



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES PARA EL  
TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUA RESIDUAL  
USANDO UN SISTEMA INMOVILIZADO  
MICROALGA-BACTERIA EN CRECIMIENTO  
AUTOTRÓFICO, HETEROTRÓFICO y  
MIXOTRÓFICO**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de**

**Maestro en Ciencias**

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

p r e s e n t a

**Raúl Octavio Pérez García**

La Paz, B.C.S. Abril de 2009

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 13 del Mes de Abril del 2009, 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:

**"Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico"**

Presentada por el alumno:

Raúl Octavio Pérez García

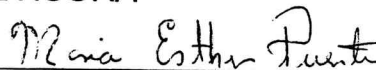
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Biotecnología

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.

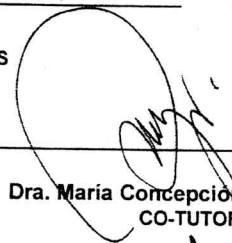
### LA COMISION REVISORA



Dr. Yoav Bashan  
DIRECTOR DE TESIS



Dra. Maria Esther Puente  
CO-TUTOR



Dra. Maria Concepcion Lora Vilchis  
CO-TUTOR



DRA. ELBA SERVIERE ZARAGOZA,  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

### **Comité tutorial**

**Dr. Yoav Bashan (Director)**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. Maria Esther Puente**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. María Concepción Lora Vilchis**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

### **Comité revisor**

**Dr. Yoav Bashan**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. Maria Esther Puente**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

**Dra. María Concepción Lora Vilchis**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

### **Jurado**

**Dr. Froylan M. Espinoza-Escalante**

**Dra. Maria Esther Puente**

**Dr. Yoav Bashan**

**Dr. Francisco Magallon (Suplente)**

## **RESUMEN**

En el presente trabajo se explora el potencial para disminuir la concentración de nutrientes (N y P) en agua residual sintética (MRS) usando a la microalga *Chlorella vulgaris* y a la bacteria promotora del crecimiento en plantas *Azospirillum brasilense*, inmovilizados juntos en esferas de alginato, sometidos a regímenes de cultivo autotrófico, heterotrófico y mixotrófico.

Análisis de muestras de agua residual domestica tomadas en temporada invernal de la Planta de tratamiento de aguas residuales del municipio de La Paz, indican concentraciones altas de amonio y nitrato, concentraciones medias de fosfato y concentraciones bajas de nitrito, ácidos orgánicos y aminas primarias. Las muestras de agua residual no sustentan el crecimiento heterotrófico de *C. vulgaris*.

La evaluación del número de células, tasa de crecimiento y eliminación de amonio de cultivos separados de células en suspensión de *C. vulgaris* y *A. brasilense* en MRS suplementado con once diferentes sustratos orgánicos, muestran que las mejores fuentes de carbono para el crecimiento heterotrófico son acetato de sodio, glucosa y peptona por parte de la microalga y ácido málico, arabinosa en la bacteria.

Se evaluó la eliminación de amonio y fosfato de MRS suplementado con glucosa, tratándolo con el sistema inmovilizado de *C. vulgaris-A. brasilense*, sometido a regímenes de cultivo heterotrófico, autotrófico y mixotrófico en biorreactores, durante 5 días. La cinética de los cultivos indican una eficiencia mayor para eliminar fosfato de MRS por parte de *C. vulgaris* y *A. brasilense* inmovilizados juntos en condiciones autotróficas comparado con el resto de los tratamientos. *C. vulgaris* inmovilizada sola en condiciones heterotróficas es el tratamiento más eficiente para eliminar amonio. La presencia de *A. brasilense* inhibe el crecimiento de *C. vulgaris* con el régimen heterotrófico. Los resultados son explicados por la baja de los niveles pH del medio en presencia de *C. vulgaris* y la relación C:N dentro de las células microalgales.

Se concluye que a pesar del alto crecimiento de células de *C. vulgaris* en condiciones heterotróficas, la aplicación del sistema inmovilizado *C. vulgaris-A. brasilense* en uno u otro régimen de cultivo, depende de si la prioridad del tratamiento de agua residual es reducir los niveles de amonio, o de fosfato o de ambos, y si se desea incluir o no la producción de biomasa.

**Palabras clave:** tratamiento de agua residual; inmovilizados celulares microalga-bacteria; crecimiento heterotrófico.

## ***ABSTRACT***

This work explores the potential of reducing the nutrients (N and P) concentrations in synthetic wastewater (MRS) using the microalgae *Chlorella vulgaris* and the microalgae growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense* jointly immobilized in alginate beads under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions.

Analysis of treated domestic wastewater sampled in the winter from the municipal wastewater treatment facility of La Paz showed high concentrations of ammonium and nitrate, medium concentration of phosphate and low concentrations of nitrite, organic acids and primary amines. Wastewater samples did not support heterotrophic growth of *C. vulgaris*.

Evaluation of cell number, growth rate, and ammonium elimination in separate suspended cultures of *C. vulgaris* and *A. brasilense* growing in MRS supplemented with eleven different organic substrates showed that the best carbon sources for heterotrophic growth of *C. vulgaris* were Na-acetate, D-glucose and peptone and for *A. brasilense* were malic acid and arabinose.

An evaluation was made on ammonium and phosphate removal from MRS supplemented with glucose using the immobilized *C. vulgaris*-*A. brasilense* system under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions in bioreactors for 5 days. Kinetics of the cultures showed higher efficiency in removal phosphate by *C. vulgaris* and *A. brasilense* jointly immobilized under autotrophic conditions. *C. vulgaris* immobilized alone under heterotrophic conditions was also efficient in removing ammonium. The presence of *A. brasilense* inhibits the growth of *C. vulgaris* under heterotrophic condition with glucose. The results are explained by the low pH in the medium in the presence of *C. vulgaris* and the C:N relation of the microalgae cells.

This work concludes that even of the high growth rate of *C. vulgaris* cells under heterotrophic conditions, the applicability of the immobilized *C. vulgaris*-*A. brasilense* system under heterotrophic or mixotrophic regimens depends if the priority of the wastewater treatment is the reduction of ammonium levels, or phosphate levels, or both nutrients and if is desirable or not the biomass production.

**Key words:** wastewater treatment; immobilized microalgae-bacteria cells; heterotrophic growth.

## ***DEDICATORIA***

Este trabajo es dedicado nuestros grandes maestros, que desde el rincón oscuro han dedicado su tiempo y energía a la expansión de nuestro universo humano, conciente e inconcientemente. De toda índole y categoría son oasis en nuestros desiertos mentales y la mayoría de las veces, a pesar de la entrega, su obra no es reconocida o se empolvo en los anaqueles. Espíritus que diariamente y entre nosotros, consagran su vida a un ideal y su esfuerzo es mucho mayor al que yo pudiera brindar.

## ***AGRADECIMIENTOS***

Agradezco en lo más profundo a Laura, mi compañera, quien me ha dado tanto a pesar de las dificultades. Tu brillo ha sido mi inspiración. Agradezco de igual manera a mis padres Laura y Ramón quienes con amor, dedicación y enseñanzas le han dado significado sustancial a los conceptos de verdadera paternidad y familia. En esta gratitud incluyo a mi querida hermana Natalia

Agradezco ampliamente a todos, toditos los miembros del Laboratorio de Microbiología Ambiental, a pesar de mis incontables peticiones (de toda clase), siempre me apoyaron en lo necesario. Lo mismo va para cualquier persona que me halla ayudado en el CIBNOR, técnicos, estudiantes e investigadores, prácticamente recibí apoyo en todos los edificios. Le brindo un agradecimiento especial a “CONACyT” y a la “Bashan Foundation” por las becas otorgadas.

Por ultimo agradezco a toda la “P a l o m i l l a ” de la “P a j a r e r a ” por las enseñanzas y alegrías, mencionando característicamente a los Zenith, nuestra música ha trascendido

Todos ustedes han sido parte de esto

# CONTENIDO

	Página
<b>1. Marco teórico y antecedentes</b>	<b>1</b>
1.1. Agua residual y su tratamiento	1
1.1.1. Contaminación de los cuerpos de agua	1
1.1.2. Nutrientes en las aguas residuales	2
1.1.3. Tratamiento de aguas residuales	6
1.2. Biotecnología de microalgas	8
1.2.1. Usos comerciales de las microalgas	8
1.2.2. Modos de nutrición de las microalgas	8
1.2.3. Métodos de cultivo de microalgas	10
1.2.4. Limitantes del cultivo de microalgas	13
1.3. Fitorremediación: Biotecnología de microalgas aplicada al tratamiento de agua residual	15
1.3.1. Fitorremediación	15
1.3.2. Inmovilización de células	19
1.4. Fitorremediación con el sistema coinmovilizado <i>Chlorella vulgaris</i> - <i>Azospirillum brasilense</i>	22
1.4.1. Coinmovilización de <i>C. vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i>	22
1.4.2. Potencial del cultivo heterotrófico de <i>C. vulgaris</i>	26
1.5. Planteamiento	31
1.6. Hipótesis	32
1.7. Objetivo general	33
1.8. Objetivos particulares	34
<b>2. Metodologías, Resultados y Discusiones</b>	<b>35</b>
2.1. Análisis de agua residual	36
2.1.1. Métodos	36
2.1.2. Resultados	39
2.1.3. Discusión	43
2.2. Crecimiento heterotrófico de células en suspensión	48
2.2.1. Métodos	50
2.2.2. Resultados y Discusiones	56
2.3. Experimentos de eliminación de nutrientes con células inmovilizadas	74
2.3.1. Métodos	74
2.3.2. Resultados	81
2.3.3. Discusión	103
<b>3. Conclusiones</b>	<b>110</b>
<b>4. Referencias</b>	<b>115</b>
<b>5. ANEXOS</b>	<b>130</b>



## LISTADO DE FIGURAS

Número de Figuras		Página
1	Proceso de tratamiento de agua residual del la planta de La Paz y el punto donde se realizo el muestreo.	38
2	Concentración de nutrientes en agua residual.	41
3	Análisis de componentes principales de nutrientes.	42
4	Curvas de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en agua residual real en completa obscuridad.	57
5	Cultivos de <i>C. vulgaris</i> en MRS+N con diferentes fuentes de carbono. (a)-Curvas de crecimiento. (b)-Consumo de amonio.	59
6	Tasa de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en MRS+N con diferentes fuentes de carbono.	60
7	Gráfica de correlación entre el número de células/mL y la concentración de amonio.	62
8	Curvas de crecimiento de <i>A. brasilense</i> en diversas fuentes de carbono.	63
9	Tasa de crecimiento de <i>A. brasilense</i> en MRS+N con diversas fuentes de carbono.	64
10	Curvas de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio MRS+N enriquecido con glucosa o acetato.	67
11	Cultivos de <i>C. vulgaris</i> en MRS+N con glucosa o acetato.	68
12	Cultivos de <i>C. vulgaris</i> en Agua residual real con glucosa o acetato.	72
13	Esquema de experimentos de eliminación de nutrientes con células inmovilizadas cultivadas en matraces invertidos.	80
14	Concentración de Amonio en MRS+N ( $NH_4^+$ ) durante 5 días de cultivo. 4 regimenes de cultivo.	82
15	Concentración de Fosfato en MRS+N ( $PO_4^{3-}$ ) durante 5 días de cultivo. 4 regimenes de cultivo.	83
16	Número de células de <i>C. vulgaris</i> por esfera ( $N_B$ ) durante los 5 días de cultivo. 4 regimenes de cultivo.	84
17	Número de células de <i>A. brasilense</i> por esfera ( $N_B$ ) durante 5 días de cultivo. 4 regimenes de cultivo.	85
18	Concentración de Glucosa en MRS+N (G) durante 5 días de cultivo 2 regimenes de cultivo.	86
19	pH del medio MRS+N durante 5 días de cultivo.	87
20	Distribución porcentual del volumen del reactor.	91
21	Porcentajes consumido de Nutrientes al tercer día de cultivo. Amonio (a) y Fosfato (b).	101
22	Afinidad específica por los nutrientes en tres días de cultivo. Amonio (a) y Fosfato (b)	102

## **LISTADO DE TABLAS**

Número de <b>Tablas</b>		Página
<b>I</b>	Niveles del tratamiento de agua residual.	6
<b>II</b>	Porcentajes de eliminación de N y P en cada nivel de tratamiento.	7
<b>III</b>	Diversidad de nutricional de las microalgas algunas de principales características metabólicas.	9
<b>IV</b>	Comparación de las características principales de fotobioreactores y biorreactores.	14
<b>V</b>	Diseño de muestreo de agua residual.	37
<b>VI</b>	Métodos empleados para el análisis de agua residual.	38
<b>VII</b>	Resultados por día de las variables analizadas del agua residual tratada	40
<b>VIII</b>	Composición de MRS y otros medios usados como agua residual artificial.	50
<b>IX</b>	Condiciones de cultivo de experimentos de células en suspensión.	51
<b>X</b>	Tabla de calificaciones asignadas a las diferentes fuentes de carbono de los experimentos 2 y 3.	65
<b>XI</b>	Nueva composición de MRS adicionado con D-Glucosa.	76
<b>XII</b>	Condiciones de cultivo de experimentos de células inmovilizadas.	77
<b>XIII</b>	El diseño experimental de cultivos para eliminación de amonio y fosfato de MRS+N usando células inmovilizadas realizados en matraces erlenmeyer de 1L.	79
<b>XIV</b>	Nomenclatura de variables analizadas.	92
<b>XV</b>	Comparación de las variables analizadas entre los 4 regimenes del tratamiento de esferas con <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> .	96
<b>XVI</b>	Comparación de las variables analizadas entre los 4 regimenes del tratamiento de esferas con <i>C. vulgaris</i>	97

# ***I* MARCO TEÓRICO y ANTECEDENTES**

## ***1.1. AGUA RESIDUAL y SU TRATAMIENTO***

### ***1.1.1. CONTAMINACIÓN DE LOS CUERPOS DE AGUA***

La contaminación del agua es una consecuencia inherente de la operación y desarrollo de las sociedades y/o comunidades actuales. Los residuos líquidos o sólidos de composición variada acarreados por las aguas provenientes de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, mineros y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas son llamadas **aguas residuales** (NOM-001-SEMARNAT-1996; Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002).

Ya que cualquier comunidad 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).

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

En el **ANEXO 1** se enlistan los componentes principales de una típica agua residual. Los valores de cada componente pueden variar notablemente según el origen (doméstico, industrial, agrícola, minero), el tipo de descargas y los contaminantes que reciba. El agua residual doméstica es una combinación excretas (heces y orina) animales y humanas con aguas grises resultantes del lavado, bañado y cocinado. Las personas excretan 100-500g en peso húmedo de heces y entre 1 a 1.3L de orina per capita al día, contribuyendo con 15 a 20g de la Demanda Bioquímica de Oxígeno al quinto día (DBO5) por día (Bitton, 2005).

### **1.1.2. NUTRIENTES EN LAS AGUAS RESIDUALES**

Los nutrientes forman parte de la composición química de cualquier agua residual. Los **nutrientes** son **elementos** indispensables que pueden ser asimilados y metabolizados para el crecimiento de los organismos vivos. Los principales nutrientes o llamados macronutrientes son C, N, O y P y se requieren en grandes cantidades. Estos nutrientes se encuentran en forma de compuestos. Los compuestos que contienen cadenas de 2 o más átomos de carbono son llamados **compuestos orgánicos** y constituyen la llamada **materia orgánica** (MO). Los compuestos orgánicos asimilables por los organismos son los llamados **nutrientes orgánicos** y forman parte de la **materia orgánica disuelta (MOD)**. No todos los compuestos orgánicos pueden ser llamados nutrientes, puesto que no todos son asimilables por los organismos. Los compuestos que no contienen carbono como los formados por moléculas con nitrógeno y fósforo que son asimilables por los organismos son llamados **nutrientes inorgánicos** (Madigan *et al.*, 2004).

#### **CARBONO**

El efecto de la MO proveniente de aguas residuales, producen en el cuerpo receptor los siguientes impactos (Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002; Atlas y Bartha, 2002; Bitton, 2005):

- a) Sobrecarga de la fase sólida.
- b) Condiciones sépticas con la presencia de gérmenes, parásitos y patógenos.
- c) Disminución del oxígeno disuelto, a causa de que los microorganismos que degradan la materia orgánica consumen oxígeno para su oxidación. Si la demanda de oxígeno es superior a la aireación por disolución de oxígeno atmosférico, se puede llegar a un ciclo anaerobio.
- d) El agua se torna oscura, de olor desagradable, se reduce la entrada de luz.
- e) Impactos negativos atascando los órganos respiratorios de animales acuáticos y filtradores.
- f) Los tóxicos, tanto orgánicos como inorgánicos, eliminan los organismos depuradores, o bien inhiben su desarrollo impidiendo reacciones enzimáticas.

Intoxicación también en varios niveles de la cadena trófica, desde microorganismos hasta animales superiores.

g) Alteración del pH.

h) Alteración del equilibrio salino (balance en sodio, calcio, etc.).

Debido a la complejidad en la composición de la materia orgánica en el agua residual (consultar *ANEXO 2*), esta es medida indirectamente por los siguientes parámetros: sólidos totales, sólidos suspendidos, sólidos sedimentables, materia flotante, grasas y aceites, demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y demanda química de oxígeno (DQO). Las concentraciones permisibles de estos parámetros en descargas de agua residual a cuerpos receptores naturales, quedan establecidas en la Norma Oficial Mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 que “Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales”

## **NITRÓGENO**

El nitrógeno se puede encontrar de nueve formas en el ambiente, debido a 7 estados de oxidación (*ANEXO 3*). En promedio la concentración de nitrógeno total encontrado en las aguas residuales domésticas es de  $35\text{mg L}^{-1}$  (Bitton, 2005). En las aguas residuales domésticas, el nitrógeno es encontrado en la forma de nitrógeno orgánico, nitrito, nitrato y amonio. A pH neutro, el 99% del amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se encuentra protonado formando el ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). La concentración de amoníaco aumenta cuando se incrementa el pH a valores mayores de 8.5 debido a la desprotonización del amonio por su constante de disociación (pK).

El agua residual puede introducir altas cantidades de amonio y nitratos al ambiente de los cuerpos de agua receptores. Esto puede generar problemas ambientales, los cuales son (U.S. EPA, 1975):

a) Toxicidad a animales acuáticos. El amoníaco es tóxico para los organismos como peces.

- b) Agotamiento del oxígeno disuelto. El agotamiento del oxígeno afecta adversamente a la vida acuática. El amonio aumenta la demanda de oxígeno del cuerpo de agua receptor, se presume que 1mg de amoniaco puede ejercer una demanda de oxígeno de 4.6mg de O<sub>2</sub>.
- c) **Eutrofización** de aguas superficiales. La descarga de nitrógeno a los cuerpos de agua receptores puede estimular el crecimiento masivo de algas y plantas por asimilación autotrófica. Este impacto será ampliado en el siguiente apartado que habla sobre el fósforo en agua residual.
- d) Efecto negativo del amonio sobre la eficiencia de la desinfección por cloración. El cloro se combina con el amonio para formar la sal cloruro de amonio y cloroaminas las cuales reducen el efecto germicida del cloro libre.
- e) Efecto corrosivo. Las concentraciones mayores a 1mg L<sup>-1</sup> de amonio tiene un efecto corrosivo en las tuberías de cobre.
- f) Metemoglobinemia en humanos. La methemoglobinemia se presenta por la conversión de nitrato a nitrito por bacterias reductoras de nitrato en el tracto gastrointestinal, que al ser absorbido al torrente circulatorio, oxida el grupo Fe<sup>2+</sup> de la hemoglobina a Fe<sup>3+</sup> transformándola en metemoglobina un pigmento café incapaz de acarrear oxígeno molecular, con la consecuencia final de sofocación.
- g) Efecto mutagénico y carcinogénico. El Nitrito también puede combinarse con las aminas secundarias de la dieta formando nitrosaminas, las cuales se sabe, son compuestos mutagénicos y carcinogénicos.

La norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 establece el valor máximo de 60mg L<sup>-1</sup> de nitrógeno total en las descargas de agua residual a ríos y embalses naturales. La norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994, que establece los “límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”, estipula que las aguas potables deben de tener valores máximos de 0.50mg L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 0.05mg L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y 10mg L<sup>-1</sup> de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

## FÓSFORO

Al igual que el carbono y el nitrógeno, el fósforo se puede encontrar en el ambiente de manera orgánica e inorgánica. Debido a su reactividad, el fósforo no se encuentra libre en la naturaleza, por lo que principalmente se encuentra como fosfato, específicamente como ortofosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  (*ANEXO 3*).

Las mayores aportaciones de fosfato a las aguas receptoras provienen de los escurrimientos de las tierras agrícolas y de los efluentes de agua residual doméstica e industrial. Carpenter *et al.*, (1998), estima que se han aplicado 600Tg de fósforo como fertilizante a la superficie terrestre. La concentración promedio de fósforo total (orgánico e inorgánico) en agua residual es de  $10\text{-}20\text{mg L}^{-1}$ , del cual mucho proviene de los detergentes convencionales de uso doméstico (Bitton, 2005). 90% del fósforo del agua residual tratada se encuentra en forma de ortofosfato (Meganck y Faup, 1988).

El principal efecto del exceso de fosfato sobre los cuerpos de agua receptores es la **Eutrofización**. Este término designa al enriquecimiento de nutrientes en un ecosistema. El uso más extendido se refiere específicamente a los síntomas que desarrolla un ecosistema en respuesta a la fertilización con nutrientes inorgánicos (Hutchinson, 1973). Para que el proceso de eutrofización se desarrolle, se tiene que dar concentraciones altas de nutrientes tales como N y P además de las proporciones correctas (N:P) de ambos nutrientes (Blackburn, 2004). La eutrofización produce de manera general un aumento de la biomasa y un empobrecimiento de la diversidad biológica del ecosistema.. En resumen se pueden establecer tres impactos negativos sobre los ecosistemas causados por la eutrofización 1)Disminución en la biodiversidad, 2) Cambios en la composición y dominancia de especies y 3) Efectos tóxicos (Reynolds, 1984).

La norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996, establece un valor máximo de  $30\text{mg L}^{-1}$  de fósforo total en las descargas de agua residual a ríos y embalses naturales según sea el caso.

### 1.1.3. TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES

El **tratamiento de agua residual** es la práctica de procesar los residuos líquidos con el objetivo producir un efluente final que asegure la protección de la salud pública y del ambiente (Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002). En México, las residencias, las industrias y los diversos sectores productivos deben de cumplir con ciertos prerrequisitos para verter sus aguas residuales a los drenajes y cuerpos de agua naturales. Estos prerrequisitos los establece la Norma Oficial Mexicana **NOM-002-ECOL-1996** y la **NOM-001-ECOL-1996**, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal y en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales respectivamente.

Los métodos de tratamiento de agua en los cuales predominan las fuerzas físicas son conocidos como unidades de operación. Los métodos de tratamiento en los cuales la remoción del contaminante es llevada a cabo por reacciones químicas y/o biológicas son conocidos como unidades de procesos. En la actualidad las unidades de operación y de procesos son agrupadas para proveer de varios niveles de tratamiento. Como se puede observar en la **Tabla I**, los niveles de tratamiento “Secundario con eliminación de nutrientes” y “Terciario”, son los enfocados a disminuir el exceso de nutriente N y P.

**Tabla I:** Niveles del tratamiento de agua residual (Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002).

Nivel de tratamiento	Descripción
Preliminar	Remoción de sólidos gruesos como pelusas, harapos, ramas, partículas flotantes y grasas que pueden causar problemas operacionales o de mantenimiento a las unidades operacionales, de proceso y de distribución. Esto mediante procesos físicos en unidades operacionales como filtros o cernidores.
Primario	Remoción de una porción de sólidos suspendidos y materia orgánica. Esto mediante procesos físicos para eliminar los constituyentes sedimentables o flotantes.
Primario avanzado	Aumentar la remoción de sólidos suspendidos y materia orgánica en unidades de procesos, mediante la incorporación de químicos y operaciones de filtrados.



Secundario	Remoción de la materia orgánica biodegradable (en solución o suspensión) y sólidos inorgánicos suspendidos. La desinfección es típicamente hecha en tratamientos secundarios convencionales. Esto se lleva a cabo en unidades de procesos químicos o biológicos como los lodos activados.
Secundario con eliminación de nutrientes	Remoción de orgánicos disueltos biodegradables, sólidos suspendidos y nutrientes, nitrógeno, fósforo o ambos.
Terciario o (avanzado)	Remoción de sólidos suspendidos residuales usualmente por filtración granular o microcribas. La desinfección es típica en el tratamiento terciario. La eliminación de nutrientes es usualmente incluida en este nivel.
Avanzado	Cualquier tratamiento para la remoción de sólidos disueltos o suspendidos remanentes después de un proceso biológico normal cuando el agua requiere cierta calidad para un uso posterior definido.

La composición de un agua residual después del nivel secundario de tratamiento es muy variada, dependiendo de la fuente original del efluente y de los procesos de tratamiento anteriores. En la **Tabla II** se muestran los porcentajes de eliminación de N y P en cada operación y/o proceso de tratamiento. Con ello se puede apreciar que el tratamiento terciario del agua residual es necesario para bajar el exceso de las concentraciones de nutrientes N y P.

**Tabla II.** Porcentajes de eliminación de N y P en cada nivel de tratamiento (Adaptado de Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002)

Nivel de tratamiento	Nitrógeno orgánico	$\text{NH}_3\text{-NH}_4^+$	$\text{NO}_3$	$\text{PO}_4^{3-}$
Preliminar	0%	0%	0%	0%
Tratamiento primario	10-20%	0%	0%	10-20%
Tratamiento secundario	15-50%	0-10%	0-10%	10-25%

Comparando las concentraciones de nitrógeno y fósforo total en los lagos, los efluentes de origen urbano, agrícola o industriales pueden presentar concentraciones de nitrógeno y fósforo arriba de los tres ordenes de magnitud, los efluentes de granjas de cultivos de cerdos tienen las concentraciones de nutrientes más altas (de la Noüe *et al.*, 1992).

## ***1.2. BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS***

### ***1.2.1. USOS COMERCIALES DE LAS MICROALGAS***

La **biotecnología** es una disciplina que se genera a partir de la integración de varias disciplinas incluyendo la microbiología, bioquímica, biología molecular e ingeniería química, con el propósito de utilizar los sistemas biológicos para generar bienes, productos y servicios (Cooney, 1983). De esta manera el término biotecnología de microalgas es el uso de las microalgas para generar bienes y servicios. (Apt y Behrens, 1999).

Muchas de las especies de microalga que en la actualidad son cultivadas con fines comerciales o que parecen tener potencial económico, pertenecen a dos clases: las **Cyanofitas** (cianobacterias) y la **Chlorofitas**, comúnmente llamadas “algas verde-azules” y “algas verdes” respectivamente (Richmond, 1986).

Los principales productos y servicios que se pueden obtener con la biotecnología de microalgas, pueden ser consultados en las siguientes referencias: Borowitzka y Borowitzka, 1988; de la Noüe y de Paul, 1988; Cannell, 1993; Chen, 1996; Borowitzka, 1992; Chaumont, 1993; Apt y Behrens, 1999; Cohen, 1999; Richmond, 2004; Chisti, 2007;

### ***1.2.2. MODOS DE NUTRICIÓN DE LAS MICROALGAS***

Las aplicaciones biotecnológicas se deben a su gran diversidad metabólica, la cual está íntimamente relacionada con su modo de nutrición (trofia). El modo de nutrición de las algas es diverso y complejo por haber un gradiente y un empalme entre los varios modos de nutrición. A la vez el modo de nutrición determina las rutas metabólicas que son empleadas en el anabolismo y catabolismo.

En la **Tabla III** se presentan las características metabólicas según el modo de nutrición. En base a los modos de nutrición (o **regímenes**) de carbono y energía, las algas tienen dos grandes formas de nutrición (Kaplan *et al.*, 1986):

- **Autótrofa** (litótrofa). Los organismos autótrofos son organismos que obtienen todos los elementos que necesitan para crecer de compuestos inorgánicos y la energía a partir de luz (**fotoautótrofa**) o la oxidación compuestos inorgánicos o iones (**quimioautótrofa**).
- **Heterótrofa**. Los organismos heterótrofos obtienen su materia y energía de los compuestos orgánicos sintetizados por otros organismos. Existen varios tipos de heterotrofia, la **quimoheterotrofia** (organotrofia): la energía es obtenida por oxidación de compuestos orgánicos que también sirven como fuente de carbono; **mixotrofia**: la luz es la principal fuente de energía, de manera paralela los compuestos orgánicos y/o el CO<sub>2</sub> son indispensables; **fotoheterotrofia**: se requiere indispensablemente de la luz para asimilar los compuestos orgánicos.

**Tabla III.** Diversidad de nutricional de las microalgas algunas de principales características metabólicas.

Modo de nutrición (Regímenes)	Características metabólicas				
	Fuente Energética	Fuente de Carbono	Respiración	Donador de electrones	Requerimientos de luz
<b>Autótrofo</b>					
Fotoautotrófico oxigenico	Luz	CO <sub>2</sub>	Aeróbica	H <sub>2</sub> O	Obligado
Fotoautotrófico anoxigenico	Luz	CO <sub>2</sub>	Anaeróbica	H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S	Facultativo
Quimioautotrófo	N, S y Fe inorgánicos	CO <sub>2</sub>	Anaeróbica	H <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> S	Nulo
<b>Heterótrofo</b>					
Fotoheterotrófico	Luz	CO <sub>2</sub> C-orgánico	Aeróbica	C-orgánico	Obligado
Quimioheterotrófico	C-orgánico	C-orgánico	Aeróbica	C-orgánico	Nulo
Mixotrófico	Luz C-orgánico	CO <sub>2</sub> C-orgánico	Aeróbica	C-orgánico	Facultativo

### **1.2.3. MÉTODOS DE CULTIVO DE MICROALGAS**

Los sistemas de cultivo juegan un papel central en el proceso biotecnológico al ser un eslabón obligado entre las materias primas y los productos finales (Cooney, 1983). Un sistema de cultivo efectivo es aquel que permite la óptima utilización de los sustratos (incluyendo el sustrato energético) a través de una biocatálisis, para generar productos de manera eficiente y económica (Lee, 2001). El objetivo primario en el diseño de un sistema de cultivo biotecnológico es minimizar el costo de producción para generar productos o servicios de alta calidad, esto, tomando en cuenta que un sistema biotecnológico incluye las síntesis, la bioconversión y la recuperación del producto (Cooney, 1983).

En la década de 1950 se inicio el cultivo moderno de microalgas, empleando luz solar y agua marina, para obtener grandes cantidades de biomasa. Durante las años 60's y 70's diversos grupos de investigación en países desarrollados (principalmente Alemania y Estados Unidos) y en vías de desarrollo, dedicaron esfuerzos a intentar lograr rendimientos de biomasa que pudieran equipararse a microorganismos como levaduras y bacterias (Contreras-Flores *et al.*, 2003)

Hay muchas características básicas que se deben tomar en cuenta cuando se diseña y opera un cultivo de microalgas: En el **ANEXO 4** se mencionan las variables prioritarias a considerar en el diseño y operación de los cultivos con luz.

#### **CULTIVOS FOTOTRÓFICOS** (fotoautotrófico y mixotrófico)

Los cultivos fototróficos abarcan la modalidades nutricionales fotoautotróficas (o simplemente autotrófico) y mixotróficas, ya que en ambos cultivos se suministra luz como fuente de energía. Los cultivos fotótrofos se llevan acabo en sistemas abiertos o en fotobiorreactores (PBS).

Las microalgas son usualmente fotoautótrofas esto quiere decir que utilizan la luz solar o artificial como fuente de energía (prefijo foto) y el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (prefijo auto) como fuente de carbono. Esto lo llevan a cabo por el proceso de fotosíntesis. En el caso de

los organismos mixotróficos la fuente de energía es suministrada por la luz y el compuesto orgánico, pero la asimilación de carbono solo por los compuestos orgánicos (Lee, 2001).

La fotosíntesis es una forma de conversión de la energía luminosa. Es bien sabido que la fotosíntesis es proceso más eficiente de adición de energía por los organismos. Virtualmente todas las formas de vida sobre la tierra dependen directa o indirectamente de la fotosíntesis como fuente de energía para su metabolismo o crecimiento.

En el cultivo de organismo fototróficos se utiliza la productividad de la fotosíntesis para generar bienes y servicios (Masojidek *et al.*, 2004).

La principal variable a considerar para el diseño y operación de los cultivos fototróficos es la luz (Consultar **ANEXO 4**). Variables como configuración del reactor, control de temperatura y control de la proporción  $O_2/CO_2$ , así como el mezclado, están en función del crecimiento celular en respuesta a la disposición de la luz suministrada. La energía en forma de luz recibida por los organismos fotoautotróficos es función de la densidad del flujo de fotones (PFD) (proporcional a la intensidad de luz (E)) que el cultivo recibe. Las células absorben solo una fracción del flujo de fotones, la magnitud de esta fracción esta gobernada por muchos factores como son (Richmond, 2004):

- La exposición de las células a ciclos luz-obscuridad dentro de un cultivo iluminado.
- La densidad celular
- Las propiedades ópticas de las células
- La absorción de luz por el material del contenedor del cultivo
- El volumen del contenedor y su relaciona con la área de expuesta a la luz
- La tasa de mezclado del cultivo.

### **CULTIVOS HETEROTRÓFICOS** (Quimioheterotróficos y mixotróficos)

Un numero significativo de microalgas son capaces de crecer heterotroficamente (Droop, 1974) (Consultar **ANEXO 5**) En los sistemas de cultivos cerrados, se están teniendo grandes avances adaptando las tecnologías de la fermentación a estas especies, eliminando los problemas del suministro de luz (Apt y Behrens, 1999). También dentro de los cultivos

heterotróficos se pueden enlistar los cultivos mixotrófico en los que la fuente de carbono y energía se adquiere por  $\text{CO}_2$ /luz a la vez que por compuestos orgánicos.

Es posible obtener cultivos de microalga de altas densidades en biorreactores o fermentadores (BR) por medio del crecimiento quimioheterotrófico (o simplemente heterotrófico) (Chen, 1996; Lee, 2004; Anderson, 2005). El crecimiento heterotrófico puede proveer un método económicamente viable a gran escala para el cultivo de microalgas que utilicen sustancias de carbono orgánico como su única fuente de carbono (heterotrofia) y energía (quimiotrofia). Este modo de crecimiento eliminan total (quimioheterotrófico) o parcialmente (mixotrófico) el requerimiento de luz y además ofrece la posibilidad de incrementar ampliamente las concentraciones de células de microalgas o de producto (P) alcanzando una alta productividad por unidad de volumen ( $Q_p$ ) (Chen, 1996). Se puede adquirir un alto grado de control del proceso por el conocimiento previo en la tecnología de fermentaciones, además disminuir los costos de cosecha por las altas densidades celulares alcanzables (Chen y Chen, 2006). Por citar un ejemplo del éxito del cultivo heterotrófico, la industria japonesa de producción de biomasa de *Chlorella sp.*, genera 500ton que es el 50% de su producción total, en cultivos quimioheterotróficos (Lee, 1997).

El medio de cultivo en los cultivos heterotróficos, es similar al de cultivos fotoautotróficos con la adición de sustratos orgánicos al medio para proveer de carbono y energía al cultivo (Tsavalos y Day, 1994). Generalmente el oxígeno gaseoso es el nutriente limitante (Behrens, 2005). Como resultado del alto grado de control del proceso y de las condiciones de cultivo, los rendimientos de biomasa son consistentes y reproducibles, alcanzando densidades celulares de 50-100g de biomasa seca por litro (Gladue y Maxey, 1994; Radmer y Parker, 1994) que son comparablemente mucho mayores a los 500mg de biomasa en peso seco por litro alcanzadas en PBR y similares a los  $130\text{g L}^{-1}$  de levadura a los que operan los fermentadores comerciales (Chen, 1996).

Ya que los cultivos quimioheterotrofos a gran escala pueden alcanzar volúmenes de hasta 100,000L, muchos cientos de kilogramos de biomasa seca pueden ser producidos. La gran productividad aunada a cultivos de grandes volúmenes puede hacer a los sistemas de cultivo heterotrófico menos costosos que los cultivos fotoautotróficos en fotobiorreactores (Radmer y Parker, 1994).

Chen y Chen (2006) señalan las características que una microalga debe de tener para ser factible de cultivarse heterotroficamente:

- La facultad de dividirse y metabolizar en ausencia de luz
- La habilidad de crecer en medios de cultivos baratos y de fácil esterilización.
- La habilidad de adaptarse rápido a cambios ambientales
- La capacidad de resistir el estrés hidrodinámico en los fermentadores

Entre las limitantes del cultivo heterotrófico de algas se pueden enlistar (Chen, 1996):

- Numero limitado de especies de algas que puedan crecer heterotroficamente
- Costo de sustrato orgánico
- Contaminación por bacterias
- Inhibición del crecimiento por exceso de sustratos orgánicos
- Inhabilidad de generar productos inducidos por la exposición a luz

Para que un sistema heterotrófico sea costeable es necesario alcanzar altas densidades celulares para abaratar los costos inducidos por el suministro de carbono orgánico (Chen, 1996).

#### ***1.2.4. LIMITANTES DEL CULTIVO DE MICROALGAS***

Benemann, (1989) comenta que las principales limitantes del cultivo masivo de microalgas son: tiempos de generación largos (generalmente de días); cosechado difícil y costoso; requerimientos de luz; baja densidad celular; fisiología microalgal poco comprendida. Se ha reportado que la cosecha de la biomasa algal producida es de un 20-30% del costo total de la producción (Gudin y Therpenier, 1986). Estos altos costos se deben principalmente a dos factores: a) el tamaño pequeño de las microalgas (3-30 $\mu$ m) y b) las bajas densidades

celulares (Molina Grima *et al.*, 2004). Los dos métodos mas comunes de cosecha son la sedimentación, floculación y la centrifugación (Becker, 1995). A pesar de que la floculación permite la concentración de la biomasa algal, usualmente se requiere usar también la centrifugación (Behrens, 2005). Los costos de cosecha pueden hacerse redituables si la biomasa recuperada es suficiente. El tipo de sistemas a aplicar (fotobiorreactores o biorreactores) depende de los objetivos del cultivo, incluyendo el tipo de crecimiento del alga, el producto final, el valor del producto. Si el crecimiento quimioheterotrófico en biorreactores es posible, será generalmente mas económico que los cultivos en crecimiento fototrófico. En términos económicos Behrens (2005) ha calculado en base a datos experimentales, que en la actualidad es mas barato producir un kilogramo de biomasa seca de microalga por métodos quimioheterotróficos (2.0US\$) comparado con métodos fotoautotróficos (11.2US\$), tomando en cuenta los costos de luz y glucosa y niveles de productividad volumétrica de  $5.8\text{g L}^{-1}\text{d}^{-1}$  en cultivos quimioheterotróficos contra los  $0.4\text{g L}^{-1}$  al día en cultivos fotoautotróficos. Estas diferencias se deben principalmente a la ineficiencia del proceso fotosintético en transformar la energía eléctrica en ATP y NADPH. En la **Tabla IV** se comparan los sistemas de cultivo según el régimen de cultivo.

**Tabla IV.** Comparación de las características principales de fotobiorreactores y biorreactores (Adaptada de Behrens, 2005)

<b>Característica</b>	<b>Fotobiorreactor (cultivo fotoautotrófico)</b>	<b>Biorreactor (cultivo quimioheterotrófico)</b>
Fuente de energía	Luz	Compuesto orgánico
Densidad celular o peso seco	Bajo	Alto
Factor limitante del crecimiento	Luz	Carbono orgánico
Cosechado	Diluido, mas difícil	Denso, más fácil
Geometría del contenedor	Dependiente de la penetración de luz	Independiente de la fuente energética
Costo de construcción	Alto por unidad de volumen	Baja por unidad de volumen
Costo de operación	Alto por Kg de biomasa	Bajo por Kg de biomasa
Algas utilizada	Algas fotosintéticas	Algas quimioheterotrofas



### ***1.3. FICORREMEDIACIÓN: BIOTECNOLOGÍA DE MICROALGAS APLICADA AL TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL***

#### ***1.3.1. FICORREMEDIACIÓN***

La **ficorremediación** es un tipo de biotecnología que es definida como el uso de macroalgas o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes presentes en el agua o en el aire (Olguín, 2003). La ficoremediación es un tipo de biorremediación con la característica específica de que los organismos empleados, son algas.

La ficoremediación se basa en la capacidad de los organismos fotosintéticos de metabolizar varios tipos de ácidos orgánicos, nitrógeno, fósforo y metales pesados. El Profesor William J. Oswald fue el primero en desarrollar tecnología para la ficoremediación de agua residual. Actualmente algunas aplicaciones tecnológicas se encuentran en el mercado como la Tecnología “Advances Integrated Wastewater Pond System (AIWPS)” comercializada por Oswald y Green, LLC, en los Estados Unidos.

Olguín, (2003) y Muñoz y Guieysse (2006), menciona las siguientes aplicaciones de la ficoremediación:

- Remoción de nutrientes de aguas residuales y de efluentes ricos en materia orgánica. Las microalgas asimilan una cantidad significativa de nitrógeno y fósforo para la síntesis proteica, de ácidos nucleicos y fosfolípidos.
- Disminución de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) ya que las microalgas en crecimiento fotoautotrófico liberan de 1.5-1.92kg de O<sub>2</sub> por kg de biomasa producida.
- Remoción xenobiótico con la ayuda de bioabsorbentes algales. Las microalgas liberan metabolitos que actúan como agentes quelantes.
- Eliminación de metales pesados. Los organismos fotosintéticos acumulan metales pesados por absorción física, intercambio iónico o inmovilización en las superficies

celulares. La toma activa de metales pesados generalmente es una respuesta fisiológica para evitar el envenenamiento.

