos químicos o biológicos, se llevó a cabo un experimento en el que se emplearon únicamente esferas de

alginato, obtenidas con el mismo procedimiento antes descrito, sin la incorporación de microorganismos inmovilizados. Se utilizó ARS, con las mismas condiciones de los experimentos anteriormente descritos.

El experimento se desarrolló en cultivos por lote en fotobiorreactores con capacidad de dos litros, llenados al 50 % de su capacidad. Se utilizó una proporción de 10 g de peso fresco de esferas de alginato por 100 mL de ARS. Por cada unidad experimental, se emplearon 1000 mL de ARS y 100 g de peso fresco de esferas. Se suministró aireación continua con un flujo de 30 mL de aire·min⁻¹. Para el tratamiento estéril, tanto el aire de alimentación como el de salida fue filtrado (acrodiscos, poro de 0.2 µm). Se utilizó iluminación continua equivalente a 90 µmoles·m²·s⁻¹ con lámparas fluorescentes, la temperatura fue mantenida a 28 ± 1°C.

Se evaluaron dos tratamientos con ARS sin esterilizar: uno sin esferas de alginato y otro con esferas de alginato; además de un tratamiento en el cual se utilizó ARS estéril, con esferas de alginato, teniendo un total de tres tratamientos.

1. ARS no estéril sin esferas de alginato (solo agua)
2. ARS estéril, con esferas de alginato,
3. ARS no estéril, con esferas de alginato.

Cada tratamiento se desarrolló por triplicado, teniendo un total de 9 unidades experimentales.

Se tomaron muestras a las 0, 24 y 48 horas del experimento, tanto de agua (muestra líquida) como de esferas (muestra sólida). En cada muestreo se tomaron 10 g de esferas y 100 mL de agua. A las muestras sólidas se les determinó la concentración de fósforo total, empleando el método colorimétrico de Olsen y Sommers (1982) para esto, se realizó una digestión con ácido perclórico. Este

análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Edafología. Las muestras líquidas se analizaron en el Laboratorio de Análisis Químico de Agua, donde se determinó la concentración de fósforo total, por el método de Valderrama (1981) ambos laboratorios pertenecen al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) en La Paz, Baja California Sur.

Se realizaron pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía seguido de un análisis Post-Hoc de Tukey con un valor de significancia $p \leq 0.05$. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 8 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

6.6 Cuantificación, aislamiento e identificación de bacterias con posible capacidad alginolítica

Cuantificación

Se realizó una cuantificación de bacterias cultivables, considerando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en caja Petri en medio de cultivo ALGIMED, formulado en el laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR, el cual tiene como fuente principal de carbono, alginato de sodio, cuya formulación se muestra en la **Tabla III**.

Para realizar la cuantificación de bacterias cultivables, se tomaron 10 mL de muestra de agua residual secundaria, tomada de la misma fuente que la empleada en todos los experimentos anteriores. Se homogenizó la muestra en un vortex al máximo de velocidad durante 1 minuto, bajo condiciones de asepsia y se realizaron 3 lavados, de la siguiente manera: se centrifugaron 2 mL de la muestra durante 3 minutos a 13,000 *g*, se retiró el sobrenadante, se re-suspendió el precipitado obtenido en 500 μ L de solución salina (NaCl, 0.85 %), se homogenizó y se repitió la misma operación dos veces más. Una vez terminados los lavados,

se realizaron diluciones seriadas, y se realizó siembra por difusión en cajas Petri. La siembra por cada dilución se llevó a cabo por quintuplicado. Únicamente, se sembraron las diluciones 10^{-2} 10^{-3} y 10^{-4} .

Tabla III.- Medio de cultivo ALGIMED, para aislamiento de bacterias con posible capacidad de degradar alginato.

Compuesto	Concentración (g·L⁻¹)
Alginato	10
NH₄Cl	0.05
KH₂PO₄	0.014
MgSO₄·3H₂O	0.002
CaCl₂	0.004
NaCl	0.007
Agar	15

Las cajas Petri fueron incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por un periodo de 72 horas. Una vez pasado este tiempo se realizó el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en caja Petri.

Aislamiento

Para los aislamientos, se seleccionaron morfotipos coloniales distintos de colonias aisladas, a partir de las cajas Petri en las que se realizaron los conteos. Cada colonia fue sembrada por extensión en dos medios distintos, ALGIMED (**Tabla III**) y un medio propuesto por Tang *et al.* (2009) (**Tabla IV**) para aislamiento de bacterias con capacidad alginolítica.

Tabla IV.- Medio propuesto por Tang *et al.* (2009) para aislamiento de bacterias con capacidad de degradar alginato.

Tang <i>et al.</i> (2009)	Concentración (g·L⁻¹)
Alginato	2
KH₂PO₄	1
MgSO₄·7H₂O	0.5
(NH₄)₂SO₄	0.002
Polipeptona	0.5
Extracto de levadura	0.3
Agar	15

Las cajas Petri fueron incubadas a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ por un periodo de 48 a 72 horas, de acuerdo al crecimiento colonial de cada cepa. Después de dos generaciones en estos medios, cada morfotipo fue sembrado en los medios de cultivo enriquecidos Agar Nutritivo (Sigma-Aldrich®) y Agar de Soja Trypticase (Becton, Dickinson and Company) a concentración 8 y 18 g·L⁻¹ respectivamente y 17 g·L⁻¹ de agar bacteriológico.

Identificación molecular

Se realizó un análisis de 16S rDNA para identificar las especies de las bacterias aisladas, los 9 morfotipos purificados fueron enviados para su secuenciación a la compañía GENEWIZ, Inc. Compañía dedicada a la secuenciación del ADN, la síntesis de genes, biología molecular, genómica.

7 RESULTADOS

7.1 Estabilidad de la matriz inmovilizante (esferas de alginato) durante el proceso de eliminación de nutrientes (N y P) del agua residual

Los resultados obtenidos con respecto a la estabilidad de la matriz inmovilizante que se evaluaron en función de: i) la concentración de alginato y la concentración de cloruro de calcio; ii) la combinación de alginato con diferentes agentes endurecedores y iii) la influencia de microorganismos nativos del agua residual, se muestran a continuación siguiendo este mismo orden.

7.1.1 Estabilidad en diferentes concentraciones de alginato y diferentes concentraciones de CaCl_2

Al evaluar la fuerza de gel como parámetro de estabilidad en las esferas de alginato, los resultados obtenidos muestran que existe una relación directa entre la fuerza de gel y la concentración de alginato y/o el CaCl_2 . Al inicio del experimento en los tratamientos con mayor concentración de alginato y CaCl_2 , se observaron los mayores valores de fuerza de gel, siendo el de mayor fuerza el tratamiento 6% de alginato con 4% de CaCl_2 el cual alcanzó una fuerza de gel de $123.94 \pm 28.80 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$ (**Figura 5a**), y el de menor valor el tratamiento control con 2 % de alginato endurecido en 2% de CaCl_2 ($17.35 \pm 1.92 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$). A las 48 horas de tratamiento, se observó una disminución significativa en la fuerza de gel en todos los tratamientos, es decir, a pesar de que es posible obtener un valor inicial mayor al resto de los tratamientos, su estabilidad no es mejorada. Se calculó la fuerza de gel relativa expresada en porcentaje (**Figura 5b**) a cada uno de los tratamientos y así poder hacer una comparación estadística, tal como se muestra en la **Figura 5c**. A pesar de que se encontraron diferencias estadísticas entre grupos de tratamientos a las 48 horas (**Figura 5c**) estos valores no representan mejoría en la

estabilidad de las esferas ya que todos los tratamientos perdieron más de un 95 % con respecto a su fuerza inicial.

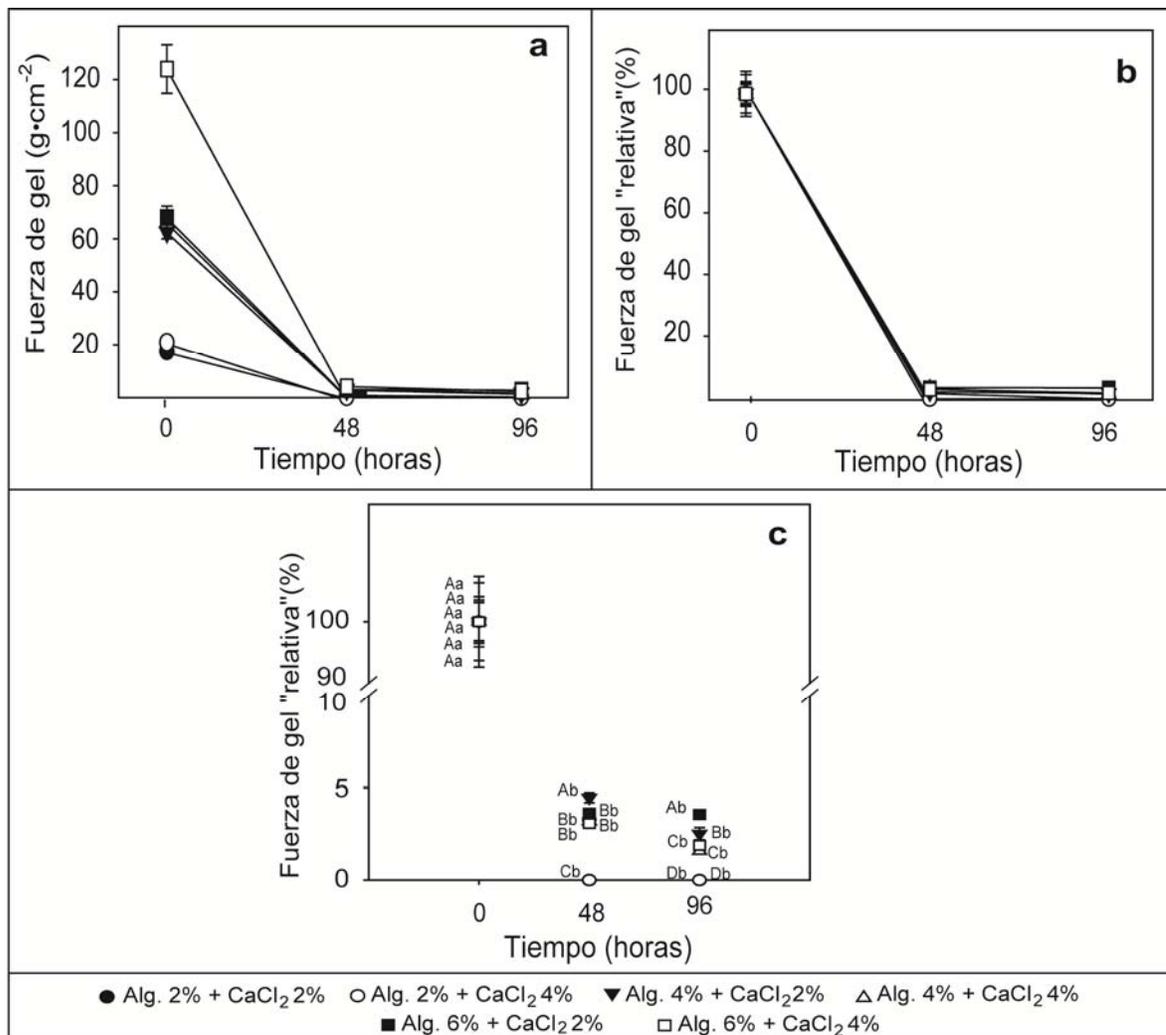


Figura 5.- a) Fuerza de gel en esferas de alginato elaboradas con diferentes concentraciones de alginato, gelificadas en diferentes concentraciones de CaCl₂, con su variación respecto al tiempo de exposición en ARS; **b)** Fuerza de gel relativa expresada en %; **c)** Análisis estadístico de la fuerza de gel relativa. Para una mejor apreciación se realizó un salto de unidades del 10 al 90 % en el eje "y". Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

Debido a que ninguna combinación fue capaz de mantener la fuerza mecánica de las esferas de alginato por más tiempo, se considera que incrementar las concentraciones del alginato o el CaCl_2 , solamente encarecería el proceso. Además de que en concentraciones mayores de estos compuestos, el poro es reducido, restringiendo la difusión de nutrientes y metabolitos, generando posibles alteraciones en el desarrollo de los microorganismos inmovilizados. Por tal motivo se tomó la decisión de usar una concentración de 2 % de alginato y 2 % de CaCl_2 .

7.1.2 Evaluación de diferentes agentes endurecedores en combinación con alginato

Al evaluar la fuerza de gel de las esferas de co-polimeros (base de alginato en combinación con diferentes polímeros o compuestos: carboximetil-celulosa, PVP k 90, CaCO_3 , PVA, y SrCl_2), se observó que la combinación de alginato con CaCO_3 , le confiere un mayor valor al inicio del experimento ($16.35 \pm 2.43 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$), seguido por el tratamiento control ($9.51 \pm 0.88 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$), contrario a esto la de menor valor fue la gelificación con SrCl ($3.10 \pm 0.49 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$) (**Figura 6a**). Al hacer una comparación de la variación de la fuerza de gel “relativa” durante el tratamiento, las combinaciones con SrCl y PVA perdieron únicamente entre el 20 y 30 % de su valor inicial en 48 horas de tratamiento, sin diferencias estadísticas entre estos dos tratamientos, pero sí con los demás tratamientos, mientras que la combinación con CaCO_3 resultó ser la menos estable ya que perdió cerca del 75% de su fuerza de gel (**Figura 6b y Figura 6c**). A las 96 horas del experimento todos los tratamientos redujeron su valor más de un 94 % con respecto al valor inicial (**Figura 6c**). Las combinaciones de SrCl y la de PVA, a pesar de mostrar menor pérdida de fuerza de gel “relativa” como ya se mencionó, mostraron valores bajos desde el inicio y por lo tanto, poco resistentes a la deformación.

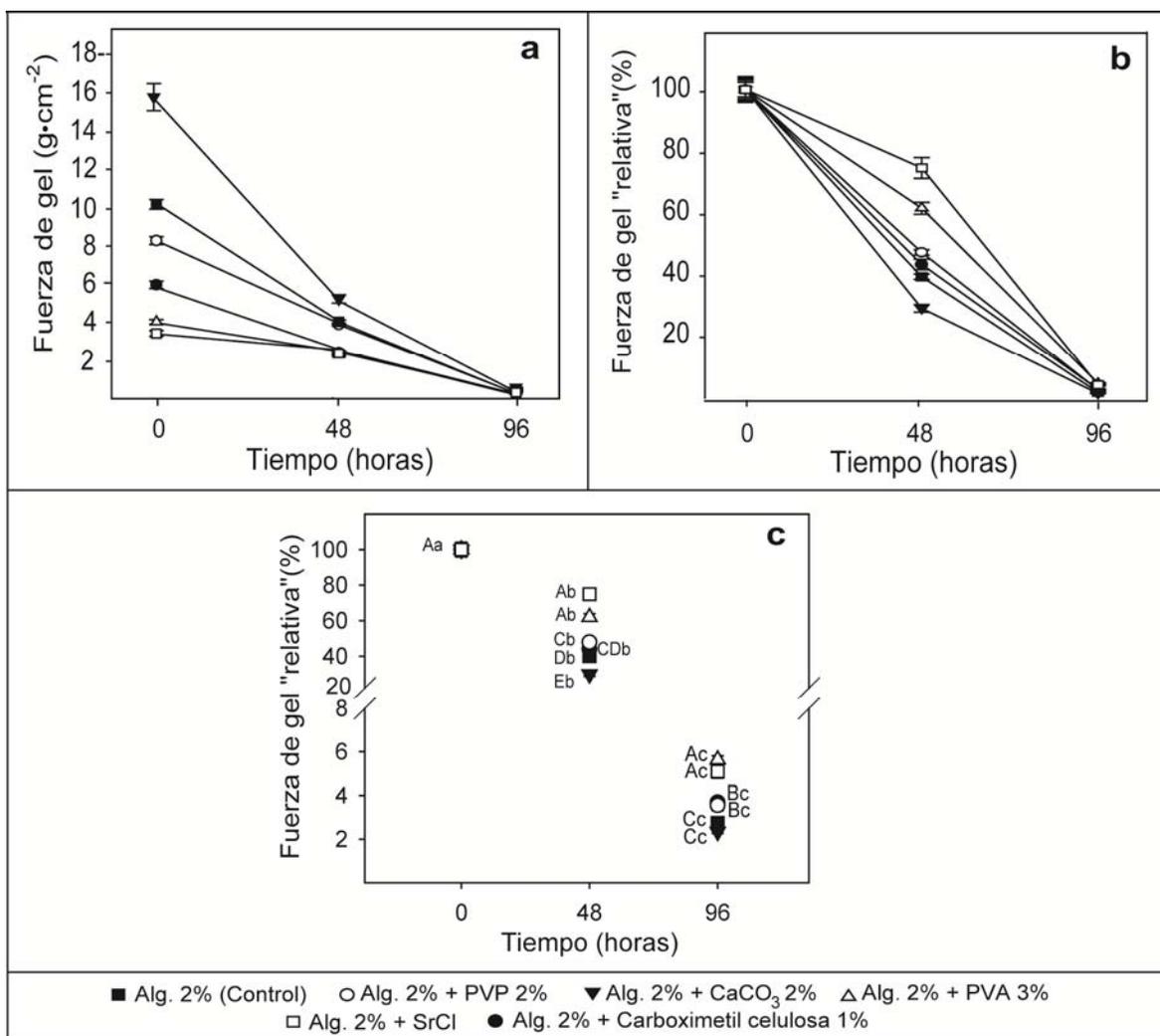


Figura 6.- a) Variación en la fuerza de gel de las diferentes combinaciones de alginato con polímeros o compuestos y su variación con respecto al tiempo de exposición en ART. **b)** Fuerza de gel relativa expresada en %. **c)** Análisis estadístico de la fuerza de gel relativa; para una mejor apreciación se realizó un salto de unidades del 8 al 20% en el eje "y". Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

7.1.3 Influencia de microorganismos nativos del ARS

Fuerza de gel y diámetro

Al comparar los tratamientos en los que se usó por una lado, Agua Residual Secundaria (ARS) estéril, y por el otro ARS cruda, fue posible observar que aquellos que fueron expuestos en ARS estéril, conservaron su fuerza de gel a lo largo del experimento, con la única diferencia en el tratamiento control (esferas sin microorganismos), en cual se redujo aproximadamente el 10 % de su fuerza durante las primeras 48 horas con diferencias estadísticas con respecto al inicial y después se estableció en el valor obtenido. El tratamiento que contenía el sistema co-inmovilizado microalga-bacteria mantuvo su fuerza de gel las primeras 48 horas de tratamiento y redujo ligeramente, después de este período, sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo (**Figura 7a**). Los tratamientos en ARS cruda presentaron pérdida en la fuerza de gel, de alrededor del 85 % en 48 horas de exposición y perdieron por completo su fuerza en 96 horas de exposición (**Figura 7a**).

En ARS cruda ambos tratamientos (esferas sin y con microorganismos) perdieron hasta un 75 % de fuerza con respecto a su valor inicial a las 48 horas de tratamiento (**Figura 7b**), mientras que en ARS estéril, el tratamiento control en este mismo periodo disminuyó un 22 % de su fuerza, mientras que las esferas con microorganismos, se mantuvieron sin variaciones estadísticamente significativas a lo largo del experimento (**Figura 7b**).

En cuanto al diámetro, los tratamientos en ARS estéril, mantuvieron su tamaño a lo largo del tratamiento (**Figura 7c**), contrario a esto, los tratamientos sometidos a ARDT cruda, disminuyeron su tamaño, reduciéndose alrededor de un 7.6 % en las primeras 48 horas de tratamiento, y hasta un 38.4% con respecto a su tamaño inicial al término del tratamiento (**Figura 7c**).