- Captación de  $\text{CO}_2$ . Toma de  $\text{CO}_2$  presente en el aire o en emisiones de combustiones de combustibles fósiles por medio de la fotosíntesis. Las emisiones pueden ser directamente inyectadas a los cultivos.
- Transformación y degradación de contaminantes orgánicos. Algunos tipos de microalgas y cianobacterias son capaces de usar compuestos tóxicos recalcitrantes como fuente de carbono, nitrógeno, azufre o fósforo.
- Uso como biosensores para el monitoreo de compuestos tóxicos. Las microalgas son sensibles indicadores de cambios ecológicos
- Control de patógenos. Por su actividad metabólica, las microalgas son capaces de alterar condiciones ambientales como el pH, temperatura u oxígeno disuelto, lo cual puede tener un efecto adverso para los patógenos presentes en el agua residual

## **ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES**

En condiciones controladas, la asimilación biológica de nutrientes por las microalgas, puede ser utilizado como una etapa terciaria de los sistemas de tratamiento de agua residual. El objetivo de dicho proceso es absorber los nutrientes disueltos, por medio de un cultivo de algas metabolitamente activo y después remover las algas completamente del efluente antes de liberarlo al cuerpo de agua receptor y así evitar su eutrofización (Oswald *et al.*, 1957; Witt y Borhardt, 1960). Los exceso de N y P en las formas de  $\text{NH}_4^+$   $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  del agua residual, pueden ser utilizados como fuente de nutrientes para el crecimiento de microalgas, de hecho las formas inorgánicas de N y P presentes en las aguas residuales son las ideales para el crecimiento de células de microalgas. El nitrógeno amoniacal  $\text{NH}_3$  ( $\text{NH}_4^+$  cuando se encuentra soluble en agua a  $\text{pH} < 8.5$ ) es la fuente preferida de Nitrógeno por las algas, y la asimilación de  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$ , esta relacionada con el pH del medio de cultivo. En cuanto al fósforo, el ion fosfato  $\text{PO}_4^{3-}$  ingresa a las células con ayuda de las enzimas fosfatasa acida y alcalina el cual es acumulado como polifosfatos dentro de la

célula o es directamente incorporado a las rutas metabólicas energéticas por los procesos de fosforilación a nivel sustrato, fosforilación oxidativa y fotofosforilación, además de ser utilizado para la de síntesis de fosfolípidos (Gobbelaar, 2005).

Una de las grandes ventajas de la bioremediación de aguas residuales con microalgas es que remoción del exceso de nutrientes no genera residuos contaminantes ya que al ser cosechada la biomasa de las microalgas se pueden reciclar de los nutrientes incorporados a esta. Una ventaja adicional de utilizar organismos fotosintéticos para el tratamiento de aguas residuales es la posibilidad de combinar el tratamiento del agua con la producción de metabolitos útiles (de la Noüe y de Pauw 1988). El interés en el uso de microalgas para el tratamiento terciario del agua residual radica en que los procesos convencionales de tratamiento terciario tiene las siguientes desventajas: a) generación de subproductos contaminantes; b) eficiencia variable, dependiendo del contaminante a ser removido; c) costos de operación; d) pérdida de nutrientes N y P potencialmente utilizables (de la Noüe *et al.*, 1992).

En la ficoremediación, se han utilizado especies de diversos géneros como *Ankistrodesmus*, *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Phormidium*. Estas especies poseen las siguientes capacidades: a) una alta tasa de absorción de los compuestos a remover en el sistema de tratamiento (Gonzalez *et al.*, 1997), b) una alta tasa de crecimiento (Hoffman, 1998), c) una alta tolerancia a contaminantes y xenobioticos que se encuentran en el agua residual (Witt y Borchardt, 1960; Post *et al.*, 1994) y e) que las especies de microalgas seleccionadas son capaces de interactuar con bacterias de una manera positiva para los propósitos del sistema (Muñoz y Guieysse, 2006).

Originalmente la ficoremediación se llevo a cabo en estanques abiertos con cultivos no axénicos de diferentes especies de microalgas pero poco a poco se han explorado las alternativas de hacer esta ficoremediación en (foto)biorreactores cerrados tratando de aumentar la productividad con una sola especie de microalga y de manera paralela facilitar la cosecha del los cultivos para tratar el agua de una manera mas eficiente (de la Noüe *et*

*al.*,1992). Los cultivos axénicos pueden ser de una sola especie o una combinación definida de especies (Ogbonna *et al.*, 2000).

Aunque de manera experimental la ficorremediación a nivel laboratorio se hace en condiciones asépticas, en un contexto aplicado y real no es factible alcanzar o generar tales condiciones (Witt y Borchardt, 1960). Sin tomar en cuenta los costos del proceso, los cultivos abiertos o cerrados para ficoremediación y para la producción de biomasa, tiene los mismos criterios de diseño: alta eficiencia en la utilización de la luz, buena escalabilidad, mezclado eficiente, alto grado de control de pH y temperatura y poco estrés hidrodinámico (Muñoz y Guieysse, 2006).

### **COSECHA EN FICORREMEDIACIÓN**

La cosecha de la biomasa producida debe de asegurar una buena calidad del efluente y prevenir el lavado de las células durante la operación continua (Evans y Furlong, 2003). En ficoremediación la cosecha ha sido un cuello de botella para el desarrollo de la tecnología, al igual que en otras ficotecnologías, el costo de cosecha (aprox. 20-30% del costo total) es uno de los factores limitantes para el cultivo aplicado de algas (Gudin y Therpenier, 1986; de la Noüe *et al.*, 1992). Los intentos para cosechar la biomasa algal por medio de sedimentación natural o inducida, filtrados en arena, y centrifugación no ha probado ser económicamente viable para procesos a gran escala (Hoffman, 1998). La alternativa mas usada es la floculación seguida de una sedimentación de la biomasa que también es un método de cosecha costoso y genera contaminación secundaria, además es poco eficiente en procesos donde se utilicen Clorofitas unicelulares de pequeño tamaño como *Chlorella* o *Scenedesmus* (de la Noüe *et al.*, 1988) En la actualidad se pueden puntualizar 3 alternativas que están en desarrollo para disminuir los costos de cosecha de los cultivos de microalgas (de la Noüe *et al.*, 1992; Olguín *et al.*, 2003)

- Monocultivos con especies con capacidad de auto-agregación celular
- Inducción de flotabilidad de células
- Inmovilización celular

### 1.3.2. INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS

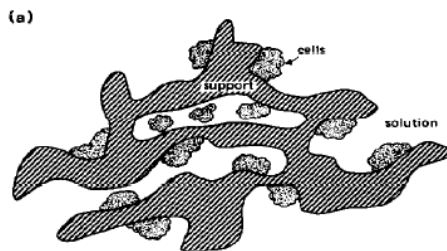
El inmovilizado celular es una opción para solucionar el problema de los costos de recuperación de las células de microorganismos y su separación del medio de cultivo. La inmovilización celular es una forma eficiente de retener la biomasa generada en el tratamiento de agua residual (Nicolleta *et al.*, 2000).

El **inmovilizado** de células se define como la confinación o localización física de células intactas a una región espacial definida en el biorreactor con la preservación de la deseada actividad catalítica (Karel *et al.*, 1985). Los objetivos de la inmovilización celular son los siguientes (Adaptado de Karel *et al.*, 1985; Dervakos y Webb, 1991):

- Incrementar la concentración celular y la productividad volumétrica
- Incrementar la estabilidad biológica
- Incrementar la estabilidad del producto
- Incrementar la concentración del producto en el medio de cultivo
- Reducir la concentración de sustrato en el medio de cultivo
- Ventajas por la proximidad entre las células
- Separación de células del medio, fácil recuperación del producto

En resumen puede permitir al reactor contener mas células y por ende aumentar las productividad volumétrica, la densidad celular además de reducir costos en procesos de recuperación de producto costosamente intensivos (Karel *et al.*, 1985).

Los inmovilizados celulares deben ser entendidos como agregados celulares de un volumen definido en proporción con el reactor con una actividad catalítica definida en calidad y tiempo, compuestos por tres fases: las células; la matriz de soporte la cual puede ser sólida o gel; y la solución que llena el espacio dentro del agregado (Karel *et al.*, 1985). Las propiedades químicas dentro del agregado son diferente a las de la solución (medio de cultivo). Este fenómeno se ha referido en la literatura como el



establecimiento de un **microambiente** en el agregado. A pesar de la complejidad del agregado como un microambiente definido, desde el punto de vista de la ingeniería del reactor, el agregado debe ser conceptualizado como una fase homogénea con una geometría simple como esferas o películas (Karel *et al.*, 1985).

Entre los materiales frecuentemente empleados en la inmovilización de microalgas están los compuestos orgánicos como: alginato, agar, agarosa, carragenina, glutaraldehído de albúmina serica, y los materiales sintéticos como: poliuretano, espumas de polivinilo, archilamida, cerámica y perlas de cristal (Becker, 2003) Este autor también señala que los materiales apropiados para el inmovilizado de células microalgales deben de tener las siguientes propiedades: alta capacidad de cargar biomasa; alta transparencia; ausencia de tóxicos para las células algales; proceso de inmovilización simple; óptima difusión de nutrientes y productos; resistencia a la abrasión; máxima relación área de superficie–volumen; estabilidad mecánica; esterilizable; conveniente para una separación fácil de la matriz del medio de cultivo.

En general hay 4 categorías de inmovilizados de células completas (Karel *et al.*, 1985; Dervakos y Webb, 1991):

- a) Fijado de células a superficies lisas
- b) Encapsulación en matrices porosas
- c) Contención detrás de barreras o membranas
- d) Auto agregación

Becker (2003) señala los principales campos de investigación en donde se utiliza la inmovilización de células de microalgas:

- Acumulación o remoción de productos de desecho en sistemas acuosos
- Biosíntesis o biotransformación de diferentes productos naturales en reactores, suelos y ambientes acuosos.
- Producción de oxígeno en sistemas alga-bacteria
- Producción de hidrógeno

El inmovilizado de células de microorganismos últimamente ha sido empleado con fines agrícolas y ambientales. (Bashan, 1986; Bashan, 1998; Trevors *et al.*, 1993; Cassidy *et al.*, 1996). Algunos autores han estudiado la ficoremediación de aguas residuales utilizando el inmovilizado celular (Chevalier y de la Noüe, 1985; Lau *et al.*, 1997; Tam y Wang, 2000; de Bashan *et al.*, 2002a). Aparentemente Chevalier y de la Noüe (1985) fueron los primeros en inmovilizar células de microalgas para utilizarlas en los sistemas de tratamiento de agua residual. En el **ANEXO 6** se enlistan estudios usando inmovilizados de microalgas aplicados la remoción de nutrientes de aguas residuales.

## **1.4. FICORREMEDIACIÓN CON EL SISTEMA COINMOVILIZADO** ***Chlorella vulgaris*-*Azospirillum brasilense***

### **1.4.1. COINMOVILIZACIÓN DE *C. vulgaris* y *A. brasilense***

La inmovilización de dos o más organismos en una misma matriz es definida como **coinmovilización**, sus ventajas son las siguientes: complementación de las actividades catalíticas de dos tipos de organismos o aumentación de la actividad de uno en presencia de otro(s); se da un enfoque mas sistematizado al aislar organismos claves en el proceso; proximidad de las especies biocatalíticas (O'Reilly y Scott, 1995):

La propuesta de Ficoremediación del “Grupo Microbiología Ambiental” del Centro de Investigaciones Biologicas del Noroeste en La Paz BCS, México, es coinmovilizar a la microalga *Chlorella vulgaris* y a la “bacteria promotora de crecimiento en microalgas” (MGPB) *Azospirillum brasilense* cd para el tratamiento de aguas residuales de origen doméstico cargadas de amonio y fosfatos (Gonzalez y Bashan, 2000; de Bashan *et al*, 2002a; de Bashan *et al.*, 2004). El coinmovilizado consiste en encapsulación en esferas de polímeros de alginato (Bashan, 1986).

El alginato es un polisacárido producido por algas cafés (principalmente *Macrocystis pyrifera*), comercializado como ácido algínico de alta y media viscosidad. Es el material de encapsulacion más común para el inmovilizado de células algales ya que el método es sencillo, versátil y compatible con la mayoría de las células vivientes. Detalles del proceso de inmovilizacion con alginato pueden ser consultados en el **ANEXO 6**

#### **POR QUÉ *Chlorella vulgaris*?**

*Chlorella vulgaris* es una especie cosmopolita de ambientes acuáticos y habitante inherente de las aguas residuales y tiene altas tasas de remoción de nitrógeno y fósforo.



Probablemente esta microalga (junto con *Scenedesmus*) es la más común de las aguas residuales, teniendo una dominancia sobre otras especies de microalgas y Cianofitas (Post *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 1997). Como característica primordial *Chlorella* crece rápidamente, teniendo tasa de crecimiento de hasta  $0.2^{-h}$  en cultivos fotoautotróficos (Lee, 2001). Este crecimiento rápido la hace demandar mas nutrientes del medio y por consecuencia removerlos mas rápidamente (Muñoz y Guieysse, 2006). De manera adicional las especies de *Chlorella* son consideradas de alta resistencia a cambios ambientales, estrés mecánico y altas concentraciones de contaminantes incluyendo nutrientes y metales pesados (Palmer, 1969; Kaplan *et al.*, 1987).

Las células de especies del genero *Chlorella*, son de forma esférica o elíptica y poseen un ciclo de vida simple. Su reproducción es exclusivamente asexual, cada célula madura produce de 4 a 8 autoesporas. La división celular se lleva a cabo en la noche, el incremento en el volumen celular durante el día, estos ciclos dependen de la intensidad de la luz y la temperatura del ambiente. Se asume que *Chlorella* tiene dos morfotipos durante su crecimiento, las células de obscuridad y células de luz (Richmond, 1986).

#### **ASOCIACIÓN CON LA BACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO EN PLANTAS *Azospirillum brasilense***

Desde la década de 1960 se ha reconocido que la asociación entre microalgas y bacterias es útil y benéfica para el tratamiento del agua residual (Oswald *et al.*, 1957) El modelo general de la interacción entre algas y bacterias para el tratamiento de aguas residuales estipula que es posible aumentar la eliminación de nutrientes, metales pesados y patógenos usando microalgas que por medio de la fotosíntesis proveen de oxígeno a las bacterias que degradan y mineralizan a la materia orgánica, el ciclo se cierra cuando las microalgas usan para su crecimiento la materia orgánica mineralizada por las bacterias (Oswald, 1962).

En la actualidad se asume que las interacciones entre algas y bacteria en tratamiento terciario de agua residual son complejas y abarcan efectos antagónicos y benéficos dependiendo de las condiciones de cultivo (Muñoz y Guieysse, 2006).

La propuesta de utilizar una bacteria promotora del crecimiento de plantas (PGPB, de sus siglas en inglés) en este caso *Azospirillum brasilense* para incrementar el crecimiento de la población de microalgas fue hecha por Gonzalez y Bashan, (2000). Posteriormente se propuso este sistema para utilizarlo en la remoción de nitrógeno y fósforo del agua residual (de-Bashan *et al.*, 2004). Las especies del género *Azospirillum* ( $\alpha$ -proteobacteria) se conocen como promotoras del crecimiento de plantas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000; Bashan *et al.*, 2004)

Dentro de esferas de alginato, *C. vulgaris* coinmovilizada con *A. brasilense*, incrementa su peso fresco, peso seco, número de células dentro de la esfera y niveles de pigmentos dentro de las células. (Gonzalez y Bashan, 2000). Ambos organismos colonizan y crecen en las mismas cavidades de la esfera de alginato (Lebsky *et al.*, 2001).

El coinmovilizado *C. vulgaris* con *A. brasilense* incrementa la eliminación de amonio y fosfato presente en agua residual sintética a comparación de inmobilizados solo con la microalga (de Bashan *et al.*, 2002a). En esas condiciones las células de *C. vulgaris*, incrementan, su tamaño, sus contenidos de clorofila a, clorofila b, luteína y violoxantina, su concentración de lípidos y el número de ácidos grasos detectados aumenta de 4 a 8, lo que indica que *A. brasilense* induce cambios profundos en el metabolismo de *C. vulgaris* (de Bashan *et al.*, 2002b).

Posteriormente, de Bashan *et al.* (2004), utilizan el sistema coinmovilizado para tratar agua residual en biorreactores de laboratorio hechos. Observaron que células de *A. brasilense* solas, no son capaces de remover significativamente amonio, nitrato y fosfato del agua residual, comparadas con células de *C. vulgaris* coinmovilizada con *A. brasilense*.

En el 2005, de Bashan *et al.* estudian el efecto de la concentración de amonio y nitrato, el pH y una fuente de carbono en medio residual sintético, sobre el crecimiento y la capacidad de tomar nitrógeno de la microalga *C. vulgaris* coinmovilizada en esferas de alginato con *A. brasilense*. El análisis de estos experimentos sugiere que en cultivos con ambos organismos el incremento de la población de la microalga es independiente al incremento en la toma de nitrógeno de la población o dicho de otra manera, la eliminación de nitrógeno

del cultivo es consecuencia de la eficiencia en la toma de nitrógeno de cada una de las células de la microalga y no en su número. Las condiciones ambientales afectan el número de células y la actividad específica de toma de nitrógeno de cada célula, de manera independiente. Sin embargo ambos factores influyen en el ambiente por lo que se da un bucle de causa-efecto.

Hernandez *et al.* (2006) realizó experimentos ayunando el sistema coinmovilizado en solución salina, antes de utilizarlo para la toma de nutrientes del agua residual sintética y de agua residual. Estos autores encontraron que el ayuno de 3 días en solución salina aumentaba la eliminación de fosfato de las aguas residuales, en ayunos de 5 días afectaba de manera negativa el crecimiento subsecuente de *C. vulgaris*. El reuso de las esferas con los organismos inmovilizados solo era efectivo en la toma de fosfatos cuando se utilizaban para tratar medio residual fresco. 72% del fosfato presente en agua residual es eliminado cuando esta agua es sometida a dos tratamientos consecutivos de células coinmovilizadas. También se observó que la capacidad de tomar fosfatos del sistema inmovilizado aumenta con la concentración inicial de fosfato del agua a tratar. Se llega a la conclusión de que *A. brasilense* ayuda a *C. vulgaris* a mitigar los efectos negativos del periodo de ayuno.

de Bashan *et al.* (2008a) concluye que parte del efecto de *A. brasilense* como bacteria promotora de crecimiento de la microalga *C. vulgaris* se debe a la producción de Ácido Indol 3-acético (IAA) por parte de la bacteria, es sabido que este ácido es una fitohormona promotora del crecimiento de las plantas vasculares. Se llegó a esta conclusión coinmovilizando mutantes de *A. brasilense* incapaces de producir Ácido Indol 3-acético con *C. vulgaris*.

La última publicación en el estudio del sistema coinmovilizado *C. vulgaris*-*A. brasilense* lo realizó de Bashan *et al.* (2008b). En esta investigación se midió la actividad enzimática de las enzimas Glutamato deshidrogenasa (GDH) y Glutamina sintetasa (GS) usando 4 diferentes concentraciones de amonio en el medio residual sintético. Los resultados obtenidos son que a concentraciones iniciales de 3, 6 y 10 mg L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> no se aumenta la capacidad de absorción de amonio de la microalga pero si el número de células cuando se encuentra coinmovilizada con *A. brasilense*. Sin embargo a concentraciones de 8 mg L<sup>-1</sup> de

$\text{NH}_4^+$ , si se ve afectada la absorción de amonio de la microalga pero no el tamaño poblacional. Se encontraron correlación lineales entre la toma de amonio a partir de diferentes concentraciones (4, 6 y  $10\text{mg L}^{-1}$ ) con el tamaño poblacional de la microalga, pero no a concentraciones iniciales de  $8\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ , donde ocurrió la mayor absorción de amonio. En todos los cultivos con ambos organismos coinmovilizados se registró un aumento en la actividad de la enzima GS, pero solo a concentraciones iniciales de  $8\text{mg L}^{-1}$  de amonio en el medio de cultivo se registró un aumento en la actividad de la enzima GDH. Se concluye que la presencia de *A. brasilense* incrementa el tamaño poblacional, la actividad de las enzima GS y la toma de amonio del medio, pero estos parámetros no se ven afectados por las diferentes concentraciones de amonio en el medio excepto a  $8\text{mg L}^{-1}$  donde se observó la mayor toma de amonio del medio y un incremento en la actividad de la enzima GDH pero no un aumento en la población.

#### ***1.4.2. POTENCIAL DEL CULTIVO HETEROTRÓFICO DE Chlorella vulgaris***

##### **CRECIMIENTO DE *C. vulgaris* CON CARBONO ORGÁNICO**

*Chlorella* (incluyendo *Chlorella vulgaris*) es capaz de crecer quimioheterotroficamente, asimilando y utilizando moléculas orgánicas como fuente de energía y de carbono (Droop .1974) Por lo general la tasa de crecimiento de las microalgas en crecimiento quimioheterotrófico es aproximadamente 2 veces menor a la tasa de crecimiento en régimen fotoautotrófico. Sin embargo *Chlorella vulgaris* es una excepción, en esta especie, la tasa máxima de crecimiento específico es equiparable en cultivos fotoautotróficos y quimioheterotróficos (Lee, 2001). Inclusive ciertas cepas de *Chlorella* han alcanzado mayores densidades ( $80\text{g L}^{-1}$  de peso seco) en biorreactores con tiempos de generación de pocas horas a comparación las alcanzadas ( $10\text{g L}^{-1}$  de peso seco) en fotobiorreactores (Behrens, 2005).

En el **ANEXO 7** se puede consultar una tabla con diversos cultivos heterotróficos de *Chlorella* spp. registrados en la bibliografía disponible

En el **ANEXO 8** se presenta un listado de las moléculas orgánicas que pueden ser utilizadas como sustrato para el cultivo quimioheterotrófico de *C. vulgaris*.

Moléculas orgánicas en forma de polímeros de más de 6 o 7 unidades monoméricas (aproximadamente 1000uma), no puede ser transportado a través de las membranas y paredes celulares de los organismos (Law, 1980). Por lo que es necesaria una hidrólisis extracelular a nivel membrana de estas macromoléculas para que el carbono en forma de polímeros pequeños y monómeros pueda ser asimilado (Confer, 1998).

Existe una importante relación en *Azospirillum* entre la fijación de nitrógeno y ciertos ácidos orgánicos y carbohidratos suplementados por plantas hospederas (Westby *et al.*, 1983). Westby *et al.* (1983) señala las fuentes de carbono que *A. brasilense* Sp7 puede utilizar para su crecimiento en placas de agar **ANEXO 8**.

Los trabajos de Komor *et al.* (1973) y Haass y Tanner (1974) establecen que la toma de glucosa en *Chlorella* se lleva a cabo por un transportador activo de hexosas y que en *Chlorella vulgaris* es 400 veces más rápido que en otras especies de *Chlorella* y *Scenedesmus*, en *C. vulgaris* el transportador es sintetizado 15 minutos después de que las células son expuestas a glucosa, el valor  $K_m$  para la inducción de glucosa es de  $5\mu\text{M}$ . Este transportador es un cotransportador hexosa-protón regulado por la concentración de glucosa, y de iones  $\text{H}^+$  (Komor y Tanner, 1974). Posteriormente se estableció la especificidad a de los azúcares transportados por este sistema (Komor *et al.*, 1985), y que es fotoinhibido por la luz, especialmente por las longitudes de onda del extremo azul del espectro (Kamiya y Kowallik, 1987)

En estudios realizados por Endo *et al.* (1977); Martínez y Orús (1991) y por Ogawa y Aiba (1981) se ha registrado que la tasa de crecimiento específico en regímenes mixotróficos es la suma de las tasa de crecimiento de los regímenes fotoautotróficos y quimioheterotróficos usando glucosa como sustrato orgánico. Las células de *C. vulgaris* son capaces de crecer mixotroficamente solo a intensidades de luz por debajo de la constante de saturación ( $E_k \approx 130\text{-}150\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{S}^{-1}$ ) Ogawa y Aiba (1981), sin embargo Kamiya y Kowallik (1987)

argumenta que la toma de glucosa es totalmente inhibida por la presencia de cualquier intensidad de luz, por lo que los regímenes fotoautotróficos y quimioheterotróficos son excluyentes. A su vez aumentar la cantidad de glucosa más allá de los  $20\text{g L}^{-1}$  genera una disminución de la tasa de crecimiento en cultivos quimioheterotróficos y mixotróficos, los rangos donde en ambos regímenes, se observaron las tasas de crecimiento más altas oscila entre los  $5\text{-}15\text{g L}^{-1}$  (Ogawa y Aiba, 1981).

El fenómeno del gigantismo celular en *C. vulgaris* se presenta cuando las células están creciendo en completa obscuridad usando carbohidratos del medio como fuente de carbono y energía por medio de la respiración aeróbica. En estas condiciones la división celular es estimulada por la glucosa y la galactosa pero no por las fructosa, manosa, xilosa y arabinosa aunque estos sustratos generen gigantismo. No hay correlación entre el gigantismo y la división celular. La actividad fotosintética de las células gigantes (o células oscuras, del inglés “dark cells”) depende del tipo de azúcar suministrada, con glucosa, fructosa y manosa, decrece pero con galactosa, xilosa y arabinosa no es afectada. La actividad respiratoria de las células gigantes es más alta que la de las células fotoautotróficas. La cantidad de nitrógeno proteico y el peso seco por unidad de volumen de las células gigantes de *C. vulgaris*, son mucho menores que aquellos en células fotoautotróficas (Higashiyma, 1967).

Los metabolismos del carbono y nitrógeno están acoplados en las microalgas, en el proceso de asimilación primaria del amonio para generar aminoácidos por el sistema GS/GOGAT (glutamina sintetasa/glutamina 2-oxoglutarato amino transferasa). Para formar los aminoácidos glutamato y glutamina, estas enzimas requieren esqueletos de carbono en forma del cetoácidos específicamente del 2-oxoglutarato (2-OG) (también llamado  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG)) y energía en forma de ATP y NADPH que pueden ser suministrados (además de fotosintéticamente) por el ciclo TCA activado en el metabolismo quimioheterotrófico de la respiración generada a partir de la asimilación de moléculas orgánicas (Huppe y Turpin, 1994; Buchanan *et al.*, 2000).

En la actualidad el cultivo comercial de *Chlorella* en régimen quimioheterotrófico y mixotrófico en fermentadores es común, sobretodo utilizando acetato como fuente de carbono y energía, por ser un medio mas selectivo por que los contaminantes bacterianos son mas limitados (Iwamoto, 2004). La levadura *Candida utilis* tiene aproximadamente el mismo tamaño que *Chlorella* pero tiene una tasa máxima de crecimiento específico de  $0.19\text{h}^{-1}$  lo cual es de unas 2-5 veces mas rápido que las tasa de *Chlorella* crecida quimioheterotroficamente. Los cultivos semicontinuos de las levaduras operan a concentraciones de  $100\text{-}150\text{g L}^{-1}$  y mantienen una productividad de  $450\text{-}700\text{g L}^{-1}$  al día (Lee, 2001). Dadas estas cifras es un reto para el cultivo de microalgas alcanzar tales cantidades de concentración celular de manera rutinaria. De manera teórica, si se pudieran alcanzar densidades celulares en cultivos de *Chlorella* equiparables las de cultivos de levaduras, se obtendría un productividad de  $91\text{-}353\text{g L}^{-1}/\text{día}$ , y el costo de producción podría ser menor a los 3US\$ por kg (Lee, 2001).

Dado la simpleza y el bajo costo de operación del cultivo quimioheterotrófico y sobretodo que *C. vulgaris* y *A. brasilense* pueden crecer con este regimen, es posible obtener las ventajas del cultivo este cultivo en la ficoremediación de aguas residuales usando inmovilizados celulares *C. vulgaris-A. brasilense*.

## **BIODISPONIBILIDAD DE CARBONO ORGÁNICO EN AGUAS RESIDUALES TRATADAS**

Se considera que la fracciones hidrofóbicas tanto acidas (A<sub>Ho</sub>) como neutras (N<sub>Ho</sub>) (consultar *ANEXO 2*), no se encuentran asimilables de manera inmediata para los organismos heterótrofos, precisamente por su carácter hidrofóbico que no permite que los organismos tengan contacto con ellas y por su tendencia a formar agregados moleculares de gran tamaño para la incorporación al interior de las células (Imai *et al.*, 2002).

La fracción N<sub>Hi</sub>, que contiene la MOD en forma de carbohidratos, no constituyen una porción importante de la composición de la MOD de aguas residuales. Se especula que este

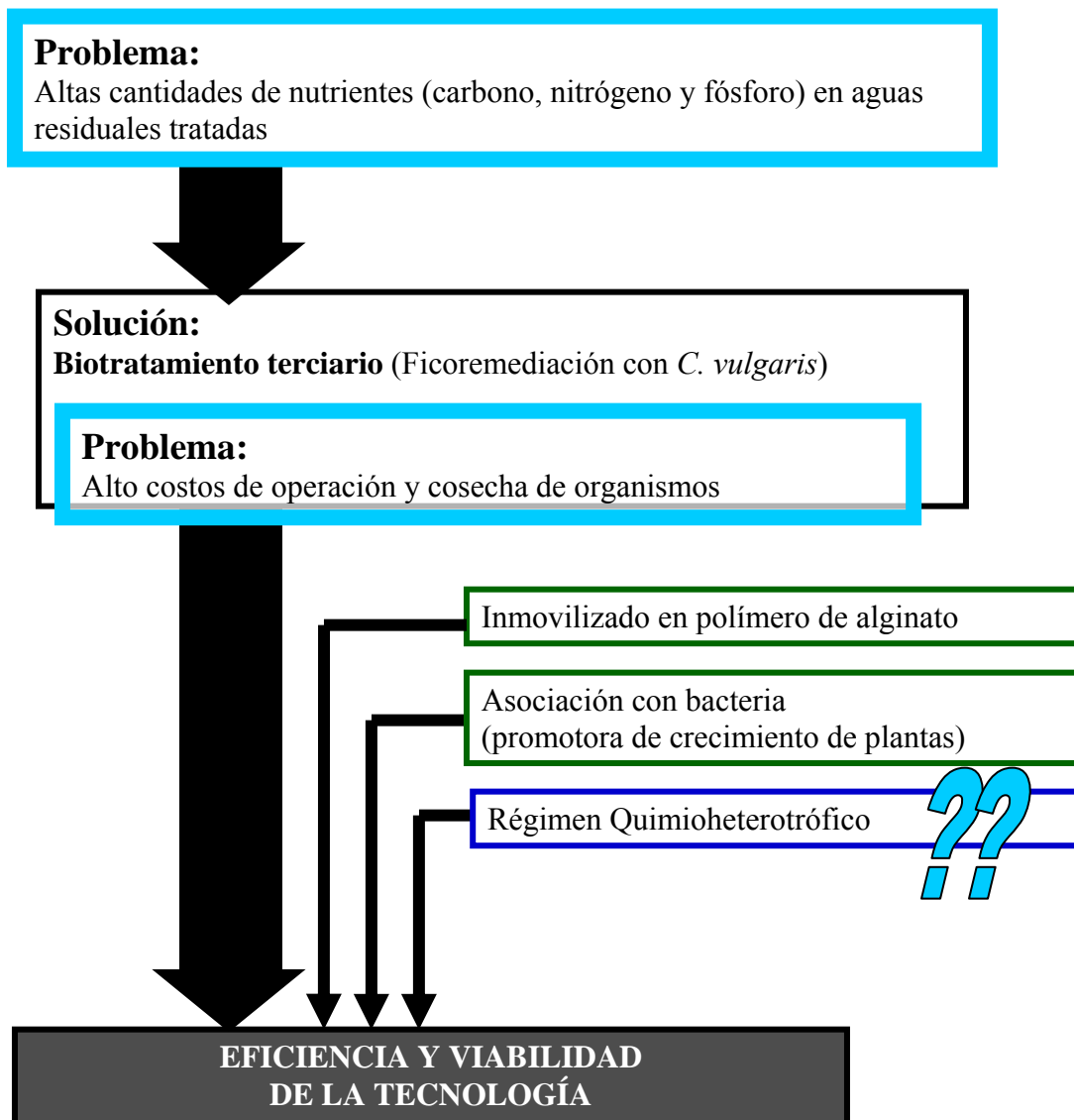
valor es bajo por la fácil degradabilidad y asimilación realizada por los microorganismos, de los compuestos de la fracción NHi. Estos compuestos son removidos casi completamente durante la oxidación biológica empleada en los sistemas de tratamiento de agua (Imai *et al.*, 2002).

Las fracciones acida hidrofílica (ácido orgánicos) y básica hidrofílica (aminoácidos) son los principales candidatas a servir como fuente de carbono asimilable en las efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual por dos razones:

- Los compuestos que forman la fracción son asimilables por los microorganismos
- Los porcentajes de estas fracciones con respecto al COD es alto. Entre las fracciones acida y básica hidrofílicas suman porcentajes de entre el 42 al 91% del COD del agua residual tratada



## 1.5. PLANTEAMIENTO



## **1.6. HIPÓTESIS**

Dado que el metabolismo del carbono, nitrógeno y fósforo están estrechamente relacionados en el régimen heterotrófico de algas y que en estas condiciones el crecimiento de células en suspensión de *Chlorella vulgaris* produce iguales o más altas densidades poblacionales comparado con cultivos en régimen fotoautotróficos, además de ser operacionalmente mas barato y sencillo. Se formula la siguiente hipótesis:

El sistema coinmovilizado de *Chlorella vulgaris* - *Azospirillum brasilense* puede ser mas eficiente para eliminar nutrientes ( $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ ) de aguas residuales sintéticas creciendo en regimenes de cultivo quimioheterotróficos o mixotróficos a diferencia de cultivos fotoautotróficos.

### ***1.7. OBJETIVO GENERAL***

Comparar la eficiencia de los regimenes de cultivo heterotróficos, autotróficos y mixotróficos de los sistemas inmovilizados de *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* para la eliminación de amonio y fosfato de aguas residuales.

## **1.8. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Encontrar fuentes de carbono orgánico presentes en agua residual real biodisponibles para el crecimiento heterotrófico de *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense*.
2. Comparar que régimen de cultivo es más eficiente para eliminar amonio y fosfato (Autotrófico, Heterotrófico o Mixotrófico).
3. Realizar un análisis cinético de los experimentos.

## **2 METODOLOGÍAS, RESULTADOS Y DISCUSIONES**

Para cumplir los objetivos de la investigación se ha planteado una estrategia de 3 etapas:

1. Trabajos preliminares.
  - Análisis de nutrientes y fuentes de carbono orgánico presentes en agua residual para definir condiciones de cultivo.
  - Experimentos de cultivos heterotróficos en suspensión con diversas fuentes de carbono para definir condiciones de los cultivos con células inmovilizadas.
  
2. Experimento de eliminación de nutrientes usando células inmovilizadas
  - Cultivos experimentales en matraces invertidos de 1L.
  
3. Análisis postcosecha.
  - Análisis cuantitativo del medio tratado y de variables cinéticas.

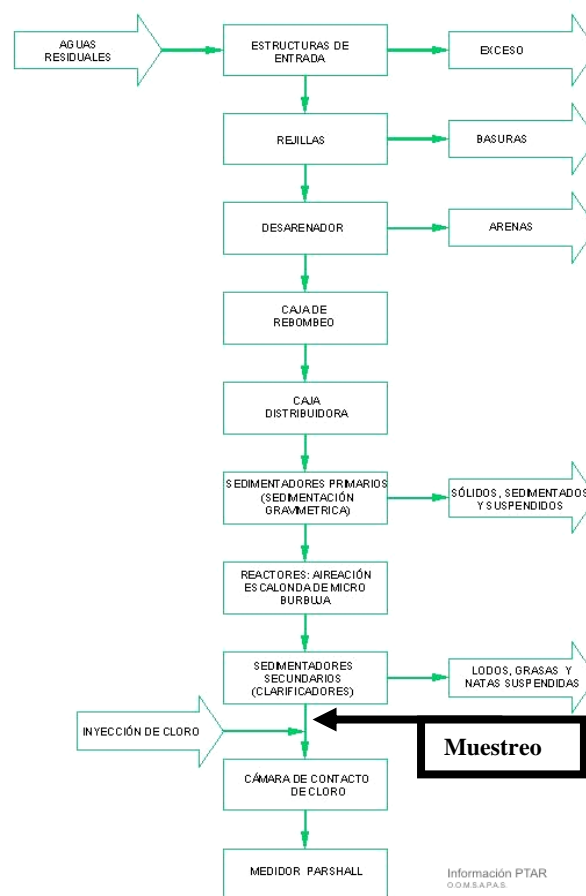
## 2.1. ANÁLISIS DE AGUA RESIDUAL

### 2.1.1. MÉTODOS

Con el fin de evaluar la concentración de nutrientes, la presencia de moléculas orgánicas biodisponibles para *C. vulgaris* y *A. brasiliensis*, así como del ambiente físico y químico al que se enfrentan los organismos al ser utilizados para el tratamiento terciario del agua residual efluente de un tratamiento secundario convencional.

#### SITIO DE MUESTREO

La toma de muestra de agua residual real tratada se llevo a cabo en la “Planta de Tratamiento de Agua Residual del Municipio de La Paz, Baja California Sur, México (*Figura 1*), durante la última semana del mes de enero del año 2008. Esta planta de tiene un flujo promedio de 300L/s de agua residual cruda, proveniente de la red de alcantarillado de la ciudad de La Paz, en la cual habitan 200,000 personas. El agua residual generada en la ciudad de La Paz es principalmente de origen doméstico (OOMSAPAS, 2008).



**Figura 1.** Proceso de tratamiento de agua residual del la planta de La Paz y el punto donde se realizo el muestreo.

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 **Figura 1** es un diagrama de flujo del proceso de tratamiento de agua de planta de La Paz. La flecha gruesa indica el punto en el sistema donde se tomaron las muestras.

### DISEÑO DE MUESTREO

En base a las variaciones del flujo de caudal en las diferentes horas del día y entre los diferentes días de la semana, se tomaron muestras en tres horarios (07:00, 14:00 y 21:00hrs), en tres días diferentes (martes, viernes y domingo) de una semana. El diseño de muestreo se presenta en la **Tabla V**.

**Tabla V.** Diseño de muestreo de agua residual.

	Día 1 (martes)	Día 2 (viernes)	Día 3 (domingo)
Hora 1 (07hrs)	12 Muestras	12 Muestras	12 Muestras
Hora 2 (14hrs)	12 Muestras	12 Muestras	12 Muestras
Hora 3 (21hrs)	12 Muestras	<b>12 Muestras</b>	12 Muestras

**12 Muestras:**

- 4 Muestras (replicas) para análisis de Nutrientes.
- 4 Muestras (replicas) para análisis de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO5)
- 4 Muestras (replicas) para análisis de Moléculas Orgánicas Disueltas

La toma de muestras se realizó por cuadruplicado. En total se obtuvieron 36 (9 muestreos con 4 repeticiones cada uno) muestras para análisis de nutrientes, 36 muestras para análisis de demanda bioquímica de oxígeno (DBO5), 36 muestras análisis de compuestos orgánicos. Las variables fisicoquímicas fueron medidas *in situ*.

## MÉTODOS ANALÍTICOS

Los frascos para la toma de muestras fueron previamente enjuagados en el agua residual, posteriormente se procedió a la toma de muestra.

Los frascos utilizados fueron los siguientes (Standard Methods, 2005):

- Nutrientes → Frascos de vidrio de 1litro
- Demanda Biológica de Oxígeno → Botellas Winkler
- Moléculas Orgánicas Disueltos → Frascos de vidrio ámbar de 500ml

Inmediatamente después de su toma, las muestras fueron selladas, rotuladas, enfriadas a 4°C y llevadas a las instalaciones del CIBNOR. Las muestras para DBO5 fueron procesadas inmediatamente y las muestras de nutrientes y fuentes de carbono fueron preservadas en ultracongelación a -80°C en el Laboratorio de Microbiología Ambiental hasta su análisis.

Medidas de temperatura, pH, salinidad, conductividad y turbidez se registraron *in situ* al momento de toma de muestra (Standard Methods, 2005). Los datos de flujo de caudal fueron proporcionados por los operadores de la planta de tratamiento.

A continuación (*Tabla VI*) se presenta las variables analizadas y sus respectivos métodos.

*Tabla VI.* Métodos empleados para el análisis de agua residual.

Variable	Conservación de muestra	Tratamiento de muestra	Método	Referencia
<b>VARIABLES FÍSICOQUÍMICAS</b>				
Flujo	n.a.	n.a.	<i>In situ.</i> Medidor de caudal	Standard Methods, 2005
Temperatura	n.a.	n.a.	<i>In situ.</i> Potenciometro YSI-63	
pH	n.a.	n.a.	<i>In situ.</i> Potenciometro YSI-63	
Salinidad	n.a.	n.a.	<i>In situ.</i> Potenciometro YSI-63	
Conductividad	n.a.	n.a.	<i>In situ.</i> Potenciometro YSI-63	
Turbidez	n.a.	n.a.	<i>In situ.</i> Potenciometro YSI-63	
<b>NUTRIENTES</b>				
Amonio	-80°C	Filtrado por filtros	Autoanalizador de	Standard
Nitrito	-80°C	Wathman no 1.y	iones de flujo	Methods,
Nitrato	-80°C	membranas de poro	continuo FIAS,	2005; Lachat



Fosfato	-80°C	de 0.4µm y 0.2 µm Dilución 1:100 con agua desionizada	Lachat QuikChem series 8000 FIAS+.	Instrument, 1985.
<b>DBO<sub>5</sub></b> DBO <sub>5</sub>	4°C por máximo 12hrs	Dilución al 25% en agua de dilución	Incubación en botellas Winkler de 300mL con 3mg de 2-cloro 6- (triclorometil) piridina para inhibir la nitrificación.  Determinación de Oxígeno Disuelto por método yodométrico	Norma mexicana NMX-AA- 028-SCFI- 2001
<b>Moléculas orgánicas disueltas</b>				
Ac. Acético Ac. Propiónico Ac. Isobutírico Ac. Butírico Ac. Isovalérico Ac. Valérico Ac. Isocaprónico Ac. Caprónico Ac. Heptanóico	-80°C	Filtrado por filtros Wathman no 1.y membranas de poro de 0.4µm y 0.2 µm Dilución 1:100 con agua desionizada.  Acidificación con 0.2mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 50% por mL de muestra Extracción con dietil- éter	Cromatografía de gases acoplada a detector de flama FID. Columna Omegawax Supelco 24136 30x0.35mm Condiciones de horno: T <sub>0</sub> =80°C por 2min, rampa a 8C/min hasta T <sub>1</sub> =140°C Inyección 1µL	Standard Methods, 2005
Aminas primarias	-80°C	Filtrado por filtros Wathman no 1.y membranas de poro de 0.4µm y 0.2 µm Dilución 1:100 con agua desionizada	Colorimétrico OPA en microplaca.	Roth, 1971

n.a = No aplica

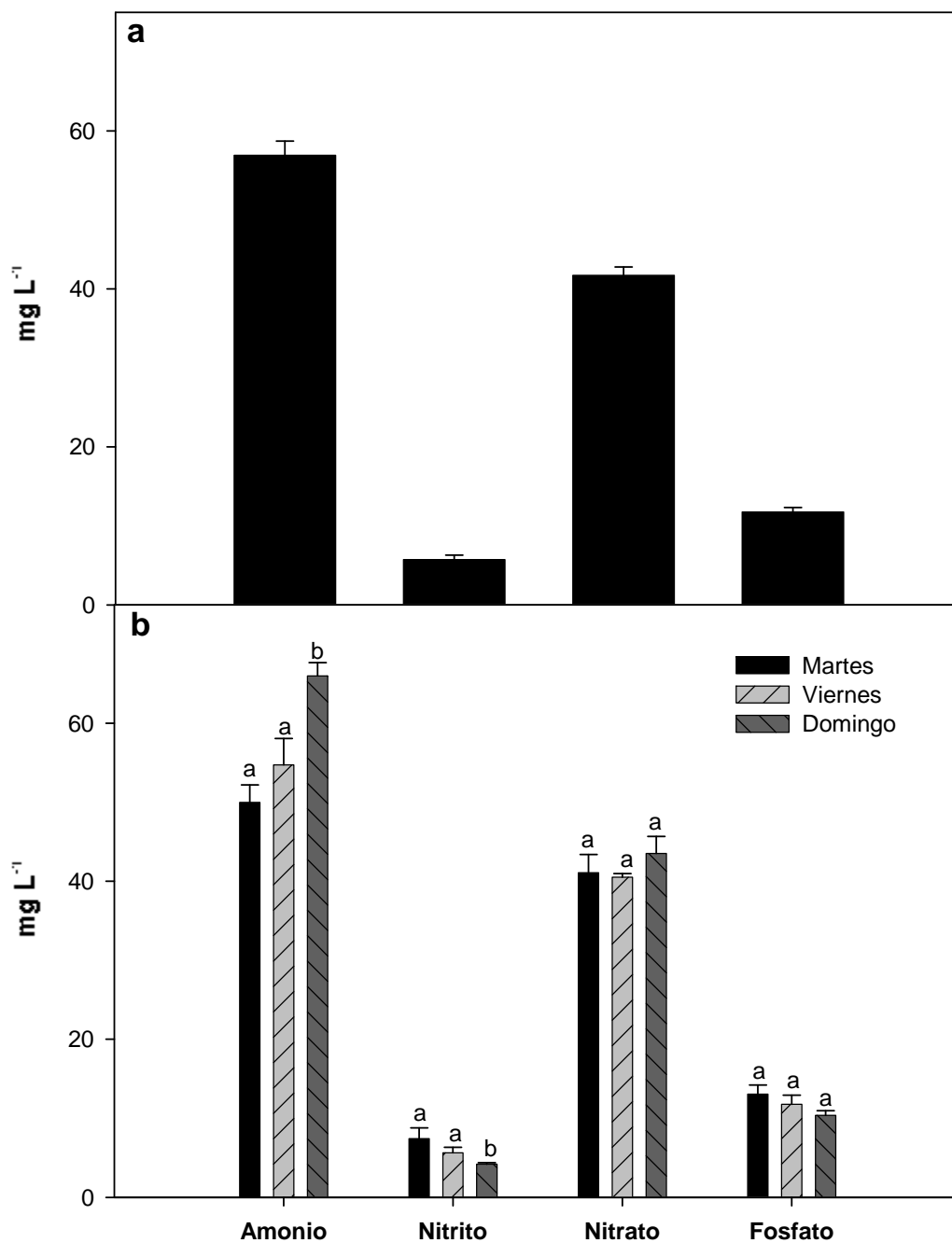
### 2.1.2. RESULTADOS

En la **Tabla VII** se presenta las medias por día de las 21 variables. La última columna presenta la media de los tres días analizados.