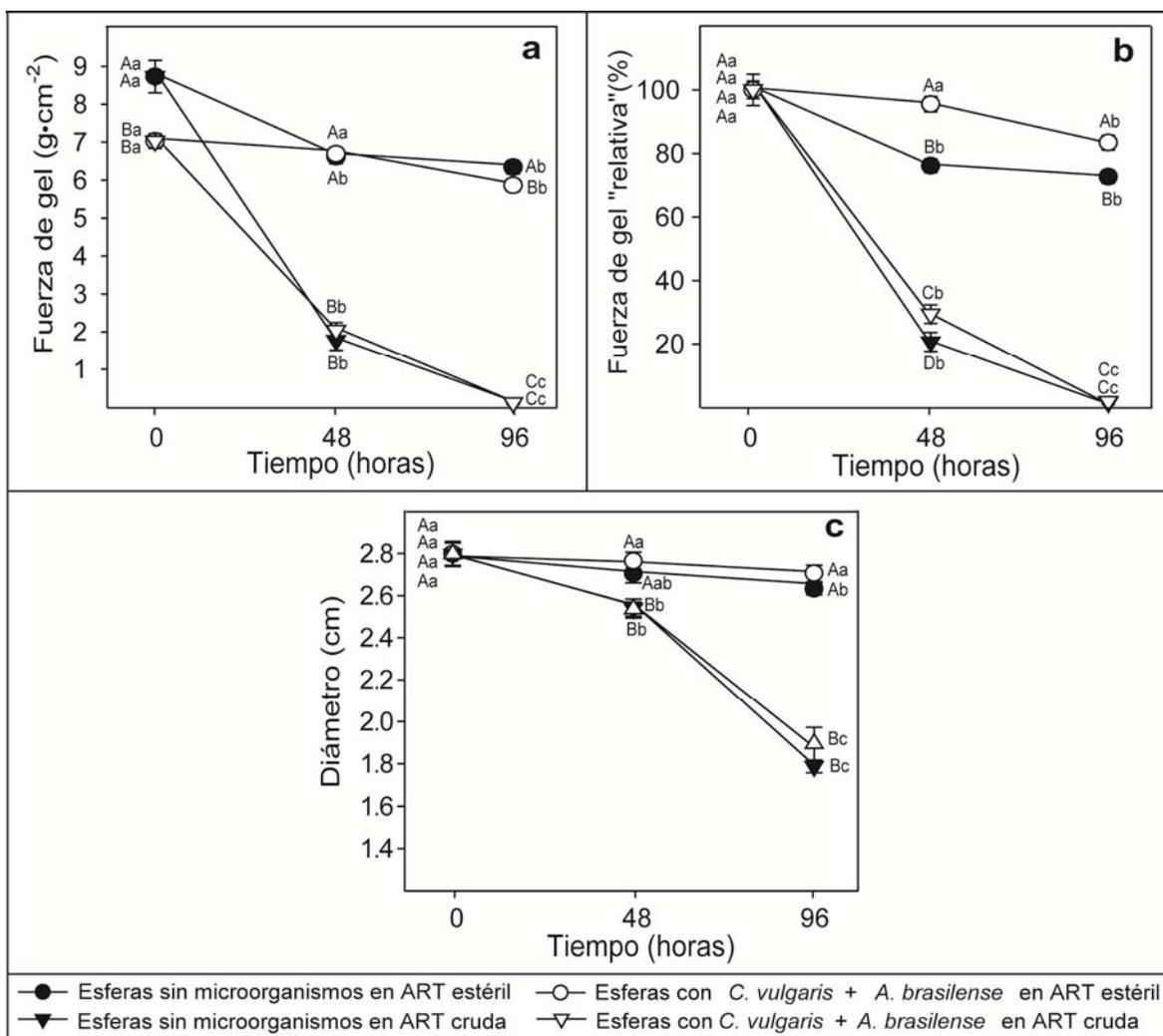


Figura 7.- a) Variaciones de la fuerza de gel en agua residual estéril y agua residual cruda; b) fuerza de gel relativa de cada tratamiento a través del tiempo; c) diámetro de las esferas de alginato. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

Concentraciones de PO_4^{3-} y NH_4^+

La concentración de PO_4^{3-} en los tratamientos con ARS estéril se con una concentración de $18.55 \pm 5.37 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (**Figura 8a**). Por otro lado, en los tratamientos con ARS cruda se reportan las siguientes variaciones: a las 48 horas

de experimento; el tratamiento que removió la mayor cantidad de PO_4^{3-} fue el que contenía la microalga-bacteria, reduciendo su valor de 20.41 ± 1.522 hasta $12.51 \pm 1.44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, siendo este diferente estadísticamente del resto de los tratamientos (**Figura 8a**). A las 96 horas de tratamiento tanto las esferas sin microorganismos como las esferas con microorganismos expuestas en ARS cruda, removieron el $11.36 \pm 1.61 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de PO_4^{3-} , lo cual equivale al $55 \pm 1.76 \%$ con respecto al valor inicial.

Los tratamientos en ARS cruda, tanto sin microorganismos como el que contenía el co-inmovilizado eliminaron $86.71 \pm 5.34 \%$ de amonio en 48 horas de haber iniciado el experimento. Los tratamientos con ARS estéril tuvieron un comportamiento extraño, en cuanto a la concentración de amonio, ya que mientras aquel que contenía el sistema microalga-bacteria mantuvo prácticamente una disminución lineal a lo largo del experimento, el tratamiento sin microorganismos presentó un incremento a las 48 horas, de aproximadamente 2.3 veces su valor inicial, y luego una disminución alcanzando valores semejantes a los iniciales (**Figura 8b**).

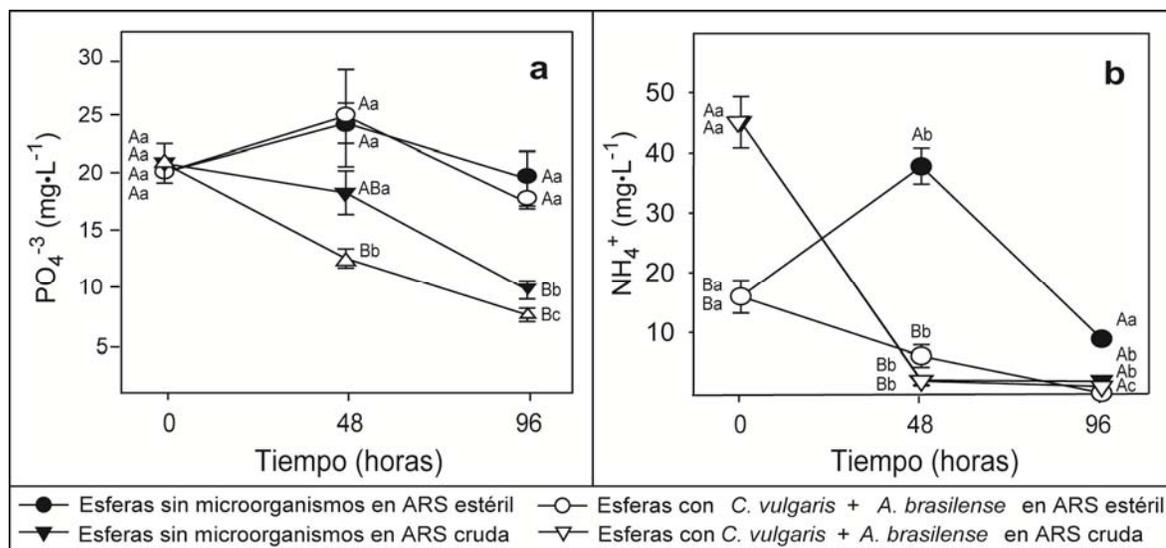


Figura 8.- Remoción de nutrientes (N y P) del ARS cruda y estéril, empleando esferas de alginato sin microorganismos (control) y con el sistema *A. brasilense*-*C. vulgaris*; a) Concentración de fósforo; b) Concentración de NH_4^+ . Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

7.2 Proporción óptima de esferas contenidas en el sistema microalga-bacteria, para remover con mayor eficiencia los nutrientes del agua residual

Se evaluó la eficiencia en la eliminación de nutrientes (N y P) al comparar diferentes proporciones de esferas de alginato que contengan el co-inmovilizado, usando 4 y 10 % de esferas. El tratamiento que produjo mayor remoción de fosfatos a las 24 horas de haber iniciado el experimento fue el tratamiento que se realizó con 10% de esferas con *C. vulgaris*-*A. brasilense* (78.91 ± 20.51 %) (**Figura 9**). A las 48 horas del experimento, todos los tratamientos que contenían esferas de alginato removieron entre el 88.15 y el 97.09 % de fosfatos con respecto a la concentración inicial (**Figura 9**).

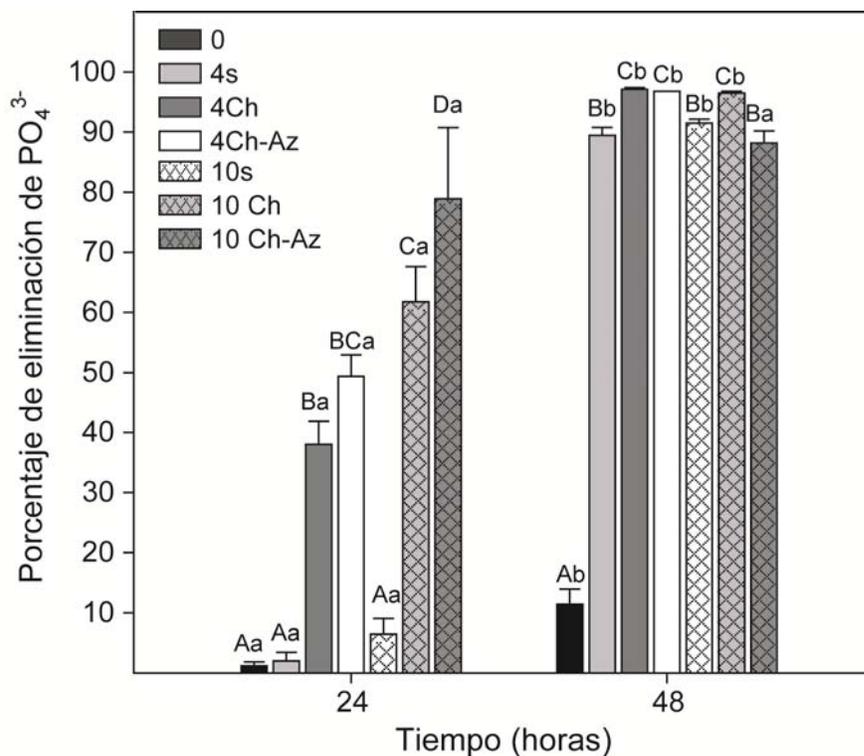


Figura 9.- Porcentaje de eliminación de PO_4^{3-} en ARS empleando diferentes proporciones de esferas contenidas en el sistema microalga-bacteria compuesto de un co-inmovilizado *C. vulgaris*-*A. brasilense*. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

Simbología

0 = ARS sin esferas (control),

4s = ARS con 4 % de esferas sin microorganismos inmovilizados,

4Ch = ARS con 4 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense* inmovilizadas en conjunto,

4Ch-Az = ARS con 4 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense* inmovilizadas en conjunto ARS con 10 % de esferas con *Chlorella vulgaris* inmovilizada y

10s = ARS con 10 % de esferas sin microorganismos inmovilizados,

10Ch = ARS con 10 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense* inmovilizadas en conjunto y

10Ch-Az = ARS con 10 % de esferas con *C. vulgaris*+ *A. brasilense* inmovilizadas en conjunto.