**Tabla VII.** Resultados por día de las variables analizadas del agua residual tratada. En todas las variables, para cada día  $n=12$ , en la última columna  $n=36$ . Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los días según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$ .

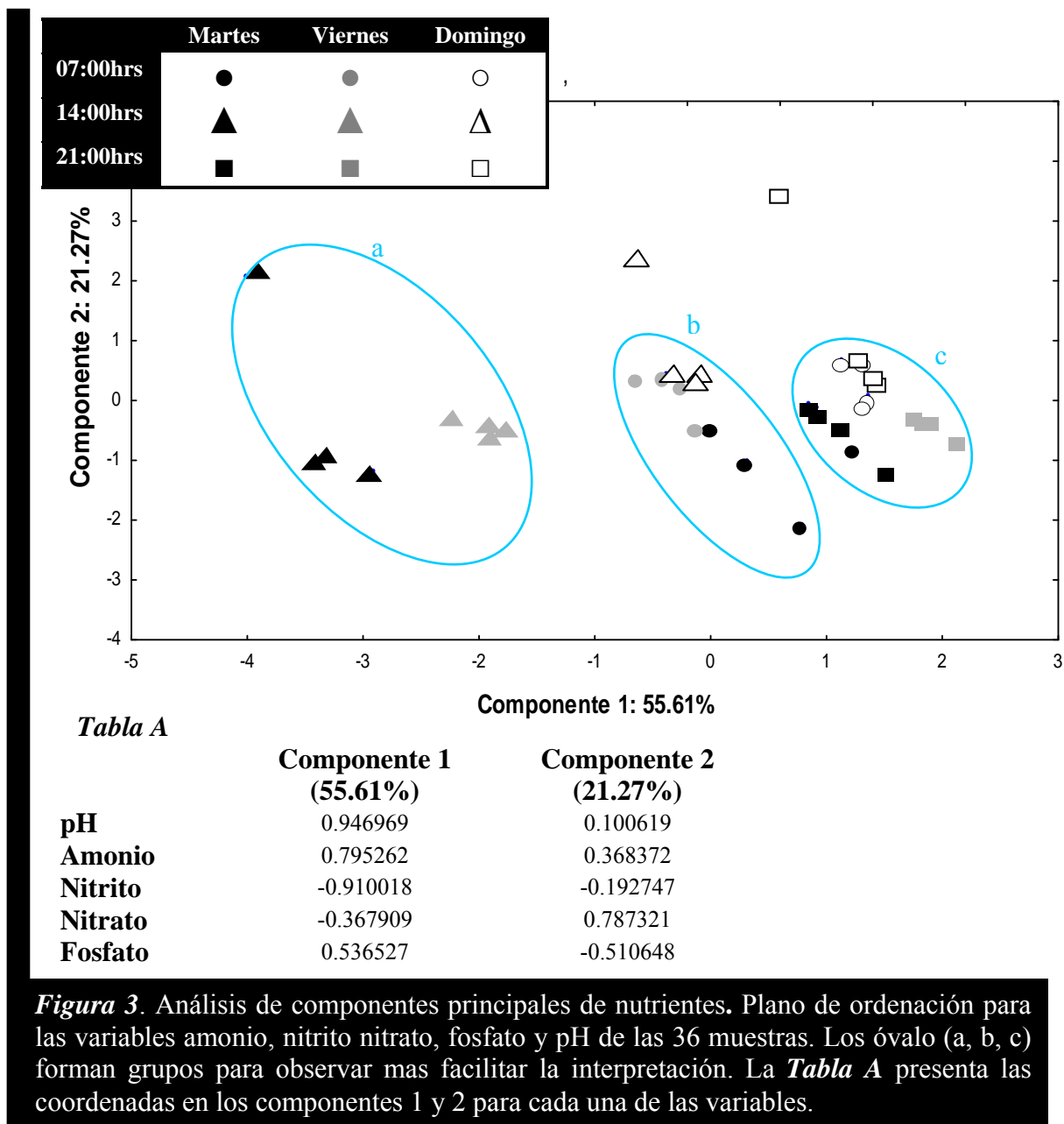
VARIABLE	Unidades	Martes	Viernes	Domingo	Media
<b>Fisicoquímicas</b>					
Flujo	$L s^{-1}$	307.41±26.a	336.59±30.a	351±45.40a	331.70±19.8
Temperatura	$^{\circ}C$	22.96±0.4a	24.25±0.85b	24.83±0.31b	24.01±0.22
pH	<i>pH</i>	7.36±0.02a	7.36±0.01a	7.40±0.00a	7.37±0.02
Salinidad	%	0.11±0.00a	0.11±0.00a	0.106±0.00b	0.108±0.00
Conductividad	$mS cm^{-1}$	2.27±0.00a	2.27±0.00a	2.27±0.00a	2.27±0.00
Turbidez	<i>UTU</i>	2.64±0.07a	2.23±0.01a	5.28±0.20b	3.38±0.23
<b>DBO5</b>					
DBO5	$mgO_2$	18.31±0.78a	20.49±5.32a	29.39±2.13a	22.7±2.04
<b>Moléculas orgánicas disueltas</b>					
Ac. Acético	$\mu g L^{-1}$	23.36±15.7a	86.06±39.1a	314.55±97.b	141.33±40.3
Ac. Propiónico	$\mu g L^{-1}$	0.66±0.66a	0.47±0.47a	0.00±0.00a	0.37±0.26
Ac. Isobutírico	$\mu g L^{-1}$	0.62±0.62a	0.33±0.33a	8.65±8.65a	3.20±2.88
Ac. Butírico	$\mu g L^{-1}$	21.71±9.78a	0.00±0.00a	28.14±19.3a	16.62±7.31
Ac. Isovalérico	$\mu g L^{-1}$	1.65±1.65a	0.00±0.00a	39.92±21.4a	13.85±7.63
Ac. Valérico	$\mu g L^{-1}$	10.28±6.95a	0.00±0.00a	0.00±0.00a	3.42±2.39
Ac. Isocapróico	$\mu g L^{-1}$	11.80±8.06a	7.07±7.07a	31.00±16.8a	16.63±6.68
Ac. Caprónico	$\mu g L^{-1}$	72.00±12.5a	70.93±13.5a	91.21±15.4a	78.05±7.94
Ac. Heptanóico	$\mu g L^{-1}$	72.14±24.6a	31.18±1.62a	42.10±5.37a	48.47±8.70
Aminas primarias	$\mu g L^{-1}$	43.31±4.47a	48.59±5.52a	53.36±4.72a	48.42±2.84
<b>Nutrientes inorgánicos</b>					
Amonio	$mg L^{-1}$	49.98±2.21a	54.72±3.33a	66.00±1.66b	56.90±1.80
Nitrito	$mg L^{-1}$	7.42±1.37a	5.61±0.71ab	4.18±0.19b	5.74±0.55
Nitrato	$mg L^{-1}$	41.09±2.28a	40.50±0.45a	43.51±2.15a	41.70±1.04
Fosfato	$mg L^{-1}$	13.07±1.14a	11.77±1.16a	10.38±0.57a	11.74±0.59

En la **Figura 2** se presenta dos gráficas donde se puede observar las concentraciones encontradas de nutrientes en el agua residual. Se puede observar que la proporción de los 4 nutrientes se mantiene en los 3 días analizados. Las barras representan la media de la muestra, los “bigotes” representan el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre las barras según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$



**Figura 2.** Concentración de nutrientes en agua residual. De las 36 muestras (a), y por día, Martes, Viernes y Domingo (b). Los bigotes señalan el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los días según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$

En la **Figura 3** se presenta un análisis de componentes principales de las 36 muestras tomando en cuenta las variables Amonio, Nitrito, Nitrato, Fosfato y pH.



Sin tomar en cuenta los puntos muestrales del día domingo (figuras blancas), se observa un gradiente de ordenación a lo largo del componente 1, en donde los puntos muestrales de las 14:00hrs (óvalo a) se encuentran a la izquierda del plano influidos por la variable nitritos

principalmente, en seguida de los puntos de las 07:00hrs (óvalo b) y mas a la derecha se agrupan las unidades muestrales de las 21:00hrs (óvalo c) formando un grupo mas compacto principalmente influenciado por las variables pH y amonio, lo que indica que las muestras de las 21:00hrs son muy similares en los valores de las variables analizadas. Las dispersiones entre los puntos de los óvalos (a) y (b) esta dada por diferencias en las concentraciones de nitratos y de fosfatos principalmente. También en este análisis se puede observar la variabilidad entre las repeticiones de cada punto de muestreo

### 2.1.3. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del análisis de 36 muestras de los 3 días, indican que por lo menos en la semana de muestreo, el ambiente fisicoquímico del agua residual del efluente del sedimentador secundario es estable y optimo para los organismos (*Tabla VII*).

No se registraron cambios abruptos de pH y se mantiene en un rango optimo  $\text{pH}=7.3\pm 0.02$ . Datos obtenidos por de Bashan (2004) indican un rango de pH entre 6.3 y 7.9 en agua residual de la misma planta. No se observo tanta variación en las muestras del presente análisis, sin embargo tomando en cuenta ambas estudios no hay indicios para establecer que el pH del agua residual pueda ser una variable limitante para el cultivo de *C. vulgaris* o *A. brasilense*.

En cuanto a la temperatura de Bashan (2008c) registró un valor de  $36.6^{\circ}\text{C}$  durante el verano (agosto) del 2003 en el agua residual de la misma planta de tratamiento, lo cual supera en  $12.6^{\circ}\text{C}$  la temperatura media de invierno registrada en el presente trabajo. Con estos datos podemos establecer un rango de temperatura entre los  $24-37^{\circ}\text{C}$  del agua residual. Posiblemente el crecimiento de *C. vulgaris* se vea afectado en los extremos más altos de temperatura de este rango ya que este organismo es una especie nativa de aguas templadas con temperaturas de  $19.7^{\circ}\text{C}$  (Gonzalez *et al.*, 1997). Otras especies del genero *Chlorella* como *C. sorokiniana* podrían ser utilizadas en el tratamiento de aguas en condiciones altas del rango de temperatura (de Bashan, 2008c).

La salinidad y la conductividad son mucho mas bajas a las encontradas por de Bashan (2004) en análisis del agua residual de la misma planta en temporada de verano.

En el presente trabajo las muestras (datos de invierno) presentaron valores de pH, temperatura, salinidad, conductividad y turbidez estables y beneficios para el crecimiento de *C. vulgaris* y *A. brasilense* y no deben de representar una limitante para su cultivo en estas muestras.

El análisis de DBO5 y de las diversas moléculas orgánicas indica que las muestras de agua residual tratada no contienen fuentes de carbono orgánico en cantidades capaces de sustentar el cultivo quimoheterotrófico de los organismos.

Los valores DBO5 entran dentro de la norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996 con valores máximos permisibles de 70-200mg de consumo de O<sub>2</sub> según sea el caso. Por los datos obtenidos, las muestras tienen poca materia orgánica susceptibles de ser oxidada por los microorganismos. Los datos de DBO5 obtenidos por de Bashan (2004) en temporada de verano son mas altos a los encontrados en este análisis.

Los valores de los diversos ácidos orgánicos y de las aminas primarias están en una escala menor a 1mg L<sup>-1</sup>. Estas moléculas corresponde a la fracción acida hidrofílica (AHi) de la materia orgánica del agua residual (Imai *et al.*, 2002) (Consultar **ANEXO 2**). La molécula orgánica con mayor presencia fue el acido acético, aun así, los valores son muy bajos comparados con los 10g L<sup>-1</sup> utilizados en el cultivo heterotrófico de microalgas (Ogbonna *et al.*, 2000). También las concentraciones de aminas primarias son del orden de microgramos similares a los valores de aminoácidos libres encontradas por Confer *et al.* (1995) en el agua residual.

Esta baja concentración de moléculas orgánicas representantes de las fracciones ácidas y básicas hidrofílicas (BHi y AHi) de la materia orgánica disuelta (MOD), son coherentes con los valores encontrados por Imai *et al.* (2002), estas concentraciones puede ser debidas a la actividad microbiana del sistema de lodos activados y al tratamiento por los sedimentadores que específicamente reducen las concentraciones de la MOD incluyendo el COD (Katsoyiannis *et al.*, 2007). Estos autores ha encontrado concentraciones de 3.7 y 22

mg L<sup>-1</sup> de COD en aguas residuales tratadas (Katsoyiannis *et al.*, 2007) (Consultar **ANEXO 2**).

La Materia Orgánica Disuelta (MOD), cambia su perfil través de los sistemas de tratamiento de agua residual a partir de que una fracción considerable no es biodegradable y puede ser descargada en ecosistemas acuáticos con el efluente tratado (Katsoyiannis *et al.*, 2007). Las materia orgánica del agua residual cruda que sirven para sostener el crecimiento de los organismos es rápidamente asimilada por las comunidades microbianas durante el proceso de tratamiento, dejando en el agua solo la materia orgánica recalcitrante por su tamaño y carácter químico (Grady *et al.*, 1994). Esta MO esta constituida principalmente por fracciones hidrofóbicas (AHO y BHO) (Ilani, 2005) y a su vez es ensamblada en sustancias húmicas de gran peso molecular (Logan y Jiang, 1990). lo cual la hacen no biodisponible y no bioasimilable para los organismos (Law, 1980; Confer y Logan, 1995).

A partir de los datos aportados en el presente trabajo (**Tabla VII**) y de los datos presentados en el **ANEXO 2**, se concluye que es necesario agregar una fuente de carbono orgánico al agua residual tratada de origen doméstico para cultivar a *C. vulgaris* y *A. brasilense* quimioheterotroficamente. Trabajos realizados por Olguin *et al.* (2003) y de Ogbonna (2000) indican que la ficoremediación usando el crecimiento quimioheterotrófico de las microalgas, es factible en aguas residuales que contengan altas concentraciones de materia orgánica como por ejemplo las provenientes de agroindustrias como ingenios azucareros o rastros ganaderos.

Los nutrientes amonio, nitrito, nitrato y fosfato están en concentraciones tales que el efluente requiere un tratamiento terciario por estar fuera de los valores establecidos en la NOM-001-SEMARNAT-1996 (**Figura 2**). Aunque puede haber variaciones de las concentraciones entre los diferentes días y horas de la semana, estas no son significativas ni abruptas. *C. vulgaris* soporta un amplio rango de 20-250mg L<sup>-1</sup> de amonio en el medio (Tam y Wang, 1996). El amonio puede ser toxico para *C. vulgaris* solo en casos donde el valor pH se mayor a 8 (Abeliovich y Azov 1976), pero esta condición no fue encontrada en

las muestras analizadas. Se han reportado aislamientos de cepas de *C. vulgaris* creciendo en agua residual con concentraciones de 36.6mg L<sup>-1</sup> (Gonzalez *et al.*, 1997). En cuanto al fósforo se ha observado que *C. vulgaris* puede soportar concentraciones de hasta 100mg L<sup>-1</sup> de fosfato sin ser afectada la tasa de crecimiento y la de consumo de fosfato (Robinson *et al.*, 1989). Las concentraciones de nutrientes encontradas en este análisis son mayores a las encontradas por de Bashan (2004) en la misma planta de tratamiento durante el verano con valores de amonio de 0.1-4.26mg L<sup>-1</sup>; nitrito de 4-5.8mg L<sup>-1</sup> y fosfatos (ortofosfato) de 4.1mg L<sup>-1</sup>, lo que implicaría una deficiencia de amonio y fosfato durante la temporada de verano. Las concentraciones y proporciones de amonio y fosfato de las muestras analizadas son óptimas para el crecimiento de microalgas.

A partir del análisis de componentes principales (**Figura 3**), se puede inferir los cambios en las proporciones de nutrientes a través del día y de la semana. De manera general en todos los días a las 14:00hrs la concentración de nitrito alcanzan sus valores más altos del día, mientras que las concentraciones de amonio y pH tienen los valores más bajos del día (40-50mg L<sup>-1</sup> y 7-7.5 respectivamente). Así mismo, a las 21:00hrs se registran los valores más altos de amonio, fosfato y pH. No se observa algún gradiente o patrón definido en las concentraciones de fosfato, aunque tiende a aumentar conforme transcurre la semana. Las variaciones de nutrientes de los días martes y viernes son más similares entre sí, comparadas con las variaciones del día domingo.

Estas variaciones pueden ser utilizadas para formular las proporciones de nutrientes N y P inorgánicos de futuros medios de cultivo que simulen aguas residuales.

Comparando los valores totales de los 4 nutrientes por día, no hay diferencias significativas en las proporciones 10:1:7:2 de las concentraciones de amonio, nitrito, nitrato y fosfato. La proporción N:P inorgánicos en los tres días fue 9:1

Tomando en cuenta los análisis anteriores, el tratamiento terciario del efluente es necesario para disminuir las concentraciones de nutrientes, estas concentraciones y las proporciones N:P son adecuadas para realizar este tratamiento por un proceso de fitoremediación. Sin



embargo, las concentraciones y proporciones de amonio, nitratos y fosfato encontradas en este análisis (en temporada invernal) son diferentes a las encontradas por de Bashan *et al.* (2004) en la temporada de verano en misma planta de tratamiento (Nitrógeno total  $>55\text{mg L}^{-1}$ ; nitratos,  $4\text{--}5.18\text{mg L}^{-1}$ ; amonio,  $0.1\text{--}4.26\text{mg L}^{-1}$ ; fosfato:  $4.1\text{mg L}^{-1}$ ; BOD,  $53\text{--}133\text{mg L}^{-1}$ ; conductividad,  $1633\text{ mScm}^{-1}$  y pH,  $6.3\text{--}7.9$ ). Por lo que es necesario tomar en cuenta las fluctuaciones anuales de las variables analizadas si se esta pensando en un proceso a gran escala.

## **2.2. CRECIMIENTO HETEROTRÓFICO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN**

### **2.2.1. MÉTODOS**

El análisis del agua residual tratada analizada no ofrece evidencia para concluir que el efluente puede soportar el crecimiento quimoheterotrófico de *C. vulgaris* y/o *A. brasilense*. El efluente no contiene carbono orgánico biodisponible para los organismos.

Dada esta observación, se analizó el efecto de adicionar al medio de cultivo diferentes moléculas orgánicas, en el crecimiento quimoheterotrófico de células en suspensión de *C. vulgaris* y *A. brasilense* en cultivos axénicas.

### **ORGANISMOS Y PREPARACIÓN DE INÓCULOS**

Para los experimentos se utilizó el organismo *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714), University of Texas, Austin, TX. La microalga es mantenida en refrigeración en placas de agar-caldo nutritivo o en condiciones axénicas en el medio mineral C30 (composición en g L<sup>-1</sup>) KNO<sub>3</sub>, 25; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1; (en µg L<sup>-1</sup>) H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2.86; MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 1.81; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.11; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.09; NaMoO<sub>4</sub>, 0.021), en agitación continua de 120r.p.m., a 27-30°C y una intensidad luminosa de 60µE m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>.

Para preparar a la microalga para los experimentos, una asada abundante de biomasa de microalga es tomada a partir del crecimiento masivo de placas de petri con agar caldo nutritivo o 10mL de cultivo de *C. vulgaris* crecido con anterioridad en medio C30, son utilizados para inocular 100 o 90mL de medio C30 fresco y estéril. Este inóculo es mantenido durante 5-7 días en las condiciones mencionadas para tener un cultivo fresco de *C. vulgaris* en fase de crecimiento exponencial.

*Azospirillum brasilense* Cd (DSM 7030) Braunschweig, Germany, es mantenido en placas de agar enriquecido con caldo nutritivo (Sigma) o en el medio estéril líquido OAB libre de nitrógeno composición (en g L<sup>-1</sup>): KOH, 4.8; ácido málico, 5; NaCl, 1.2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.13; CaCl<sub>2</sub>, 0.22; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.17; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.4; NaHCO<sub>3</sub>, 0.5; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.09; Fe(III)EDTA, 0.07; solución stock (en mg L<sup>-1</sup>): MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.2; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.2; ZnCl<sub>2</sub>, 0.15; CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2.0) a una temperatura de 35±2°C, con una agitación de 120r.p.m. por 17 horas (Bashan *et al.*, 1993).

Antes de ser usado para los experimentos *A. brasilense* es crecido en 50mL del medio líquido estéril TyG durante 24 horas y resembrado (3mL de inóculo) en 50mL frescos del mismo medio. Este inóculo se incuba durante 24h. Después de esta segunda incubación *A. brasilense* está en crecimiento exponencial, joven y fresco para ser utilizado en los experimentos. La composición del medio TyG se presenta a continuación (en g L<sup>-1</sup>): NaCl, 1.2; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.13; CaCl<sub>2</sub>, 0.22; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.17; NH<sub>4</sub>Cl, 1; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.4; NaHCO<sub>3</sub>, 0.5; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.09; Fe(III)EDTA, 0.07; Triptona, 5; Glucosa, 5; Extracto de levadura, 5. Una vez que se esteriliza el medio se ajusta el pH a 7 con KOH 1M.

## **MEDIO DE CULTIVO**

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones controladas en el medio de cultivo Medio Residual Sintético (MRS) que simula las características minerales del agua residual (de Bashan *et al.*, 2002a). En la **Tabla VIII** se presenta la composición de MRS y sus variantes, así como la composición de otros medios de cultivo utilizados en experimentos de tratamiento de agua residual. El medio de cultivo utilizado en los experimentos es el **MRS+N**, el cual es el medio MRS publicado por de Bashan *et al.* (2002) y modificado con las concentraciones medias de amonio y fosfato encontradas en el agua residual en el previo análisis descrito en la sección 2.1.

**Tabla VIII.** Composición de MRS y otros medios usados como agua residual artificial. Todos los datos están en mg L<sup>-1</sup>, excepto donde se indica.

Reactivo	MRS <sup>1</sup>	MRS+A <sup>2</sup>	B11 <sup>3</sup>	SWW <sup>4</sup>	N-8 <sup>5</sup>	MRS+N
NaCl	7	7				7
CaCl <sub>2</sub>	4	4			13	4
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	2	75	100	50	2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	21.7	21.7	3	60		21.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	8.5	8.5			740	8.5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	33.4	33.4			260	25
NH <sub>4</sub> Cl	10	10*	20	100		191
KNO <sub>3</sub>		24*		20	1000	
NaNO <sub>3</sub>			3			
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O			36	14		
Ácido cítrico			6			
Citrato de amonio Ferrico			6			
EDTA			1			
Fe EDTA					10	
NaCO <sub>3</sub>			20			
Metales traza			1ml/L			
Solución A6						
KCl				30		
Citrato Fe				0.1		
Solución SL7				0.3ml		
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·18H <sub>2</sub> O					3.58µg L <sup>-1</sup>	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O					12.9µg L <sup>-1</sup>	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O					1.83µg L <sup>-1</sup>	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O					3.2µg L <sup>-1</sup>	
Extracto de levadura				1		
Acetato				5000		
Propionato				1000		
Caldo Nutritivo		2.7				
Arabinosa		1000				
Buffer HEPES			5mM			
pH final	7.0	8.0	7.3-7.4	7.0		6.7

<sup>1</sup> (de Bashan *et al.*, 2002a)

<sup>2</sup> (de Bashan *et al.*, 2005)

<sup>3</sup> (Shi *et al.*, 2006; Stanier *et al.*, 1971)

<sup>4</sup> (Ogbonna *et al.*, 2000, )

<sup>5</sup> (Lee y Lee, 2002; Mandalam y Palsson, 1998)

\* NH<sub>4</sub>Cl y KNO<sub>3</sub> son alternados uno del otro como fuente de N

Con la formulación de MRS+N, el medio residual de experimentación tiene valores de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> de 50mg L<sup>-1</sup> y de P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de 12mg L<sup>-1</sup>. Las diferentes fuentes de carbono añadidas a MRS+N se mencionaran en cada uno de los experimentos.

## CONDICIONES DE CULTIVO y MÉTODOS ANALÍTICOS

Los experimentos se realizaron en cultivos en lote en tubos de vidrio de 50mL con volumen final de 10mL y en matraces Erlenmeyer de 500mL con volumen final de 100mL. Las condiciones de cultivo se especifican en la **Tabla IX**, también se indican los métodos analíticos empleados durante los experimentos. Condiciones como volumen final del cultivo, intensidad de luz y concentración de moléculas orgánicas serán especificadas según cada experimento.

**Tabla IX.** Condiciones de cultivo de experimentos de células en suspensión.

Variables	Condición	Método analítico
<i>Chlorella vulgaris</i>	Inoculo 1:10 del volumen final del cultivo (10 y 100mL) Cada mL de inoculo tiene una concentración de $1 \times 10^7$ células/mL	Conteo directo en microscopio con cámara Neubauer (Bright line counting chamber, Hauser Scientific Company Harsham, PA, USA). usando un software analizador de imágenes Image Pro Plus
<i>Azospirillum brasilense</i>	Inoculo de 1:10 según el volumen de cultivo. Cada mL de inoculo de cultivo bacteriano en fase exponencial tiene una concentración aproximada de $1 \times 10^9$ células/mL o densidad óptica de 1Abs a 540nm	Conteo directo de células viables teñidas con Fluorescein diacetato (FDA de sus siglas en ingles) en microscopio con lámpara de fluorescencia. (Chrzanowski <i>et al.</i> , 1984)
Medio de cultivo	Medio Residual Sintético MRS+N	No aplica
P- $\text{PO}_4^{3-}$ inicial	12mg L <sup>-1</sup>	No analizado
N- $\text{NH}_4^+$ inicial	50mg L <sup>-1</sup>	Mediciones de muestras diluídas 1:50 en agua desionizada por el Metodo colorimetrico del Fenato (Solorzano, 1969) adaptado a microplaca por Hernández –López y Vargas-Albores (2003).
Temperatura	28°C	Termómetro convencional
pH	6.7	Potenciometro convencional
Agitación	120rpm	No aplica

Duración	10 días	No aplica
Esterilización	Medio MRS+N esterilizado por filtración en membranas de 0.4µm, 0.2µm. Loas materiales fueron esterilizados por autocable durante 20 minutos a una presión de 180Pa	Confirmación de condiciones estériles del medio de cultivo por medio de plaques en agar caldo nutritivo

---

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron 6 experimentos que se detallan a continuación:

**1-Cultivos de *C. vulgaris* en agua residual real.** Cultivos de *C. vulgaris* en 100mL de agua residual real (muestras del día viernes las 14:00hrs) en matraces de 500mL en completa oscuridad. Numero de tratamientos:6. Numero de replicas: 3. Numero de repeticiones: 2. Tiempo de duración de cultivo: 10 días. Toma de muestra cada día. Análisis realizados: conteos directos de *C. vulgaris*. Los resultados fueron comparados por una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $p \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1 Agua Residual Real 1 (ARR1)
- 2 Agua Residual Real 2 (ARR2)
- 3 Agua Residual Real 2 (ARR3)
- 4 Medio C30
- 5 Solución Salina (SS)
- 6 Caldo Nutritivo al 2%

**2- Cultivos de *C. vulgaris* en MRS+N con diferentes fuentes de carbono.** Cultivos en completa oscuridad de *C. vulgaris* en 10mL de MRS+N adicionado con diferentes fuentes de carbono realizados en tubos de ensaye de 50mL. Se utilizaron 13 tratamientos diferentes, dados por 10 fuentes de carbono diferentes mas un

control sin carbono orgánico, mas un control no inoculado. Cada experimento tiene 13 tratamientos diferentes los cuales fueron realizados por triplicado. Numero de repeticiones del experimento: 2. Duración de cultivo: 10 días. Toma de muestra los días 0, 1, 5 y 10. Análisis realizados: conteos directo de células y mediciones de amonio presente en el medio de cultivo. Los resultados fueron comparados por una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $p \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de No inoculado
- 2 MRS+N +10 g L<sup>-1</sup> de Sin fuente carbono orgánico
- 3 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de D-Glucosa
- 4 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de L-Arabinosa
- 5 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de D-Fructosa
- 6 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de Acetato de sodio
- 7 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de Citrato de sodio
- 8 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de DL-Ácido málico
- 9 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de DL-Ácido láctico
- 10 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de Ácido acético neutralizado con KOH
- 11 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de Peptona
- 12 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de Urea
- 13 MRS+N +10g L<sup>-1</sup> de Ácidos fúlvicos

### **3- Cultivos de *A. brasilense* en MRS+N con diferentes fuentes de carbono.**

Cultivos de *A. brasilense* en 10mL de MRS+N adicionado con diversas fuentes de carbono realizados en tubos de ensaye de 50mL. Se utilizaron 13 tratamientos diferentes, dados por 10 fuentes de carbono diferentes mas un control sin carbono orgánico, mas un control no inoculado. Cada experimento tiene 13 tratamientos diferentes. Numero de replicas de cada tratamiento: 3. Numero de repeticiones de experimento: 2. Duración de cultivo: 10 días. Toma de muestra: días 0, 1, 5 y 10. Análisis realizados: conteos de células viables por tinción FDA. Los resultados

fueron comparados por una prueba ANOVA con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $P \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron los siguientes:

1	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	No inoculado
2	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Sin fuente carbono orgánico
3	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	D-Glucosa
4	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	L-Arabinosa
5	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	D-Fructosa
6	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Acetato de sodio
7	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Citrato de sodio
8	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	DL-Ácido málico
9	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	DL-Ácido láctico
10	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Acido acético neutralizado con KOH
11	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Peptona
12	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Urea
13	MRS+N +10g L <sup>-1</sup> de	Ácidos fúlvicos

- 4- Cultivos de *C. vulgaris* con acetato y glucosa.** Cultivos de *C. vulgaris* en 100mL de MRS+N adicionado con diversas fuentes de carbono en matraces Erlenmeyer de 500mL, en completa oscuridad. Se utilizaron 8 tratamientos diferentes, dados por 6 fuentes de carbono diferentes mas un control sin carbono orgánico, mas un control sin carbono orgánico y con luz fluorescente. Cada experimento tiene 8 tratamientos diferentes los cuales fueron realizados por triplicado para dar un total de 24 cultivos. Numero de repeticiones del experimento: 2. Duración de cultivo: 10 días. Toma de muestra: días 0, 1, 3, 5 y 10. Análisis realizados: conteos directo de células. Los resultados fueron comparados por una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $P \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron los siguientes:

1	MRS+N	Sin C orgánico
2	MRS+N	Sin C orgánico + Luz (60 $\mu$ E/m <sup>2</sup> /s)



- 3 MRS+N +0.06M de D-Glucosa
- 4 MRS+N +0.12M de D-Glucosa
- 5 MRS+N +0.06M de Sacarosa
- 6 MRS+N +0.06M de Acetato como sal de Na
- 7 MRS+N +0.06M de Acetato como sal de Ca
- 8 MRS+N +0.06M de Acetato como vinagre comercial de manzana

**5- Cultivos de *C. vulgaris* en MRS+N con acetato y glucosa a diferentes concentraciones.** Cultivos de *C. vulgaris* en 100mL de MRS+N adicionado con diversas fuentes de carbono en matraces Erlenmeyer de 500mL, en completa obscuridad. Se utilizaron 8 tratamientos diferentes, dados por 3 concentraciones diferentes de glucosa, 3 concentraciones diferentes de acetato de sodio, un tratamiento fotoautotrófico y un control son fuentes de carbono y sin luz. Cada experimento tiene 8 tratamientos diferentes los cuales fueron realizados por triplicado. Numero de repeticiones del experimento: 2. Duración de cultivo: 5 días. Toma de muestra: día 0 y 5. Análisis realizados: conteos directo de células y mediciones de amonio del medio. Los resultados fueron comparados por una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $P \leq 0.05$ . Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1 Control Sin C orgánico
- 2 Fotoautotrófico Sin C orgánico + Luz ( $60\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )
- 3 MRS+N +0.06M de Acetato como sal de Na
- 4 MRS+N +0.06M de D-Glucosa
- 5 MRS+N +0.12M de Acetato como sal de Na
- 6 MRS+N +0.12M de D-Glucosa
- 7 MRS+N +0.18M de Acetato como sal de Na
- 8 MRS+N +0.18M de D-Glucosa

**6- Cultivos de *C. vulgaris* en agua residual adicionada con carbono orgánico.** Cultivos de *C. vulgaris* en 100mL de agua residual real (ARR) esterilizada por doble filtración con tamaño de poro de 0.2y MRS+N adicionados con glucosa o

acetato en matraces erlenmeyer de 500mL, en completa oscuridad. Se utilizaron 8 tratamientos diferentes, dados por 4 tratamientos en agua residual real y 4 tratamientos en MRS+N, los cuales fueron realizados por triplicado. Repeticiones del experimento: 2. Duración de cultivo: 5 días. Toma de muestra: día 0 y 5. Análisis realizados: conteos directo de células y mediciones de amonio. Comparadas por una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $P \leq 0.05$ . Los tratamientos fueron los siguientes:

1	ARR	Sin C orgánico y sin Luz
2	MRS+N	Sin C orgánico y sin Luz
3	ARR	Fotoautotrofico ( $90\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )
4	MRS+N	Fotoautotrofico ( $90\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )
5	ARR+ 0.06M de	Acetato
6	MRS+N + 0.06M de	Acetato
7	ARR+ 0.06M de	D-Glucosa
8	MRS+N + 0.06M de	D-Glucosa

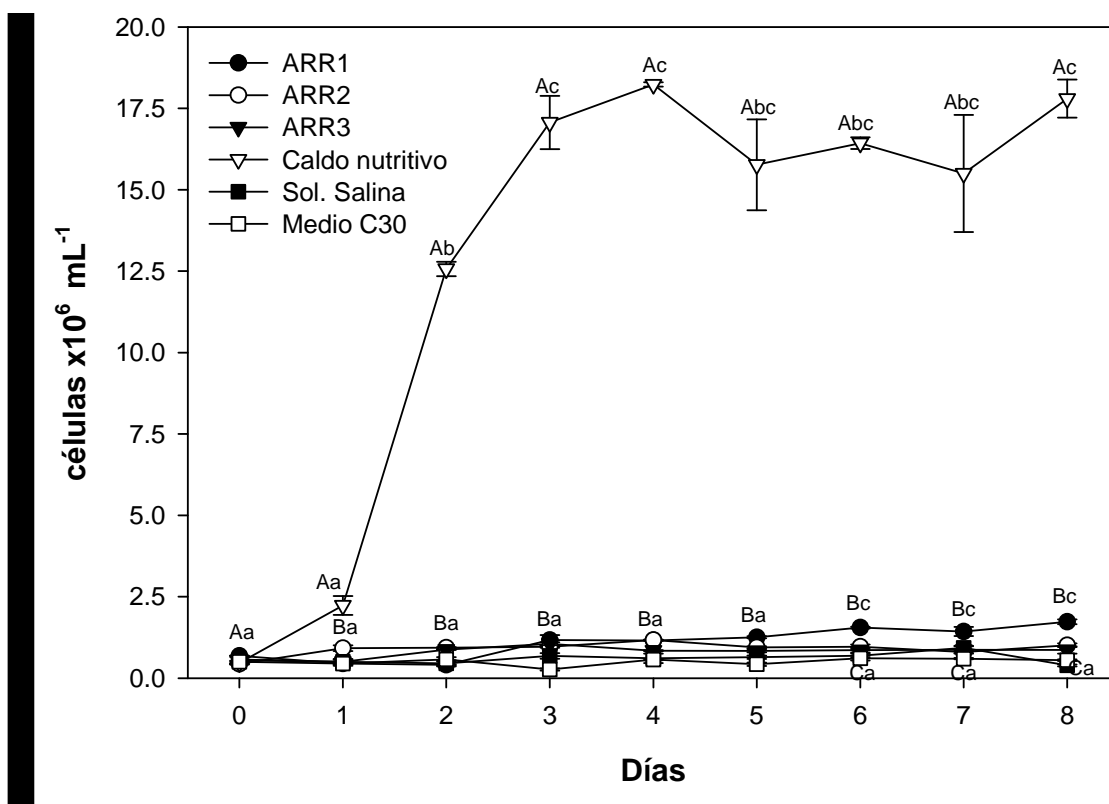
### **2.2.2. RESULTADOS y DISCUSIONES**

A continuación se presentan los resultados enumerados como en el diseño experimental del apartado 2.2.1. de métodos, en la sección de diseño experimental. En todas las figuras los puntos y las barras indican la media muestral. Los bigotes señalan el error estándar. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los días de un tratamiento. Diferentes letras mayúsculas indican deferencias significativas entre los tratamientos en un mismo día, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$ . Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA, Versión 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

#### **EXPERIMENTO 1. Cultivos de *C. vulgaris* en agua residual real**

**RESULTADOS.** Como se observa en la **Figura 4**, de los seis tratamientos utilizados. *C vulgaris* solo pudo crecer en caldo nutritivo, alcanzando concentraciones de  $1.7 \times 10^7$  células

por mL en aproximadamente tres días. El resto de los días *C. vulgaris* no aumenta su población lo que se interpreta como una fase estacional del crecimiento. En ninguno de los cultivos hechos con ARR hubo crecimiento de *C. vulgaris*, no hay diferencias significativas entre los días de un solo tratamiento ni entre los tres tratamientos de ARR en el mismo día. No hubo aumento de la concentración celular en los cultivos en medio C30 y en solución salina. El medio C30 tiene las concentraciones ideales de N y P para *C. vulgaris*, con este experimento se comprueba que este medio solo es nutritivo en presencia de luz.



**Figura 4.** Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en agua residual real en completa oscuridad. (ARR)=Agua Residual Real. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo día, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

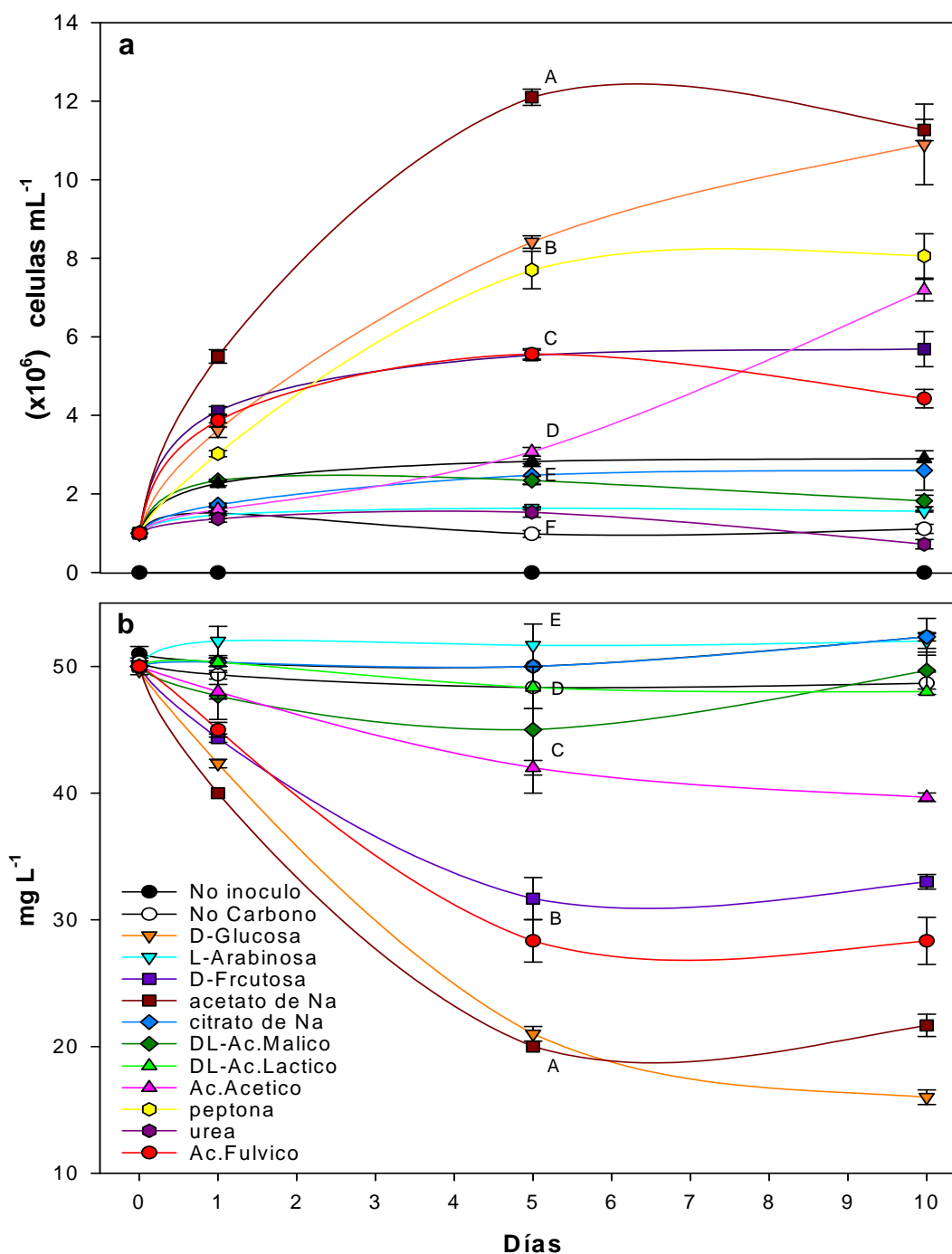
**DISCUSIÓN.** Los resultados de este experimento apoyan la hipótesis que pugna que las muestras de agua residual tratada (por un proceso de lodos activados) no contienen fuentes de carbono orgánico biodisponibles para el crecimiento quimioheterotrófico de la

microalga *C. vulgaris*. a pesar de que el agua residual contenía los valores de nutrientes apropiados ( $56.3 \pm 1.8 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ ;  $6.38 \pm 0.51 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Ninguno de los cultivos con agua residual real presentó aumento en la población. El número de células por mL se mantuvo a través del tiempo. Las *C. vulgaris* creció bien en completa obscuridad en caldo nutritivo, alcanzando densidades poblacionales de  $1.7 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

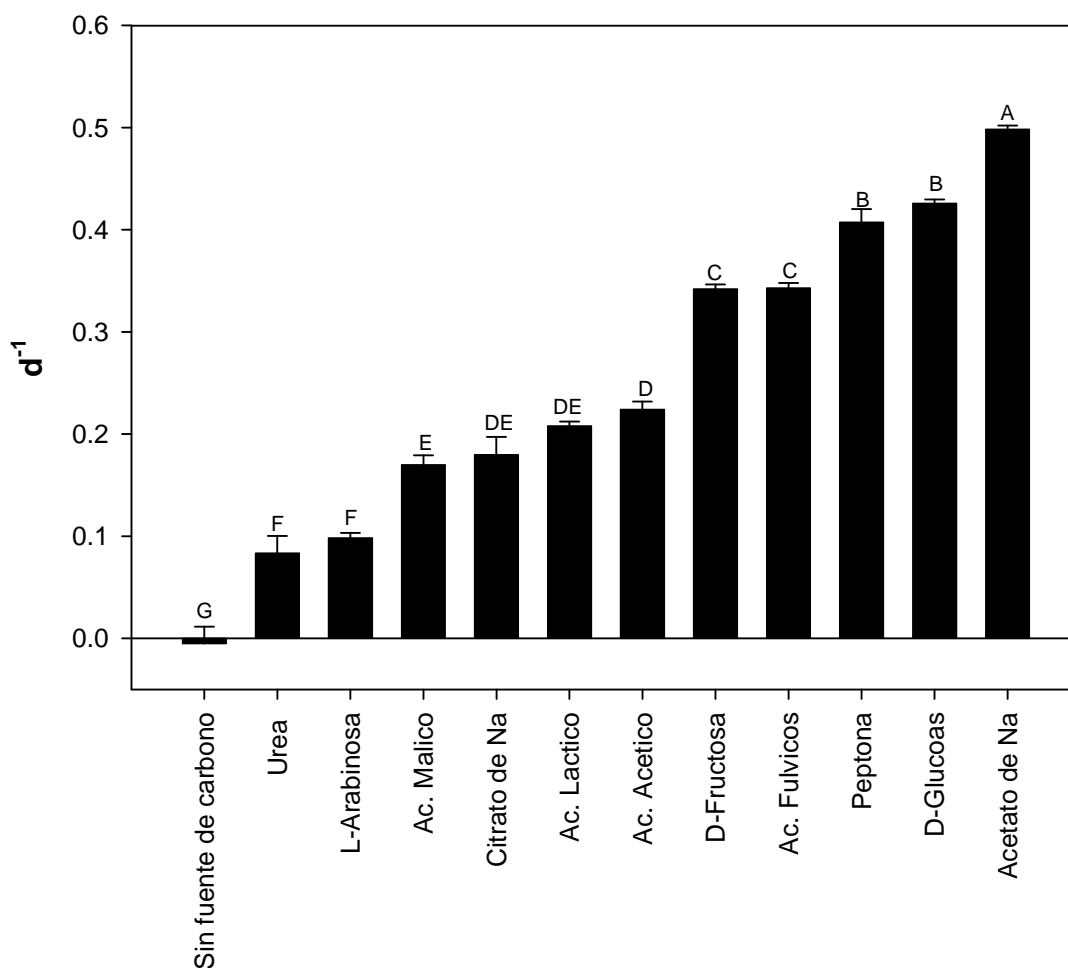
Se comprueba que *C. vulgaris* es capaz de crecer quimoheterotroficamente en completa obscuridad y que la microalga no crece si no hay carbono orgánico o luz.

## **EXPERIMENTO 2. Cultivos de *C. vulgaris* en MRS+N con diferentes fuentes de carbono.**

**RESULTADOS.** Las curvas obtenidas del crecimiento de *C. vulgaris* en diferentes fuentes de carbono en completa obscuridad mostradas en la **Figura 5** muestran que las mayores concentraciones celulares se obtuvieron usando acetato de sodio como fuente de carbono en cultivos quimoheterotróficos. Las tasas de crecimiento de la **Figura 6** también respaldan esta conclusión. Seguido del acetato, con glucosa y peptona también se pueden alcanzar altas densidades celulares, aunque no hay diferencias significativas entre estas dos. También se observó un buen crecimiento con fructosa y ácidos fúlvicos, con estos últimos se obtuvo la tercera mejor remoción de amonio. En acetato *C. vulgaris* no es tan activa para asimilar amonio como lo es estando en glucosa. Menos células creciendo en glucosa eliminan la misma cantidad de amonio del medio que las que crecen en acetato (**Figura 5b**). Es importante destacar que no fue posible medir amonio en los medios MRS+N enriquecidos con peptona y urea (**Figura 5b**), por que se presentaba una saturación en la reacción cromófora del método del fenato, aun haciendo diluciones. Aunque esta prueba es específica para medir amonio libre, las altas concentraciones ( $10 \text{ g L}^{-1}$ ) de urea y aminas primarias afectaron la especificidad de la reacción.



**Figura 5.** Cultivos de *C. vulgaris* en MRS+N con diferentes fuentes de carbono. **(a)**-Curvas de crecimiento. **(b)**-Curvas de eliminación de amonio. En la grafica (a) diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos de las concentraciones celulares al 5to día. En la grafica (b) las diferencias significativas son de concentración de amonio en el medio.



**Figura 6.** Tasa de crecimiento de *C. vulgaris* en MRS+N con diferentes fuentes de carbono. Las tasas ( $\mu$ ) fueron calculadas en el periodo de tiempo del día 0 al 5. Diferentes letras indican diferencias significativas en las tasas de crecimiento de los tratamientos. Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ), fueron calculadas con la siguiente formula  $\mu = (\ln N_f - \ln N_0) / T_f - T_0$ . Donde  $N_1$  y  $N_2$  son el numero de células/mL al tiempo  $T_0$  y  $T_f$  respectivamente y  $T_0$  = tiempo inicial (día 1) y  $T_f$  = tiempo final (día 5).

**DISCUSIÓN.** En este experimento (2) se muestran las curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en completa obscuridad en el medio MRS+N suplementado con diferentes fuentes de carbono. También se muestran la disminución de la concentración de amonio en el medio.

Todos los cultivos se encuentran en fase estacionara en el quinto día, a excepción de los cultivos con glucosa y con ácido acético que presentaron un aumento en la densidad

poblacional en los recuentos del décimo día. Esto nos da indicios de que posiblemente estos sustratos no han sido consumidos en su totalidad y todavía se encuentren disponibles en el medio.

Los cultivos suplementados con acetato de sodio fueron los que presentaron la mayor densidad celular ( $1.2 \times 10^7$ ) al quinto día. Seguido por los cultivos suplementados con glucosa y peptona. Así mismo, estos mismos cultivos fueron los que presentaron mayor disminución en la concentración de amonio. Se ha reportado ampliamente que el crecimiento quimioheterotrófico de *Chlorella* en acetato y glucosa (consultar **ANEXO 7**).

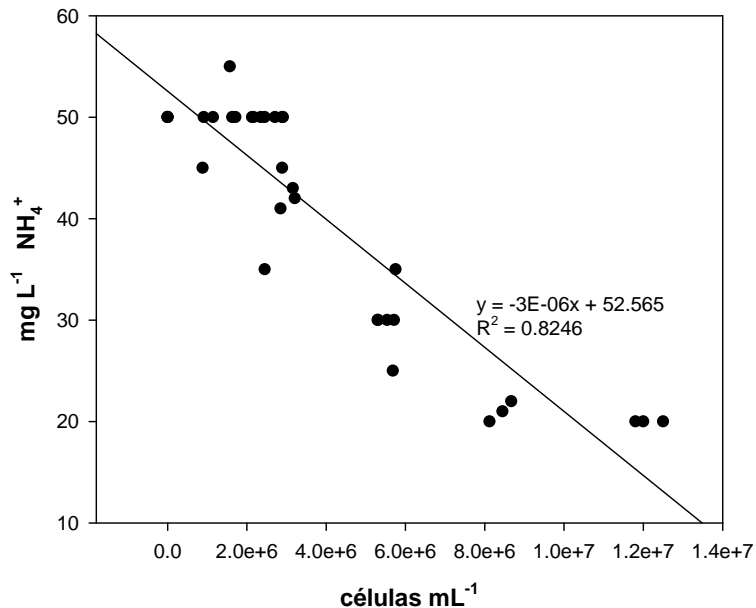
Ogawa y Aiba, (1981) reportan una tasa de crecimiento de  $0.098 \text{h}^{-1}$  de *C. vulgaris* en  $10 \text{g L}^{-1}$  de Glucosa en Cultivo en lote. Esta tasa es menor a la de  $0.44 \text{d}^{-1}$  encontradas en este estudio en las mismas condiciones En cultivos con acetato de sodio ( $5 \text{g L}^{-1}$ ) en completa obscuridad de *Chlorella sorokiniana*, Ogbonna *et al.* (2000) reportan una tasa de  $2.0 \text{d}^{-1}$ . Esta tasa es 3 veces más alta la de  $0.5 \text{d}^{-1}$  encontradas en este estudio. Estas diferencias posiblemente sean debido a las condiciones de cultivo, principalmente composición del medio.

En los cultivos con urea y peptona no fue posible medir la concentración de amonio por la saturación del color azul generado, esta saturación se puede deber a dos cosas: 1-la reacción para medir amonio por el método del fenato es sensible a la presencia de aminas primarias y secundarias como los son los aminoácidos y la urea, lo cual es improbable dado la especificidad de la prueba (Standard Methods, 2005) o 2- La microalga secreta amonio al medio por un exceso de nitrógeno dentro de las rutas metabólicas dado por el consumo de moléculas nitrogenadas. Se ha observado que *C. vulgaris* excreta amonio en cuando nitrato es suministrado como fuente de nitrógeno en condiciones de privación de  $\text{CO}_2$  y fosfato (Di Martino Rigano *et al.*, 1985). Independientemente del amonio presente en el medio, en cultivos con peptona se presenta un crecimiento con tasas de  $0.41 \text{d}^{-1}$ , similares a las alcanzadas con glucosa lo que indica que la peptona puede ser suministrada como fuente de carbono. Los aminoácidos glicina, serina, alanina, ácido glutámico son una buena fuente de nitrógeno en cultivos fotoautotróficos de *Chlorella* (Syrett, 1981). Y en completa obscuridad usando glucosa como fuente de carbono (Neilson y Larsson, 1980). En

contraste con los resultados reportados en el presente trabajo, Neilson y Lewin (1974), argumentan que el uso de aminoácidos como fuente de carbono es un fenómeno que no se presenta en las microalgas a excepción de algunos casos como el del caso de *Euglena gracilis*.

Poco crecimiento se observó en los cultivos quimioheterotróficos adicionados con urea (**Figura 5a**). Se sabe que las microalgas pueden utilizar a la urea transformándola a amonio (usando las enzimas ureasa o el sistema urea carboxilasa/alofenato hidrolasa) como fuente de nitrógeno en cultivos fotoautotróficos (Syrett, 1981). Nielson y Larsson (1980) reportan un buen crecimiento de *Chlorella* en condiciones de completa obscuridad en el medio DB con urea pero usando glucosa como fuente de carbono.

Eliminando los datos de los cultivos con urea y peptona donde un fue posible cuantificar el amonio del medio, se puede establecer una correlación negativa de con un valor  $r^2=0.82$  entre la densidad poblacional y la concentración de amonio presente en el medio (**Figura 7**). Lo que significa que en células en suspensión independientemente de las fuentes de carbono, a mayor número de células producidas menor es la concentración de amonio del medio. De esta manera *C. vulgaris* está tomando activamente el amonio del medio siempre y cuando la fuente de carbono pueda suministrar los esqueletos de 2-oxoglutarato para la síntesis de aminoácidos a partir de amonio (Huppe y Turpin, 1994).

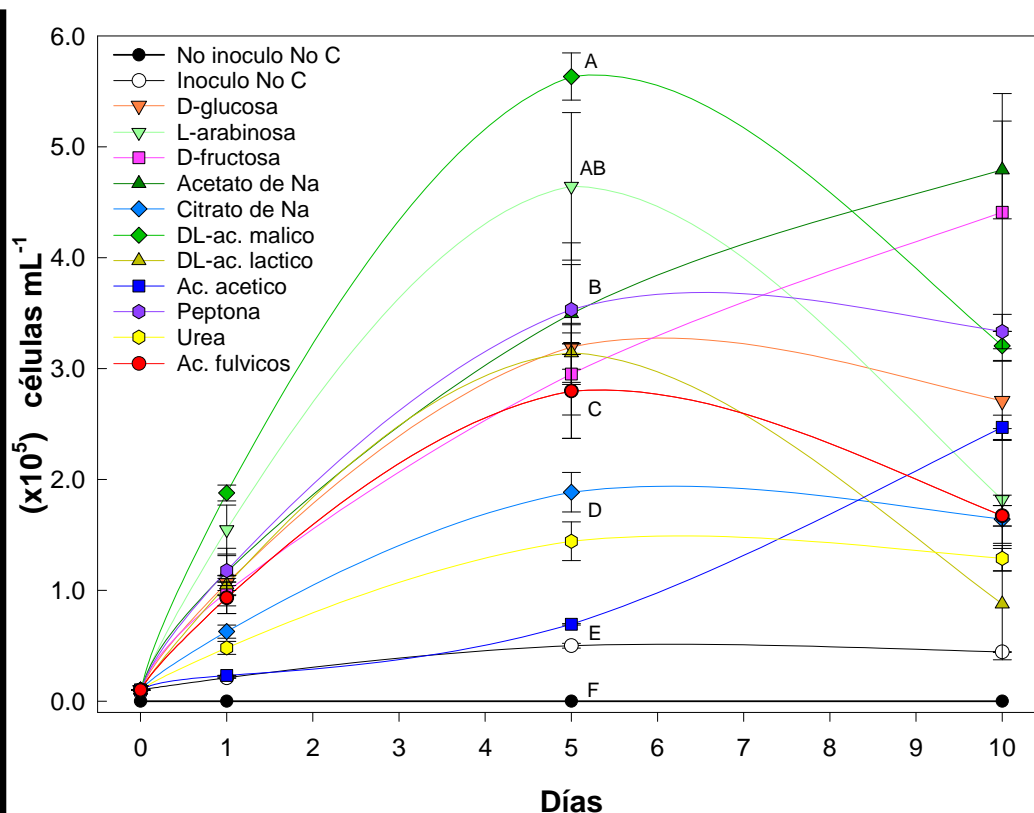


**Figura 7.** Gráfica de correlación entre el número de células/mL y la concentración de amonio.  $R^2=0.82$

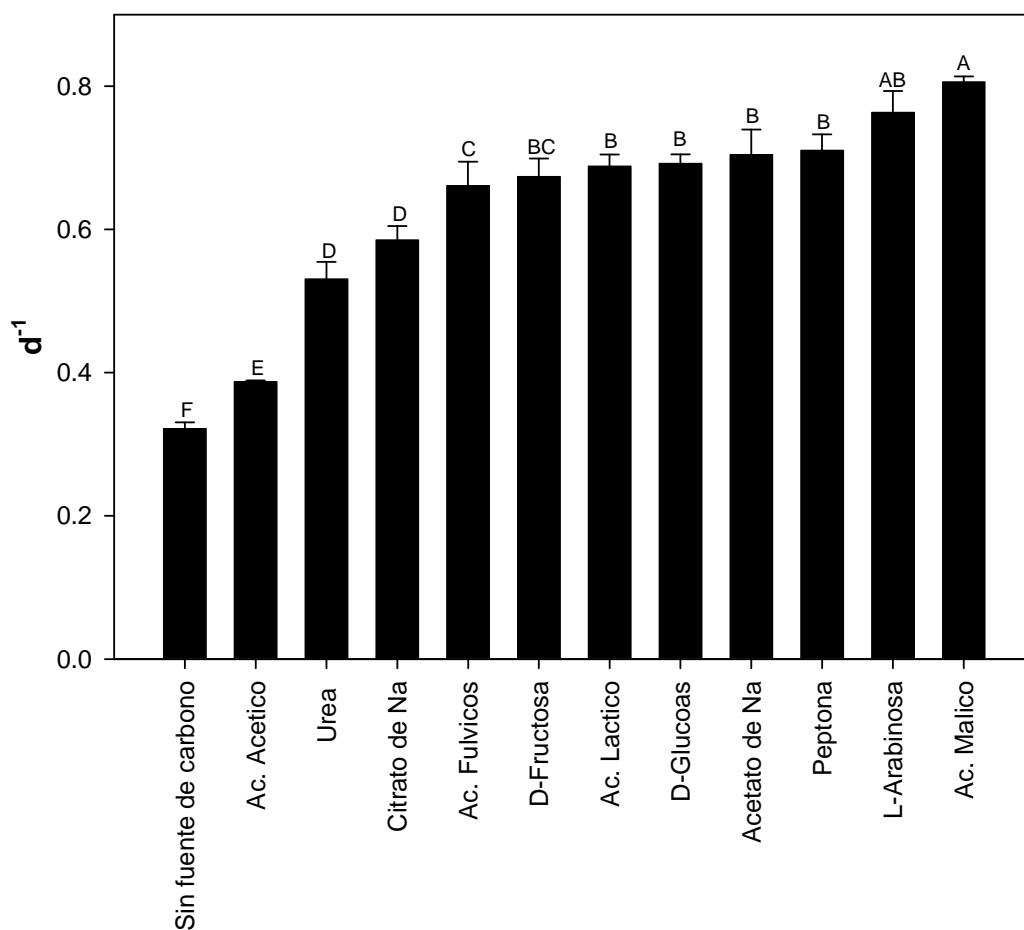


### EXPERIMENTO 3. Cultivos de *A. brasilense* en MRS+N con diferentes fuentes de carbono

**RESULTADO.** Ácido málico fue el sustrato que generó mayor concentración celular de *A. brasilense* al quinto día, seguido del tratamiento con arabinosa (**Figura 8**). Posteriormente, peptona, acetato, glucosa, ácido láctico, fructosa y ácidos fúlvicos, producen concentraciones celulares aproximadas de  $3 \times 10^5$  al quinto día, no se observó distinción en el crecimiento utilizando estos 6 tratamientos. A pesar de esto, el crecimiento en acetato y fructosa al quinto día, tiende a aumentar, ya que en el décimo día las concentraciones se elevan a  $5 \times 10^5$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Esta tendencia también se observó en el tratamiento con ácido acético. En todos los tratamientos excepto en acetato, ácido acético y fructosa, el número de células disminuye al décimo día.



**Figura 8.** Curvas de crecimiento de *A. brasilense* en diversas fuentes de carbono. Diferentes letras indican diferencias significativas en las concentraciones celulares al 5to día, entre los tratamientos.



**Figura 9.** Tasa de crecimiento de *A. brasilense* en MRS+N con diversas fuentes de carbono. Las tasas ( $\mu$ ) fueron calculadas en el periodo de tiempo del día 1 al 5. Diferentes letras indican diferencias significativas en las tasas de crecimiento de *A. brasilense* en los distintos tratamientos. Las tasas de crecimiento ( $\mu$ ), fueron calculadas con la siguiente formula  $\mu = (\ln N_f - \ln N_0) / (T_f - T_0)$ . Donde  $N_1$  y  $N_2$  son el numero de células/mL al tiempo  $T_0$  y  $T_f$  respectivamente y  $T_0$  = tiempo inicial (día 1) y  $T_f$  = tiempo final (día 5).

**DISCUSIÓN.** En este experimento, el ácido málico y la L-arabinosa fueron los sustratos orgánicos en los que mas creció *A. brasilense*, seguido de peptona y acetato de sodio.

Cabe destacar que aunque la adición de fuentes de carbono a al medio de cultivo de *A. brasilense*, produce densidades máximas de  $5 \times 10^5$  células  $mL^{-1}$  en 5 días usando acido málico, estas son muy bajas comparadas con las  $1 \times 10^9$  células  $mL^{-1}$  generadas en dos días en medios de cultivos enriquecidos como el TyG (sección 2.2.1). De esta observación se

concluye que el medio MRS+N no es apropiado para el cultivo de *Azospirillum brasilense* y que por el contrario este organismos se encuentra estresado y pobremente se mantiene creciendo a bajas tasas a expensas de sus reservas energéticas. Además del bajo contenido de nutrientes del medio mineral MRS+N para *A. brasilense*, otras variables fisicoquímicas como exceso de O<sub>2</sub> disuelto, pueden contribuir al pobre crecimiento de *A. brasilense*, ya que este organismo es microaerofílico. El crecimiento celular de especies del genero *Azospirillum* se ven favorecidos en condiciones microaerofílicas (Bashan *et al.*, 2004).

En la **Tabla X** se muestran calificaciones asignadas a las diversas fuentes de carbono tomado en cuenta el número de diferencias significativas entre ellas para las variables de número de células de *C. vulgaris* y *A. brasilense* por mL y concentración de amonio del medio. De esta manera por ejemplo para la variable numero de células de *C. vulgaris*, hay 5 niveles o grupos de diferencias significativas a los cuales a cada uno se asigno una numeración ascendente.

**Tabla X.** Tabla de calificaciones asignadas a las diferentes fuentes de carbono de los experimentos 2 y 3. Las calificaciones fueron asignadas por el numero de diferencias significativas obtenidas a partir del crecimiento de *C. vulgaris*; el crecimiento de *A. brasilense* y de la eliminación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por *C. vulgaris* del medio MRS+N. El total indica la suma de las calificaciones de las tres variables.

Fuente de carbono	Crecimiento de <i>C. vulgaris</i>	Crecimiento de <i>A. brasilense</i>	Eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Suma de variables
Acetato de Na	5	4	4	13
D-Glucosa	4	3	4	11
D-Fructosa	3	3	3	9
Ac. Fúlvico	3	3	3	9
Peptona	4	4	0	8
Ac. Málico	2	5	1	8
L-Arabinosa	1	5	1	7
Ac. Láctico	2	3	1	6
Citrato de Na	2	2	1	5

Ac. Acético	2	1	2	5
Urea	1	2	0	3
Sin fuente de carbono	1	1	1	3
No inoculado	0	0	1	1

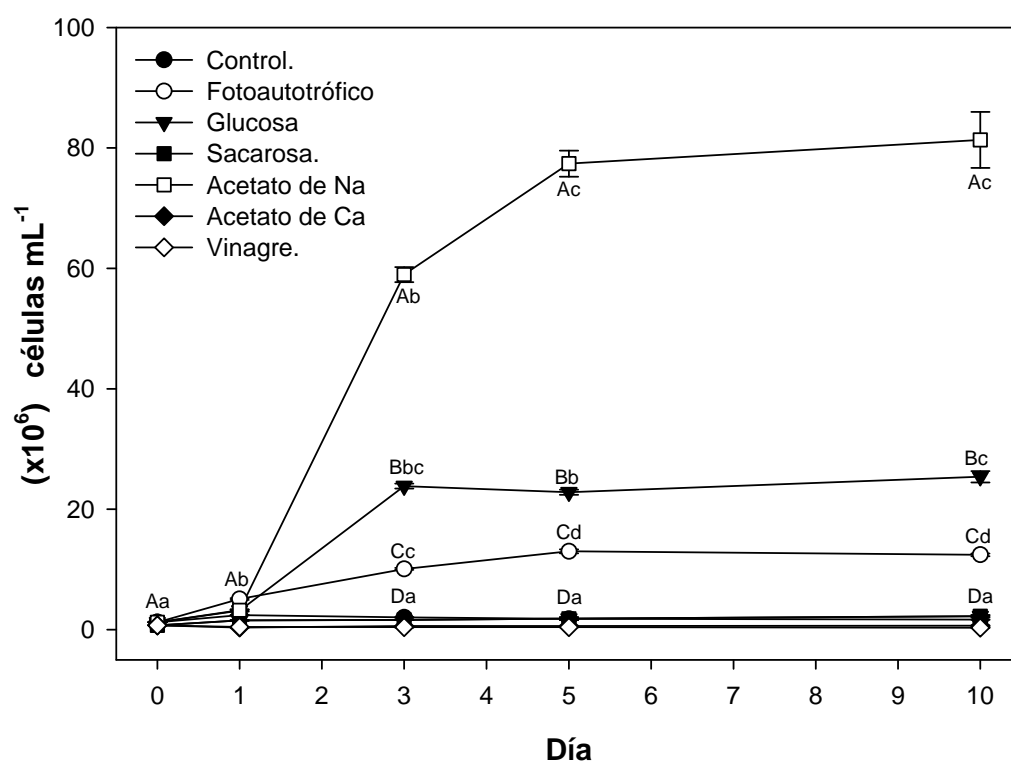
Según las calificaciones obtenidas tomando en cuenta las tres variables, acetato de sodio (con 13 puntos) es el sustrato que favoreció más el crecimiento de *C. vulgaris* y *A. brasilense* y en el que las concentraciones de amonio fueron las más bajas. Después de acetato, los cultivos con D-glucosa (11 puntos) son los más eficientes en el aumento de células y disminución de amonio. D-fructosa y los ácidos fúlvicos también son eficientes tomando en cuenta las tres variables.

Por los anteriores datos y por sus bajos costos, D-glucosa y acetato de sodio son las moléculas candidatas más fuertes para ser utilizadas como fuentes de carbono en cultivos quimoheterotróficos de *C. vulgaris*. En condiciones aeróbicas, la glucosa es metabolizada por glicólisis vía la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y por la ruta de las pentosas-fosfato. Ambas rutas comparten la formación inicial de la glucosa-6-fosfato. El principal producto de la ruta EMP es el piruvato, en la ruta de las pentosas-fosfato con la producción de ribosa fosfato y CO<sub>2</sub> (Neilson y Lewin, 1974). La principal ruta de asimilación de acetato es a través del ciclo del glioxilato para producir malato a partir del acetil-Coenzima A y del glioxilato, y citrato a partir del acetil-Coenzima A y del oxaloacetato en el glioxisoma (peroxisoma especializado en este ciclo) (Neilson y Lewin, 1974).

#### **EXPERIMENTO 4. Cultivos de *C. vulgaris* en glucosa y acetato.**

**RESULTADOS.** Solo en los tratamientos fotoautotrófico, D-glucosa y acetato de Na se presentó un incremento en el número de células por mL (**Figura 10**). Siendo el más elevado el crecimiento en acetato de sodio, alcanzando hasta  $8 \times 10^7$  células mL<sup>-1</sup> al quinto día de cultivo. En estos tratamientos los cultivos entran en fase estacionaria a partir del

quinto día en acetato y del tercer día en glucosa, más allá de estos días, no hay aumento en el número de células. En el caso de Entre los días 0 y 1, se observa poco aumento de la densidad celular lo que puede ser interpretado como una fase lag de crecimiento de las células. El mayor incremento del número de células se presenta entre los días 1 y 3 del cultivo lo que se interpreta como una fase de crecimiento exponencial. En los tratamientos control, sacarosa, acetato de Ca y vinagre, no se registró ningún incremento en el número de células, pero tampoco una disminución



**Figura 10.** Curvas de crecimiento de *C. vulgaris* en medio MRS+N enriquecido con glucosa o acetato. Todas las fuentes de carbono tienen una concentración de 0.12M. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en un mismo día, según pruebas ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

**DISCUSIÓN.** En este experimento, células *C. vulgaris* a diferentes carbohidratos (D-glucosa y sacarosa comercial) y acetato (acetato de sodio, acetato de calcio y vinagre

comercial). También se utilizó un control fotoautotrófico sin fuentes de carbono orgánico. No se registró crecimiento en los cultivos con sacarosa comercial, acetato de calcio, y vinagre.

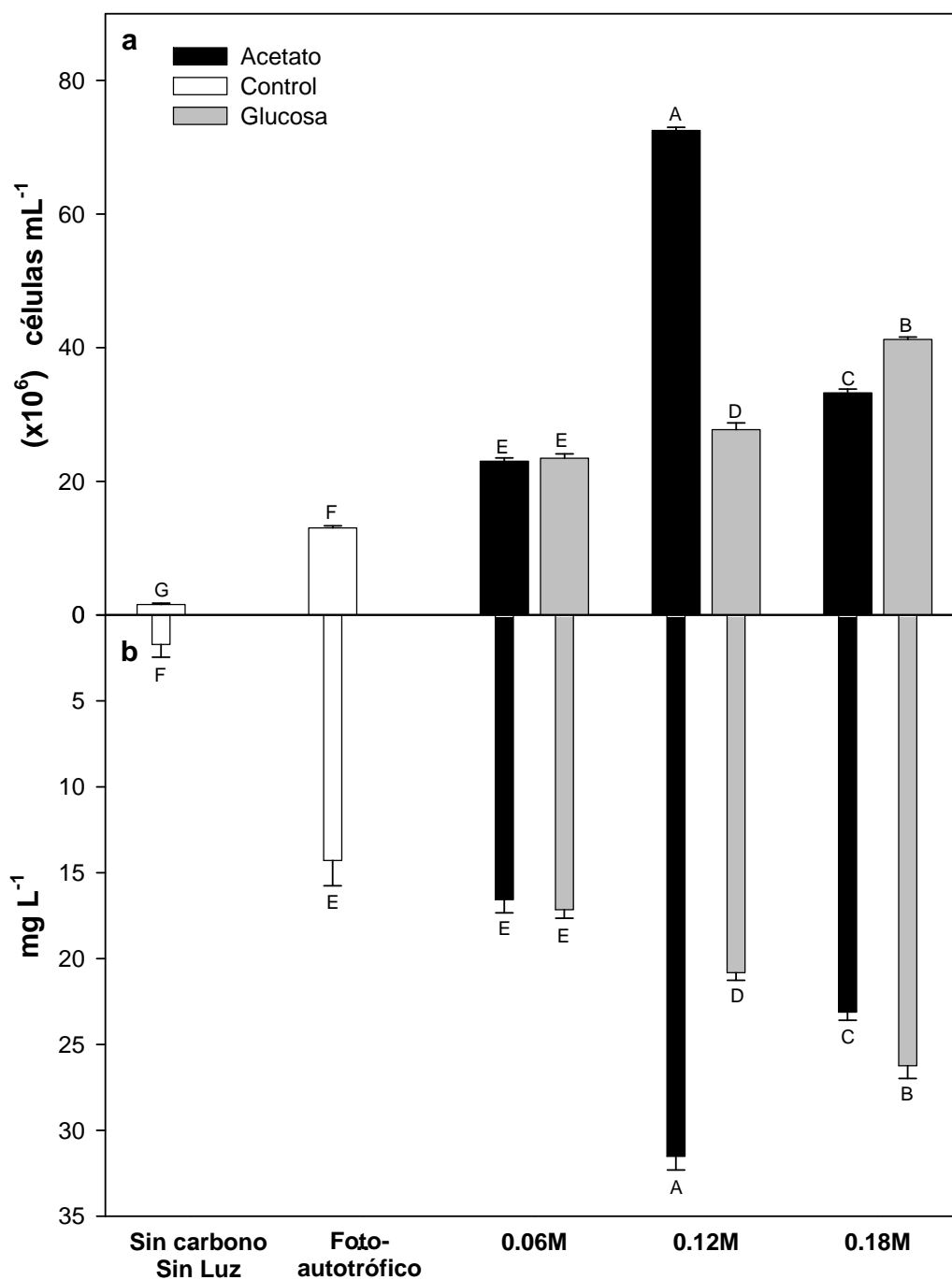
El nulo crecimiento de *C. vulgaris* en sacarosa es contradictorio ya que esta registrado que especies de clorofitas son capaces de crecer heterotroficamente usando disacáridos como sacarosa (Nielson y Lewin, 1974).

El nulo crecimiento en acetato de calcio puede ser debido al exceso de iones  $\text{Ca}^{2+}$  (0.125M) en el medio. Se ha reportado que concentraciones de 0.5M de  $\text{Ca}^{2+}$  comienzan a disminuir el crecimiento, el nitrógeno total, la cantidad de lípidos y ácidos grasos totales, en cultivos fotoautotróficos de *C. vulgaris* (Macarthy and Patterson, 1974). Pero no se encontraron referencias con el efecto de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el crecimiento heterotrófico de *C. vulgaris*. En los cultivos con acetato como vinagre de manzana comercial no aumentaron de población, esto podría ser a causa de los agentes antimicrobianos (como el metabisulfito de sodio al 0.02%)

De nuevo el tratamiento en donde mayor número de células se alcanzaron, fue el de acetato de sodio, esta vez se registraron densidades celulares de  $7.8 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ . El aumento en el número de células de *C. vulgaris* en acetato de sodio comparado con los datos obtenidos en el experimento 2 ( $1.2 \times 10^7$  células  $\text{mL}^{-1}$ ) posiblemente es debido a la mayor eficiencia del intercambio gaseoso y mezclado de los cultivos en matraces Erlenmeyer de 500mL con un volumen de cultivo de solo 100mL. Se puede asumir que es importante tomar en cuenta la proporción entre el volumen de cultivo y el contenedor para optimizar el intercambio gaseoso y el mezclado, ya que la generación de condiciones anóxicas en el cultivo afecta drásticamente el crecimiento quimoheterotrófico de la microalga (Behens, 2005; Ogawa y Aiba, 1981).

#### **EXPERIMENTO 5. Cultivos de *C. vulgaris* en MRS+N con acetato y glucosa a diferentes concentraciones.**

**RESULTADOS.** En el experimento 5 (*Figura 11a*), se reafirmó que bajo



**Figura 11.** Cultivos de *C. vulgaris* en MRS+N con glucosa o acetato. Todos los cultivos tuvieron una concentración inicial  $\approx 1.1 \times 10^6$  células por mL. **(a)**-Número de células mL<sup>-1</sup> al quinto día de cultivo. **(b)**-Amonio en mg L<sup>-1</sup> consumido por *C. vulgaris* al quinto día de cultivo, la escala se encuentra invertida. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

las condiciones experimentales, la concentración óptima de acetato para el crecimiento de *C. vulgaris* se encuentra próxima los de 0.12M (o 10g L<sup>-1</sup>). Un incremento en la concertación de acetato a 0.18M (o 14.7g L<sup>-1</sup>) no aumentó la densidad celular de los cultivos comparado con los de concentraciones de 0.12M de acetato

En el caso de glucosa, no se observaron aumentos cuantiosos en la densidad poblacional al aumentar la concertación de glucosa de 0.06M (o 11g L<sup>-1</sup>) a 0.12M (o 22g L<sup>-1</sup>) y hasta 0.18M (o 32g L<sup>-1</sup>). Posiblemente la tasa de crecimiento máxima de *C. vulgaris* usando el sustrato glucosa se encuentra dada por concentraciones entre 0.12-0.18M.

Los consumos de amonio son proporcionales a las densidades poblacionales en cada uno de los tratamientos (**Figura 11b**), siendo el tratamiento con acetato a 0.12M donde se cuantifico la menor cantidad de amonio del medio.

**DISCUSIÓN.** La disminución en las densidades poblacionales obtenidas al aumentar la concentración de acetato a 0.18M se pudo haber presentado por una disminución del pH del medio debido al consumo de amonio (Tam y Wong, 1996) y/o la respiración (Kaplan *et al.*, 1987) estimulada por la asimilación del acetato. Es conocido que *Chlorella vulgaris* crece con rendimientos de  $Y=25.6\text{g}$  de peso seco por mol de acetato asimilado (Richmond, 1987). En cultivos de *C.sorokiniana*, Ogonna (2000) reporta que en un rango de 0.35 a 10g L<sup>-1</sup> de acetato no hay efecto significativo en la tasa de crecimiento (2.0d<sup>-1</sup>) pero el crecimiento es completamente inhibido en concentraciones de 15g L<sup>-1</sup>, lo cual concuerda con los datos obtenidos en este estudio en donde el crecimiento disminuye el numero de células en los cultivos con 14.7g L<sup>-1</sup> de acetato. En estos mismos experimentos Ogonna *et al.*, (2000) reportan una eliminación del 100% de amonio de un total de 20mg L<sup>-1</sup> en cultivos de con concentraciones de acetato menores de 10g L<sup>-1</sup>. En el presente trabajo se registro una disminución de 30mg L<sup>-1</sup> de amonio del medio con la concentración 0.12M (10g L<sup>-1</sup>) lo cual concuerda con a bibliografía

En los cultivos con glucosa a concentraciones de 0.6M (11g L<sup>-1</sup>) y de 0.12 (22g L<sup>-1</sup>) no se registro un cambio drástico en el numero de células por mL. Posiblemente en estas concentraciones *C. vulgaris* se encuentre próxima a su máximo de asimilación de glucosa.



Posiblemente el fenómeno de disminución de la velocidad de crecimiento se deba a inhibición por exceso de sustrato. El exceso de sustrato orgánico presente en el medio inhibe el crecimiento de los organismos, por ejemplo Chen (1996) encontró que la máxima concentración (o concentración inhibitoria) de glucosa a la que puede crecer *Chlorella sorokiniana* es  $20\text{g L}^{-1}$ , con un aumento de esta concentración el crecimiento celular es severamente inhibido. Lo que contrasta con los  $35\text{g L}^{-1}$  de glucosa añadidas a cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* alcanzando densidades de  $14\text{g L}^{-1}$  por Ogbonna *et al.* (1997). Esto puede ser una desventaja ya que generalmente se requieren altas concentraciones de sustrato para alcanzar una alta densidad celular en el tiempo mas corto posible.

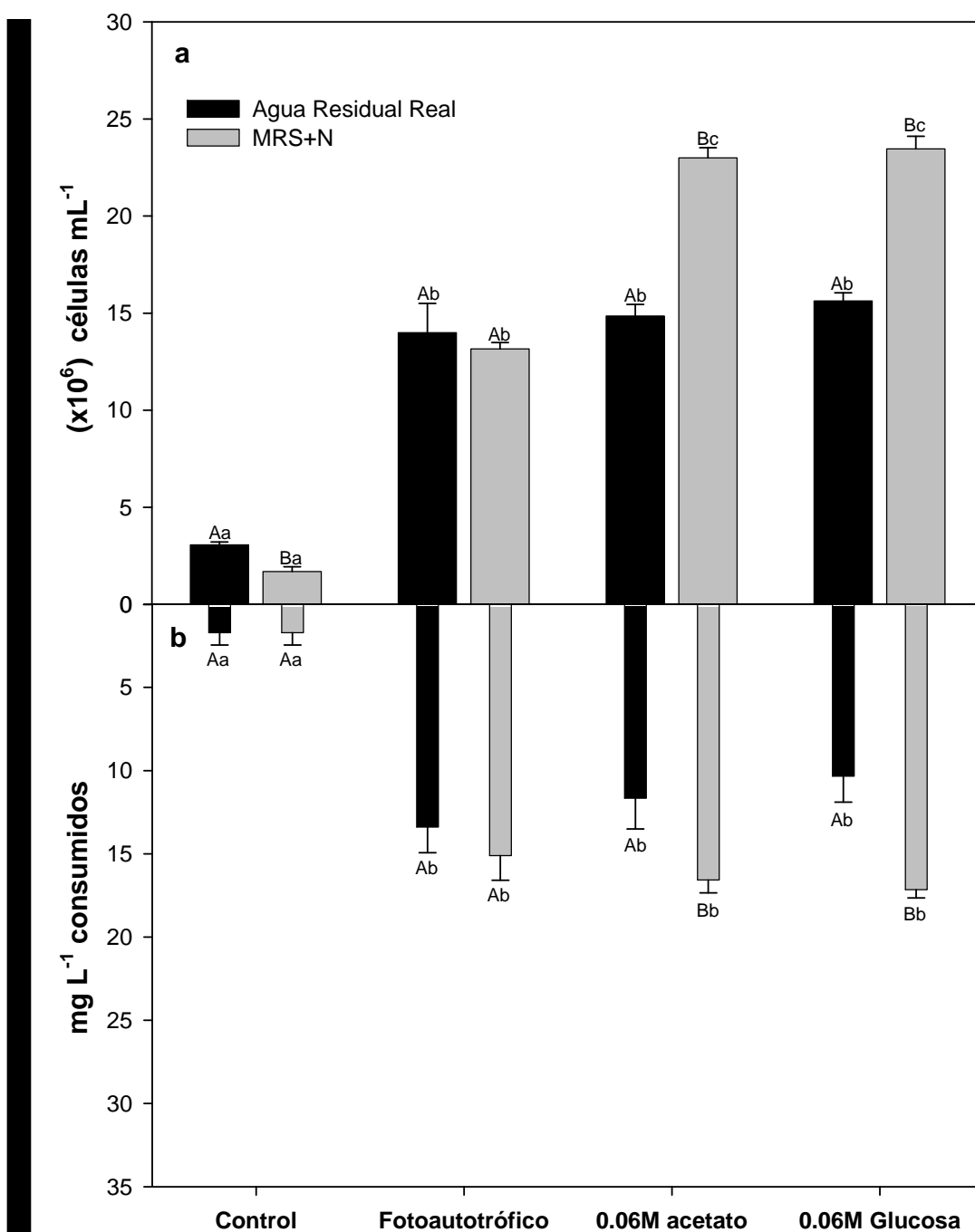
#### **EXPERIMENTO 6. Cultivos quimoheterotróficos en agua residual real**

**RESULTADOS.** En el experimento 6 representado en la *Figura 12*. *C. vulgaris* fue cultivada heterotroficamente en agua residual real usando concentraciones  $0.06\text{M}$  de glucosa o de acetato de sodio.