Los tratamientos con 4 % de esferas conteniendo *C. vulgaris*- *A. brasilense* inmovilizados en conjunto, así como el 10 % de esferas con *C.vulgaris* y el 10 % con *C. vulgaris*- *A. brasilense*, fueron los que mayor eliminación de amonio presentaron a las 24 horas del experimento, sin diferencias significativas entre estos (**Figura 10**). A las 48 horas de haber transcurrido el experimento, las diferencias en la eliminación de amonio fueron mínimas con respecto a los valores obtenidos a las 24 horas, en este tiempo se alcanzaron valores entre 33.34 y 55.40 %, todos los tratamientos realizaron remoción de nutrientes, incluyendo los controles.

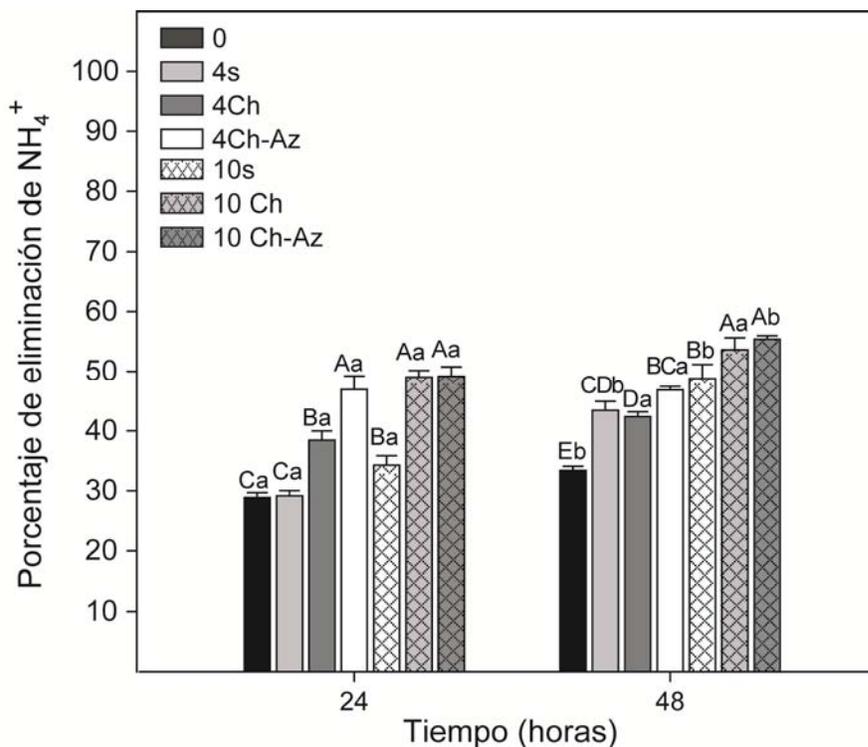


Figura 10.- Porcentaje de eliminación de NH_4^+ en ARS empleando diferentes proporciones de esferas que contiene el sistema microalga-bacteria del sistema co-inmovilizado *C. vulgaris*-*A. brasilense*. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

7.3 Evaluación de la eficiencia del sistema en la eliminación de nutrientes, en un biorreactor de 25 L

La eficiencia en la eliminación de nutrientes se evaluó en función de las concentraciones de fosfatos y amonio en el ARS. Se encontró que en 24 horas de incubación, el mayor porcentaje de remoción de fosfatos se obtuvo con el tratamiento que contenía es sistema co-inmovilizado, el cual eliminó el 94.22 ± 0.82 % de la concentración inicial en el ARS, seguido por esferas con *C. vulgaris* inmovilizada que eliminó 85.04 ± 2.29 %, mientras que el tratamiento control (esferas sin microorganismos) únicamente eliminó 4.55 ± 1.29 %, sin embargo, el tratamiento control 2 (sólo esferas son microorganismos), eliminó el 65.36 ± 0.46 % (**Figura 11a**). A las 48 horas de incubación, los tres tratamientos que contenían esferas de alginato, tanto aquellos que contenían los microorganismos inmovilizados, como los que no, lograron remover entre el 85 y el 98 % (**Figura 11a**) mientras que en este mismo tiempo, el tratamiento sin esferas de alginato únicamente removió el 12.03 ± 2.82 . Con respecto a la eliminación de amonio, los resultados muestran que la mayor eliminación de amonio fue registrada tanto por el tratamiento con *C. vulgaris*-*A. brasilense* co-inmovilizadas y *C. vulgaris* inmovilizada, eliminando 54.01 ± 16.56 y 49.65 ± 5.94 % con respecto al valor inicial, respectivamente y sin diferencias estadísticas entre estos; el siguiente en eliminar la mayor cantidad de amonio, fue el tratamiento con esferas de alginato sin microorganismos el cual eliminó el 34.62 ± 3.25 %; y por último el tratamiento son esferas de alginato eliminó 11.97 ± 4.68 % (**Figura 11b**). A las 48 horas de incubación los tres tratamientos con esferas de alginato, eliminaron entre el 89 y 100 % del amonio inicial; y el tratamiento sin esferas de alginato eliminó 26.77 ± 2.13 %.

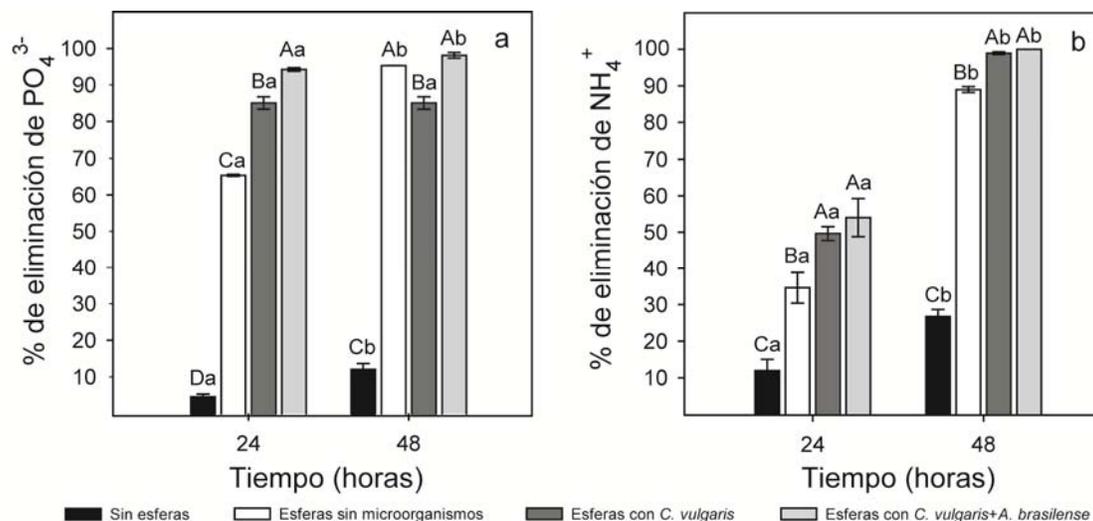


Figura 11.- Porcentaje de eliminación de nutrientes del ARS en biorreactor de 25 L, usando 10 % de esferas de alginato. a) Eliminación de fosfatos; b) eliminación de amonio. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

7.4 Conteo de bacterias viables por Diacetato de Fluoresceína

En la **Figura 12** se muestra la concentración de bacterias viables totales, suspendidas en el agua (ARS) y su variación con respecto al tiempo de cada tratamiento, las células fueron cuantificadas mediante la técnica de tinción con FDA. A continuación, se muestra el número de células bacterianas viables desde el inicio del experimento ($4.8 \pm 0.2 \times 10^4$ células \cdot mL⁻¹), lo cual se podría considerar como la carga natural que trae el ARS al salir del tratamiento secundario de la Planta de Tratamiento de Aguas.

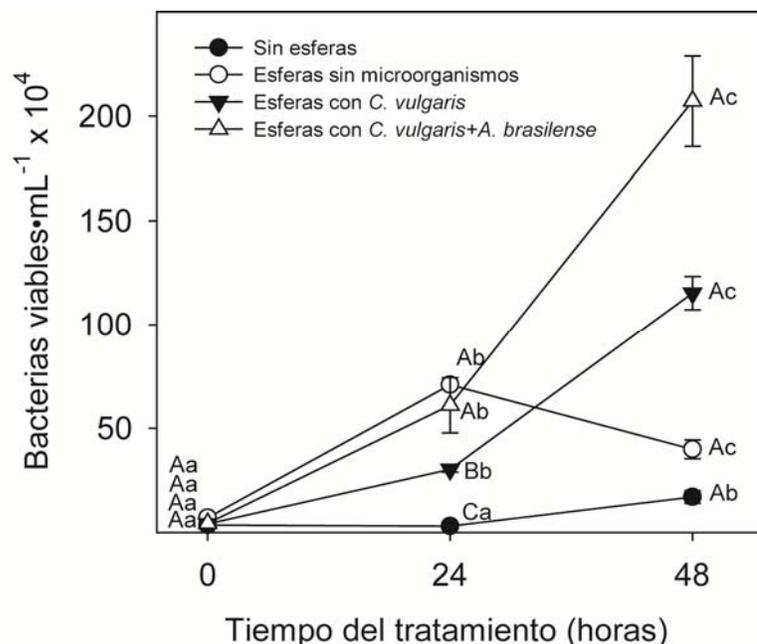


Figura 12.- Bacterias viables en el agua (ARS) durante 48 horas del experimento con el sistema co-inmovilizado *C. vulgaris*-*A. brasilense* para tratamiento terciario de aguas. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

El control 1 (agua sin esferas de alginato) no mostró diferencias significativas a las 24 horas del experimento, con respecto a los valores iniciales, únicamente en el tercer muestreo (48 horas) se presentaron diferencias significativas, llegando a una concentración de $0.17 \pm 0.07 \times 10^6$ células·mL⁻¹. Mientras que el control 2 (esferas sin microorganismos) presentó diferencias significativas en cada uno de los muestreos, reportándose un incremento a las 24 horas del experimento, alcanzando una concentración de $0.70 \pm 0.03 \times 10^6$ células·mL⁻¹, seguido por un decremento a las 48 horas del experimento, con una concentración de $0.39 \pm 0.01 \times 10^6$ células·mL⁻¹. Mientras que los otros dos tratamientos, *C. vulgaris* inmovilizada y *C. vulgaris* + *A. brasilense* co-inmovilizadas mostraron un incremento continuo en la población. El tratamiento con *C. vulgaris* alcanzó una población de $1.15 \pm$

0.19×10^6 células·mL⁻¹, al final del tratamiento; mientras que el tratamiento co-inmovilizado $2.07 \pm 0.53 \times 10^6$ células·mL⁻¹ también al final del tratamiento.

7.5 Adsorción de fosfato en las esferas de alginato

Se demostró en experimentos anteriores que el tratamiento sin microorganismos inmovilizados, pero que contenía esferas de alginato, era capaz de remover una elevada concentración de nutrientes (N y P), alcanzando a las 48 horas del tratamiento, niveles de remoción semejantes a los tratamientos con *C. vulgaris* y *C. vulgaris*-*A. brasilense* inmovilizados. Por lo que se procedió a desarrollar este experimento, con la finalidad de poder determinar si esta eliminación se debe principalmente a factores físico-químicos o biológicos.

El tratamiento control, ARS estéril con esferas de alginato, se mantuvo sin variaciones estadísticamente significativas a lo largo del experimento, con un promedio de 2.15 ± 2.50 mg por Kg de Fósforo total (**Figura 13**). El tratamiento en el cual se utilizó ARS sin esterilizar, no mostró variaciones estadísticas significativas durante las primeras 24 horas del experimento, sin embargo, a las 48 horas del experimento, sí se presentó variación, alcanzando un valor promedio de 18.67 ± 3.80 mg·Kg⁻¹ de Fósforo total (**Figura 13**).

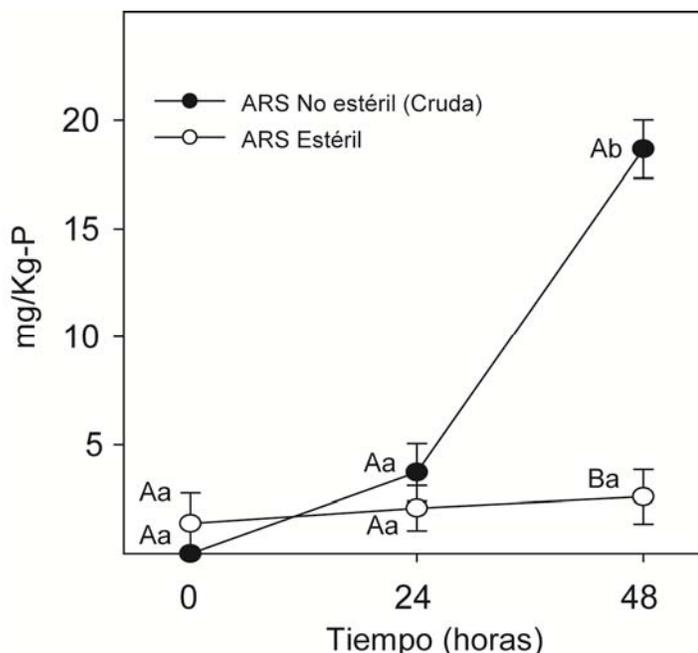


Figura 13.- Variación en la concentración de P-total ($\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) en esferas de alginato, al ser expuestas en ARS estéril y no estéril. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

A lo largo del experimento, el cual tuvo una duración de 48 horas, se evaluó la concentración de fosfato en el agua. Tal como se observa en la **Figura 14**, se encontraron valores iniciales de $21.28 \pm 1.28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para los tres tratamientos. A las 24 horas del experimento, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el de más baja concentración el tratamiento en ARS no estéril con esferas, con $11.30 \pm 0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, seguido por el tratamiento ARS estéril con esferas con $18.61 \pm 0.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y el de mayor concentración ARS sin esferas, $19.99 \pm 0.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, este último sin diferencias significativas con respecto a su valor inicial. A las 48 horas del experimento, se presentó una reducción significativa en cada uno de los tratamientos. En este tiempo, el tratamiento ARS no estéril con esferas, redujo más del 60% de su concentración inicial, mientras que los tratamientos ARS estéril con esferas y ARS sin esferas, redujeron aproximadamente el 20 y 14 % respectivamente.

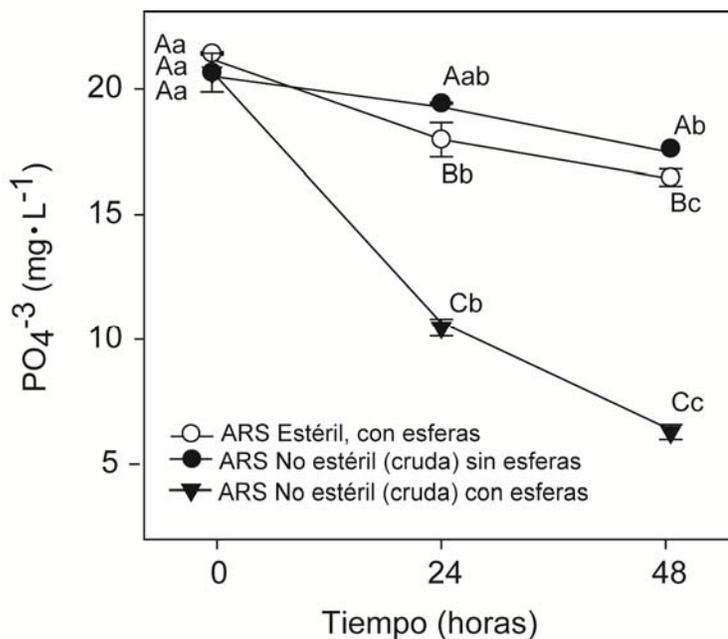


Figura 14.- Variación en la concentración de PO_4^{3-} -total ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) en ARS estéril y no estéril, al ser tratada con esferas de alginato. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo tiempo, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a $p \leq 0.05$.

7.6 Cuantificación, aislamiento e identificación de bacterias con posible capacidad alginolítica

Usando los medios selectivos para bacterias con capacidad alginolítica, los cuales se encuentran descritos en la metodología, y bajo las condiciones de incubación antes especificadas, fue posible cuantificar $1.62 \pm 0.09 \times 10^3$ UFC, con potencial de actividad alginolítica.

Se lograron aislar y purificar 9 cepas con características coloniales distintas entre sí, las cepas purificadas fueron mantenidas en medios enriquecidos, tal como se ha descrito en la sección de materiales y métodos.

Las 9 cepas que se lograron aislar fueron analizadas por medio de 16S rDNA para su identificación, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla V**.

Tabla V.- Cepas identificadas con posible capacidad alginolítica, aisladas del ARS.

Cepas	Phylum	Identificación más cercana	Max Ident (%)	Longitud (pb)
ICS_6	Proteobacteria (gama)	<i>Acinetobacter junii</i>	99	1415
ICS_3	Proteobacteria (alfa)	<i>Ancylobacter polymorphus</i>	99	1367
ICS_5	Poteobacteria (gama)	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	99	1413
ICS_8	Proteobacteria (gama)	<i>Pseudomonas putida</i>	99	1407
ICS_9	Proteobacteria (gama)	<i>Pseudomonas sp</i>	99	1413
ICS_4 y ICS_7	Proteobacteria (gama)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99	1414 1411
ICS_1	Proteobacteria (alfa)	<i>Xanthobacter flavus</i>	99	1354
ICS_2	Proteobacteria (beta)	<i>Zoogloea resiniphila</i>	99	1413

Taxonomía de cada especie

A continuación se da una descripción taxonómica de cada una de las especies identificadas:

Acinetobacter junii

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Moraxellaceae; Acinetobacter.

Ancylobacter polymorphus

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;
Xanthobacteraceae; Ancylobacter.

Pseudomonas plecoglossicida

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas

Pseudomonas putida

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

Pseudomonas sp.

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

Pseudomonas stutzeri

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Pseudomonadales;
Pseudomonadaceae; Pseudomonas.

Xanthobacter flavus

Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales;
Xanthobacteraceae; Xanthobacter

Zoogloea resiniphila

Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Rhodocyclales;
Rhodocyclaceae; Zoogloea.

8 DISCUSIÓN

El confinamiento de microalgas en ficocoloides como el alginato o la carragenina, es la técnica de inmovilización más utilizada en los experimentos de tratamiento de aguas residuales (de-Bashan y Bashan, 2010; Mallick, 2002; Moreno-Garrido, 2008). El más empleado para inmovilizar células en esferas, es el alginato, debido a que su preparación es simple. Además, numerosos estudios han reportado una distribución homogénea de células dentro de dicha matriz, así como la conservación de la viabilidad celular por periodos prolongados (Lau *et al.*, 1997; Tam y Wong, 2000), al mismo tiempo que es posible la difusión de nutrientes y metabolitos a través de la esfera semipermeable (Chen, 2001; Pane *et al.*, 1998). Sin embargo, las principales limitaciones para el uso del alginato en la inmovilización de microalgas están relacionadas principalmente con su inestabilidad al entrar en contacto con cationes que sirven como agentes quelantes y cationes anti-gelificantes (Dainty *et al.*, 1986; Martinsen *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 2006). Además, se espera que el daño en la esfera aumente en los experimentos *in situ*, debido principalmente a la eliminación del catión (Ca) que forma el complejo quelante del medio, ocasionando que el alginato tenga menor resistencia mecánica y sea más susceptible a la filtración celular (Moreira *et al.*, 2006).

Uno de los objetivos de esta investigación fue producir esferas de alginato más estables para su aplicación *in situ* durante el proceso de eliminación de nutrientes en el tratamiento terciario de aguas residuales. A pesar de que se han propuesto en la literatura diferentes sugerencias para superar la inestabilidad de esferas de alginato (Doria-Serrano *et al.*, 2002; Joo *et al.*, 2001; Moreno-Garrido, 2008; Chen 2007; Salem y Barakat, 2005; Smidsrød y Skak-Bræk, 1990), pocos son los que han investigado cuantitativamente la estabilidad del alginato (Dainty *et al.*, 1985; Draget *et al.*, 1997; Moreira *et al.*, 2006), y por lo que sabemos, ninguno ha estudiado la estabilidad de la esfera durante su exposición en agua residual real, al mismo tiempo que se evalúe la capacidad de eliminación de nutrientes.