La densidad celular y el consumo de amonio de los cultivos con luz, con glucosa y con acetato en agua residual real, no fue significativamente diferente. En agua residual no se registra diferencias entre los tipos de régimen.

Se registro una disminución en la densidad celular en los cultivos heterotróficos en agua residual real con glucosa o acetato comparados con los cultivos en MRS+N. En los cultivos en MRS+N, en los dos tratamientos heterotróficos, se registraron mayores densidades celulares y consumos de amonio comparado con el tratamiento fotoautotrófico. No hubo diferencias significativas en las dos variables analizadas entre los cultivos quimoheterotróficos en glucosa comparado con los cultivos en acetato.

No hay diferencia significativa en el crecimiento y en el consumo de amonio entre ambos cultivos fotoautotróficos. En el control sin carbono orgánico y sin luz, en ambos medios de cultivo, no hubo un incremento en la densidad celular, ni en el amonio consumido.



**Figura 12.** Cultivos de *C. vulgaris* en Agua residual real con glucosa y acetato. Todos los cultivos tienen una concentración inicial  $\approx 1.1 \times 10^6$  células por mL. **(a)**-Número de células por mL al quinto día de cultivo. **(b)**-Amonio consumido por *C. vulgaris* al quinto día de cultivo, la escala se encuentra invertida. Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos del mismo régimen. Diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos con el mismo medio de cultivo (Agua Residual Real o MRS+N).

**DISCUSIÓN.** Las posibles causas de la disminución del incremento en la densidad celular en agua residual son 2: 1-La presencia de compuestos inhibidores del crecimiento en el agua residual (Baumgarten *et al.*, 1999) o 2-La secuestación de las moléculas orgánicas por los sólidos disueltos como los ácidos fúlvicos. Esta secuestación se podría deber las interacciones hidrofóbicas, polares y por puentes de hidrógeno entre las moléculas (Ilani *et al.*, 2005). No es posible que la disminución de la densidad poblacional de la microalga se causa de una competencia por los sustratos orgánicos puesto que el agua residual se encontraba estéril.

de Bahan *et al.* (2004) reportan una remoción de amonio de agua residual real de  $4\text{mg L}^{-1}$  y un crecimiento de 2.5 a  $4.0 \text{ células} \times 10^6$  por mL en 4 días de cultivos fotoautotrofos de *C. vulgaris* inmovilizada en esferas de alginato. Estos resultados son mucho menores en ambas variables que lo obtenidos en el presente trabajo, probablemente debido a la transferencia de masa e intercambio gaseosos limitados en sistemas inmovilizado (Dervakos y Webb, 1991).

Usando agua residual sintética, Ogbonna *et al.* (2000) reportan una menor disminución en el consumo de amonio en cultivos con luz a diferencia de cultivos sin luz con acetato ( $5\text{g L}^{-1}$ ) como fuente de carbono, logrando eliminar  $100\text{mg L}^{-1}$  de amonio con *Chlorella sorokiniana* en 50 horas de cultivo quimioheterotrófico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio aunque la cantidad máxima de amonio eliminado en el presente trabajo es de  $20\text{mg L}^{-1}$ . Posiblemente la diferencia en esta eliminación de amonio del medio se deba al mejor control del pH.

La baja eliminación amonio de los cultivos fotoautotróficos comparada con la de cultivos quimioheterotróficos podría deberse a la acumulación de nitrógeno intracelular en forma del aminoácido inerte asparagina que es sintetizado por la enzima asparagina sintasa (AS). La obscuridad promueve la expresión de la enzima AS por un mecanismo que involucra al fotorreceptor fitocromo (Buchanan *et al.*, 2000). De tal manera que los cultivos quimioheterotrofos de *C. vulgaris* podrían estar acumulando más nitrógeno intracelular en forma de asparagina.

## **2.3. EXPERIMENTOS DE ELIMINACIÓN DE NUTRIENTES CON CÉLULAS INMOVILIZADAS**

### **2.3.1. MÉTODOS**

Estos experimentos se realizaron como cultivos en lote en matraces invertidos con inyección de aire. A continuación se describen los diversos métodos que se emplearon para la realización de estos experimentos.

#### **PREPARACIÓN DE ORGANISMOS**

Los organismos utilizados en estos experimentos son los mismos que en los experimentos de células en suspensión, la microalga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714), University of Texas, Austin, TX y la  $\alpha$ -protobacteria. *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 7030) Braunschweig, Germany.

Los inóculos fueron preparados como se indica en la sección 2.2.1.

#### **BIORREACTORES**

Los cultivos experimentales fueron realizados en matraces erlenmeyer de 1L utilizados como biorreactores (Consultar *Figura 13*).

Los matraces se utilizaron de manera invertida, con la boca del matraz hacia abajo.

La boca fue sellada con un stoper No 18 y reforzada con gollete y tope de plástico prensados con tornillos de acero inoxidable. El stoper tiene dos perforaciones de aproximadamente 0.3cm. En una perforación esta insertado un tubo de acero inoxidable que atraviesa el stoper, este tubo tiene perforaciones de 0.1cm para la generación de burbujas en el extremo que queda en la parte interna del matraz. La otra perforación tiene insertado otro pitel de acero inoxidable conectado a una pequeña manguera utilizada para la toma de muestra.

En la parte superior de l reactor (base del matraz) se encuentra una perforación con un pitel de vidrio conectado a una manguera con un filtro acrodisco con tamaño de poro de  $1\mu\text{m}$  para la salida del aire inyectado.

El tubo de inyección de aire esta conectado a una manguera de 70cm de longitud con diámetro de luz de 0.2cm. En el otro extremo de la manguera se encuentran tres filtros acrodiscos conectados en serie, el primero con tamaño de poro de  $1\mu\text{m}$  y seguido de dos acrodiscos con tamaño de poro de  $0.2\mu\text{m}$ . El aire es inyectado por esta manguera con los filtros utilizando una bomba de aire convencional para acuario. (Consultar **Figura 13**)

Los matraces fueron montados en soportes de plástico transparente y colocados en una cámara ambiental BIOTRONETTE Mark III de Lab-Line Instruments Inc. equipada con lámparas fluorescentes. La cámara ambiental tiene un espacio para montar un lote de 6 reactores. (Consultar **ANEXO 9**).

## **MEDIO DE CULTIVO**

Se utilizaron dos medios de cultivos para simular al agua residual:

- a) El MRS+N, utilizado en los experimentos con los regimenes control (sin luz y sin carbono orgánico) y fotoautotrófico.
- b) El MRS+N adicionado con glucosa, utilizado en los experimentos con los regimenes quimioheterotrófico y mixotrófico

Ya que el acetato de sodio a concentración de  $10\text{g L}^{-1}$  en MRS+N disuelve las esferas, se decidió usar  $10\text{g L}^{-1}$  de D-glucosa como fuente de carbono. El acetato de sodio disuelve las esferas por que los iones  $\text{Na}^+$  libres sustituyen al  $\text{Ca}^{2+}$  que forma los enlaces ionicos cruzados entre los ácidos maluronico y guluronico del alginato de calcio. El  $\text{Ca}^+$  no puede formar enlaces cruzados entre los ácidos por ser un ion monoprótico.

Pruebas preliminares confirmaron que concentraciones de glucosa menores a  $22\text{g L}^{-1}$  no afectan la integridad física de las esferas de alginato de calcio al 2%.

En la **Tabla XI** se indica la composición de MRS+N adicionado con  $10\text{g L}^{-1}$  de glucosa.

**Tabla XI:** Nueva composición de MRS adicionado con D-Glucosa.

Compuesto	g L <sup>-1</sup>	Elemento	g L <sup>-1</sup>	mM	%
NaCl	0.0070	H	0.6293	3.977	6.1343
CaCl <sub>2</sub>	0.0040	C	4.0257	55.866	39.240
MgSO <sub>4</sub>	0.0020	N	0.0500	3.572	0.487
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0217	O	5.3867	0.406	52.506
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0085	Na	0.0076	0.330	0.073
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0010	Mg	0.0002	0.008	0.001
NH <sub>4</sub> Cl	0.1909	P	0.0123	0.397	0.119
D-glucosa	10.0000	S	0.0003	0.008	0.002
		Cl	0.1321	3.726	1.287
		K	0.0122	0.187	0.118
		Ca	0.0028	0.035	0.027
		<b>Total</b>	<b>10.2591</b>		<b>100.000</b>

### INMOVILIZACIÓN DE ORGANISMOS

Para el inmovilizado de los organismos, el gel de alginato se prepara al 2% en agua destilada con una relación 3:1 de alginato de media viscosidad con respecto al alginato de alta viscosidad, los reactivos mezclados se añaden poco a poco al agua destilada y se agitan vigorosamente hasta la homogenización. Esta solución de alginato es esterilizada por autoclave. Posteriormente en condiciones asépticas, se incorporan los microorganismos suspendidos en solución salina, por cada 9 partes de solución de alginato puro, se añade una parte de inóculo de *Chlorella vulgaris* o de *Azospirillum brasilense* o ambos (densidad  $\approx 1 \times 10^9$  células/mL). Esta suspensión alginato-células se mezcla vigorosamente hasta su homogenización. La solidificación del gel se hace decantando la solución alginato-células gota a gota con bomba peristáltica en una solución de cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>) al 2% estéril. En este caso se utilizó una manguera Masterflex® No 16 para el goteo de la suspensión de alginato-células en la de calcio. El proceso detallado puede ser encontrado en: Bashan, 1986; de Bashan y Bashan. 2000; de Bashan *et al.*, 2002; y de Bashan *et al.*, 2004a. (Consultar **Figura 13**)

## CONDICIONES DE CULTIVO

Todos los experimentos se realizaron en condiciones axénicas y libres de contaminación. Los experimentos contaminados fueron repetidos. El biorreactor así como sus tapones, mangueras y filtros, fueron esterilizados por autoclave. El medio residual sintético fue esterilizado por filtración con membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de  $0.4\mu\text{m}$  y posteriormente de  $0.2\mu\text{m}$ . La glucosa fue añadida en una solución stock. Esta solución de glucosa fue esterilizada por doble filtración con membranas de  $0.2\mu\text{m}$ . Las condiciones de cultivo y sus respectivos métodos analíticos se enlistan en la *Tabla XII*.

**Tabla XII.** Condiciones de cultivo de experimentos de células inmovilizadas (datos para cada reactor)

Variables	Condición	Método analítico
<i>Chlorella vulgaris</i> $N_B$ =Número de células por esfera	10mL de inóculo fresco a una densidad de $1 \times 10^8$ células/mL. Estos 10mL son utilizados para producir $\approx 90\text{g}$ de esferas, los cuales son divididos en 3 porciones de 30g.	Una esfera es disuelta en 1mL bicarbonato de sodio al 4%. De esta solución se hacen conteos directos en cámara Neubauer con microscopio equipado con analizador de imágenes
<i>Azospirillum brasilense</i> $N_B$ =Número de células por esfera	10mL de inóculo fresco volumen de cultivo. Cada mL de inóculo tiene una concentración aproximada de $1 \times 10^9$ células/mL o densidad óptica de 1Abs a 540nm	Una esfera es disuelta en 1mL bicarbonato de sodio al 4%. De esta solución se hacen conteos directos de células viables teñidas con Fluoroscein diacetato (FDA) en microscopio con lámpara de fluorescencia equipado con analizador de imágenes (Chrzanowski <i>et al.</i> , 1984)
Medio de cultivo $V$ =Volumen del medio de cultivo expresado en mL	$V = 750\text{mL}$ de Medio Residual Sintético MRS+N	No aplica
Esferas $BX$ =Concentración de esferas frescas en el cultivo expresado en $\text{g L}^{-1}$	$BX = 40\text{g L}^{-1}$ 30g de esferas por cultivo de 750mL <ul style="list-style-type: none"> <li>• sin organismos</li> <li>• con <i>C. vulgaris</i></li> <li>• con <i>A. brasilense</i></li> <li>• con <i>C. vulgaris</i>+<i>A. brasilense</i></li> </ul> Según sea el tratamiento	Preparación de esferas indicado en la sección anterior de "Inmovilización de organismos"

P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> pX= Concentración de fosfato expresado en mg L <sup>-1</sup>	pX inicial = 12mg L <sup>-1</sup>	Mediciones de muestras diluidas 1:50 en agua desionizada por el método del Ácido Acorbico (Edwards <i>et al.</i> , 1965; Lachat Instruments, 1985).
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> NX= Concentración de amonio expresado en mg L <sup>-1</sup>	NX inicial = 50mg L <sup>-1</sup>	Mediciones de muestras diluidas 1:50 en agua desionizada por el Metodo colorimétrico del Fenato (Solorzano, 1969) adaptado a microplaca por Hernández -López y Vargas-Albores (2003).
Carbono orgánico	10g L <sup>-1</sup> de glucosa (en cultivos con carbono orgánico)	X <sub>G</sub> =Concentración de glucosa, g L <sup>-1</sup> Mediciones de muestras diluidas 1:50 en agua desionizada. por el método GOD-PAP con kit de Randox
Temperatura expresada en °C	28°C	Termómetro convencional. La temperatura fue controlada con el aire acondicionado del cuarto de cultivo.
Luz E= Intensidad de luz de la superficie del reactor medida en μE m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>	E=90μE m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> (en cultivos con luz)	Medidor de intensidad de Luz, Broad Range Lux/FC Meter. Sper Scientific 840022
pH	pH inicial = 6.70	Potenciómetro convencional
Aireación-mezclado	Inyección de Aire estéril a un flujo de 30mL/min	Flujómetro. Gilmont Instruments GF-2000
Duración T=Tiempo expresado en días	T inicial = 0 días T final = 5 días	No aplica

## DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplico un diseño de bloques completos al azar. Se realizaron en total de 20 tipos de cultivos deferentes, dados por 4 regimenos de cultivo y 5 tipos de tratamientos de esferas.

En la *Tabla XIII* se presenta el diseño experimental.



Los **regimenes** de cultivo son:

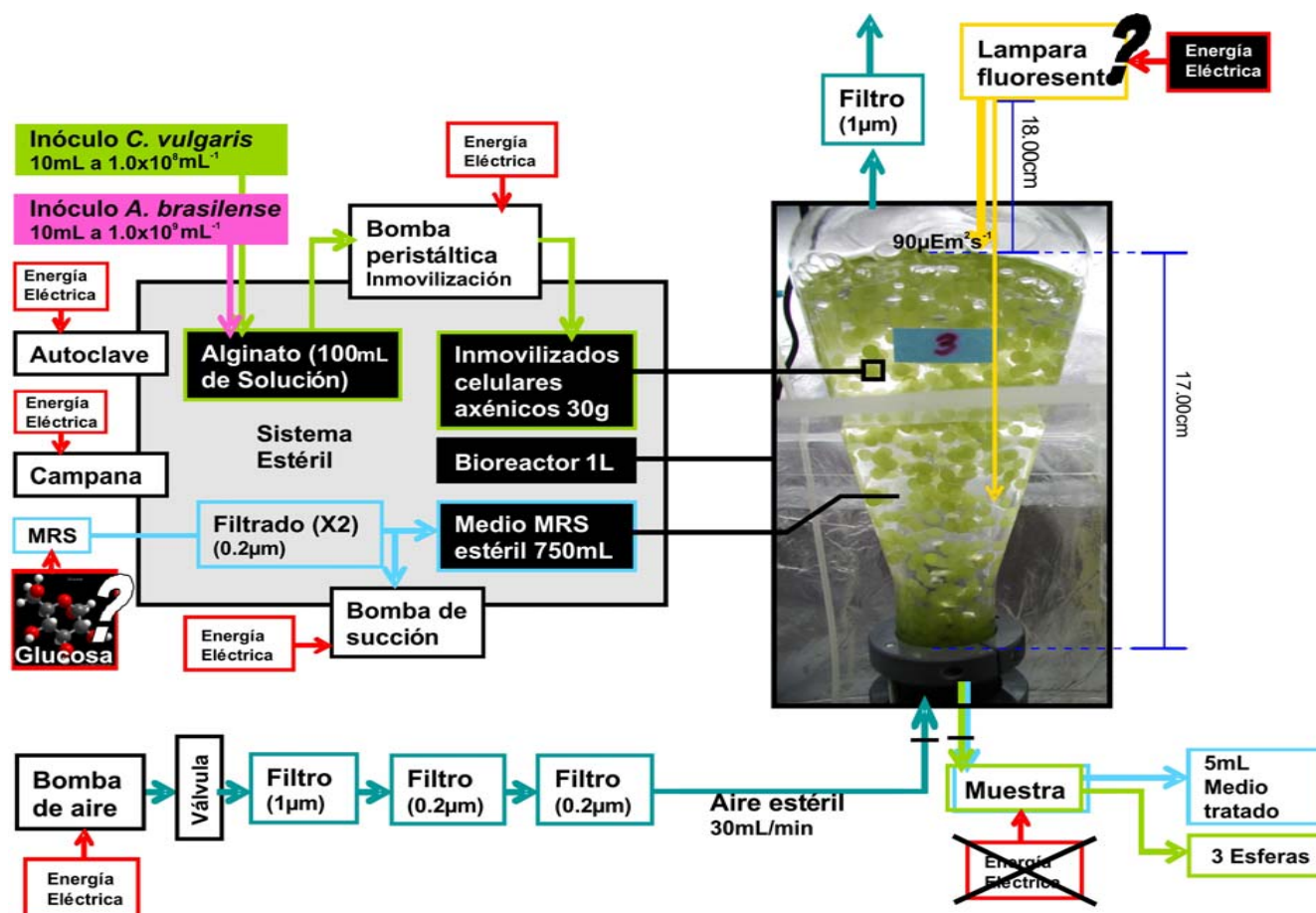
- 1- **Control (C)**: Sin luz y sin glucosa
- 2- **Fotoautotrófico (Fa)**: Con  $(90\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1})$  de luz y sin glucosa
- 3- **Quimioheterotrófico (Qh)**: Sin luz y con  $10\text{g L}^{-1}$  de D-glucosa
- 4- **Mixotrófico (M)**: Con  $90\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$  de luz y con  $10\text{g L}^{-1}$  de D-glucosa con ciclos luz-obscuridad de 12h/12h

Los **tratamientos** de organismos inmovilizados son:

- 1- Sin esferas
- 2- Esferas sin organismos inmovilizados
- 3- Esferas con *Chlorella vulgaris* inmovilizada
- 4- Esferas con *Azospirillum brasilense* inmovilizado
- 5- Esferas con *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizados

**Tabla XIII:** El diseño experimental de cultivos para eliminación de amonio y fosfato de MRS+N usando células inmovilizadas realizados en matraces erlenmeyer de 1L. Cada tipo de cultivo fue realizado por duplicado (dos reactores) El experimento completo (40 reactores) fue repetido una vez.

	1-CONTROL		2-FOTO-AUTOTROFICO		3-QUIMIO-HETEROTROFICO		4-MIXOTROFICO	
	No Luz	No Glucosa	No Luz	Si Glucosa	Si Luz	No Glucosa	Si Luz	Si Glucosa
1-Sin esferas	2		2		2		2	
2-Esferas sin organismos	2		2		2		2	
3-Esferas <i>C. vulgaris</i>	2		2		2		2	
4-Esferas <i>A. brasilenses</i>	2		2		2		2	
5-Esferas <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i>	2		2		2		2	



**Figura 13.** Esquema de experimentos de eliminación de nutrientes con células inmovilizadas cultivadas en matraces invertidos. En la parte central izquierda de la figura se aprecia un “sistema estéril” en el cual se inmovilizan las células y el material de los reactores y el medio de cultivo MRS+N se esterilizan. En la parte central derecha se observa el matraz invertido funcionando como biorreactor, con un sistema de inyección de aire estéril (parte inferior), un sistema de iluminación (parte superior). La toma de muestra y cosecha se realizan por simple sedimentación de las esferas. En toda la figura se indican los puntos de entrada de energía del sistema de experimentación. Los signos de interrogación indican las entradas de materia y/o energía al sistema que la hipótesis de esta tesis esta retando.

### 2.3.2. RESULTADOS

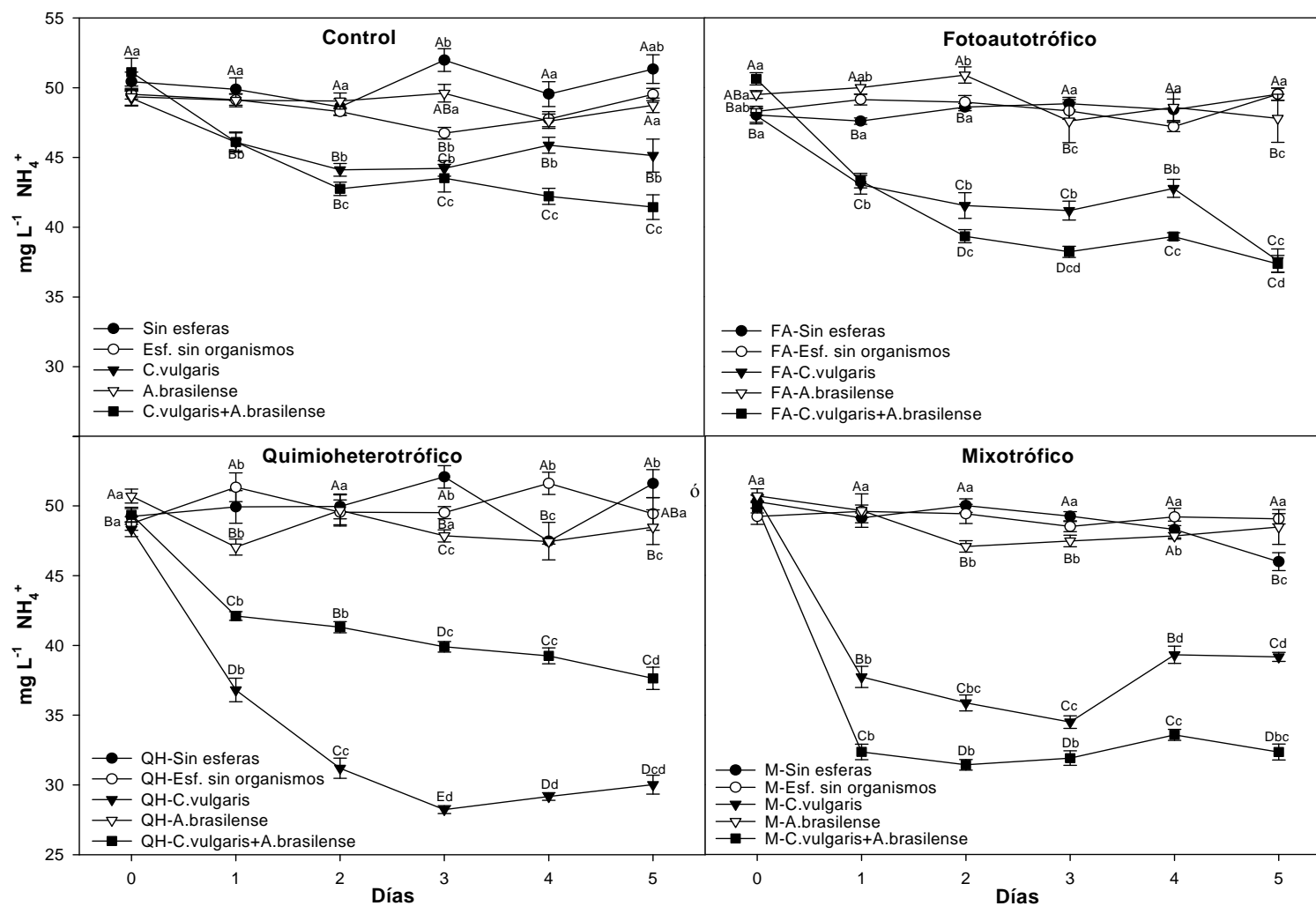
En 6 figuras (**Figuras 14, 15, 16, 17, 18 y 19**) se presentan los resultados de las variables: número de células por esfera de *C. vulgaris*; y de *A. brasilense*; concentración de amonio; fosfato; glucosa; y pH en MRS+N; durante los 5 días de cultivo. Se presenta una figura para cada variable. Las figuras están divididas en 4 o 2 graficas cada una correspondiente a un régimen de cultivo. Cada grafica tiene curvas de 2 o 5 tratamientos según se el caso. En cada uno de las figuras y tablas de los resultados se indicara la técnica de análisis estadístico utilizada. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA, Version 7 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

#### ELIMINACIÓN DE AMONIO

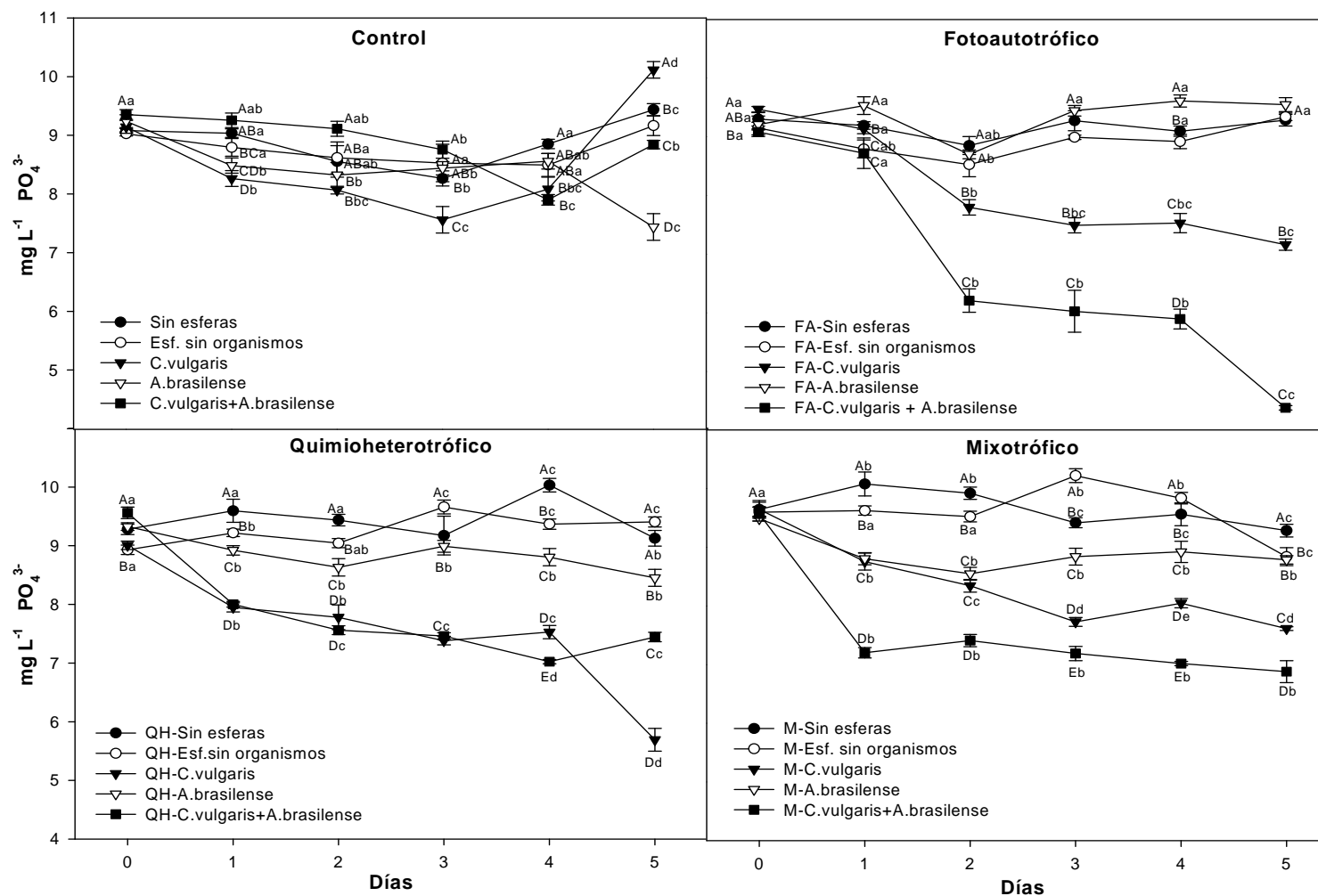
Como se observa en las **Figura 14**, el tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense* es mas eficiente que cualquier tratamiento para la eliminación de amonio bajo los regimenes fotoautotrófico y mixotrofico, siendo este ultimo el régimen donde se registraron las mayores disminuciones, la mayor disminución de amonio se presento en los cultivos mixotróficos. En el caso de los cultivos quimoheterotróficos, el tratamiento con *C. vulgaris* sola en el que se obtuvieron las mayores remociones de amonio. En todos los regimenes, solo se observó disminución de amonio del medio en los tratamientos con *C. vulgaris*, ya sea inmovilizada sola o coinmovilizada con *A. brasilense*. Aun en el régimen control, se registró una disminución de amonio siempre y cuando *C. vulgaris* estuviera presente, siendo las mayores disminuciones en con el tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense*. En los tratamientos: Sin esferas, esferas sin microorganismos y *A. brasilense* sola, no se registro eliminación significativa de amonio del medio en todos los regimenes.

El valor mas bajo de amonio en el medio se registro en el tratamiento de *C. vulgaris* sola en régimen quimoheterotróficos.

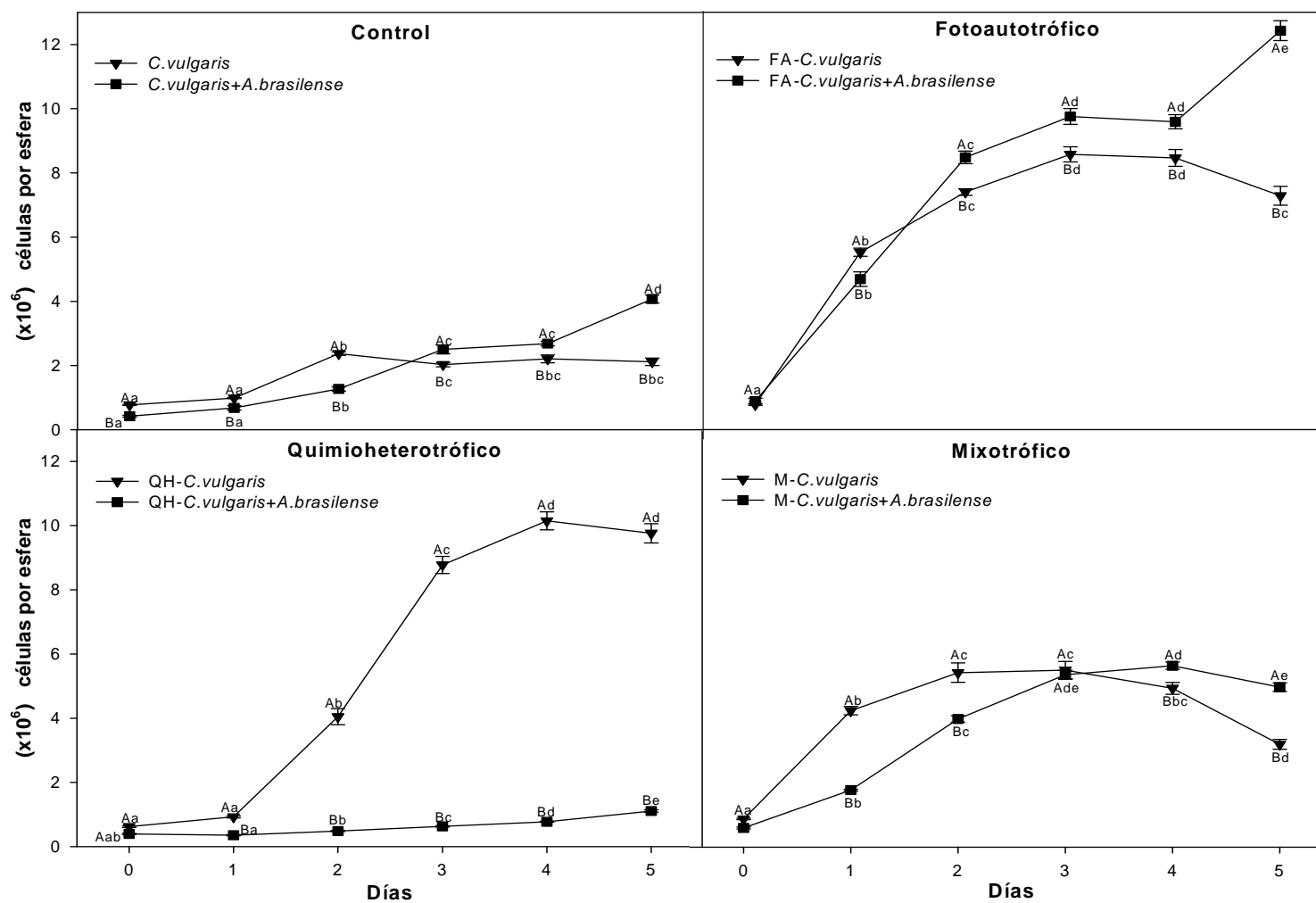
En todos los tratamientos y regimenes, no hay eliminación significativa de amono mas allá del tercer día de cultivo.



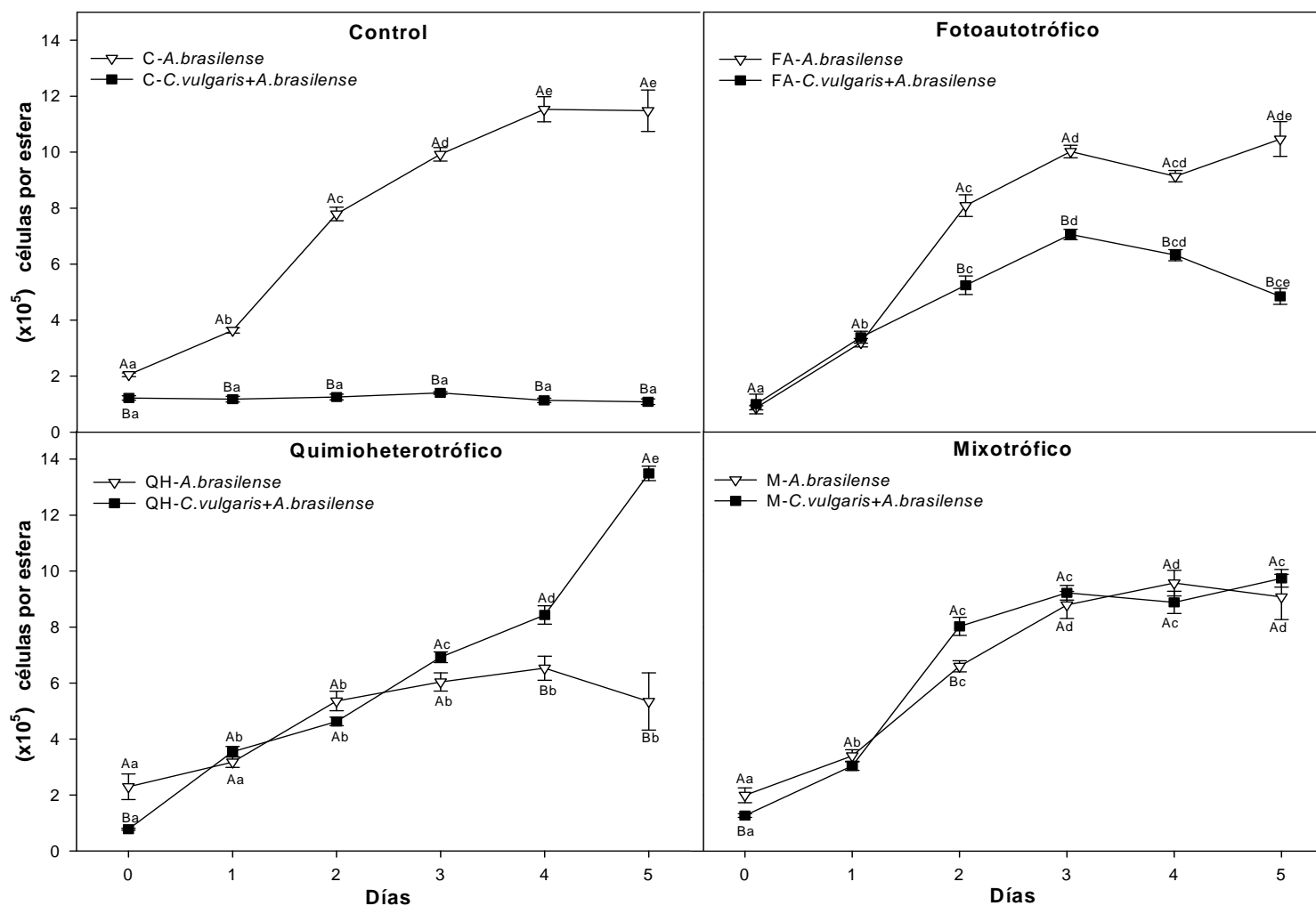
**Figura 14.** Concentración de Amonio en MRS+N ( $NH_4^+$ ) durante 5 días de cultivo. La figura presenta 4 graficas, una grafica para cada régimen de cultivo. Puntos rotulados con diferente letra mayúscula en cada día, tiene diferencias significativas. Puntos rotulados con diferente letra minúscula en cada curva tiene diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$ .



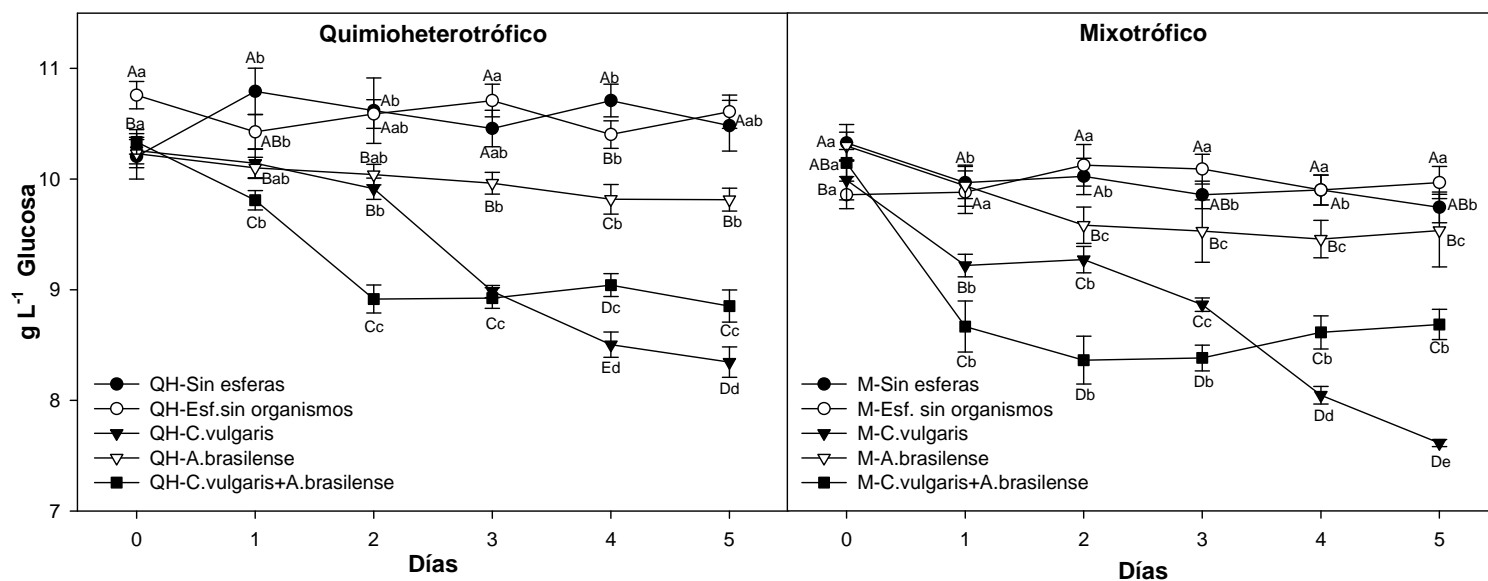
**Figura 15.** Concentración de Fosfato en MRS+N ( $PO_4^{3-}$ ) durante 5 días de cultivo. La figura presenta 4 graficas, una grafica para cada régimen de cultivo. Puntos rotulados con diferente letra mayúscula en cada día, tiene diferencias significativas. Puntos rotulados con diferente letra minúscula en cada curva tiene diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .



**Figura 16.** Número de células de *C. vulgaris* por esfera ( $N_B$ ) durante los 5 días de cultivo. La figura presenta 4 graficas, una grafica para cada régimen de cultivo. Puntos rotulados con diferente letra mayúscula en cada día, tiene diferencias significativas. Puntos rotulados con diferente letra minúscula en cada curva tiene diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

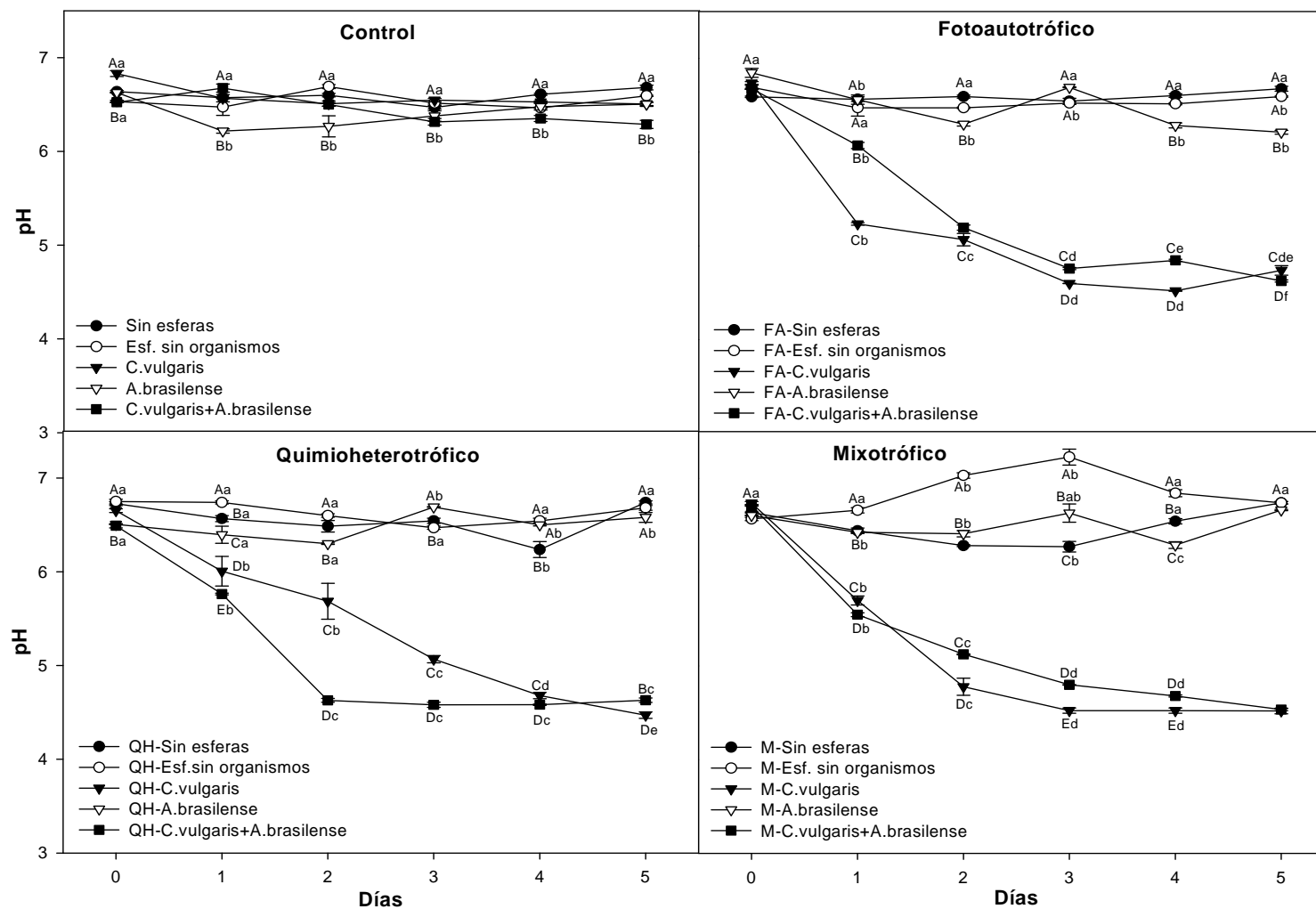


**Figura 17.** Número de células de *A. brasilense* por esfera ( $N_B$ ) durante 5 días de cultivo. La figura presenta 4 graficas, una grafica para cada régimen de cultivo. Puntos rotulados con diferente letra mayúscula en cada día, tiene diferencias significativas. Puntos rotulados con diferente letra minúscula en cada curva tiene diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .



**Figura 18.** Concentración de Glucosa en MRS+N (G) durante 5 días de cultivo. La figura presenta 2 graficas, una grafica para cada uno de los regimenes que contiene 10g/L de glucosa. Puntos rotulados con diferente letra mayúscula en cada día, tiene diferencias significativas. Puntos rotulados con diferente letra minúscula en cada curva tiene diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .





**Figura 19.** pH del medio MRS+N durante 5 días de cultivo. La figura presenta 4 graficas, una grafica para cada régimen de cultivo. Puntos rotulados con diferente letra mayúscula en cada día, tiene diferencias significativas. Puntos rotulados con diferente letra minúscula en cada curva tiene diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p < 0.05$ .

## ELIMINACIÓN DE FOSFATO

El régimen fotoautotrófico con el tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense* fue en donde se registró mayor eliminación de fosfato (**Figura 15**). En todos los regimenes a excepción del control el tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense* fue el mas eficiente para eliminar fosfato.

Los tratamientos: sin esferas, esferas sin organismos y *A. brasilense* sola no presentan eliminación de fosfato significativa.

En el régimen foto autotrófico *C. vulgaris* coinmovilizada es significativamente superior para eliminar fosfato del medio que *C. vulgaris* inmovilizada. En este régimen es donde se observan las diferencias más amplias entre ambos tratamientos. En los regimenes quimioheterotrofico y mixotrófico, no hay diferencia significativa entre ambos tratamientos

## NÚMERO DE CÉLULAS DE *Chlorella vulgaris*

La bacteria *A. brasilense* promueve el aumento del número de células por esfera de *C. vulgaris* en los cultivos fotoautotróficos y mixotróficos pero en cultivos quimoheterotróficos (**Figura 16**). Este efecto benéfico para el crecimiento de la microalga es más pronunciado en el régimen fotoautotrófico y mas al final del periodo de cultivo, entre los días 4 y5 de hecho el quinto día de este tratamiento fue en el que se registraron las mayores densidades celulares ( $1.2 \times 10^7$ ) Caso similar en el cultivo mixotrófico donde el beneficio bacteriano se presenta en los días 4 y 5 de cultivo.

En los cultivos quimoheterotróficos, el aumento en el número de células de *C. vulgaris* no se fue beneficiado por la presencia de *A. brasilense*, por el contrario, la población de la microalga solo se mantuvo a la misma densidad a través del tiempo sin registrar aumento alguno. Caso contrario en el tratamiento con *C. vulgaris* sola donde se presento un crecimiento típico microbiana con una fase lag de crecimiento en durante el primer día para luego entrar en fase de criamiento exponencial entre los días 2 y 3 para posteriormente entrar en una fase estacionaria en los días 4 y5 con una densidad de  $1.0 \times 10^7$  células por esfera.

En el régimen control se registro un leve aumento en el número de células por esfera en ambos tratamientos, siendo mas pronunciado el aumento en el tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense* y mas al final del periodo de cultivo.

En todos los casos el efecto benéfico de la presencia de *A. brasilense* se hizo evidente durante los días 4 y5 del tiempo de cultivo.

### **NÚMERO DE CÉLULAS DE *Azospirillum brasilense***

El mayor aumento en el número de células por esfera de *A. brasilense* ( $1.4 \times 10^6$ ) se presentó en el régimen quimoheterotrófico cuando el organismo se encuentra coinmovilizado con *C. vulgaris* (**Figura 17**). (Ver **ANEXO 9**) En este régimen las densidades celulares del tratamiento coinmovilizado fueron superiores a las de *A. brasilense* solo.

En los cultivos fotoautotróficos, *A. brasilense* creció mejor estando solo que coinmovilizado alcanzando densidades de  $1.0 \times 10^6$  células por esfera.

El crecimiento en los cultivos mixotróficos es prácticamente idéntico comparando entre *A. brasilense* solo y coinmovilizado.

En el régimen control, *A. brasilense* no crece estando coinmovilizado, pero si lo hace estando solo.

### **CONSUMO DE GLUCOSA**

El consumo de glucosa en los regimenes quimoheterotrófico y mixotrófico es prácticamente idéntico (**Figura 18**). En ambos casos los tratamientos *C. vulgaris*+*A. brasilense* son los que consumen glucosa mas rápido, ya que durante los días 1y 3 se presenta la disminución de dicho sustrato para luego no verificar cambios significativos. En el caso de los tratamientos de *C. vulgaris* sola, no se registra eliminación de glucosa del medio durante los días 1y 2 pero si durante los días 3, 4 y 5. De tal manera que independientemente de la presencia de luz, *C. vulgaris* consume glucosa aunque este consumo es mas rápido en los cultivos con luz.

En los tratamientos: sin esferas, esferas sin microorganismos y esferas con *A. brasilense* sola, no se observa una disminución significativa de glucosa del medio.

Es importante notar que las unidades están en gramos por litro, de esta manera *C. vulgaris* en régimen quimoheterotrófico consumió aproximadamente  $300\text{mg L}^{-1}$  al día dos mientras que *C. vulgaris* coinmovilizada consumió  $1300\text{mg L}^{-1}$ . *C. vulgaris* sola incrementa la velocidad de toma de glucosa hasta el día 3 donde se registro una concentración de glucosa en el medio similar a la del tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense*

En el régimen mixotrófico *C. vulgaris*+*A. brasilense* consume aproximadament  $1500\text{mg L}^{-1}$  al primer día, para no consumir mas glucosa el resto de los días.

### **CAMBIO DEL pH**

En todos los tratamientos con *C. vulgaris* ya sea sola o coinmovilizada, se registró una disminución del pH a valores próximos 4 (**Figura 19**) al tercer día de cultivo. En estos casos, más allá del día 3 no se registraron cambios significativos del pH.

En el régimen control no se registró cambios del pH en ninguno de los tratamientos.

En los tratamientos: sin esferas, esferas sin microorganismos y esferas con *A. brasilense* sola, no se observa una disminución significativa del pH del medio.

Las curvas de cambio de pH no son significativamente diferentes entre los tratamientos *C. vulgaris* sola y *C. vulgaris*+*A. brasilense*.

### **TAMAÑO, DIÁMETRO y VOLUMEN DE ESFERA**

Se midió el peso fresco y el diámetro de las esferas producidas. El tamaño muestral total fue de 150 esferas, de las cuales, 50 son solo con *C. vulgaris*, 50 con solo *A. brasilense*, 50 esferas con *C. vulgaris* + *A. brasilense* juntos.

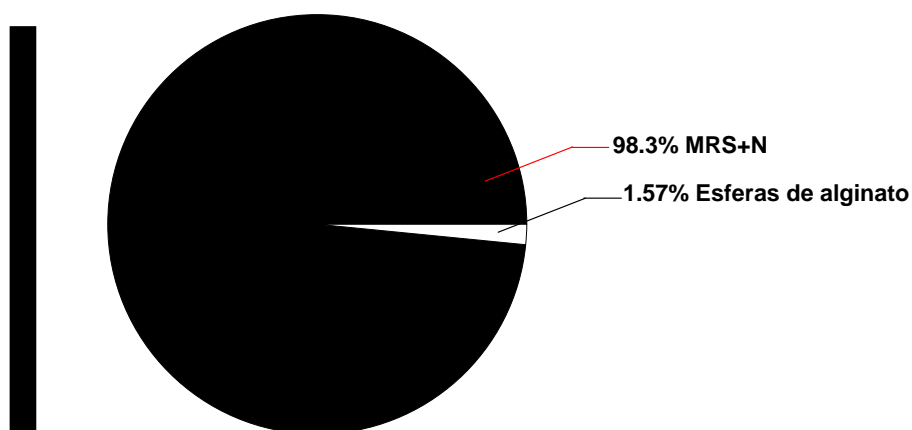
No hubo diferencias significativas en el peso y diámetro de los 3 tipos diferentes de esfera, según la prueba ANOVA de una vía a  $P \leq 0.05$ . Los datos de ambas variables presentaron una distribución normal.

Los 150 datos de peso fresco de esfera presentan una media y error estándar de  $51.22 \pm 1.29$  mg con valores mínimos de 33.00 mg y valores máximos de 76.00 mg.

Los diámetros de esfera presentan una media y error estándar de  $3.34 \pm 0.064$  mm con valores mínimos de 2.4 mm y valores máximos de 4.2 mm.

El volumen medio de cada esfera es de  $20.62 \pm 1.17$   $\mu$ L

30 g de esferas frescas equivalen a  $617 \pm 20$  esferas, de esta manera definimos que la constante ( $N_X$ ) **número de esferas por gramo de esfera** es de 20.5. El volumen medio de todas las esferas dentro del reactor con cultivos de 750 mL es de  $12.72 \pm 0.76$  mL lo que equivale al un 1.57% del volumen del reactor (**Figura 19**).



**Figura 20.** Distribución porcentual del volumen del reactor. El volumen de las esferas es mínimo dentro del reactor

## ANÁLISIS CINÉTICOS

En la **Tabla XIV** se presenta la simbología y nomenclatura utilizadas en el análisis. A continuación se presenta las formulas utilizadas para calcular las diferentes variables. Posteriormente en la **Tabla XV** se presentan las datos obtenidos correspondiente al un análisis cinético del tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense* y en la **Tabla XVI** se presenta el análisis del tratamiento *C. vulgaris*.

**Tabla XIV.** Nomenclatura de variables analizadas.

SIMBOLO	VARIABLE	UNIDADES
$N_B$	Numero de células de organismos por esfera	células por esfera
$N$	Numero de células de organismo por cultivo	células L <sup>-1</sup>
$X_B$	Concentración de biomasa de organismo por esfera	mg por esfera
$X$	Concentración de biomasa de organismo en cultivo	mg L <sup>-1</sup>
$c_{PS}$	Peso seco de células <i>Chlorella vulgaris</i>	pg por célula
$BX$	Concentración de peso de esferas en cultivo	g L <sup>-1</sup>
$BN_X$	Numero de esferas por gramo de esferas (constante a 40g L <sup>-1</sup> )	esferas g <sup>-1</sup>
$BN$	Numero de esferas por cultivo (constante 20.5 esferas g <sup>-1</sup> )	esferas L <sup>-1</sup>
$E$	Intensidad luminosa en superficie de reactor (constante 90μE m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )	μE m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup>
$NH_4^+$	Concentración de sustrato N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en el medio	mg L <sup>-1</sup>
$PO_4^{3-}$	Concentración de sustrato P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> en el medio	mg L <sup>-1</sup>
$G$	Concentración de sustrato D-glucosa en el medio	g L <sup>-1</sup>
$i$	Variable cualquiera	
$S$	Sustrato cualquiera sea $NI$ , $P$ o $G$	g ; mg o μg
$i\Delta$	Cambio neto de la condición de una variable cualquiera ( $i$ ) en un intervalo de tiempo $T_f - T_0$	Unidades de variable
$\mu$	Tasa de crecimiento	d <sup>-1</sup>
$Tg$	Tiempo de generación	d
$S\%$	Porcentaje consumido del sustrato ( $S$ )	%
$Q_P$	Productividad volumétrica, gramos de producto por litro al día.	g L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup>
$Y_{P/S}$	Rendimiento de generación de producto ( $X$ o $N$ ) por unidad de sustrato ( $S$ )	
$A_{(s)}$	Afinidad o Actividad por el sustrato ( $S$ ). Cantidad de sustrato ( $S$ ) consumido por célula	pg por célula
$T$	Tiempo de cultivo	días
$V$	Volumen de cultivo	mL
$pH$	Potencial de hidrogeno	

Partiendo de que la **concentración de esferas en cultivo** ( ${}_B X$ ) es del 4% en peso del volumen de cultivo (4g de esferas en 100mL de medio de cultivo o 0.04g/mL) (de Bashan *et al.*, 2002a) y con la constante ( ${}_B N_X=20.5$ ) del número de esferas por gramo de esferas, podemos calcular el **numero de esferas por cultivo** dado su volumen ( ${}_B N$ )

$${}_B N = ({}_B N_X)({}_B X)(V) \quad (1)$$

Donde ( $V$ ) es el volumen del cultivo en mL.

de Bashan *et al.* (2005) encontró que no hay diferencias significativas en el peso seco por célula de *C. vulgaris* ( $25.7 \pm 0.28$  pg por célula) en cultivos fotoautotróficos cuando se encuentra sola o inmovilizada con *A. brasilense*, y cultivada a concentraciones iniciales de  $\text{NH}_4^+$  de 1, 3 y 13mg L<sup>-1</sup>. De manera similar, no hay diferencias significativas entre los diámetros de célula ( $2.32 \pm 0.05$  μm) en estos tratamientos.

Con los datos anteriores podemos calcular **la biomasa por esfera** ( $X_B$ ) en μg por esfera

$$X_B = \frac{N_B({}_C PS)}{1 \times 10^6} \quad (2)$$

Donde ( $N_B$ ) es el **numero de células por esfera** obtenida por los conteos celulares, y ( ${}_C PS$ )=25.7pg por célula, es la constante de peso de cada célula de *C. vulgaris* en encontrada por de Bashan *et al.* (2005).

Tomando en cuenta el número de esferas por cultivo ( ${}_B N$ ) y la biomasa por esfera ( $X_B$ ) de *C. vulgaris*, podemos calcular la **concentración de biomasa** del cultivo ( $X$ ) en mg L<sup>-1</sup>:

$$X = ({}_B N)(X_B) * 1000 \quad (3)$$

Teniendo el número de esferas por cultivo ( ${}_B N$ ) y el número de células por esfera ( $N_B$ ) ya sea de *C. vulgaris* o de *A. brasilense*, podemos calcular el **número de células por cultivo** ( $N$ ):

$$N = ({}_B N)(N_B) \quad (4)$$

El **cambio neto** ( $\Delta$ ) del número o concentración de alguna variable cualquiera ( $i$ ) en un intervalo de tiempo se calcula con la siguiente resta:

$$\Delta i = iT_f - iT_0 \quad (5)$$

Donde  $iT_f$  es el valor de la variable ( $i$ ) al tiempo final y  $iT_0$  es la condición de la variable ( $i$ ) al tiempo inicial. En los casos donde el valor de la variable  $i$  disminuye a través del tiempo la resta tiene productos negativos que deben ser transformados a valores positivos

Ya que a partir del tercer día no se observan cambios significativos en la disminución de amonio y fosfato y en el número de células por esfera (**Figuras 14, 15, 16**), el tiempo final ( $T_f$ ) de los análisis cinéticos y de productividad es el día 3.

La **tasa de crecimiento** ( $\mu$ ) de los organismos se calculo según la siguiente formula (Wood, 2005)

$$\mu = \frac{(\ln N_f - \ln N_0)}{T_f - T_0} \quad (5)$$

En esta formula el número de células ( $N$ ) y el tiempo ( $T$ ), con subíndice ( $0$  = iniciales) son los datos correspondientes al día 0 del experimento y los datos ( $N_f$ ) y ( $T_f$ ), con subíndice ( $f$  = finales), son los correspondientes al tercer día de cultivo

El **tiempo de generación** se calculo según la siguiente formula (Wood, 2005):

$$Tg = \frac{0.63}{\mu} \quad (6)$$

A partir del cambio en la concentración de un sustrato cualquiera ( $\Delta S$ ), sea amonio ( $NI$ ), fosfato ( $P$ ) o glucosa ( $G$ ), podemos calcular el **porcentaje consumido** con respecto al 100% de su valor inicial ( $S_0$ )

$$S\% = \frac{(\Delta S) * 100}{S_0} \quad (7)$$



La **productividad volumétrica** ( $Q_p$ ) es la cantidad de producto ( $P$ ) ya sea biomasa ( $X$ ) o en numero de células ( $N$ ) producidos en un litro durante una unidad de tiempo ya sean días u horas. Se calcula de la siguiente manera (Cooney, 1983):

$$Q_p = P_1 - P_0 \quad (8)$$

La **afinidad** ( $A$ ) (también llamada o actividad específica) por el sustrato ( $S$ ) es la cantidad de sustrato que cada célula (o enzima) esta consumiendo por unidad de tiempo dado, los valores  $A_s$  reflejan la capacidad catalítica de la célula. Se expresa en ng por célula. Su cálculo se da partir de la división de la cantidad sustrato consumido  $\Delta S$  en un intervalo de tiempo entre el número de células presentes al final del intervalo de tiempo ( $N_f$ ) (Cooney, 1983):

$$A_s = \left( \frac{\Delta S}{N_f} \right) * 1 \times 10^6 \quad (9)$$

El rendimiento ( $Y_{X/S}$ ) es una medida de la eficiencia de conversión del sustrato ( $S$ ) a biomasa ( $X$ ). El sustrato ( $S$ ) puede ser amonio ( $NH_4^+$ ), fosfato ( $PO_4^{3-}$ ), glucosa ( $G$ ), o luz ( $E$ ) (Bitton, 2005).

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f} \quad (10)$$

De manera general, no se observaron diferencias significativas en la concentración de nutrientes (**Figuras 14 y 15**) y en el crecimiento de los organismos (**Figuras 16 y 17**) a partir del día 3, cuando el pH alcanzaba sus niveles más bajos. (**Figura 19**). De esta manera el análisis cinético solo se realiza hasta al día 3 como tiempo final ( $T_f$ ) A continuación se presentan los datos calculados según las formulas anteriores. En estos análisis no se incluyen los experimentos con el tratamiento con esferas solo con *A. brasilense*, Ya que no se observo un cambio muy significativo en la concentración de nutrientes con este tratamiento.

**Tabla XV.** Comparación de las variables analizadas entre los 4 regimenes del tratamiento de esferas con *C. vulgaris*+*A. brasilense*. Todas las variables fueron calculadas al tercer día de cultivo. Donde aplica, el intervalo de tiempo es entre los días 0 y 3.

VARIABLE		Control Sin Luz y sin Glucosa	Foto- autotrófico	Quimio- Heterotrófico	Mixotrófico
$N_B$	células por esfera	2.54±0.13x10 <sup>6</sup> C	9.78±0.21x10 <sup>6</sup> A	0.61±0.27x10 <sup>5</sup> D	5.33±0.12x10 <sup>6</sup> B
$N$	células L <sup>-1</sup>	2.08±0.14x10 <sup>9</sup> C	8.10±0.26x10 <sup>9</sup> A	0.54±0.02x10 <sup>8</sup> D	4.81±0.17x10 <sup>9</sup> B
$X_B$	mg de peso seco por esfera	0.064±0.003 C	0.251±0.007 A	0.016±0.000 D	0.151±0.003B
$X$	mg de peso seco L <sup>-1</sup>	53.29±2.83 C	208.68±6.14 A	13.37±0.43 D	125.50±2.67 B
$NH_4^+$	mg L <sup>-1</sup>	43.51±0.99 C	38.21±0.39 B	39.89±0.37 B	34.03±0.36 A
$PO_4^{3-}$	mg L <sup>-1</sup>	8.75±0.14 C	6.02±0.35 A	7.45±0.05 B	7.18±0.12 B
$G$	mg L <sup>-1</sup>			8921±934 A	9046±146 A
$\Delta N$	células L <sup>-1</sup>	1.74±0.11x10 <sup>9</sup> C	7.32±0.27x10 <sup>9</sup> A	1.92±0.21x10 <sup>8</sup> D	4.07±0.15x10 <sup>9</sup> B
$\Delta X$	mg L <sup>-1</sup>	44.35±2.89 C	188.71±7.10 A	4.97±0.54 D	111.34±2.69 B
$\Delta NH_4^+$	mg L <sup>-1</sup>	7.45±1.71 C	12.40±0.60 B	9.46±0.68 BC	17.95±0.76 A
$\Delta PO_4^{3-}$	mg L <sup>-1</sup>	0.59±0.07 C	3.05±0.31 A	2.10±0.11 B	2.37±0.10 B
$\Delta G$	mg L <sup>-1</sup>			1411.52±150 B	1791.84±139 A
$\%oNH_4^+$	%	14.63±3.3 C	24.50±1.2 B	19.18±1.39 BC	36.01±1.54 A
$\%oPO_4^{3-}$	%	6.38±0.81 C	31.59±2.27 A	22.26±1.1 B	24.32±0.96 B
$\%oG$	%			12.13±1.29 B	17.36±1.37 A
$\mu$	d <sup>-1</sup>	0.60±0.02 B	0.80±0.03 A	0.15±0.01 C	0.72±0.00 A
$Tg$	d	1.19±0.05 A	0.89±0.04 A	5.46±0.65 B	0.95±0.1 A
$IA_{NH_4^+}$	pg célula <sup>-1</sup> al día 1	8.61±1.78 B	1.79±0.15 C	24.71±1.94 A	11.53±0.47 B

$2A_{NH_4^+}$	pg célula <sup>-1</sup> al día 2	3.18±0.89 A	0.63±0.08 A	1.99±1.36 A	0.28±0.25 A
$3A_{NH_4^+}$	pg célula <sup>-1</sup> al día 3	-0.36±0.40 B	0.15±0.08 B	2.70±0.99 A	0.098±0.14 B
$1A_{PO_4^{3-}}$	pg célula <sup>-1</sup> al día 1	0.17±0.17 C	0.09±0.07 C	5.29±0.40 A	1.55±0.05 B
$2A_{PO_4^{3-}}$	pg célula <sup>-1</sup> al día 2	0.13±0.11 B	0.35±0.06 B	1.10±0.26 A	-0.04±0.02 B
$3A_{PO_4^{3-}}$	pg célula <sup>-1</sup> al día 3	0.17±0.03 A	0.02±0.02 A	0.19±0.17 A	0.04±0.03 A
$Y_{N/NH_4}$	células mg <sup>-1</sup>	3.76±1.50x10 <sup>8</sup> AB	6.36±0.40x10 <sup>8</sup> A	1.93±0.23x10 <sup>7</sup> C	2.28±0.15x10 <sup>8</sup> BC
$Y_{N/PO_4}$	células mg <sup>-1</sup>	2.8x10 <sup>9</sup> ±3.5x10 <sup>8</sup> A	2.9x10 <sup>9</sup> ±4.3x10 <sup>8</sup> A	1.0x10 <sup>8</sup> ±1.1x10 <sup>7</sup> C	1.6x10 <sup>9</sup> ±5.7x10 <sup>7</sup> B
$Y_{N/G}$	células mg <sup>-1</sup>			1.7x10 <sup>5</sup> ±2.8x10 <sup>4</sup> B	2.5x10 <sup>6</sup> ±2.1x10 <sup>5</sup> A
$Y_{X/NH_4}$	mg mg <sup>-1</sup>	9.65±4.00 AB	16.19±1.03 A	0.50±0.06 C	6.28±0.35 BC
$Y_{X/PO_4}$	mg mg <sup>-1</sup>	72.00±9.02 A	75.38±11.23 A	2.66±0.29 B	45.95±2.29 A
$Y_{X/G}$	mg g <sup>-1</sup>			0.0044±0.00 B	0.064±0.005 A

**Tabla XVI.** Comparación de las variables analizadas entre los 4 regimenes del tratamiento de esferas con *C. vulgaris*. Todas las variables fueron calculadas al tercer día de cultivo. Donde aplica, el intervalo de tiempo es entre los días 0 y 3.

VARIABLE		Control Sin Luz y sin Glucosa	Foto- autotrófico	Quimio- Heterotrófico	Mixotrófico
$N_B$	células por esfera	2.03±0.06x10 <sup>6</sup> C	8.58±0.23x10 <sup>6</sup> A	8.77±0.26x10 <sup>6</sup> A	5.57±0.27x10 <sup>6</sup> B
$N$	células L <sup>-1</sup>	1.33±0.05x10 <sup>9</sup> C	7.11±0.19x10 <sup>9</sup> A	7.27±0.22x10 <sup>9</sup> A	4.59±0.22x10 <sup>9</sup> B
$X_B$	mg de peso seco por esfera	0.041±0.001 C	0.220±0.006 A	0.225±0.006 A	0.141±0.006 B
$X$	mg de peso seco L <sup>-1</sup>	34.23±1.42 C	182.90±4.99 A	186.94±5.66 A	117.42±5.75 B
$NH_4^+$	mg L <sup>-1</sup>	39.07±1.14 C	41.17±0.67 C	28.23±0.28 A	34.48±0.48 B
$PO_4^{3-}$	mg L <sup>-1</sup>	7.55±0.22 A	7.49±0.12 A	7.38±0.07 A	7.72±0.07 A

<i>G</i>	mg L <sup>-1</sup>			8983±54 A	8863±60 A
<i>pH</i>		6.54±0.01 C	4.59±0.00 A	5.06±0.03 B	4.52±0.02 A
$\Delta N$	células L <sup>-1</sup>	6.63±0.05x10 <sup>8</sup> C	6.43±0.19x10 <sup>9</sup> A	6.7±0.22x10 <sup>9</sup> A	3.8±0.21x10 <sup>9</sup> B
$\Delta X$	mg L <sup>-1</sup>	17.04±1.46 C	165.31±5.09 A	173.72±5.6 A	98.19±5.55 B
$\Delta NH_4^+$	mg L <sup>-1</sup>	5.27±0.61 D	6.81±0.59 C	20.09±0.47 A	16.07±0.50 B
$\Delta PO_4^{3-}$	mg L <sup>-1</sup>	1.44±0.26 A	1.97±0.12 A	1.62±0.12 A	1.91±0.17 A
$\Delta G$	mg L <sup>-1</sup>			1272.94±98 A	1126.84±164 A
% <i>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></i>	%	10.72±1.25 C	14.45±1.19 C	41.58±0.97 A	31.79±1.00 B
% <i>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></i>	%	15.79±2.84 A	20.88±1.32 A	17.87±1.20 A	16.78±3.08 A
% <i>G</i>	%			12.41±0.96 A	11.27±1.64 A
$\mu$	d <sup>-1</sup>	0.22±0.01 D	0.78±0.01 B	0.91±0.01 A	0.61±0.01 C
<i>Tg</i>	d	3.28±0.21 B	0.89±0.01 A	0.75±0.01 A	1.14±0.02 A
<i>1A<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub></i>	pg célula <sup>-1</sup> al día 1	3.53±1.29 B	0.86±0.18 B	10.01±0.78 A	3.64±0.23 B
<i>2A<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub></i>	pg célula <sup>-1</sup> al día 2	1.66±0.49 A	0.29±0.11 B	1.11±0.16 AB	0.41±0.25 AB
<i>3A<sub>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></sub></i>	pg célula <sup>-1</sup> al día 3	-0.05±0.45 A	0.04±0.04 A	0.27±0.06 A	0.30±0.07 A
<i>1A<sub>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></sub></i>	pg célula <sup>-1</sup> al día 1	1.06±0.27 B	0.07±0.01 B	11.32±6.40 A	0.25±0.04 B
<i>2A<sub>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></sub></i>	pg célula <sup>-1</sup> al día 2	0.15±0.14 A	0.21±0.06 A	0.03±0.03 A	0.09±0.02 A
<i>3A<sub>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></sub></i>	pg célula <sup>-1</sup> al día 3	0.22±0.16 A	0.04±0.00 A	0.03±0.01 A	0.13±0.02 A
<i>Y<sub>N/NH<sub>4</sub></sub></i>	células mg <sup>-1</sup>	1.97±0.65x10 <sup>8</sup> A B	9.95±1.07x10 <sup>8</sup> A	3.46±0.18x10 <sup>8</sup> B	2.45±0.22x10 <sup>8</sup> B
<i>Y<sub>N/PO<sub>4</sub></sub></i>	células mg <sup>-1</sup>	7.50±1.81x10 <sup>8</sup> A	3.22±0.33x10 <sup>9</sup> C	4.61±0.28x10 <sup>9</sup> B	2.10±0.27x10 <sup>9</sup> C
<i>Y<sub>N/G</sub></i>	células g <sup>-1</sup>			5.93±0.48x10 <sup>9</sup> A	4.66±1.1x10 <sup>6</sup> B

$Y_{X/NH_4}$	mg mg <sup>-1</sup>	5.08±1.68A B	25.58±2.76 A	8.89±0.46 B	6.31±0.57 B
$Y_{X/PO_4}$	mg mg <sup>-1</sup>	19.28±4.66 C	82.81±8.67 B	118.49±7.31 A	54.05±7.06 B
$Y_{X/G}$	mg g <sup>-1</sup>			0.152±0.012 A	0.119±0.028 A

En términos de eliminación de nutrientes del medio, las variables que reflejan una mayor eficiencia comparando los diversos tratamientos y regímenes son la eliminación neta del nutriente ( $\Delta_{NH_4}$  y  $\Delta_{PO_4}$ ) y el porcentaje de eliminación ( $\%_{NH_4}$  y  $\%_{PO_4}$ ) (**Tablas XV y XVI**). Estas variables reflejan el cambio real de la concentración de nutrientes. Aunque ambas se basan en mediciones de la concentración en el medio, estos datos apoyados de datos de nitrógeno y fósforo total en la biomasa nos confirmarían que el nitrógeno y/o fósforo faltante en el medio fue realmente incorporado a la biomasa de los organismos.

#### ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO *C. vulgaris*+*A. brasiliense*

**AMONIO.** Los valores significativamente más altos de cambio neto en la concentración de amonio  $\Delta_{NH_4}$  se registraron en el régimen mixotrófico ( $17.95 \pm 0.76 \text{ mg L}^{-1}$ ) (**Tabla XV**). No se registraron cambios significativos en entre los regímenes quimoheterotrófico ( $9.46 \pm 0.68 \text{ mg L}^{-1}$ ) y fotoautotrófico ( $12.40 \pm 0.60 \text{ mg L}^{-1}$ ). No hubo cambios significativos en esta variable entre el tratamiento control y el régimen quimoheterotrófico.

Los valores de porcentajes de eliminación de amonio ( $\%_{NH_4^+}$ ) tienen la misma tendencia la misma tendencia siendo el régimen mixotrófico el que presenta un mayor porcentaje de eliminación, con valores de  $36.01 \pm 1.54\%$ , lo cual es muy superior a los  $24.50 \pm 1.2$  del régimen fotoautotrófico y a los  $19.18 \pm 1.3$  del régimen quimoheterotrófico, entre este y el control (con valores de  $14.63 \pm 3.3$ ) no hubo diferencias significativas (Consultar **Figura 21a**).

La afinidad o actividad específica de cada célula por el sustrato amonio se presenta en la **Figura 22a**. En cultivos en lote, esta variable no es estadísticamente comparable entre los diferentes tiempos (días) por los cambios en las condiciones del cultivo. En la figura se

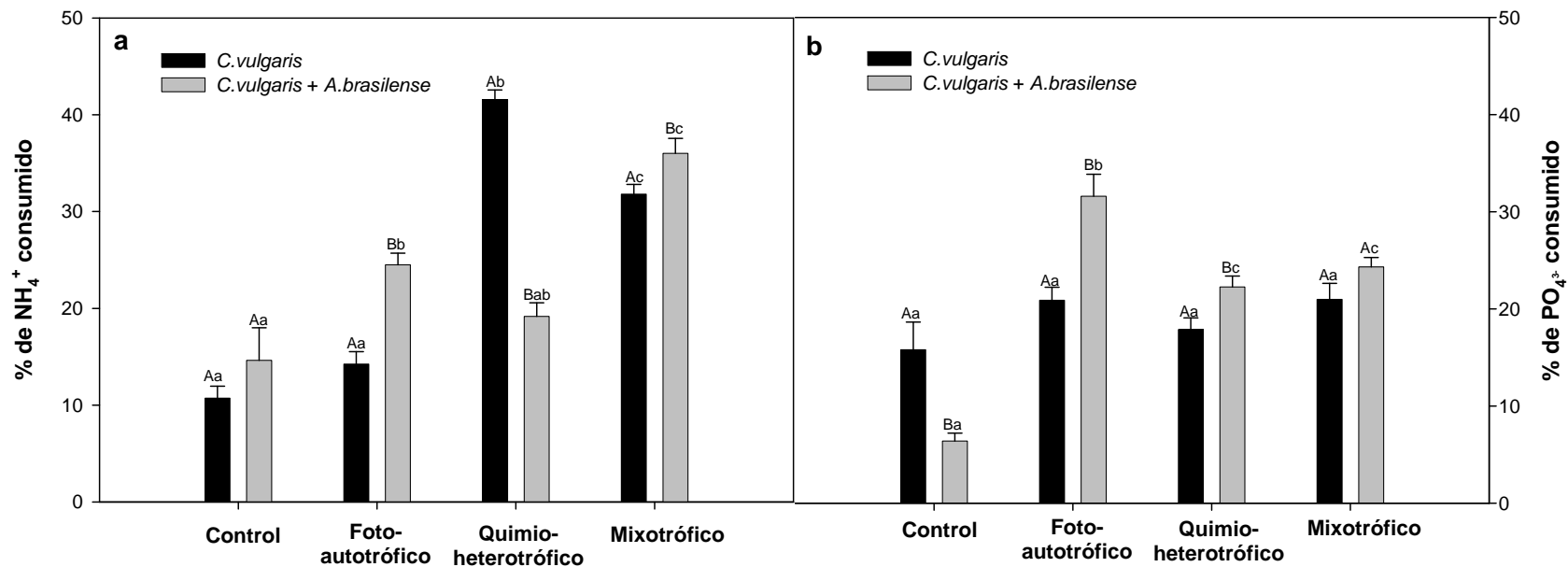
pude observar que la verdadera afinidad dada por el regimen solo es observable durante el primer día de cultivo. Tomando en cuenta esto, el valor de afinidad por el amonio durante el día 1 ( $IA_{NH_4^+}$ ) mas alto son los del régimen quimoheterotrófico con  $24.71 \pm 1.94 \text{pg célula}^{-1}$ , seguido por el régimen mixotrófico con  $11.53 \pm 0.47 \text{pg célula}^{-1}$ , el control con  $8.61 \pm 1.78 \text{pg célula}^{-1}$  y el régimen fotoautotrófico con afinidad mas baja  $1.79 \pm 0.15 \text{pg célula}^{-1}$ .

Todas las afinidades específicas por el amonio de *C. vulgaris* durante el día 1, son aumentadas por la presencia de *A. brasilense*, independientemente del régimen de cultivo (**Figura 22a**).

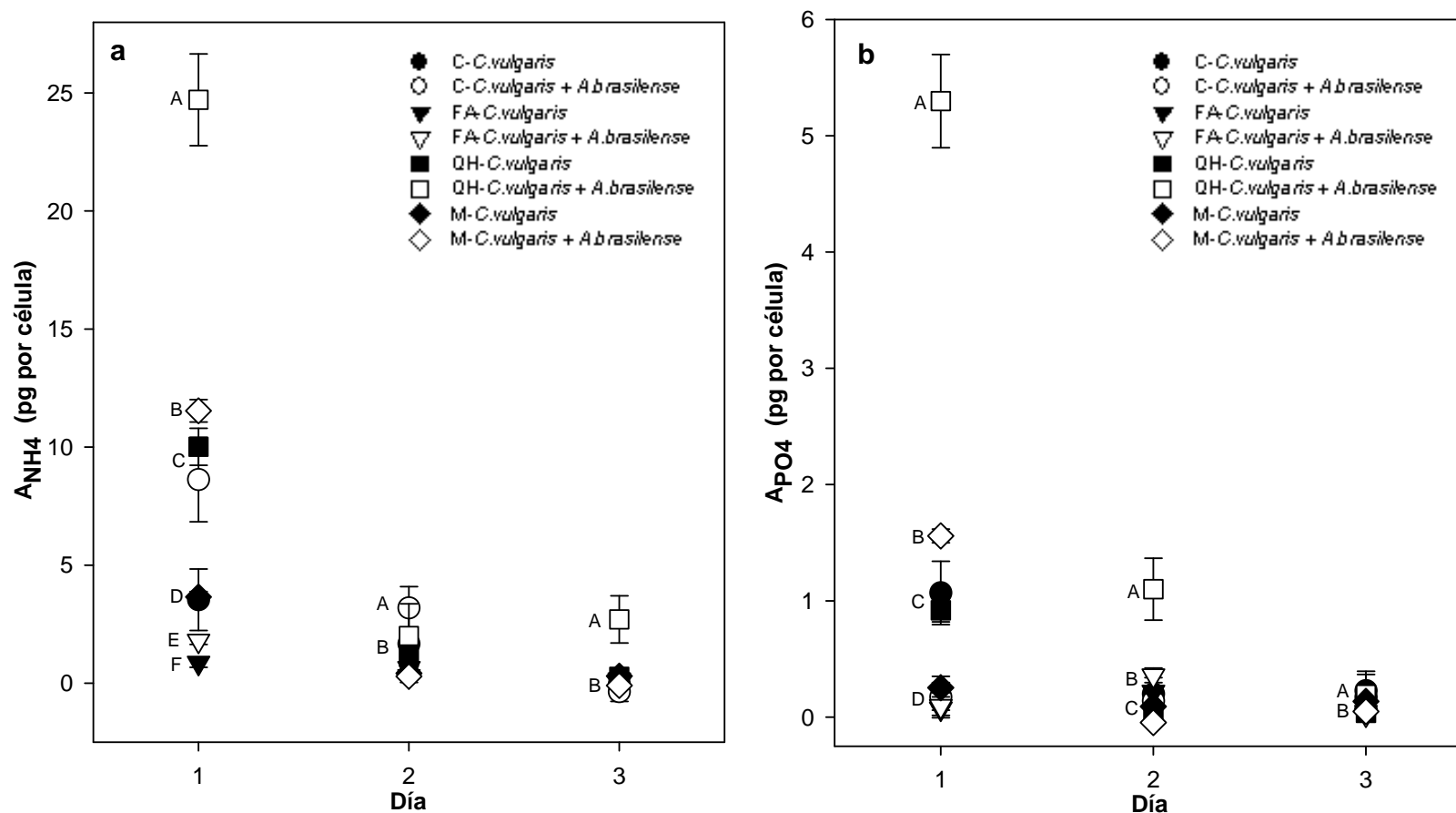
**FOSFATO.** En términos de cambio neto de la concentración de fosfato ( $\Delta PO_4^{3-}$ ) (**Tabla XV**), el régimen en el que se registraron cambios más amplios fue el fotoautotrófico con valores de  $3.05 \pm 0.31 \text{mg L}^{-1}$ . Lo cual es significativamente superior a los  $2.10 \pm 0.11 \text{mg L}^{-1}$  del régimen quimoheterotrófico y a los  $2.37 \pm 0.10 \text{mg L}^{-1}$  del régimen mixotrófico. En el régimen control se registraron los valores mas bajos ( $0.59 \pm 0.07$ ) incluyendo a los tratamientos con *C. vulgaris* sola.

El porcentaje de eliminación de fosfato (**Figura 21b**) se comporta paralelamente al consumo neto, los porcentajes mas altos son los del régimen fotoautotrófico ( $31.59 \pm 2.27\%$ ), seguidos del mixotrófico ( $24.32 \pm 0.96\%$ ) que es significativamente igual al quimoheterotrófico ( $22.26 \pm 1.1\%$ ) y por ultimo el control ( $6.38 \pm 0.81\%$ ).

En la **Figura 22b** se observa la afinidad específica del *C. vulgaris* por el fosfato al día 1 ( $IA_{PO_4^{3-}}$ ) en el régimen quimoheterotrófico fue la mas alta  $5.29 \pm 0.4078 \text{pg célula}^{-1}$  seguida del régimen mixotrófico  $1.55 \pm 0.05 \text{pg célula}^{-1}$ , no hay diferencias significativa entre la afinidad del régimen fotoautotrófico  $0.09 \pm 0.0705 \text{pg célula}^{-1}$  y el control  $0.17 \pm 0.1705 \text{pg célula}^{-1}$ .



**Figura 21.** Porcentajes consumido de nutrientes al tercer día de cultivo. Amonio (a) y Fosfato (b). Barras del mismo régimen rotuladas con diferente letra mayúscula, tiene diferencias significativas. Barras del mismo tratamiento (mismo color) rotuladas con diferente letra minúscula, tienen diferencias significativas. Las diferencias significativas fueron calculadas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$ .



**Figura 22.** Afinidad específica por los nutrientes en tres días de cultivo. Amonio (a) y Fósforo (b). Los puntos no son comparables entre los diferentes días. Solo son comparables los puntos del mismo día. Puntos con diferente letra mayúscula, tiene diferencias significativas según la prueba ANOVA de una vía seguida de un análisis post-hoc de *Tukey* a  $p \leq 0.05$ .



**CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS.** El aumento neto de células ( $\Delta N$ ) más altos se registraron en el régimen fotoautotrófico con  $7.32 \pm 0.27 \times 10^9$  células  $L^{-1}$  seguido del régimen mixotrófico con  $4.07 \pm 0.15 \times 10^9$  células  $L^{-1}$  (**Tabla XV**).