En esta tesis, se evaluó la estabilidad de las esferas en función de las concentraciones del alginato y el agente quelante (cloruro de calcio), usando como principal parámetro de la estabilidad, la fuerza de gel y así poder hacer una relación entre sus propiedades físicas y químicas (Martinsen *et al.*, 1989). Los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de alginato extraído de *M. pyrifera* indican que es posible incrementar la resistencia de las esferas al inicio del experimento, de 17.35 ± 1.92 hasta $123.94 \pm 28.80 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-2}$, lo cual coincide con lo reportado por Martinsen *et al.* (1989) quien reportó que la fuerza mecánica de las esferas incrementa al aumentar la concentración de alginato. Sin embargo durante la exposición de las esferas *in situ*, la estabilidad se pierde rápidamente, ya que se encontró una reducción de más del 95 % de la fuerza de gel en todas las concentraciones evaluadas, durante las primeras 48 horas de exposición.

Se han propuesto otras opciones para mejorar la estabilidad de las esferas, tales como el uso de cationes divalentes, entre los que destacan; plomo, cobre, cadmio, bario y estroncio (Gaserød *et al.*, 1999; Smidsrød y Skjak-Bræk 1990), sin embargo con excepción del estroncio, el uso de los demás cationes, en gran parte está restringido a causa de su toxicidad para las células (Widerøe y Danielsen, 2001). De igual forma se han sugerido diferentes co-polimeros, combinando el alginato con compuestos como: polivinil alcohol (PVA) (Jianlong *et al.*, 1995; Chen y Lin, 1994); polivinilpirrolidona (PVP)(Doria-Serrano *et al.*, 2001; 2002); carbonato de calcio (CaCO_3) (Liu y Hermanowicz, 1997); carboximetil celulosa (Joo *et al.*, 2001); e incluso agar (Salem y Barakat, 2005), todos ellos con resultados positivos, sin embargo, cabe mencionar que la mayoría de estos autores emplearon, ya sea agua residual sintética, agua residual estéril o en condiciones controladas con monocultivos.

La fuerza mecánica se incrementó al inicio de cada experimento; no obstante, la estabilidad de las esferas de alginato no fue mejorada al incrementar las concentraciones de alginato de sodio y CaCl_2 , motivo por el cual, se procedió a realizar diferentes combinaciones de alginato con materiales endurecedores, entre los que se encuentra polímeros y compuestos. Se probó la combinación del

alginato con: PVA, PVP, CaCO_3 , carboximetil celulosa y SrCl ; sin embargo, éstas combinaciones no le brindaron mayor fuerza mecánica a las esferas de alginato, que los valores obtenidos al aumentar la concentración del alginato o la concentración de CaCl_2 , lo cual difiere a lo reportado por (Smidsrød y Skak-Bræk, 1990; Moreno-Garrido, 2008; Jianlong *et al.*, 1995; Chen y Lin, 1994; Joo *et al.*, 2001; Liu y Hermanowicz, 1997; Doria-Serrano *et al.*, 2002; Salem y Barakat, 2005), quienes mencionan una mejor estabilidad el esfera de alginato. La estabilidad de éstas al ser expuestas *in situ*, fue ligeramente mejorada, comparando con las elaboradas al incrementar las concentraciones de alginato de sodio o CaCl_2 , ya que en 48 horas de experimento, algunos tratamientos perdieron menos del 40 % de su fuerza de gel inicial, sin embargo al finalizar el experimento (96 horas) todos los tratamientos habían perdido más del 94 % de su valor inicial. La estabilidad fue mejorada ligeramente al emplear SrCl tal como lo refiere Moreira (2006), ya que esta combinación perdió menos del 20% de su fuerza a las 48 horas de experimento, sin embargo esta combinación tiene valores muy bajos desde el inicio, incluso se reporta como el valor más bajo de todas la combinaciones empleadas en esta tesis. Al no encontrar ninguna combinación que fuera capaz de mantener sus cualidades durante el tiempo de exposición propuesto para que se lleve a cabo la eliminación de nutrientes, con respecto a los resultados obtenidos por Perez-Garcia *et al.* (2010) y ya que cualquiera de estas encarecería el proceso de tratamiento terciario de aguas residuales, se decidió continuar con los demás experimentos empleando el 2% de alginato con el 2% de de CaCl_2 .

La mayoría de los autores refiere la inestabilidad del alginato *in situ* a la presencia de iones o agentes quelantes, tales como calcio, EDTA, fosfatos y citratos (Kierstan y Coughlan, 1985; Dainty *et al.*, 1986 y Martinsen *et al.*, 1989) o principalmente fosfatos (Moreira *et al.*, 2006). Sin embargo, muy pocos autores refieren esta inestabilidad a la presencia de microorganismos nativos de los cuerpos de agua (Vogelsang y Østgaard, 1996) o mencionan al alginato como un compuesto biodegradable (Bashan, 1986; Bashan y González, 1999; Power *et al.*,

2011). Al notar que las combinaciones realizadas, no lograron mantener la estabilidad de las esferas de alginato, se procedió a buscar las causas de ésta pérdida en la fuerza mecánica, con ésta finalidad, se realizó un análisis comparando la influencia tanto de microorganismos nativos del agua secundaria, como de las concentraciones de fosfatos y se encontró que la estabilidad se encuentra relacionada principalmente la presencia de microorganismos, más que a las concentraciones de fosfato. Fue posible observar que no existe una relación directa con la concentración de fosfatos y la pérdida de la estabilidad de las esferas de alginato, ya que si se estuviera llevando a cabo una interacción iónica entre el alginato y los fosfatos, al disminuir las concentraciones de fosfato en el agua disminuiría la fuerza mecánica. Por otro lado se pudo observar una fuerte relación entre la pérdida de fuerza y la presencia de microorganismos nativos del agua residual secundaria.

Al comprobar que la principal causa de la pérdida en la estabilidad era la presencia de microorganismos, se procedió a buscar el menor tiempo posible de retención hidráulica el que sea posible llevar a cabo el tratamiento terciario de aguas, usando la base de alginato de sodio al 2% y CaCl_2 al 2 % para la inmovilización de *C. vulgaris* – *A. brasilense*. Se procedió a evaluar si esto era posible incrementando la proporción de esferas de alginato con el sistema co-inmovilizado con respecto al volumen de agua secundaria. El análisis de la proporción de esferas de alginato demostró que usando el 10 % de esferas con *C. vulgaris*-*A. brasilense*, es posible remover del 78.90 ± 20.51 % de fosfatos con respecto a su valor inicial en tan solo 24 horas de tratamiento, lo cual supera a los 31.5 % en cinco días de tratamiento, reportados por Perez-Garcia (2010) usando el 4 % de esferas. A los 2 días de tratamiento, se eliminó 93.24 ± 4.02 % en todos los tratamientos, con excepción del tratamiento que contenía solo agua sin esferas de alginato, el cual eliminó 11.41 ± 4.36 %. Este valor se asemeja al 15.7 % en los tratamientos control reportados por Perez-Garcia (2010) a los 3 días de incubación, en tratamientos heterotróficos y mixotróficos. Con respecto a la

eliminación de N en forma de amonio, a las 24 horas de experimento, todos los tratamientos realizaron la eliminación de amonio incluyendo los dos controles. Sin embargo se registran diferencias significativas entre ellos, siendo los de mayor eliminación los tratamientos con el 10 % de esferas, con *C. vulgaris* y *C. vulgaris*-*A. brasilense* y el 4 % de esferas, con *C. vulgaris* - *A. brasilense*. Estos tratamientos removieron entre el 46.90 y el 49.18 %, mientras que los tratamientos del 4% con *C. vulgaris* inmovilizada y el 10 % de esferas sin microorganismos removieron entre el 34.27 y el 38.4 %.

La evaluación de la eliminación de nutrientes en los biorreactores de 25 L mostró que aquellos tratamientos que contienen esferas de alginato, independientemente si tienen a la microalga *C. vulgaris* o no, son capaces de eliminar tanto N como P. A las 24 horas de la inoculación fue posible eliminar 94.22 ± 0.82 % con el tratamiento *C. vulgaris*-*A. brasilense*, y 85.04 ± 2.29 % con solo *C. vulgaris*, seguido por el tratamiento con solo esferas de alginato, el cual fue capaz de eliminar más de un 65.36 ± 0.46 %, a las 48 horas de la inoculación los tres tratamientos con esferas de alginato eliminaron más de un 85 y 98 % de Fosfatos. Se sabe que en el agua residual existen microorganismos (bacterias, actinomices y hongos) que pudieran eliminar el fósforo (Bitton, 2011; Bond *et al.*, 1999; Mino, 2000; Onuki *et al.*, 2002; Seviour *et al.*, 2003), lo cual pudiera explicar porque todos los tratamientos fueron capaces de eliminar fosfatos.

Por otro lado, en el análisis de la microbiota natural del agua secundaria, realizado con la técnica de tinción con Diacetato de Fluoresceína (FDA, por sus siglas en ingles) (Chrzanowski *et al.*, 1984) mostró variaciones en la concentración de la microbiota en cada uno de los experimentos realizados con respecto al tiempo de exposición, sobre todo en aquellos que contenían esferas de alginato. El tratamiento sin esferas de alginato, se mantuvo sin variación las primeras 24 horas de tratamiento, el cual a las 48 horas de tratamiento mostró variación significativa. Los tratamientos de esferas con *C. vulgaris* y *C. vulgaris* - *A. brasilense* mostraron

un aumento de hasta dos órdenes de magnitud. El que mayor concentración celular alcanzó fue el tratamiento *C. vulgaris* - *A. brasilense*, sugiriendo que es la bacteria *A. brasilense* quién se pudo haber filtrado de las esferas de alginato y sea responsable de un incremento en el número de bacterias suspendidas, ya que la técnica de FDA es incapaz de discernir entre género y especie. Sin embargo, esta posibilidad contradice lo encontrado por Hernández (2011) quien reportó un descenso en la población de *A. brasilense* inmovilizado, lo cual también corresponde con lo reportado por de-Bashan *et al.*, 2002b, 2005, 2008, donde encuentran un descenso en la población de *A. brasilense* inmovilizado sola o co-inmovilizado con *C. vulgaris* o *C. sorokiniana*.