La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) más alta se registró en el régimen fotoautotrófico ( $0.80 \pm 0.03 d^{-1}$ ) y mixotrófico ( $0.72 \pm 0.00 d^{-1}$ ) sin haber diferencias significativas entre estos, seguidas de las tasas del régimen control y finalmente del quimoheterotrófico.

Los tiempos de generación son estadísticamente iguales entre los regímenes mixotrófico, fotoautotrófico y control

### 2.3.3 DISCUSIÓN

#### ELIMINACIÓN DE AMONIO

Usando el sistema coinmovilizado, el régimen mixotrófico, es el más eficiente en la eliminación de amonio del medio. Posteriormente el régimen fotoautotrófico y finalmente los regímenes quimoheterotrófico y control.

El porcentaje de eliminación más alto lo presentaron los cultivos mixotrófico con el  $36.01 \pm 1.54\%$  del amonio eliminado del medio, este porcentaje de eliminación es levemente superior a los  $31.79 \pm 1.00\%$  alcanzado por cultivos los mixotrófico de *C. vulgaris* sola.

El efecto superior de los cultivos mixotrófico para eliminar amonio podría ser causada por una combinación entre la afinidad al amonio por célula ( $A_{NH_4} = 11.53 \pm 0.47$  pg por célula) junto con una elevada tasa de crecimiento ( $\mu = 0.72 \pm 0.00 d^{-1}$ ). De hecho esta tasa no tiene diferencias significativas comparadas con la de cultivos fotoautotróficos  $0.80 \pm 0.03$  en los cuales se registraron las tasas más altas de crecimiento. La afinidad por el amonio de *C. vulgaris* coinmovilizada en el régimen quimoheterotrófico es la más alta, esto contrasta con el poco amonio neto eliminado del medio y con el poco crecimiento observado en este cultivo, de tal manera que las pocas células de *C. vulgaris* están tomando mucho amonio pero no lo están utilizando para la división celular, posiblemente lo estén almacenando en forma asparagina que es un aminoácido con baja proporción C:N y por lo tanto sirve como

almacén de nitrógeno (Cho *et al.*, 1981; Buchanan *et al.*, 2000). La eliminación de amonio en presencia de luz es mayor que en cultivos quimoheterotróficos por la densidad celular del cultivo y no por la afinidad de cada célula, De hecho se sabe que las células *Chlorella* producen pocas cantidades de  $\alpha$ -cetoglutarato y ácido pirúvico en presencia de luz comparado con células creciendo heterotroficamente en glucosa (Millbank, 1957), de esta manera las células heterótrofas disponen de más esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos mediante la asimilación primaria de amonio por el sistema enzimático GS/GOGAT y GDH.

La alta producción de biomasa en cultivos autotróficos se debe a la eficiencia en transformar el ATP generado en biomasa (Yang *et al.*, 2000).

La relación de afinidad Glucosa:NH<sub>4</sub> en el régimen quimoheterotrófico es alta 39.9 comparada con la del régimen mixotrófico 0.37, esto quiere decir que cada célula está consumiendo mucha glucosa en relación al amonio, caso contrario al régimen mixotrófico donde cada célula está consumiendo poca glucosa en relación al amonio, por lo que posiblemente la demanda de carbono no sea suministrada por la glucosa sino por el proceso fotosintético y este siendo utilizado para la división celular. La diferencia en la producción de biomasa entre ambos regímenes se debe a la mayor eficiencia en transformar la glucosa en ATP en cultivos heterotróficos vía la ruta de las pentosas fosfato (Yang *et al.*, 2000)

La presencia de la bacteria promotora de crecimiento en plantas *Azospirillum brasilense* aumenta el porcentaje de amonio eliminado del medio comparado con los cultivos con *C. vulgaris* sola, excepto en los cultivos quimoheterotróficos. El efecto de la presencia de *A. brasilense* para la eliminación de nitrógeno en el sistema coinmovilizado se hace evidente en el régimen fotoautotrófico. De esta manera se confirman los trabajos publicados por de Bashan *et al.* (2004; 2005) donde se establece que en cultivos con luz, la eliminación de nutrientes del agua residual sintética es aumentada usando la combinación *C. vulgaris* + *A. brasilense* en comparación con el uso de *C. vulgaris* sola.

El efecto de aumentar la eliminación de nutrientes en presencia de *A. brasilense* es más significativo en los cultivos fotoautotróficos comparado con el resto de los regímenes. En estos cultivos también se observó una alta tasa de crecimiento con valores  $\mu$  de  $0.78 \pm 0.01 \text{ d}^{-1}$  en cultivos con *C. vulgaris* sola y de  $0.80 \pm 0.03$  en cultivos de *C. vulgaris* + *A. brasilense*. También el aumento en el número de células es alto en ambos casos pero es un poco más alto en los cultivos con ambos organismos.

El porcentaje de eliminación más alto lo presentaron los cultivos mixotrófico con el  $36.01 \pm 1.54\%$  del amonio eliminado del medio de cultivo, este porcentaje de eliminación es levemente superior al alcanzado por cultivos mixotrófico de *C. vulgaris* sola  $31.79 \pm 1.00$ .

Ya que en los cultivos con solo *A. brasilense* no se presentó un consumo significativo de amonio (*Figura 17*), se puede afirmar que el aumento de la eliminación de amonio de cultivos con *C. vulgaris*+*A. brasilense* es causado por el efecto promotor de crecimiento de *A. brasilense* sobre *C. vulgaris* como lo afirma de Bashan *et al.* (2004; 2008b) y no por una toma directa de amonio por parte de *A. brasilense*.

Esta hipótesis contrasta con el hecho de que *A. brasilense* puede tomar amonio del medio para crecer ya que cuenta con un transportador activo de amonio (AmtB) en sus membranas celulares (Van Dommelen *et al.*, 1998).

La capacidad diazotrófica de *A. brasilense* solo se da en condiciones microaerofílicas, los cultivos inmovilizados están en condiciones aerobias, si *A. brasilense* está creciendo sin fijar  $\text{N}_2$  y sin asimilar amonio del medio (*Figuras 14 y 18*), posiblemente lo está obteniendo de algún metabolito secundario nitrogenado excretado por la microalga. De hecho Watanabe *et al.* (2006), caracterizó la composición de los exudados de *Chlorella sorokiniana* en condiciones fotoautotróficas y detectó que además de diversos azúcares (Sucrosa, ácido galacturónico, xilitol, inositol, manosa, galactosa, arabinosa, ramnosa y fructosa) el mucílago de *C. sorokiniana* contenía  $809 \mu\text{g}$  de proteína por gramo de peso seco celular. Posiblemente estos compuestos nitrogenados están siendo utilizados por *A. brasilense* satisfaciendo sus demandas de nitrógeno y carbono al mismo tiempo. De hecho los resultados del experimento “Cultivos de *A. brasilense* en diversas fuentes de carbono”

de la sección 2.2. mostrados en la **Figura 9** del presente trabajo, muestran que *A. brasilense* crece bien en cultivos con Medio Residual Sintético adicionados con peptona como fuente de carbono.

Si asumimos la hipótesis de que *A. brasilense* No asimila amonio del medio y obtiene el nitrógeno a través de los exudados orgánicos nitrogenados de la microalga, surge la pregunta, del por que *A. brasilense* no esta asimilando para su crecimiento el amonio libre y abundante del medio?

### **ELIMINACIÓN DE FOSFATO**

El régimen de cultivo no tiene efecto en el consumo de fosfato a menos que *A. brasilense* se encuentre presente. La presencia de la bacteria en el sistema coinmovilizado aumenta la eliminación de fosfato, siendo más pronunciado este efecto aditivo en cultivos fotoautotróficos probablemente a la síntesis del sistema de membranas de los cloroplastos.

La afinidad por el fosfato de *C. vulgaris* coinmovilizada en el régimen quimoheterotrófico es la mas alta, esto contrasta con el poco fosfato neto eliminado del medio y con el poco crecimiento observado en este cultivo, de tal manera que las pocas células de *C. vulgaris* están tomando mucho fosfato pero no lo están utilizando para la división celular, posiblemente lo estén almacenando en forma de polifosfatos

### **INFLUENCIA DE *A. brasilense***

Un efecto de inhibición por parte de *A. brasilense* en el crecimiento quimoheterotrófico de *C. vulgaris* se observa en la **Figura 15c**. Este efecto no se puede explicar por competencia del sustrato glucosa ya que esta bien documentado que *A. brasilense* no puede utilizar la glucosa para su crecimiento (Westby *et al.*, 1983; Van Dommelen *et al.*, 1997). A pesar de que no se esta aumentando el numero de células de *C. vulgaris*, si se esta eliminando amonio, fosfato y glucosa del medio. En estos cultivos, la afinidad de *C. vulgaris* por los sustratos amonio y fosfato es significativamente alta en comparación al resto de los

cultivos (*Figura 23*). En contraste los rendimientos  $Y_{N/NH_4}$  y  $Y_{N/PO_4}$ , son los mas bajos de todos la serie de experimentos con el tratamiento *C. vulgaris*+*A. brasilense*. Esto no indica que las células se encuentran metabolitamente activas consumiendo altas cantidades de sustratos pero no los están utilizando para llevar a cabo la división celular.

En todos los regimenes con cultivos de ambos organismos se registró un aumento en la afinidad al los sustratos  $NH_4^+$  (*Figura 23a*) comparados con los cultivos de solo *C. vulgaris* del mismo régimen. De lo anterior podemos deducir que el efecto de *A. brasilense* sobre la microalga se da nivel de aumento de la actividad en el consumo y asimilación de  $NH_4^+$  de cada célula y no como consecuencia del aumento en el número de células, como lo plantea de Bashan *et al.* (2008b). El aumento en el consumo de amonio podría darse por la activación de la enzima Glutamato deshidrogenasa (GDH) en presencia de *A. brasilense* complementando la actividad de la ruta Glutamina Sintasa-Glutamato Sintasa GS/GOGAT (Bashan *et al.*, 2008b) El mayor efecto de *A. brasilense* en el aumento del consumo de amonio por célula en cultivos quimioheterotrófico podría atribuirse la activación de la isoforma NADH-GDH constitutiva presente en la mitocondria e independiente de luz, la cual posiblemente no se estaría activando en cultivos fotoautotróficos. Posiblemente si *A. brasilense* tiene su principal efecto de aumentar la toma de Amonio mediante de la activación de la GDH, la isoforma activada sea la NADH-GDH de mitocondria y no la NADPH-GDH de cloroplasto que además es dependiente de la concentración de amonio.

Los metabolismos de nitrógeno y carbono están ligados por que deben de compartir el carbono orgánico y el abastecimientos de energía provenientes de la fotosíntesis (procesos fotoautotróficos: cadena transportadora de electrones de la fotosíntesis y la fijación del  $CO_2$ ) o la respiración (procesos quimioheterotróficos: carbono fijado vía glicólisis, al ciclo del acido tricarboxilico y la cadena mitocondrial transportadora de electrones) Ambos procesos convergen en el ciclo de ácidos tricarboxilicos, el cual suministra ceto-ácidos (2-oxoglutarato) al sistema enzimático GS/GOGAT y la GDH para incorporarles amonio y formar aminoácidos (Huppe y Turpin, 1994).

## DISMINUCIÓN DEL pH

Tomando en cuenta la información y las conclusiones recabadas en los análisis preliminares del agua residual (Sección 2.1) del crecimiento heterotrófico de *C. vulgaris* (Sección 2.3) se realizaron los experimentos usando células inmovilizadas.

En los cultivos inmovilizados, todos los tratamientos donde creció *C. vulgaris* con o sin *A. brasilense* presentaron una caída continua del pH a partir del día 0 cultivo hasta el día 3, alcanzando a valores aproximados de 4.2 para después mantenerse en este valor. Esta caída afectó negativamente el crecimiento de todos los cultivos. Posiblemente de mantenerse el pH en valores óptimos para el crecimiento, se habrían alcanzado valores más altos en la eliminación de nutrientes y en el número de células, limitados solo por la densidad celular dentro de la esfera y su transferencia de masa (Dervakos y Webb, 1991).

La disminución del consumo de nutrientes a través del tiempo puede ser observada en la *Figura 23* donde se presentan los valores de Afinidad específica por los sustratos  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$ . Es notorio que como disminuye el consumo por célula de nutrientes en el día 2, de esta manera el consumo final observado en los cultivos es principalmente resultado de la actividad metabólica de las células durante el primer día de cultivo.

El nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_4^+$ ) es la fuente preferida de Nitrógeno por las algas, y la asimilación de  $\text{NH}_4^+$ , esta relacionada con el pH del medio de cultivo (Kaplan *et al.*, 1986). Cuando el amonio es utilizado como única fuente de Nitrógeno, el pH puede disminuir significativamente durante el crecimiento activo, por la liberación de iones  $\text{H}^+$ . causando efectos negativos al crecimiento celular (Kaplan *et al.*, 1986; Grobbelar, 2004). De manera experimental Tam y Wong (1996), reportan que el crecimiento de *C. vulgaris* en conjunción con la toma amonio del medio coinciden con una disminución significativa del pH. A partir de concentraciones de 50mg L<sup>-1</sup> de N-NH<sub>4</sub> el pH del medio de cultivo disminuye de manera significativa ( $\text{pH} \leq 4.5$ ) a través del periodo de cultivo (0-21 días), a pesar de que el pH ha sido ajustado a neutro diariamente. Esto sugiere que altas cantidades

de iones  $H^+$ , son generados en medios con altas concentraciones de amonio (Tam y Wong, 1996).

La disminución del pH apoya la hipótesis de que el Nitrógeno no se está perdiendo por volatilización, y que la reducción de amonio del medio es causada por la asimilación de las células de *C. vulgaris*. Pérdidas de amonio del medio solo son significativas a  $pH > 8.5$  cuando el amonio ( $NH_4^+$ ) se desprotoniza por su valor  $pK_a = 9$  y se pierde en forma de amoniaco ( $NH_3$ ) que es un gas, por volatilización (Tam y Wong, 1996). De manera contrastante, un incremento en pH ocurre cuando  $NO_3$  es administrado como única fuente de nitrógeno. Este factor que puede ser importante para decidir si suministrar amonio o nitrato o ambos como fuente de Nitrógeno.

Otro factor que podría influir en la baja del pH del medio es la disminución de iones  $PO_4^{3-}$  por medio de la toma directa de las células. Ya que el medio MRS está formulado con una proporción de sales de Fosfato que actúan como sistema amortiguador del pH, el consumo activo del fosfato podría romper el balance necesario para que actúe como base disociada-acido y de esta manera perder la capacidad amortiguadora de la solución.

# 3 CONCLUSIONES

El agua residual analizada es candidata de ser tratada con un proceso de biorremediación puesto que tiene altas concentraciones de nutrientes (amonio y fosfato) que pueden generar impactos negativos al ambiente.

El agua residual analizada tiene características de pH, salinidad, turbidez, conductividad y temperatura que son compatibles con el ambiente en el que los organismos pueden desarrollarse sin que estas variables limiten el crecimiento

El agua residual de las muestras analizadas no contiene carbono orgánico biodisponible para los organismos puesto que tiene una baja DBO5 y no se detectaron ácidos orgánicos y aminas primarias en cantidades significativas para ser usadas como sustrato de carbono por *C. vulgaris* y *A. brasilense* para crecer. *C. vulgaris* es incapaz de crecer en agua residual en completa obscuridad, pero si lo hace cuando hay luz o cuando el agua residual esta adicionada con glucosa o acetato.

*C. vulgaris* en suspensión es capaz de crecer quimoheterotroficamente en completa obscuridad en caldo nutritivo y en el medio residual sintético adicionado con acetato, glucosa y peptona. En medios con urea hay baja capacidad de utilizarla como fuente de carbono en condiciones de completa obscuridad, caso contrario a cultivos con luz. En cultivos quimoheterotróficos el número de células mL<sup>-1</sup> esta correlacionado con el amonio eliminado del medio de cultivo.

Glucosa y acetato son las moléculas candidatas más fuertes para ser utilizadas como fuentes de carbono en cultivos quimoheterotróficos o mixotrófico de *C. vulgaris*, por el alto crecimiento registrado en ellas comparado con otras moléculas orgánicas y por sus bajos costos. Con concentraciones de 10g L<sup>-1</sup> de acetato se registraron las densidades más altas en el cultivo heterotrófico de *C. vulgaris*. Aumentar la concentración de acetato a 15g L<sup>-1</sup> inhibe el crecimiento. Ya que no se observan cambios significativos en la densidad celular generada usando 11, 22 o 32 g L<sup>-1</sup> de glucosa, es preferible usar la menor cantidad para el



cultivo de *C. vulgaris*. Este organismo no crece heterotroficamente en MRS+N adicionado con sacarosa comercial, vinagre comercial o acetato de calcio.

A pesar de las diversas fuentes de carbono adicionadas al medio MRS+N, este no es un medio apropiado para el cultivo de *Azospirillum brasilense* y por el contrario este organismos se encuentra estresado y se mantiene en fase estacionaria probablemente creciendo con sus reservas energéticas. Los cultivos adicionados con ácido málico y arabinosa son en los que se registra mayor aumento en el número de células.

El acetato de sodio disuelve las esferas de alginato de calcio al 2% cuando es adicionado al medio MRS+N en concentraciones de  $10\text{g L}^{-1}$ , por lo que su uso como fuente de carbono orgánico en cultivos inmovilizados, requiere una mayor resistencia de la matriz de inmovilización o que el acetato no sea adicionado directamente al medio a tratar.

En los experimentos con células inmovilizadas. Usando glucosa como sustrato orgánico, el sistema coinmovilizado forzosamente requiere de regímenes de luz para obtener altas remociones de amonio, ya sea fotoautotrófico o mixotrófico.

En el régimen mixotrófico es mayor la eliminación de amonio comparada con el régimen fotoautotrofico, con la diferencia de que en este último es mayor el crecimiento de *C. vulgaris*, en términos de células producidas, biomasa generada, tasa de crecimiento y rendimiento de células generadas por unidad de amonio consumido. Siendo así el régimen mixotrófico es más eficiente si se desea eliminar amonio, el régimen fotoautotrófico no es tan eficiente en la eliminación de amonio pero tiene la ventaja de que se producen mayores cantidades de biomasa

Independientemente del régimen de cultivo la afinidad de *C. vulgaris* por el amonio es incrementada por la presencia de *A. brasilense* en el sistema coinmovilizado.

En términos de eliminación de fosfato, el régimen fotoautotrófico es definitivamente superior al resto de los regímenes, puesto que se obtienen mayores porcentajes de

eliminación, así como mayores rendimientos de células y biomasa producida por unidad de fosfato eliminado del medio.

El régimen de cultivo no tiene efecto en el consumo de fosfato por parte de *C. vulgaris* a menos que *A. brasilense* se encuentre presente, de tal manera que la presencia de la bacteria en las esferas de alginato aumenta la eliminación de fosfato, siendo más pronunciado este efecto aditivo en cultivos fotoautotróficos.

El régimen quimoheterotrófico en glucosa no es una opción adecuada para la eliminación de amonio y fosfato del medio. El sistema coimmobilizado remueve prácticamente la misma cantidad de nutrientes adicionando o no glucosa al medio en completa oscuridad, por lo que en estas condiciones, es preferible no usar glucosa. El uso del régimen quimoheterotrófico es justificado cuando no se puede suministrar luz, cuando no es importante la producción de biomasa y cuando es posible incrementar el número de esferas añadidas al medio puesto que la afinidad por ambos nutrientes de las células quimoheterotróficas es la mayor del resto de los tratamientos. De esta manera es posible incrementar la eliminación neta de los nutrientes, aumentando el número de células dentro del cultivo.

El régimen quimoheterotrófico es una buena opción para eliminar amonio y fosfato del medio cuando no está presente la bacteria *A. brasiliense*. Cuando *C. vulgaris* está sola, los diferentes regímenes no ofrecen ventajas o desventajas en términos de eliminación de fosfato pero el régimen quimoheterotrófico es más efectivo para eliminar amonio y generar biomasa que el resto.

En todos los experimentos con *C. vulgaris* inmovilizada con o sin la bacteria, se registró una disminución significativa del pH del medio a valores de 4. Esto es explicado por el consumo de amonio por parte de la microalga que conlleva una liberación de iones  $H^+$  al medio por efecto de la asimilación de amonio para la biosíntesis de aminoácidos. Se especula manteniendo estable el pH del medio en valores neutros, es posible incrementar la eliminación de nutrientes y el crecimiento de los organismos.

En términos generales el desempeño de los biorreactores para eliminar nutrientes es alto comparado a los de cultivos en matraces de 250 o 500mL. Independientemente del régimen y del tratamiento, las eliminaciones netas de nutrientes en mg de amonio o fosfato por litro de cultivo, son mayores a reportes anteriores usando los sistemas inmovilizado de *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* a pesar de que los porcentajes de eliminación de nutrientes fueron menores al 50%. Siendo así, podemos concluir que el escalamiento del proceso de eliminación de nutrientes a matraces invertidos de 1L ha sido exitoso.

En resumen los tratamientos mas eficientes para eliminar amonio y fosfato son: *C. vulgaris* coinmovilizada con *A. brasilense* en régimen fotoautotrófico; *C. vulgaris* inmovilizada sola en régimen quimioheterotrofico y *C. vulgaris* coinmovilizada con *A. brasilense* en regimenes mixotrófico Entre los dos primeros tratamientos no hay diferencias significativas en el crecimiento de *C. vulgaris* y su producción de biomasa pero el primero es más eficiente para eliminar fosfato, mientras que el segundo es más eficiente para eliminar amonio. En el tercer tratamiento se dan altas eliminaciones de ambos nutrientes mas equilibradas. Dado estas consideraciones se concluye que:

- Los tratamientos con *C. vulgaris* coinmoivlizada con *A. brasilense* en régimen foto autotrófico deben ser usados cuando la prioridad del tratamiento sea disminuir la concentración de fosfato y/o cuando la fuente de carbono orgánica (glucosa) sea un factor limitante por costos o disponibilidad
- Los tratamientos con *C. vulgaris* inmovilizada sola en régimen quimioheterotrófico deben ser usados cuando la prioridad del tratamiento sea disminuir la concentración de amonio y/o cuando el suministro de luz sea un factor limitante por su costo, poca disponibilidad o por la dificultad de diseño y operación de los fotobiorreactores
- El régimen mixotrófico usando el sistema coinmovilizado, ofrece altas remociones de amonio y niveles intermedios de producción de biomasa y eliminación de fosfatos. Puede ser aplicado cuando la prioridad del tratamiento sea eliminar amonio y no se disponga de una fuente continua de luz como por ejemplo en exteriores

En el caso de contar con un tratamiento quimoheterotrófico o mixotrófico que logre eliminar altos porcentajes de nutrientes del medio tratado, este también deberá maximizar el consumo del sustrato orgánico, de tal manera que el efluente del proceso no contenga concentraciones altas del mencionado sustrato. La aplicación de una fuente de carbono exógena (como acetato o glucosa) al efluente secundario se justifica cuando otras estrategias para eliminar el exceso de nutrientes sean más costosas o cuando el costo de los impactos al ambiente generados por el exceso de nutrientes sea mayor al costo de la adición de carbono orgánico al proceso.

# 4 REFERENCIAS

- Abe, K., Takahashi, E., Hirano, M.** 2008. Development of laboratory-scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*. 20: 283–288.
- Abeliovich, A., Azov, Y.** 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage ponds. *Applied and Environmental Microbiology*. 31: 801-806.
- Apt, K. E., Behrens, P. W.** 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. Review. *Journal of Phycology* 35: 215–226.
- Atlas, R. M., Bartha, R.** 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ta Edición. Pearson edicacion. Madrid. p 473-501
- Barsanti, L., Gualtieri, P.** 2000. *Algae. Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. p.2.
- Bashan, Y.** 1986. Alginate beads as synthetic inoculants carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*. 51: 1089-1098.
- Bashan, Y.** 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16: 729-770.
- Bashan, Y., Holguin, G., de-Bashan, L. E.** 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and enviromental advances (1997 - 2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50: 521 – 577.
- Becker, E. W.** 2003. *Microalgae Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press. New York. p.267, 293.
- Behrens, P. W.** 2005. Photobioreactor and Fermentors: The light and the dark sides of the growing algae. En: Andersen, R. A (ed.). *Algal culturing techniques*. Phycological Society of America. Elsevier Academic Press. Amsterdam. p.189-203.

- Benedict, C. R.** 1978. Nature of obligate photoautotrophy. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 29: 67–93.
- Benemann, J. R.** 1989. The future of microalgal biotechnology. En: Cresswell, R. C., Rees, T. A. V., Shah N (eds.). *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*. Longman Scientific and Technical. Harlow. p. 317-337.
- Bitton, G.** 2005. *Wastewater microbiology*. 3rd edition. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology. Wiley and Sons Publications. New Jersey. p.213-222.
- Blackburn, S.** 2004. Water pollution and bioremediation by microalgae: eutrophication and water poisoning. En: Richmond, A (ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell publishing. p.417-429.
- Bollman, R. C., Robinson, G. G. C.** 1977. The kinetics of organic acid uptake by three chlorophyta in axenic culture. *Journal of Phycology* 13: 1-5.
- Borowitzka, M. A.** 1992. Algal biotechnology products and process. Matching science and economics. *Journal of Applied Phycology* 4: 267-279.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. Editores** 1998. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press. Cambridge. p.477.
- Buchanan, B. B., Gruissen, W., Jones, R. L.** 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville. p1367.
- Cannell, R. J.** 1993. Algae as a source of biologically active products. *Pesticide Science*. 39: 147-153.
- Carpenter, S. R., Caraco, N. F, Smith, V. H.** 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*. 8: 559-568.
- Cassidy, M. B., Lee, H., Trevors, J. T.** 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 16: 79-101.
- Chaumont, D.** 1993. Biotechnology of algal biomass production: a review of systems of outdoor mass culture. *Journal of Applied Phycology* 5: 593-604.
- Chen, F.** 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in biotechnology*.14: 421-426.

- Chen, F., Johns, M. R.** 1996. Heterotrophic growth of *Chlamydomonas reinhardtii* on acetate in chemostat culture. *Process in Biochemistry*. 31: 601-604.
- Chen, G.-Q., Chen, F.** 2006. Growing phototropic cells without light. *Biotechnology Letters*. 28: 607-616.
- Chevalier, P., De la Noue, J.** 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbiology Technology*. 7: 621-624
- Chisti, Y.** 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25: 294–306. *Chlorella* based on a hybrid neural network model. *Letters in Applied Microbiology* 44: 13–18.
- Cho, B.-H., Sauer, N., Komor, E., Tanner, W.** 1981. Glucose induces two amino acids transport systems in *Chlorella*. *Proceedings of the National Academy of Science* 78: 3591-3594.
- 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.
- Confer, D. R., Logan B. E.** 1998. Location of protein and polysaccharide hydrolytic activity in suspended and biofilm wastewater cultures. *Water Research* 32: 31-38
- Confer, D. R., Logan, B. E., Aiken, B. S., Kirchman, D. L.** 1995. Measurement of dissolved free amino acids in unconcentrated wastewaters using high performance liquid chromatography. *Water Environment Research*, 67:118-125.
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J. M., Flores-Cotera, L. B., Cañizares-Villanueva, R. O.** 2003. Avances en el diseño conceptual de fotobioreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia*. 28: 450-456.
- Cooney, C. L.** 1983. Bioreactors: Design and Operation. *Science*. 219: 728-733.
- de Bashan, L. E., Moreno, M., Hernandez, J. P., Bashan, Y.** 2002a. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36: 2941-2948.

- de Bashan, L. E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V. K., Bustillos J. J.** 2002b. Increased pigment and lipid content, lipid variety and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 514-521
- 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., 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., Antoun, H., Bashan, Y.** 2008a. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the Growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting Growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 44: 938–947.
- de Bashan, L. E., Magallon, P., Antoun, H., Bashan, Y.** 2008b. 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., Trejo, A., Huss, V. A. R., Hernandez, J.-P., Bashan, Y.,** 2008c. *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology*. 99: 4980–4989.
- de la Noüe J., Lessard, P. Proulux, D.** 1992. Algae and wastewater. *Journal of Applied Phycology*. 4 :247-254.
- de la Noüe, J., de Pauw, N.** 1988. The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances* 6:725-670.



- Dervakos, G. A., Webb, C.** 1991. On the merits of viable-cell immobilization. *Biotechnology Advances*. 9: 559-612.
- Di Marlino Rigano, V., Martello, A., Di Martino, C., Rigano, C.** 1985. Effect of CO<sub>2</sub> and phosphate deprivation on the control of nitrate, nitrite and ammonium metabolism in *Chlorella*. *Physiology of Plant*. 63: 241-246.
- Dickson, L. G., Galloway, R. A., Patterson, G. W.** 1969. Environmentally induced changes in the fatty acids of *Chlorella*. *Plant Physiology*. 41: 1413-1416.
- Disch, A., Schwender, J., Muller, C., Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M.** 1998. Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis PCC 6714*. *Biochemistry Journal*: 333: 381-388.
- Droop, M. R.** 1974. Heterotrophy of carbon. En: Stewart, W. D. P (ed.). *Algal physiology and biochemistry*. Botanical Monographs Volumen 10. University of California Press. Los Angeles. p.530.
- Edwards, G. P., Molof A. H., Scheneeman, R. W.** 1965. Determination of orthophosphate in fresh and saline waters. *J. Amer, Water Works Assoc.* 57:917
- Endo, H., Sansawa, H., Nakajima, K.** 1977. Studies on *Chlorella regularis* fast-growing strain II. Mixotrophic growth in relation to Light intensity and acetate concentration. *Plant and Physiology*. 18: 199-205.
- Evans, G. M., Furlong, J. C.** 2003. Phytotechnology and photosynthesis. In *Environmental Biotechnology: Theory and Applications*. 1<sup>st</sup> Edition. Wiley Publishing. New York. p.163-169.
- Gladue, R. M., Maxey, J. E.** 1994. Microalgal feeds for aquaculture. *Journal of Applied Phycology*. 6: 131-141.
- Gonzalez, L. E., Bashan, Y.** 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coinmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1527-1531.

- Gonzalez, L. E., Canizares, R.O., Baena, S.** 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology* 60: 259-262.
- Grady, C. P. L. Jr, Kirsh, E. J., Koczwara M. K., Trogovcich, B., Watts R. D.** 1994. Molecular weight distributions in active sludge effluents. *Water Research* 18: 239-245.
- Grobbelaar, J. U.** 2004. Algal Nutrition, mineral nutrition. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and applied phycology.* Blackwell Publishing. Oxford. p.97.
- Gudin, C., Therpenier, C.** 1986. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Advances in biotechnological processes.* 6: 73–110.
- Haass, D., Tanner, W.** 1974. Regulation of hexose transport in *Chlorella vulgaris*. Characteristics of induction and turnover. *Plant Physiology* 53: 14-20.
- Harris, R. V., Harris, P., James, A. T.** 1965. The fatty acids metabolism of *Chlorella vulgaris*. *Biochemistry and Biophysics Acta.* 106: 465-473.
- Hernández –López J., Vargas-Albores, F.** 2003. A microplate technique to quantify nutrientes ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$ ) in seawater. *Aquaculture Research.* 34, 1201-1204.
- Hernandez, J. P., de Bashan, L. E., Bashan, Y.** 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology.* 38: 190–198.
- Hilgarth, C., Sauer, N., Tanner, W.** 1991. Glucose increases the expression of the ATP/ADP Translocator and the Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase genes in *Chlorella*. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 266: 24044-24047.
- Hoffman, J. P.** 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology.* 34: 757-763.

- Huppe, H. C., Turpin, D. H.** 1994. Integrations of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 45: 577-607.
- Hutchinson, G. E.** 1973. Eutrophication. American Scientist 61: 269–279.
- Ilani, T., Schulz, E., Chefetz, B.** 2005. Interactions of Organic Compounds with Wastewater Dissolved Organic Matter: Role of Hydrophobic Fractions. Journal of Environmental Quality. 34: 552–562.
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Choi, K.** 2002 Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. Water Research 36: 859–870.
- Ip, P.-F., Chen, F.** 2005. Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark. Process Biochemistry 40: 733–738.
- Iwamoto, H.** 2004. Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – Major industrial species, *Chlorella*. En: Richmond, A. (ed.). Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology. Blackwell publishing. Oxford. p.255.
- Kamiya, A., Kowallik, W.** 1987. The inhibitory effect of light on proton-coupled hexose uptake in *Chlorella*. Plant and Cell Physiology. 28: 621-625.
- Kaplan, D., Christiaen, D., Arad, S. M.** 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp. Applied and Environmental Microbiology. 53: 2953-2956.
- Kaplan, D., Richmond, A., Dubinsky, Z., Aaranson, S.** 1986. Algal Nutrition. En: Richmond, A. (ed.). CRC Handbook of Microalgal Mass Culture. CRC Press. Boca Raton. p.147.
- Karel, F. S., Libicki, S. B., Robertson R.** 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. Chemical Engineering Science. 40: 1321-1354.
- Katsoyiannis, A., Sanara, C.** 2007. The fate of dissolved organic carbon (DOC) in the wastewater treatment process and its importance in the removal of wastewater contaminants. Environmental Science Pollution Research. 14: 284-292.

- Komor, E., Haass, D., Komor, B., Tanner, W.** 1973. The active hexose-uptake system of *Chlorella vulgaris*. European Journal Biochemistry. 39: 193-200.
- Komor, E., Schobert, C., Cho, B.-H.** 1985. Sugar specificity and sugar-proton interaction for the hexose-proton-symport system of chlorella. European Journal of Biochemistry. 146: 649-656.
- Komor, E., Tanner, W.** 1974. The hexose-proton cotransport system of *Chlorella* pH-dependent change in *K<sub>m</sub>* values and translocation constants of the uptake system. The Journal Of General Physiology. 64: 568-581.
- Kovarova-Kovar, K., Egli, T.** 1998. Growth kinetics of suspended cells: From single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 646-666.
- Lachat Instruments.** 1985. QuikChem series 8000 FIAS+. Operation manual. Milwaukee, USA.
- Landstein, D., Chipman, D. M., Arad, S., Barak, Z.** 1990. Acetohydroxy acid synthase activity in *Chlorella emersonii* under auto- and heterotrophic growth conditions. Plant Physiology. 94: 614-620.
- Lau, P., Tam, N. F. Y., Wong, Y. S.** 1997. Wastewater nutrients (*N* and *P*) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. Environmental Technology. 18: 893-899.
- Lebsky, V. K., Gonzalez-Bashan L. E., Bashan, Y.** 2001. Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growthpromoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Canadian Journal of Microbiology. 47: 1-8.
- Lee, K., Lee, C.-G.** 2002. Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. Journal of Microbial Biotechnology. 12: 979-985.
- Lee, Y.-K.** 1997. Commercial production of microalgae in the Asia-Pacific rim. Journal of Applied Phycology. 9: 403-411.

- Lee, Y.-K.** 2001. Microalgal mass culture systems and methods: Their limitation and potential. *Journal of Applied Phycology*. 13: 307-315.
- Lee, Y.-K.** 2004. Algal nutrition. Heterotrophic carbon nutrition. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of microalgal culture, biotechnology and applied phycology*. Blackwell publishing. Oxford. p.116.
- Li, X., Xu, H., Wu, Q.** 2007. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*. 98: 764-771.
- Logan, B. E., Jiang, Q.** 1990. A model for determining molecular size distribution of DOM. *Journal of Environmental Engineering*. 116: 1046-1062.
- Maccarthy, J. J., Patterson, G. W.** 1974. Effects of cation levels of the nutrient medium on the biochemistry of *Chlorella*. Concentration series. *Plant Physiology*. 54: 129-132.
- Madiagn, M. T., Martinko, J. M., Parcker, J.** 2004. Brock, *Biología de los organismos*. 10ma Edición. Pearsons Education. Madrid. p.137.
- Martínez F., Orús, M. I.** 1991. Interactions between glucose and inorganic carbon metabolism in *Chlorella vulgaris* strain UAM101. *Plant Physiology*. 95: 1150-1155
- Masojidek, J., Koblizek, M., Torzillo, G.** 2004. Photosynthesis in microalgae. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of Microalgal culture: biotechnology and applied phycology* Blackwell Publishing. Oxford. p.20.
- Meganck, M. T. J., Faup, G. M.** 1988. Enhanced biological phosphorus removal from waste water. In: *Biotreatment Systems, Vol 3*. Edited by Wise, D. L. CRC Press. Boca Raton. p.111-203.
- Metcalf & Eddy, Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H. D.** 2002. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill Professional. USA. p.1030.
- Millbank, J. W.** 1957. Keto-acids in the alga *Chlorella*. *Annals of Botany*. 21: 23-31.
- Molina Grima, E., Acien Fernandez, F. G., Robles Medina, A.** 2004. Downstream processing of cell mass and products. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of*

Microalgal culture: biotechnology and applied phycology Blackwell Publishing. Oxford. p.215.

- Molina, E., Fernandez, F. G. Chisti, Y.** Tubular photobioreactor design for algal cultures. Journal of Biotechnology. 92: 113-131.
- Muñoz, R., Guieysse, B.** 2006. Algal-bacterial processes for treatment of hazardous contaminants: A review. Water Research. 40: 2799-2815.
- Nielson, A. H., Larson, T.** 1980. The utilization of organic nitrogen for growth of algae: physiological aspects. Physiologia Plantarum. 48: 542-553.
- NMX-AA-028-SCFI-2001.** 1981. "Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno en aguas naturales, residuales (DBO<sub>5</sub>) y residuales tratadas-Método de diluciones". Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario oficial de la federación. México, DF.
- NOM-001-SEMARNAT-1996.** 1997. Norma Oficial Mexicana que "Establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales". Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. Diario oficial de la federación. México, DF.
- O'Reilly, A. M., Scott J. A.** 1995. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. Enzyme and Microbial Technology. 17: 636-646.
- Ogawa, T., Aiba, S.** 1981. Bioenergetic analysis of mixotrophic growth in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. Biotechnology and Bioengineering. 23: 1121-1132.
- Ogbonna, J. C., Masui, H., Tanaka, H.** 1997. Sequential heterotrophic/autotrophic cultivation – an efficient method of producing chlorella biomass for health food and animal feed. Journal of Applied. Phycology. 9: 359-399.
- Ogbonna, J. C., Tanaka, H.** 1997. Industrial-size photobioreactors. The American Chemical Society. Chemtech: 27. 43-49.
- Ogbonna, J. C., Tanaka, H.** 2000. Light requirement and photosynthetic cell cultivation. Development of process for efficient light utilization in photobioreactors. Journal of Applied Phycology. 12: 499-506.

- Ogbonna, J. C., Yoshizawa, H., Tanaka, H.** 2000. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *Journal of Applied. Phycology.* 12: 277–284.
- Olguin, E. J., Galicia, S., Mercado, G., Perez, T.** 2003. Annual productivity of spirulina (arthrospira) and nutrient removal in pig wastewater recycling process, under tropical conditions. *Journal of applied phycology;* 15. 249-257
- Olguin, E.J.** 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances;* 22. 81-91.
- OOMSAPAS Organismo Operador Municipal del Sistema de Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento de La Paz.** 2008. H. XIII Ayuntamiento de La Paz. <http://www.lapaz.gob.mx/sapa.htm>
- Oswald, W. J.** 1962. The coming industry of controlled photosynthesis. *American Journal of Public Health and the Nation's health.* 52: 235-242.
- Oswald, W. J., Gotaas, H. B., Goluke, C. G., Kellen, W. R.** 1957. Algae in waste treatment. *Sewages and Industrial Wastes.* 29:437-455.
- Palmer, C. M.** 1969. A composite rating of algae tolerant organic pollution. *Journal of Phycology.* 5: 78-82.
- Post A. F., Cohen, I., Romen, E.** 1994. Characterization of two *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) strains isolated from wastewater oxidation ponds. *Journal of Phycology.* 30: 950-954.
- Pulich, W. M., Ward, C. H.** 1973. Physiology and ultrastructure of an oxygen-resistant *Chlorella* Mutant under heterotrophic conditions. *Plant Physiology.* 51: 337-344.
- Qualls, R. F., Haines, B. L.** 1991. Geochemistry of dissolved organic nutrients in water percolating through a forest ecosystem. *Soil Science Society of America Journal.* 55: 1112-1123.
- Radmer, R. J., Parker, B. C.** 1994. Commercial applications of algae: opportunities and constraints. *Journal of Applied Phycology.* 6: 93-98.

- Ramkumar K. Mandalam, Bernhard Ø. Palsson.** 1998. Elemental balancing of biomass and medium composition enhances growth capacity in high-density *Chlorella vulgaris* cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 59: 605-611.
- Reynolds, C. S.** 1984. *Ecology of freshwater phytoplankton*. Cambridge University Press. Cambridge. p.184.
- Richmond, A.** 1986. Microalgae of economic potential. En: Richmond, A. (ed.). *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*. CRC Press. Boca Raton. p.199.
- Richmond, A.** 2004. Biological principles of mass cultivation. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* Blackwell Publishing. Oxford. p.125.
- Richmond, A.** 2004. Economic applications. En: Richmond, A. (ed.). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* Blackwell Publishing. Oxford. p.253.
- Robinson, P. K., Reeve, J. O. Gouldin K. H.** 1986. Phosphorus uptake kinetics of immobilized *Chlorella* in batch and continuous flow culture. *Enzyme and Microbial Technology*. 11: 590-596.
- Roth, M.** 1971. Fluorescence reaction for amino acids. *Analytical Chemistry*. **43**, 880-882
- Running, J. A., Huss, R. J., Olson, P. T.** 1994. Heterotrophic production of ascorbic acid by microalgae. *Journal of Applied Phycology*. 6: 99-104.
- Sansawa, H., Endo, H.** 2004. Production of intracellular phytochemicals in *Chlorella* under heterotrophic conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 98: 437-444.
- Shi, J., Podola, B., Melkonian, M.** 2006. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *Journal of Applied Phycology*. 19: 417-423.
- Shi, X.-M., Zhang, X.-W., Chen, F.** 2000. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*. 27: 312-318.