En los microambientes, de manera natural, existe una sucesión de microorganismos, al igual que existen interacciones entre bacterias y microalgas. Esto muchas veces es a consecuencia de que las bacterias usan exudados derivados de las microalgas como fuente de carbono para su metabolismo (Peterson *et al.*, 2011) y algunas microalgas usan metabolitos (vitaminas, fitohormonas, u otros compuestos) producidos por bacterias para su crecimiento (de-Bashan *et al.*, 2004). A consecuencia de esta sucesión de microorganismos, en el medio ambiente se propician variaciones en las concentraciones de exoenzimas, así como en las concentraciones de nutrientes u oxígeno disueltos y el pH (Riquelme y Avendaño, 2003). Por lo tanto, es probable, que no solo el alginato sino que la producción de metabolitos de *C. vulgaris* e incluso de *A. brasilense*, sean capaces de favorecer el crecimiento de macro y microorganismos residentes del agua, esto concuerda con el concepto de “anillo microbiano” en el que se afirma que existe una relación de mutualismo o antagonismo microalga-bacteria (Azam *et al.*, 1983). Es decir, al estar la microalga (*C. vulgaris*), presente en el medio (agua residual), aunque inmovilizada, podría ser capaz de favorecer el crecimiento de bacterias residentes. Esto se debe a que en el presente trabajo se utilizó agua residual secundaria (sin esterilizar), ya que, como ya se mencionó, en la naturaleza las microalgas se encuentran asociadas a bacterias, las cuales

aportan factores especiales para estimular el crecimiento (Day *et al.*, 1999). El conjunto de todos estos factores pudieran ser la causa de las variaciones registradas en la concentración de la microbiota en el agua.

La degradación de alginato por microorganismos en general no es un proceso fácil debido a la complejidad de la molécula (Tang *et al.*, 2009). En este estudio, se cuantificaron $1.62 \pm 0.09 \times 10^3$ UFC·mL⁻¹ bacterias, que se encuentran dentro de la carga natural de agua residual secundaria y que presentaron posible capacidad alginolítica. Esta concentración representa cerca del 3.36 % del total de bacterias metabólicamente activas en el mismo sistema.

Los miembros del género *Acinetobacter* han sido objeto de intensa investigación debido a que estos organismos ubicuos han ganado importancia en medicina, biotecnología y medioambiente (Wiedmann-Al-Ahmad, 1994). *Acinetobacter junii*, ha sido seleccionada en estudios de tratamiento de aguas residuales como bacteria acumuladora de fósforo (Hrenovic *et al.*, 2011) por lo cual, en este estudio pudiera ser una de las causas de reducción de fósforo en agua sin esterilizar.

Los miembros del grupo *Ancylobacter* se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, particularmente en ambientes acuáticos tales como en fondos de pantanos, reservorios de agua y estanques de agua residual (Raj, 1989; Xin *et al.*, 2006). Los miembros del género parecen desempeñar un importante papel ecológico, su importancia ecológica radica en su capacidad de disolver materia orgánica en agua dulce, y posiblemente juega un papel importante en el ciclo del carbono, este quimiorganotrofo, como la mayoría, tiene la capacidad de crecer autotróficamente (Raj, 1989). *Ancylobacter polymorphuses* reconocida como bacteria oligótrofa que es capaz de oxidar metanol así como hidrógeno y fijar nitrógeno. *Ancylobacter polymorphus* produce gránulos de poli-β-hidroxibutirato, fija nitrógeno libre.

Pseudomonas plecoglossicida, *Xanthobacter flavus*, son especies con las cuales se han realizado investigaciones de biorremediación, por su capacidad de degradar compuestos peligrosos como insecticidas organofosforados: también son capaces de degradar compuestos cloroalifáticos vía de cloración hidrolítica (Song *et al.*, 2003) *Zoogloea resiniphila* es una especie que también se ha evaluado su uso en biorremediación, y es reconocida por su capacidad de degradar resinas ácidas, se ha identificado en sistemas de lodos activos y se ha demostrado su capacidad de degradar y eliminar contaminantes tales como fenoles, fosfatos, solventes clorados e hidrocarburos aromáticos (Yu y Mohn, 2002).

Ninguna de las cepas identificadas tiene referencias de ser capaces de degradar alginato o producir alginato liasas, sin embargo, algunas de ellas como ya se mencionó tienen la capacidad de usar diversas fuentes de carbono para su desarrollo, lo cual pudiera explicar en cierta medida la degradación del alginato, por otro lado, se ha reportado que bacterias con capacidad de producir poli- β -hidroxibutirato, tienen la posibilidad de producir alginato liasas (Draget *et al.*, 2002).

9 CONCLUSIONES

- Queda demostrado que, usando 10 g de esferas de alginato con el sistema co-inmovilizado *C. vulgaris* – *A. brasilense* por cada 100 mL de ARS, es eficiente en la eliminación de más del 90 % de fosfatos y cerca del 50 % de amonio en 24 horas bajo el régimen fotoautotrófico, tiempo en el que aun se mantienen estables las esferas de alginato.
- La pérdida de estabilidad de las esferas de alginato está más influenciada por la presencia de microorganismos nativos del ARS que por la presencia de iones fosfato.
- *C. vulgaris* inmovilizada con *A. brasilense* en esferas de alginato es eficaz en la remoción de nutrientes en biorreactor de 25 L bajo el régimen fotoautotrófico, sin embargo las esferas de alginato sin microorganismos inoculados también son capaces de eliminar nutrientes del ARS, ya que la presencia de las esferas de alginato favorece el crecimiento de microorganismos residentes del ARS capaces de asimilar nutrientes (N y P).

10 LITERATURA CITADA

- APHA, AWWA, WEF. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, American Water Works Association, and Water Environment Federation.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L. A., Thingstad, F. 1983. The ecological role of watercolumn microbes In the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Bartone, C. 1991. International perspective on water management and wastewater reuse – appropriate technologies. IAWPRC. Biental International Conference on Water Reuse Seminar, Kyoto, 29 July - 3 August.
- Bashan, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl Environ Microbiol.* 51: 1089–1098.
- Bashan, Y., Gonzalez, L.E. 1999. Long-term survival of the plant-growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* in dry alginate inoculant. *Appl Microbiol Biotechnol.* 51: 262–266.
- Becker, E.W. 1994. *Microalgae: biotechnology and microbiology.* Cambridge University Press, New York, USA. 177-195
- Bitton, G. 2011. *Wastewater microbiology.* 4th edition. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology. Wiley and Sons Publications. New Jersey. 213-222.
- Bond, P.L., Erhart, R., Wagner, M., Keller, J., Blackall, L.L. 1999. Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology.* 65: 4077-4084.
- Borchardt, J.A., Azad, H.S. 1968. Biological extraction of nutrients. *Journal of Water Pollution Control Federation.* 40 (10): 1739–1754.
- Boyen, C., Kloareg, B., Polne-Fuller, M., Gibor, A. 1990. Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycologia.* 29: 173-181.
- Cade-Menun, B.J., Paytan, A. 2010. Nutrient temperature and light stress alter

- phosphorus and carbon forms in culture-grown algae . *Marine Chemistry*. 12:27–36.
- Chen, Y.C. 2001. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*.195: 71–80
- Chen, K.C. Lin, Y.F. 1994. Immobilization of microorganisms with phosphorylated polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Enzyme and Microbial Technology*. 16:79-83
- Chen, Y.C., 2007. Immobilization of twelve benthic diatom species for long-term storage and as feed for post-larval abalone *Haliotis diversicolor*. *Aquaculture* 263: 97–106
- Chrzanowski, T.H., Crotty, R.D., Hubbard, J.G., Welch, R.P. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microbial Ecology*. 10: 179-185
- Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., Bashan, Y. 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology* (en prensa).
- Dainty, A.L., Goulding, K.H., Robinson, P.K., Simpkins, I., Treva, M.D. 1986. Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnol Bioeng*. 28:210–216.
- Davis, T.A., Volesky, B., Mucci, A. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*. 37: 4311-4330.
- Day, J.G. 1999: Conservation strategie for algae. - E. E. Benson (ed.) *Plant Conservation Biotechnology* London. 111-124.
- de-Bashan, L.E., Hernandez J.P., Morey, T., Bashan Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as helpers for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*. 38: 466-474.
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*. 101: 1611–1627.
- de-Bashan, L.E., Magallon, P., Antoun, H., Bashan, Y. 2008. Role of glutamate

- dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 44: 1188-1196.
- de-Bashan, L.E., Antoun, H., Bashan, Y. 2005. Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology*. 54: 197-203.
- de-Bashan, L.E., Hernandez, J.P., Morey, T., Bashan, Y. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as helpers for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*. 38: 466-474 .
- Doria-Serrano, M.C., Riva-Palacio, G., Ruiz-Trevino, F. A., Hernandez-Esparza, M. 2002. Poly(N-vinyl pyrrolidone)-Calcium Alginate (PVP-Ca-alg) Composite Hydrogels: Physical Properties and Activated Sludge Immobilization for Wastewater Treatment. *Ind. Eng. Chem. Res.* 41: 3163-3168.
- Doria-Serrano, M.C., Ruiz-Treviño, F.A., Rios-Arciga, C., Hernández-Esparza, M., Santiago, P. 2001. Physical Characteristics of Poly(vinyl alcohol) and Calcium Alginate Hydrogels for the Immobilization of Activated Sludge. *Biomacromolecules*. 2(2): 568-574.
- Draget, K.I., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O. 1997. Alginate based new materials. *Int. J. Biol. Macromol.* 21: 47-55
- Draget, K.I., Gaserod, O., Aune, I., Andersen, P.O., Storbakken, B., Stokke, B.T., Smidsrod, O. 2001. Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gel. *Food Hydrocolloids*. 15: 485-490.
- Draget, K.I., Moe, S.T., Skjak-Brek, G., Smidsrød, O. 2006. Alginate. In Stephen, A. M., Phillips, G. O., Williams, P. A. (Eds.). *Food polycaccharides and their application*. 2nd Ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC.
- Draget, K.I., Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. 2002. Alginates from Algae. *Biopolymers*, in: S. De Baets, E.J. Vandamme, A. Steinbüchel, Editors Wiley-

- VCH, Weinheim. 6: 215-244
- Draget, K.I., Simensen, M.K., Onsoyen, E., Smidsrød, O. 1993. Gel strength of Ca-limited alginate gels made in situ. *Hydrobiologia*. 261: 563-565.
- Espín, G., Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. 2000. The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly- β -Hydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 182: 2624-2628.
- Gaserød, O., Sannes, A., Skjak-Bræk, G. 1999. Microcapsules of alginate-chitosan. II. A study of capsule stability and permeability. *Biomaterials*. 20: 773-83.
- Gómez, J.L. 1993. Caracterización enzimática de extractos digestivos de ficófitos y su aplicación ficotecnológica en el aislamiento de protoplastos de macroalgas marinas. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 191 pp.
- Gonzalez, L.E., Bashan, Y. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1527-1531.
- Gonzalez, L.E., Cañizares, R.O., 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: 259-262.
- Gorin, P.A.J., Spencer, F.T. 1966. Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian J. Journal of Chemistry*. 44: 993-998
- Govan, R.W., Fyfe, J.A.M., Jarmaran, R.J.T. 1981. Isolation of alginate producing mutants of producing mutants of *Pseudomonas jiuorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. *Journal of General Microbiology*. 125: 217-220.
- Haug, A., Larsen, B., Smidsrød, O. 1963. Alkaline Degradation of Alginate. *Acta Chem. Scand.* 21: 2859-2870.
- Haug, A., Myklesta, S., Larsen, B., Smidsrød, O. 1967. Correlation between

- chemical structure and physical properties of alginates. *Acta Chemica Scandinavica*. 21: 768–778.
- Hernandez, J.P., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalgae *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 190-198.
- Hernández, S.A. 2011. Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato como protección contra condiciones adversas en un tratamiento de agua residual. Tesis de maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC. 67 pp.
- Hrenovic, J., Kovacevic, D., Ivankovic, T., Tibljas, D. 2011. Selective immobilization of *Acinetobacter junii* on the natural zeolitized tuff in municipal wastewater. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 88: 208-214.
- INEGI, Censo 2010, <http://cuentame.inegi.org.mx/default.aspx>
- Inokuchi, R., Kuma, K.I., Miyata, T., Okada, M. 2002. Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenetic and physiological perspectives. *Physiol. Plant*. 116: 1–11.
- Iwamoto, Y., Araki, R., Iriyama, K., Oda, T., Fukuda, H., Hayashida, S. Muramatsu, T. 2001. Purification and characterization of bifunctional alginate lyase from *Alteromonas* sp. strain no. 272 and its action on saturated oligomeric substrates. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65: 133–142.
- Jianlong, W., Wenhua, H., Yi, Q. 1995. Immobilization of microbial cells using polyvinyl alcohol (PVA) — polyacrylamide gels. *Biotechnology Techniques*. 3: 203-208.
- Joo, D.S., Cho, M.G., Lee, J.S., Park, J.H., Kwak, J.K., Han, Y.H., Bucholz, R., 2001. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation. *J. Microencapsul*. 18: 567–576
- Kaplan, D., Richmond, A.E., Dubinsky, Z., Aaronson, S., 1986. Algal nutrition. In: Richmond, A.E. (Ed.), *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press, Boca Raton.

- Karel, F.S., Libicki, S.B., Robertson, R. 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*. 40: 1321-1354.
- Kierstan, M.P. J., Coughlan, M.P. 1985. Immobilisation of cells and enzymes by gel entrapment. En: Woodward, J. (ed.). *Immobilised Cells and Enzymes: A practical approach*. Oxford: IRL Press. 39-48 pp.
- Kyun, J. 2008. Mechanism of nitrogen assimilation of *Porphyra* from New England. Thesis (Ph. D.). University of Connecticut. Editorial: Storrs, CT: University of Connecticut, Dept. of Botany.
- Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ. Technol.* 18: 945–951.
- Lavoie, A., De La Noûe, J. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*. A new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water Resources*. 19 (11): 1437 – 1442.
- Lincoln, E.P., Earle, J.F.K. 1990. Wastewater treatment with microalgae. En: Akatsuka I. (ed.). *Introduction to Applied Phycology*. The Hague: SPB Academic Publication. 429-446 pp.
- Linker, A., Jones, R.S. 1966. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 241: 3845-3851
- Liu, S.X., Hermanowics, S.W. 1997. Application of Artificially Immobilized Microorganisms to Nitrate Removal from Drinking Water. Technical Completion Report. University of California Water Resources Center. No. 857
- Lobban, C., Harrison, P.J. 1994. *Seaweed ecology and physiology*. Cambridge University Press. 366 pp.
- Lu, B., Yuan, Y., Zhang, C., Ou, J., Zhou, W., Lin, Q. 2005. Modulation of key enzymes involved in ammonium assimilation and carbon metabolism by low temperature in rice (*Oryza sativa L.*) roots. *Plant Sci.* 169: 295–302.
- Mallick, N. 2002. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*, 15: 377-390.
- Martinsen, A., Skj°ak-Bræk, G., Smidsrød, O. 1989. Alginate as immobilization

- material. I. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads. *Biotechnol Bioeng.* 33: 79–89.
- McHugh, D. (2003) A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441. Rome, FAO. 105 pp.
- Metcalf, Eddy, Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D. 2000. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse.* 4th Edition. McGraw-Hill Professional. USA. 1030 pp.
- Mino, T. 2000. Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry (Moscow).* 65: 341-348
- Miyachi, S., Kanai, R., Mihara, S., Miyachi, S., Aoki, S. 1964. Metabolic roles of inorganic polyphosphates in *Chlorella* cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 93 (3): 625–634
- Moen, E., Horn, S., Østgaard, K. 1997. Alginate degradation during anaerobic digestion of *Laminaria hyperborean* Stipes. *J. Appl. Phycol.* 9: 157–166
- Mørch, Y.A. 2008. Novel Alginate Microcapsules for Cell Therapy. Tesis doctoral. Norwegian University of Science and Technology. 74 pp.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Guilhermino, L. Rubeiro, R. 2006. Immobilization of the marine microalga *Pheodactylum tricornutum* in alginate for in situ experiments: Bead stability and suitability. *Enzyme and microbial technology.* 38: 135-141.
- Moreno-Garrido, I. 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology.* 99: 3949-3964.
- Nagasawa, N., Mitomo, H., Yoshii, F., Kume, T. 2000. Radiation-induced degradation of sodium alginate. *Polym Degrad Stab.* 69: 279–285.
- Olsen, S.L., Sommers, L.E. 1982. *Methods of soil analysis part 2, chemical and microbiological properties*, 2nd ed. American Society of Agronomy, Inc., and Soil Science Society of America, Inc., Madison, Wis. In A. L. p. 406-407
- Onuki, M., Satoh, H., Mino, T. 2002. Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate.

- Water Science and Technology. 46: 145–154
- Pane, L., Feletti, M., Bertino, C., Carli, A. 1998. Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads. *Aquacult Int.* 6:411–20.
- Pautard, F.G.E. 1978. Phosphorus and bone. in: Williams, R.J.P., Da Silva, J.R.R. F. *New Trends in bio-inorganic chemistry.* Academic Press. 261-354.
- Perez-Garcia, O., de-Bashan, L.E., Hernandez, J.-P., and Bashan, Y. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology* 46: 800–812.
- Peterson, C.G., Daley, A.D., Pechauer, S.M., Kalscheur, K.N., Sullivan, M.J., Kuffa, S.L., Rojas, M., Gray, K.A., Kelly, J.J. 2011. Development of associations between microalgae and denitrifying bacteria in streams of contrasting anthropogenic influence. *FEMS Microbiology Ecology.* 77(3): 477–49.
- Power, B., X. Liu, X., Germaine, K.J., Ryan, D., Brazil D., Dowling, D.N. 2011. Alginate beads as a storage, delivery and containment system for genetically modified PCB degrader and PCB biosensor derivatives of *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Applied Microbiology.* 110: 1351–1358.
- Powell, N., Shilton, A., Chistia, Y., Prat, S. 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. *Water research.* 43: 4207–4213.
- Raj, H.D. 1989. Oligotrophic methylotrophs: *Ancylobacter* (basionym “*Microcyclus*” Ørskov) Raj gen. nov. *Crit Rev Microbiol.* 17: 89–106.
- Rezaee, A., Godini, H., Bakhtou, H. 2008. Microbial cellulose as support material for the immobilization of denitrifying bacteria, *Environmental Engineering and Management Journal* 7 (5): 589-594.
- Riquelme, C., Avendaño, R. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural.* 76: 725-736.
- Said, A.A., Hassan, R.M. 1993. Thermal decomposition of some divalent metal

- alginate gel compounds. *Polym Degrad Stab.* 39: 393–397.
- Seviour, R.J., Mino, T., Onuki, M. 2003. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews.* 27: 99-127.
- Smidsrød. O., Skjåk-Bræk, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* 8:71–76.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnology and Oceanography.* 14: 799
- Song, J.S., Lee, D.H., Lee, K., Kim, C.K. 2003. Characteristics of Several Bacterial Isolates Capable of Degrading Chloroaliphatic Compounds via Hydrolytic Dechlorination. *The Journal of Microbiology.* 277-283
- Tam, N.F., Wong, Y.S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution.* 107: 145-151.
- Tang, J.C., Taniguchi, H., Chu, H., Zhou, Q., Nagata, S. 2009. Isolation and characterization of alginate-degrading bacteria for disposal of seaweed wastes. *Letters in Applied Microbiology.* 48:38-43.
- Valderrama, J.C. 1981. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. *Marine chemistry.* Elsevier Scientific publishing company, Amsterdam. 10: 109-122.
- Valderrama, L.T., Del Campo, C.M., Rodriguez, C.M., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Research.* 36: 4185-4192
- Vanoni, M.A., Curti, B. 2005. Structure-function studies on the iron-sulfur flavoenzyme glutamate synthase: an unexpectedly complex self-regulated enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 433:193–211.
- Vogelsang, C., Østgaard, K. 1996. Stability of alginate gels applied for cell entrapment in open systems. *Progress in Biotechnology.* 11: 213-220.
- Widerøe, H., Danielsen, S. 2001. Evaluation of the use of Sr^{2+} in alginate immobilization of cells. *Naturwissenschaften.* 88:224–8.

- Wiedmann-Al-Ahmad, M., Tichy, H.V., Schön, G. 1994. Characterization of *Acinetobacter* Type Strains and Isolates Obtained from Wastewater Treatment Plants by PCR Fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*. 4066-4071.
- Wong, T.Y., Preston, L.A., Schiller, N.L. 2000. Alginate lyase: Review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Ann Rev Microbiol*. 54: 289–340.
- Xin, Y. H., Zhou, Y. G., Chen, W. X. 2006. *Ancylobacter polymorphus* sp. nov. and *Ancylobacter vacuolatus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1185-1188.
- Yu, Z., Mohn, W.W. 2002. Bioaugmentation with the resin acid-degrading bacterium *Zoogloea resiniphila* DhA-35 to counteract pH stress in an aerated lagoon treating pulp and paper mill effluent. *Water Research*. 36: 2793-2801.
- Zhou, L., Li, G., An, T., Fu, J., Sheng, G. 2008. Recent patents on Immobilized Microorganism Technology and Its Engineering Application in Wastewater Treatment. *Recent Patents on Engineering*. 2: 28-35.