- Solorzano, L.** 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenylhypochlorite method. *Limnology and Oceanography*. 14:799.
- Standard Methods for the examination of water and wastewater.** 21<sup>st</sup> Edition. 2005. Edited por: Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., Greenberg, A. E. American Public Health Association. American Water Works Association. Water Environmental Federation. USA.
- Steenhoudt, O., Vanderleyden, J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Review*. 24: 487-506.
- Street, H. E., Griffiths, D. J., Thresher, C. L., Owens, M.** 1958. Ethanol as a carbon source for the growth of *Chlorella vulgaris*. *Nature*. 182: 1360-1361.
- Suh, I. S., Lee, C.-G.** 2003. Photobioreactor engineering: Design and Performance. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 8: 313-321.
- Syrett, P. J.** (1981) Nitrogen metabolism of microalgae. *Canadian Bulletin of Fisheries and Aquaculture Sciences*. 210: 182-210.
- Tam N. F. Y., Wang Y. S.** 1996. Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media. *Bioresource Technology*. 57: 45-50.
- Tam N. F. Y., Wang Y. S.** 2000 Effect of immobilized microalgal bead concentration on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution* 107: 145-151.
- Theriault, R. J.** 1965. Heterotrophic growth and production of xanthophylls by *Chlorella pyrenoidosa*. *Applied Microbiology*. 13: 402-416.
- Trevors, J. T., Van-Elsas, J. D., Lee, H., Wolters, A. C.** 1993. Survival of alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells in soil. *Applied Microbial Biotechnology*. 39: 637-643.
- Tsavalos, A. J., Day, J. G.** 1994. Development of media for the mixotrophic/heterotrophic culture of *Brachiomonas submarina* *Journal of Applied Phycology*. 6: 431-433.
- U.S. Environmental Protection Agency.** 1975. Process design manual for nitrogen control. Office of technology transfer. Washington DC.

- Van Dommelen, A., Keijers, V., Vanderleyden, J., De Zamaroczy, M.** 1998. (Methyl)ammonium transport in the nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*. 180: 2652–2659.
- Van Dommelen, A., Van Bastelaere, E., Keijers, V., Vanderleyden, J.** 1997. Genetics of *Azospirillum brasilense* with respect to ammonium transport, sugar uptake, and chemotaxis. *Plant and Soil*. 194: 155–160.
- Vonshak, A.** 1986. Laboratory techniques for the cultivation of microalgae. En: Richmond, A. (ed.). *CRC Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Boca Raton. p.117-145.
- Wang, Y., Peng, J.** 2008. Growth-associated biosynthesis of astaxanthin in heterotrophic *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 1915–1922.
- Watanabe, K., Imase, M., Sasaki, K., Ohmura, N., Saiki, H., Tanaka, H.** 2006. Composition of the sheath produced by the green alga *Chlorella sorokiniana*. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 538–543.
- Westby, C. A., Cutshall, D. S., Vigil, G. V.** 1983. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*. 156: 1369-1372.
- Witt, V., Borchardt, J. A.** 1960. The removal of nitrogen and phosphorus from sewage effluents through the use of algal culture. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*. 2: 187-203.
- Wood, A. M., Everroad, R. C. Wingard, L. M.** 2005. Measure growth rates in microalgal cultures. En: Andersen, R. A. (ed.). *Algal culturing techniques*. Phycological society of America. Elsevier Academic Press. Amsterdam. p.580.
- Xu, H., Miao X., Wu, Q.** 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *Journal of Biotechnology*. 126: 499–507.
- Yang, C., Hua, Q., Shimizu, K.** 2000. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-

autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 6: 87-102.

**Zhang, X.-W., Shi, X.-M., Chen, F.** 1999. A kinetic model for lutein production by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic culture. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 23: 503–507.

# 5 ANEXOS

## ANEXO 1

**Composición del agua residual** (Modificado de Metcalf & Eddy Inc. *et al.*, 2002; Atlas y Bartha, 2002; Bitton, 2005)

Componentes	Parámetro de caracterización	Tipo de efluentes	Problemática
<b>Componentes físicos</b>			
Constituyentes Sólidos	Sólidos totales Sólidos suspendidos Sólidos disueltos Sólidos volátiles Sólidos flotantes Sólidos sedimentables Distribución del tamaño de partícula	Domésticos Industriales	Condiciones sépticas Problema estéticos Depósitos de barros Adsorción de contaminantes Protección de patógenos Condiciones anaerobias Sobrecarga de fase sólida
Propiedades físicas	Turbidez Color Olor Temperatura Conductividad	Domésticos Industriales	Problemas estéticos Condiciones anormales en los cuerpos de agua receptores
<b>Componentes químicos inorgánicos</b>			
Componentes no metálicos. (Nutrientes)	Nitrógeno total Amonio Nitrito Nitrato Fósforo total Fósforo inorgánico	Domésticos Industriales Agrícolas	Crecimiento excesivo de algas (eutrofización del cuerpo receptor) Toxicidad para los peces (amonio) Enfermedades en niños(nitratos) Contaminación del agua subterránea.
Componentes no metálicos. (No nutrientes)	pH Carbonato-bicarbonato (alcalinidad) Cloro Sulfato	Domésticos Industriales Agrícolas Mineros	Acides y basicidad de; agua Capacidad amortiguadora del agua Factibilidad de reuso agrícola Capacidad de formar olores y la factibilidad

---

Metales pesados	Elementos específicos: As, Cd, Ca, Cr, Co, Cu, Pb, Mg, Hg, Ni, Pb, Zn, Se.	Industriales Mineros	de tratar los lodos Toxicidad Inhibición al tratamiento biológico de las aguas residuales Problemas con la disposición de los barros en la agricultura Contaminación del agua subterránea
Gases	O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S, CH <sub>4</sub>	Domésticos Agrícolas	Presencia o ausencia de gases específicos
<b>Componentes químicos orgánicos</b> Compuestos orgánicos	Carbono orgánico total Carbono orgánico disuelto Carbono orgánico particulado Demanda química de oxígeno (DQO) Demanda bioquímica de oxígeno (DBO) Fósforo orgánico Nitrogeno organicos	Domésticos Industriales	Consumo de Oxígeno Mortalidad de peces Condiciones sépticas
Compuestos no biodegradables xenobióticos y recalcitrantes	Compuestos específicos: Pesticidas Detergentes Otros	Domésticos Industriales Agrícolas	Toxicidad (varios) Espumas (detergentes) Reducción de la transferencia de Oxígeno (detergentes) No biodegradabilidad Malos olores
<b>Componentes biológicos</b> Microorganismos	Coliformes totales Coliformes fecales Virus Algas	Domésticos	Enfermedades transmitidas por el agua Comprobar la efectividad de procesos de desinfección
Microorganismos parásitos	Helmintos Protozoarios	Domésticos	Enfermedades transmitidas por el agua Comprobar la efectividad de procesos de desinfección

---

## **ANEXO 2**

### **Composición de la Materia Orgánica Disuelta de las aguas residuales tratadas**

El carbono en aguas es dividido en (Scheneider y Leis, 2002):

- a) Carbono inorgánico (CO<sub>2</sub> y carbonatos)
- b) Carbono orgánico, también llamado Materia Orgánica (MO)
  - Materia Orgánico Particulado (MOP), carbono orgánico retenido por filtros con poros de 0.45µm
  - Materia Orgánica Disuelta (MOD) la fracción de carbono orgánico que pasa a través de filtros con poros de 0.45µm

La materia orgánica disuelta (MOD) de las aguas residuales es altamente heterogénea en tamaño y composición química. La determinación de la estructura química de la MOD es difícil debido a su compleja composición. Entre un 30 y 80% de todo el COD en aguas naturales y residuales son ensamblados al azar, en ácidos orgánicos poliméricos de alto peso molecular conocidos como “sustancias húmicas”, que forman agregados de 2 a 50nm de diámetro y se encuentran comúnmente asociados con minerales de arcillas y óxidos de hierro y aluminio (Scheneider y Leis, 2002). No se puede asignar una estructura química definida para estas macromoléculas polifuncionales y polielectrolíticas, su funcionalidad es dominada por ácidos carboxílicos, ésteres y amidas, OH alifáticos y aromáticos y nitrógeno heterocíclico. El término genérico de sustancias húmicas abarca a los ácidos húmicos, ácidos fulvicos y a la fracción insoluble llamada humina o ácidos hidrofílicos. Los ácidos húmicos tienen pesos moleculares que abarcan desde los 2000 a los 100000Da por lo que son considerados como macromoléculas. Los ácidos húmicos, contienen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos y constituyen del 10 al 15% de la COD en las aguas naturales (Scheneider y Lies, 2002).

Las fracciones de la MOD en el agua natural establecidas por Leenheer (1981) son esenciales para la comprensión de la variedad de los diferentes compuestos que comprenden la MOD en aguas residuales. Resinas absorbentes como la XAD-8 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) son usadas para la separación de las fracciones hidrofílica e

hidrofóbica, que posteriormente son fraccionadas en acidas, básicas y neutras. Leenheer (1981) y posteriormente Qualls y Hanes (1991) clasifican las fracciones de la MOD medida como COD de las aguas naturales y residuales según las propiedades de las superficies de las moléculas a varios pH's en: Neutra hidrofóbica, Acida hidrofóbica débil, Acida hidrofóbica fuerte, Básica hidrofóbica, Acida hidrofílica, Neutra hidrofílica, Básica hidrofílica

**Fracciones de la Materia Orgánica Disuelta del agua residual tratada** (Modificada de Qualls *et al.*, 1991; Imai *et al.*, 2002):

Fracción	Proporción en efluente de planta de tratamiento de agua residual	Compuesto
Neutra hidrofóbica (NHo)	0-21%	Hidrocarburos, Clorofila, Carotenoides, Fosfolípidos, Sustancias húmicas con < 1 grupos iónicos o fenólicos por cada 13 átomos de C, Pesticidas, Detergentes sintéticos, Alcalibenzenos Sulfonatos lineares, Compuestos carbonilos.
Acida hidrofóbica débil (fenólica) (AHOd)		Taninos, Flavonoides, Otros polifenoles con <1 grupo carboxilo por cada 13 átomos de C, Vanilina.
Acida hidrofóbica fuerte (carboxílica) (AHO f)	Sustancias Húmicas Acuáticas (SHA) 3-28% (en aguas naturales del 30-80%)	Sustancias Húmicas (Ácidos húmicos y Ácidos fúlvicos), Aminoácidos y péptidos unidos a sustancias húmicas, Carbohidratos unidos a sustancias húmicas, Ácidos aromáticos (incluyendo ácidos fenólicos y carboxílicos), Polifenoles oxidados con >1 grupo carboxílico por cada 12 átomos de C, Ácidos grasos de cadena larga (>5 átomos de C).
Básica hidrofóbica (BHO)	0%	Aminas aromáticas
Neutra hidrofílica (NHi)	<10%	Azúcares simples neutras, Polisacáridos no unidos a sustancias húmicas, Alcoholes (<4 átomos de C)
Acida hidrofílica (AHi)	32-74%	Sustancias húmicas de tamaño molecular pequeño y altas proporciones COOH/C (Ácidos fúlvicos), Carbohidratos oxidados con grupos COOH, Ácidos carboxílicos pequeños, Inositoles y otros azúcares-fosfato
Básica hidrofílica (BHi)	10-17%	Proteínas, Aminoácidos y péptidos libres, Polímeros de amino-azúcares (como los que forman las paredes celulares de los microorganismos)

Los porcentajes de cada fracción de la MOD esta medido como COD.

## Valores de COD en Aguas residuales tratadas de origen domestico

Planta	Capacidad de tratamiento m <sup>3</sup> /d	Agua Residual Cruda mg/l	Agua Residual Tratada mg/l	Referencia
Thessaloniki	120000-150000	72	19.00	Katsoyiannis <i>t al.</i> 2007
STPE-1	200		3.49	Imai <i>et al.</i> , 2002
STPE-2	20000		4.33	Imai <i>et al.</i> , 2002
STPE-3	66000		3.72	Imai <i>et al.</i> , 2002
ONSITE			6.33	Imai <i>et al.</i> , 2002
HWTPE-1	255		31.60	Imai <i>et al.</i> , 2002
HWTPE-2	255		29.20	Imai <i>et al.</i> , 2002
HWTPE-3	95		2.30	Imai <i>et al.</i> , 2002
No especificada		500	50.00	Bitton, 2005
Promedio		130	16.10	

Tomando en cuenta una cantidad promedio de 16.10mg/l de COD calculado en la tabla anterior y los porcentajes aproximados de las diferentes fracciones de la materia organica en el agua residual, podemos obtener las cantidades aproximadas de cada fracción

**Compuestos orgánicos utilizables por *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense*** como fuentes de carbono presentes en aguas residuales domesticas tratadas.

Fracción	Porcentaje del COD	Tipo	Compuestos representant s de la fracción	Asimilable por <i>Chlorella vulgaris</i>	Asimilable por <i>Azospirillum brasilense</i>
Inorgánica			CO <sub>2</sub> disuelto	+++	
Neutral Hidrofilica (NH <sub>i</sub> )	<10% 0-1.6mg/L	Carbohidratos Alcoholes	Fructosa, Etanol	+ +	+++ ++
Acida Hidrofilica (AH <sub>i</sub> )	32-74% 5.12- 11.84mg/L	Ácidos orgánicos	Acetato Malato Lactato Cittrato Propionato Piruvato Succionato	+++ + + + - - -	- +++ +++ +++ - ++ ++
		Sustancias húmicas de peso molecular pequeño	Ácidos fúlvicos		



Básica Hidrofilica (BHi)	10-17% 1.6-2.72mg/L	Aminoácidos	Alanina	+ +++ (en presencia de glucosa)
			Glicina	+ +++ (en presencia de glucosa)
			Prolina	+ +++ (en presencia de glucosa)
			L-Serina	+ +++ (en presencia de glucosa)
			L-Arginina	+ +++ (en presencia de glucosa)
			L-Lisina	+ +++ (en presencia de glucosa)

---

+ = Poco crecimiento  
 ++ = Buen crecimiento  
 +++ = Excelente crecimiento

### ANEXO 3

#### Estados de oxidación del nitrógeno en la naturaleza

Compuesto	Formula	Estado de oxidación
Nitrógeno orgánico	R-N	-3
Amoniac (gas)	NH <sub>3</sub>	-3
Ión Amonio (soluble)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-3
Nitrógeno gaseoso	N <sub>2</sub>	0
Oxido nitroso	N <sub>2</sub> O	+1
Oxido nítrico	NO	+2
Ión nitrito(soluble)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	+3
Dióxido nitroso (gas)	NO <sub>2</sub>	+4
Ión nitrato (soluble)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+5

#### Estados de oxidación del fósforo en la naturaleza

Compuesto	Formula	Estado de oxidación
Fósforo alótopico	P <sub>x</sub>	-3
Ión Metafosfato	PO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	+3
Organofosfatos	OP(OR) <sub>x</sub>	-3, -1, +1, +3, +5
Acido Fosforico	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	-3
Ión Digidrogenfosfato	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	+1
Ión Hidrogenfosfato	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	+3
Ión Ortofosfato	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> o Pi	+5
Fosfato polimérico	PPi, PPPi	+5

## ANEXO 4

### Principales variables consideradas en los cultivos de microalgas:

- a) Cantidad y calidad de luz. La **cantidad de luz suministrada a las células** ( $E$  o  $I$ ), sus unidades son  $\mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ . Las cantidades óptimas de ( $E$ ) varían según la especie entre 1 a  $300 \mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ . La **calidad de la luz** se refiere al longitud de onda ( $\lambda$ ) de la luz suministrada, expresada en nanómetros (nm). Los requerimientos cualitativos de las plantas y las microalgas esta determinado por su pigmentos fotosinteticamente activos. La mejor luz para estos organismos se encuentra en el rango espectral de la luz visible (380-700nm) (Pluz y Scheibenbogen, 1998; Suh y Lee, 2003)
- b) Tasa fotosintética y eficiencia fotosintética de la especie cultivada: La **tasa de fotosíntesis celular** ( $F$ ) es la capacidad de captación de fotones, depende de la cantidad y la calidad de luz recibida por las células, es medida por los moles producidos de  $\text{O}_2$  en las reacciones luminosas de la fotosíntesis. La **eficiencia fotosintética** ( $FE$ ) (o  $Y_{x/s}$  utilizando otra fuente de energía o sustrato) es la capacidad de transformar la energía luminosa en energía química, ( $FE$ ) es una proporción entre ( $E$ ) y los moles de glucosa producidos en las reacciones oscuras de la fotosíntesis. Depende de la energía luminosa que recibe las células. ( $F$ ) y ( $FE$ ) son dependientes de la intensidad luminosa ( $E$ ). Esta relación esta representada por la curva Dosis-Respuesta de la energía luminosa. El valor óptimo de intensidad de luz para maximizar ( $F$ ) y ( $FE$ ) es llamado ( $Ek$ ), este valor es una **constante de saturación** y es definida para cada especie. Si se aumenta ( $E$ ) mas allá del valor ( $Ek$ ), ( $F$ ) esta al máximo y no aumenta mas, de manera inversa, a partir de ( $Ek$ ), ( $FE$ ) es minimizada puesto que los fotosistemas están saturados y la energía luminosa no es transformada en energía química, este fenómeno es llamado **fotoinhibición** y paralelamente las altas intensidades de luz generan el fenómeno de **fotoxidación** en las células. (Pluz y Scheibenbogen, 1998;; Suh y Lee, 2003).
- c) Distribución de la luz dentro del reactor. En los PBS la penetración de la luz es muy importante, esta variable es inversamente proporcional a la concentración celular. En el diseño de estos sistemas se utiliza el **Coefficiente de suministro de luz**

$(E/V \cdot K_{iv})$ , Definido como el producto de la **energía luminosa suministrada por unidad de volumen** ( $E/V$ ) multiplicado por el **Coefficiente de distribución de la luz dentro del reactor** ( $K_{iv}$ ). Por el fenómeno del **autosombreado** entre las mismas células, la zona iluminada (zona fótica) del reactor es de unos cuantos milímetros por debajo de las superficie, las células solo son expuestas a la luz cíclicamente ya que están en constante mezclado, para calcular ( $E$ ) es importante tomar en cuenta estos ciclos Luz-Oscuridad dentro del reactor. Para evitar el autosombreado se trata de maximizar la **proporción area-volumen** con la morfología del reactor (Ogbonna y Tanaka, 1997). El coeficiente de suministro de luz es el valor de la cantidad de luz suministrada a las células ( $E$ ), tomando en cuenta el área iluminada del reactor y la distribución de la Luz dentro del reactor y los ciclos luz-obscuridad de las células (Suh y Lee, 2003).

- d) Suministro de  $CO_2$ . El  $CO_2$  se encuentra como bicarbonato cuando se encuentra disuelto en el medio de cultivo. La difusión del  $CO_2$  en el medio y la concentración en el aire (0.03% de  $CO_2$ ) son tan bajas que no son suficientes para remplazar el  $CO_2$  consumido por las células en crecimiento, por lo que es necesario suministrar este gas. Generalmente se utilizan proporciones del 5 al 15% del aire suministrado para satisfacer las demandas de C de las células creciendo fotosintéticamente. El **tamaño de burbuja**, medido como diámetro de burbuja ( $d_B$ ), la saturación de  $CO_2$  en el medio, la presión en el reactor y la temperatura, influyen en la disponibilidad de este gas para las células. Se debe de tener cuidado en que el suministro de  $CO_2$  no disminuya adversamente el pH del cultivo (Suh y Lee, 2003).
- e) Remoción del  $O_2$ . Así como es importante suministrar  $CO_2$ , es importante eliminar el exceso de  $O_2$  del medio. El exceso de  $O_2$  genera daños fotooxidativos e incrementa la tasa de **fotorespiración**, lo cual disminuye la productividad general del cultivo. En el cultivo fotoautotrófico la fotorespiración es negativa ya que se consumen sustratos orgánicos dentro de la célula y que se liberan como  $CO_2$  sin ninguna ganancia metabólica neta. En PBS se pueden alcanzar supersaturaciones de  $O_2$  de hasta 300-500% mayores del porcentaje normal de 8mg/L de  $O_2$  disuelto. Estas

saturaciones se generan por la propia generación de O<sub>2</sub> en la fotosíntesis. En cultivos a gran escala en tubos, es necesario instalar etapas de aeración tipo *airlift* para que el O<sub>2</sub> sea capturado por el aire y eliminado del medio (Contreras-Flores *et al.*, 2003; Suh y Lee, 2003; Behrens, 2005).

- f) Control de pH. Para el control del pH es importante tener en cuenta la concentración de CO<sub>2</sub> en el medio, generalmente el pH se eleva al disminuir la concentración de CO<sub>2</sub> por ser asimilado por las microalgas. El pH del medio de cultivo afecta la química de los compuestos polares y la disponibilidad de diversos nutrientes para la células. Variaciones en el pH afectan los transportes iónicos en el plasmalema, las cargas eléctricas en la superficie pared celular y los potenciales de membrana (Suh y Lee, 2003).
- g) Mezclado. El mezclado favorece el intercambio gaseoso, evita la sedimentación de las células, la formación de gradientes de condiciones ambientales y de concentración de nutrientes, pero su función principal es que todas las células puedan acceder a las zonas fóticas del PBS (Ogbonna y Tanaka, 2000). En un sistema con mezclado, cada célula es expuesta homogéneamente a la luz y es más difícil que se presente la fotoinhibición, aún a altas intensidades luminosas. Se debe tomar en cuenta que las células en suspensión pueden sufrir estrés hidrodinámico si la agitación es muy vigorosa. El mezclado se puede llevar a cabo por **burbujeo** de gases (medido en L/min) o por mezclado con propelas, cabe destacar que el mezclado es un importante insumo energético y económico del PBS (Molina *et al.*, 2001; Suh y Lee, 2003).
- h) Circulación del medio de cultivo. La velocidad de circulación dentro del PBS debe de ser suficiente para evitar el crecimiento celular en la pared del tubo, pero si generar estrés mecánico a las células, Una velocidad baja de circulación (<15cm/s) casi siempre produce crecimiento en la pared y posiblemente inhibición del crecimiento por altas concentraciones de O<sub>2</sub>
- i) Tamaño de PBS. El tamaño óptimo del PBS está dado por la disponibilidad y el costo de la luz. En sistemas donde la luz es costosa, principalmente se debe de

tomar en cuenta en el diseño morfológico y escalamiento, el maximizar la eficiencia fotosintética ( $EF$ ) en el uso de luz y el rendimiento (masa producida por unidad de volumen). En sistemas donde la luz no es costosa como por ejemplo con luz solar se debe de tomar como criterio el maximizar la **productividad volumetrica** ( $Q_p$ ) (masa producida por unidad de volumen en un tiempo dado expresada en g/L/día o g/m<sup>2</sup>/día) de biomasa o del producto deseado (Ogbonna y Tanaka, 1997).

- j) Esterilización. Para muchos fotótrofos, la contaminación con hongos y bacterias es insignificante por que no hay fuentes de carbono orgánico disponible para soportar el crecimiento, pero es importante prevenir la contaminación de otros fo fotótrofos. La solución mas practica no es esterilizar el PBS si no **higienizarlo** con lejía (solución de hidróxido de sodio o potasio).
- j) En general en el diseño de cualquier biorreactores para el cultivo de microorganismos una variable importante es: el **Coefficiente de transferencia de masa** ( $k_La$ ), que es el índice mas usado para el diseño de biorreactores y su escalamiento (Molina *et al.*, 2001; Ogbonna y Tanaka, 1997).

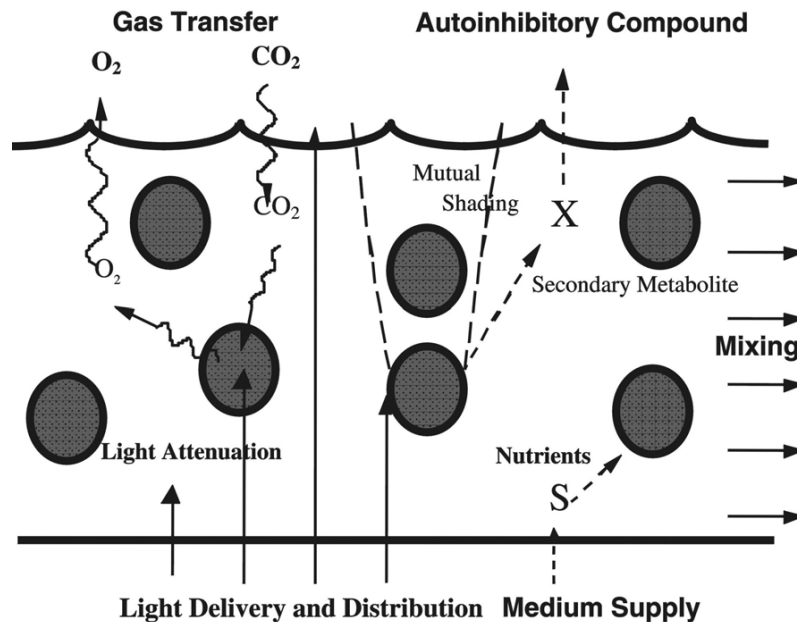


Figura tomada de Suh y Lee (2003)

## ANEXO 5

Listado de las especies de microalgas de importancia comercial cultivadas quimioheterotroficamente y mixotroficamente (Modificada de Lee, 2001).

Microalga	Sustrato de carbono orgánico	Quimio-heterotrofia	Mixotrofia
<i>Anabaena variabilis</i>	Fructosa, glucosa		+
<i>Brachiomonas submarina</i>	Acetato	+	+
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato	+	
<i>Chlorella minutissima</i> *	Metanol		+
<i>Chlorella pyrenoidosa</i> *	Acetato, glucosa, lactato, glutamato	+	
<i>Chlorella regularis</i> *	Acetato, glucosa, etanol	+	+
<i>Chlorella saccharophila</i> *	Glucosa	+	
<i>Chlorella sorokinianna</i> *	Glucosa	+	+
<i>Chlorella vulgaris</i> *	Acetato, glucosa, lactato, glutamato	+	+
<i>Chlorococcum sp.</i>	Acetato, fructosa, glucosa, maltosa, manosa		+
<i>Cyclotella cryptica</i>	Glycerol, glucosa		+
<i>Dunaliella salina</i>	Acetato, glucosa, lactato, glutamato	+	
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	Glucosa	+	
<i>Euglena gracilis</i>	Acetato, glucosa, alanina, aspartato, asparagina, glutamina, etanol	+	+
<i>Euglena gracilis</i>	Glucosa, glycerol, galactosa, etanol		+
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Acetato		+
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Acetato, asparagina	+	
<i>Nannochloropsis CCAP221/78</i> *	Glicerol		+
<i>Nannochloropsis CCAP879/5</i> *	Glicerol, glucosa		+
<i>Nannochloropsis oculata</i> *	Glucosa	+	
<i>Navicula saprophila</i>	Acetato		+
<i>Nitzschia alba</i> *	Acetato, glucosa, glutamato	+	
<i>Nitzschia sp.</i> *	Acetato		+
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> *	Glicerol		+
<i>Phaeodactylum tricornutum</i> **	Glucosa	+	
<i>Poterochromonas malhamensis</i>	Glucosa, extracto de levadura	+	
<i>Rhodomonas reticulata</i>	Glicerol, glucosa		+
<i>Rhodomonas salina</i>	Acetato		+

<i>Scenedesmus acutus</i>	Glucosa	+	+
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Metanol		+
<i>Spirulina platensis</i>	Glucosa	+	+
<i>Tetraselmis chuii</i>	Glucosa	+	
<i>Tetraselmis suecica</i> *	Acetato, glucosa, glutamato, lactato	+	
<i>Tetraselmis tetrathele</i>	Acetato, glucosa, lactato, glutamato	+	
<i>Tetraselmis verrucosa</i>	Glucosa	+	

---

(\* = especies como alto porcentaje de aceites como peso seco)

(\*\* = mutante modificada para la toma de glucosa con la inserción del gen *Glut1* para la síntesis del transportador de membrana de glucosa por Zaslavskaja *et al.*, 2001)



## ANEXO 6

### Estudios de ficroremediación de agua residual usando células de microalgas inmovilizadas. Modificada de Olguín, (2003)

Organismo	Matriz de Inmovilización	Aplicación
<i>Scenedesmus abliquus</i>	Capsulas de k-carragenina	Eliminación de N y P.
<i>Phormidium spp.</i>	Hojuelas de Quitosano	Eliminación de N y P.
<i>Phormidium laminosum</i>	Espumas de polivinilo	Eliminación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> con buenos resultados con tiempo de residencia de 14h.
<i>Phormidium uncinatum</i>	Espumas de polivinilo	90% de la eliminación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> con tiempo corto de residencia (3-4h).
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Alginato	Pantallas de alginato mas eficientes para la eliminación de N y P,
<i>Phormidium laminosum</i>	Fibras porosas de celulosa	Eliminación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .
<i>Chlorella vulgaris</i> + <i>Azospirillum brasilense</i>	Capsulas de alginato	Eliminación de NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .
<i>Chlorella vulgaris</i> <sup>1</sup>	Sistema de doble pelicula de nitrocelulosa y fibra de vidrio	Eliminación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .
<i>Scenedesmus rubescens</i> <sup>1</sup>	Sistema de doble capa de nitrocelulosa y fibra de vidrio	Eliminación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>-</sup> .
<i>Trentepohlia aurea</i> <sup>2</sup>	Filtro de fibra de vidrio en embudos	Eliminación de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>

<sup>1</sup>(Shi *et al.*, 2006)

<sup>2</sup>(Abe *et al.*, 2007)

El alginato es parte de una familia de polímeros binarios sin ramificaciones, los monómeros son el β-D-acio murónico (M) y el α-L-acido gulurónico (G) unidos por un enlace covalente en la posición 1-4, estos carbohidratos varían ampliamente en composición y secuencia. Los alginatos comerciales son producidos por los organismos *Laminaria hyperborea*, *L. digitata*, *L. japonica*, *Macrocystis pyrifera* y *Ascophyllum nodosum*.

Para la producción de la solución de alginato al 2 – 5%w/v, es esterilizable por autoclave durante o por filtrado (poros de 0.22µm). Una vez estéril el alginato es mezclado con una suspensión del organismo a encapsular. Para obtener las esferas de gel, la suspensión ya mezclada alginato/alga es goteado a temperatura ambiente con una jeringa con cánula de 0.1 a 1.0mm a una solución con 20-100mM de CaCl<sub>2</sub>, en donde es mantenido por 20-30 minutos. La gota de alginato instantáneamente forma una esfera de gel que encapsula a la célula en una matriz porosa tridimensional de alginato enlazado ionicamente por el Ca<sup>+</sup>. Las esferas son removidas y lavadas en una solución buffer para después ser depositadas en el biorreactor con el medio fresco (Bashan, 1986; Becker, 2003).

## ANEXO 7

### Cultivos heterotróficos de *Chlorella* y otras microalgas

Microalga	Fuente de carbono y Concentración	Densidad de biomasa	Tasa de crecimiento	Tiempo de cultivo (h)	Régimen de cultivo Observaciones	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i>	Caldo nutritivo	2.7mg/l			Coinmovilizada con <i>A.brazillense</i>	de Bashan <i>et al.</i> , 2005
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 1.35g/L	7.5mM			Mixotrófico	Komor <i>et al.</i> , 1985
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 1g/L		1.1 <sup>-d</sup>		Quimioheterotrófico	Droop, 1974
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 1g/L + CO <sub>2</sub>		1.6d <sup>-1</sup>		Mixotrófico	Droop, 1974
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 10g/L		0.098h <sup>-1</sup>		Quimioheterotrófico Cultivo en lote	Ogawa y Aiba, 1981
<i>Chlorella vulgaris</i>	CO <sub>2</sub> 2% v/v 67μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup>		0.11h <sup>-1</sup>		Fotoautotrófico Cultivo en lote	Ogawa y Aiba, 1981
<i>Chlorella vulgaris</i>	Glucosa 10g/L + 67μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup>		0.198h <sup>-1</sup>		Mixotrófico Cultivo en lote	Ogawa y Aiba, 1981
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	No CO <sub>2</sub> 0, 30, 150μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup>		0.00, 0.82 y 0.82d <sup>-1</sup> respectivamente	72h	Fotoautotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	Burbujeo de aire 0μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup>		0.00d <sup>-1</sup>	72h	Fotoautotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	Burbujeo de aire 150μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup>		1.11d <sup>-1</sup>	72h	Fotoautotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	CO <sub>2</sub> 2% v/v 150μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup>		1.95d <sup>-1</sup>	72h	Fotoautotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	No CO <sub>2</sub> 0μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup> + Glucosa 5g/L (28mM)		1.08d <sup>-1</sup>	72h	Quimioheterotrófico	Martínez y Orús, 1991

<i>Chlorella vulgaris</i>	No CO <sub>2</sub> 30μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup> + Glucosa 5g/L (28mM)		1.90d <sup>-1</sup>	72h	Mixotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	No CO <sub>2</sub> 150μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup> + Glucosa 5g/L (28mM)		2.48d <sup>-1</sup>	72h	Mixotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	Burbujeo de aire 0μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup> + Glucosa 5g/L (28mM)		1.20d <sup>-1</sup>	72h	Quimioheterotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgaris</i> <i>UAM 101</i>	Burbujeo de aire 150 μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup> + Glucosa 5g/L (28mM)		2.54d <sup>-1</sup>	72h	Mixotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella vulgari</i> <i>UAM 101s</i>	CO <sub>2</sub> 2% v/v 150 μE·m <sup>-2</sup> ·S <sup>-1</sup> + Glucosa 5g/L (28mM)		3.16d <sup>-1</sup>	72h	Mixotrófico	Martínez y Orús, 1991
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa 10g/L	3.74g/L de peso seco		144h	Quimioheterotrófico 500mL de cultivo	Xu <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlorella protothecoides</i>	Polvo de maíz hidrolizado	3.92g/L de peso seco		144h	Quimioheterotrófico 500mL de cultivo	Xu <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa	15.5g/L de peso seco		184h	Quimioheterotrófico Cultivo semicontinuo	Xu <i>et al.</i> , 2006
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa 40g/l + amonio, nitrato o urea	≈18.9g/l de peso seco)		150h	Quimioheterotrófico.	Shi <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa, semi continio solución de 200g/L con KOH como control de pH	14g/L		200h	Quimioheterotrófico. En biorreactor de 11000L	Li <i>et al.</i> , 2007
<i>Chlorella protothecoides</i>	Glucosa 35g/L	19.0g/L de peso seco	0.052h <sup>-1</sup>	180h	Quimioheterotrófico.	Zhang <i>et al.</i> , 1999
<i>Chlorella pyrenoidosa l</i>	Glucosa 36.8g/L	20.0g/L de peso seco		60h	Quimioheterotrófico Cultivo en lote	Wu y Shi, 2006
<i>Chlorella pyrenoidosa l</i>	Glucosa	116.2g/L de peso seco	0.43h <sup>-1</sup>	110h	Quimioheterotrófico Cultivo semicontinuo Régimen optimizado con modelo de red neural	Wu y Shi, 2006

<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa 35g/l	14g/l de peso seco		91h	Quimioheterotrófico Cultivo en lote	Ogbonna <i>et al.</i> , 1997
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CO <sub>2</sub>			1.96d <sup>-1</sup>	Fotoautotrófico	Droop, 1974
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Acetato			0.4d <sup>-1</sup>	Quimioheterotrófico	Droop, 1974
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa			0.92d <sup>-1</sup>	Quimioheterotrófico	Droop, 1974
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa concentración final 80g/L Control de pH con amonio gaseoso	40g/L de peso seco	3.5h Tiempo de generación		Quimioheterotrófico Cultivo semicontinuo producción de Acido ascórbico	Running <i>et al.</i> , 1994
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Glucosa monohidratada 30g/L mantenido en cultivo semicontinuo	100g/L		168h	Mixotrófico en fermentadores de 30L 450mg/L de xantofilas totales	Theriat, 1965
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Glucosa 20g/l			0.74d <sup>-1</sup>	Quimioheterotrófico	Ip y Chen, 2005
<i>Chlorella zofingiensis</i>	Glucosa 20g/L	8g/L de peso seco	0.034h <sup>-1</sup>	144d	Quimioheterotrófico Produccion de astaxantina	Wang y Peng, 2008
<i>Chlorella regularis</i>	Glucosa 10g/L concentración mantenida Efectos de gradientes de $k_1 a$ $2.0-15 \times 10^{-2} h^{-1}$	90g/L $100 \times 10^8$ células /mL	0.2h <sup>-1</sup>		Quimioheterotrófico Cultivo sincronico Producción de almidón, proteína, clorofila, carotenoides, tocoferoles, ubiquinonas	Sansawa y Endo, 2004
<i>Chlorella regularis</i>	Acetato 0.12g/L CO <sub>2</sub> 5% v/v $130 \mu E \cdot m^{-2} \cdot S^{-1}$			0.55d <sup>-1</sup>	Mixotrófico Cultivo continuo Inhibiciona del crecimiento a $195 \mu E \cdot m^{-2} \cdot S^{-1}$	Endo <i>et al.</i> , 1997
<i>Chlorella regularis</i>	$390 \mu E \cdot m^{-2} \cdot S^{-1}$ CO <sub>2</sub> 5% v/v			0.29d <sup>-1</sup>	Fotoautotrófico	Endo <i>et al.</i> , 1997
<i>Chlorella regularis</i>	Acetato 0.12g/L CO <sub>2</sub> 5% v/v			0.28d <sup>-1</sup>	Quimioheterotrófico	Endo <i>et al.</i> , 1997

<i>Chlorella sorokiniana</i>	Glucosa 30g/L Acetato 25g/L	-0.4log(mg de peso seco/mL) 0.0 log(mg de peso seco/mL)		12h	Quimioheterotrófico Fallo en crecer con 1% de Bacto-Casitone, D-xylosa, D-arabinosa, Sucrosa, Glycerol, D-glucosamina, L-glutamina, L-prolina, y ácidos piruvico, citrico, succinico, and a-keto-glutarico	Pulich y Ward, 1973
<i>Chlorella sorokiniana</i>	Acetato 5g/L	1.6g/L de peso seco	$2.0d^{-1}$ $2.5gL^{-1}d^{-1}$ de consumo de acetato	60h	Quimioheterotrófico Eliminación de amonio a $60mgL^{-1}d^{-1}$	Ogbonna <i>et al.</i> , 2000
<i>Chlorella emersonii</i>	Glucosa 10g/L	$13.8 \times 10^6$ células/mL		144h	Quimioheterotrófico No diferencia en la actividad de la acetohidroxi acido sintasa con respecto a cultivos fotoautotrofos	Landstein <i>et al.</i> , 1990
<i>Chlorella fusca</i>	$C^{13}$ -Glucosa 1g/L	0.6g/L de peso seco		120h	Quimioheterotrófico Síntesis de Isoprenoles (esteroles, fitol, carotenóides) via GAP/pyruvate pathway	Disch <i>et al.</i> , 1998
<i>Chlorella fusca</i>	Glucosa 5g/L CO <sub>2</sub> 10-30% v/v				Quimioheterotrófico Aumento del 40% de lípidos totales y del 50% Ácidos grasos	Dickson <i>et al.</i> , 1969
<i>Chlorella kessleri</i>	Glucosa 2.5g/L			0.5h	En presencia de glucosa, aumento en la expresión de los genes que codifican para el translocador ATP/ADP (AAT), la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenaza (GAPDH) y el transportador intermembrana de hexosas (HUPI)	Hilgarth <i>et al.</i> , 1991
<i>Chlorella kessleri</i>	Glucosa 1.126g/L CO <sub>2</sub> 1vvm	$2 \times 10^9$ volume total de ceulas ( $\mu m/mL$ )		144h	Mixotrófico Eliminación de $>100mg/L$ de NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Lee y Lee, 2002
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Acetato 3.4g/l	1.5g/l		Cultivo continuo	Quimioheterotrófico. Cultivo continuo	Chen. <i>et al.</i> , 1996

## ANEXO 8

### Moléculas orgánicas utilizables por *Chlorella vulgaris* para crecer en completa oscuridad.

Fuente de carbono		Referencia
Carbohidratos	Glucosa <sup>##</sup>	Droop, 1974
	Fructosa <sup>#</sup>	Higashiyama, 1967
	Galactosa <sup>##</sup>	Higashiyama, 1967
	Manosa <sup>#</sup>	Higashiyama, 1967
	Xylosa <sup>#</sup>	Higashiyama, 1967
	Arabinosa <sup>#</sup>	Higashiyama, 1967
	Ácidos orgánicos	Acetato <sup>+</sup>
Citrato <sup>+</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977
Glicolato <sup>+</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977
Fumarato <sup>++</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977
Propionato		Ogbonna <i>et al.</i> , 2000
Lactato <sup>+</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977; Lee. 2005
Piruvato <sup>++</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977
Succinato <sup>++</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977
Malato <sup>+</sup>		Bollman <i>et al.</i> , 1977
Ácidos orgánicos de cadena larga (ácidos grasos)	Octanoato <sup>1</sup>	Harris <i>et al.</i> , 1965
	Decanoato <sup>1</sup>	Harris <i>et al.</i> , 1965
	Dodecanoato <sup>1</sup>	Harris <i>et al.</i> , 1965
	Tetradecanoato <sup>1</sup>	Harris <i>et al.</i> , 1965
Aminoácidos y compuestos nitrogenados	Glicina*	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981
	Glutamato	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981; Lee 2004
	Glutamina	Nielson y Larson, 1980
	Glicilglicina	Nielson y Larson, 1980
	Aspartato	Nielson y Larson, 1980
	Asparagina	Nielson y Larson, 1980
	Histidina	Nielson y Larson, 1980
	Metionina	Nielson y Larson, 1980
	Alanina*	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981
	Prolina*	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981
	Serina*	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981
	Ornitina	Nielson y Larson, 1980
	Arginina**	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981; Lee 2004
	Lisina**	Nielson y Larson, 1980; Cho <i>et al.</i> , 1981
	Betaina	Nielson y Larson, 1980
	Acetamida	Nielson y Larson, 1980
	Putrescina	Nielson y Larson, 1980
	Urea	Nielson y Larson, 1980
	Todos los L-aminoácidos a excepción de L-Triptofano y L-Leucina	Cho <i>et al.</i> , 1981

Compuestos nitrogenados aromaticos	Adenosina	Nielson y Larson, 1980
	Anosina	Nielson y Larson, 1980
	Ureato	Nielson y Larson, 1980
	Uridina	Nielson y Larson, 1980
Alcoholes	Metanol	(Lee. 2004)
	Etanol	(Street <i>et al.</i> , 1958)

\* = Su asimilación aumenta mas de 100 veces al suministrar D-Glucosa.

\*\* = Su asimilación aumenta hasta de 25 a 50 veces al suministrar D-Glucosa.

+ = Toma de sustrato por transporte pasivo.

++ = Toma de sustrato por transporte activo.

# = Sustratos que inducen al gigantismo de las células

## = Sustrato que induce al gigantismo de las células y estimulan la división celular.

<sup>1</sup> = Incorporados en presencia de luz y glucosa para la síntesis de palmitato, estearato, oleato y linoleato por elongación de cadena sin degradación

**Fuentes de carbono orgánico adicionadas al agar DDN para el crecimiento de *A. brasilense*.** (Adaptada de Westby *et al.*, 1983).

Fuente de carbono		Crecimiento
Carbohidratos	D-Glucosa	-
	D-Galactosa	-
	D-Manosa	-
	D-Ribosa	-
	D-Xilosa	-
	Glicerato	-
	D-Gluconato	+++
	D-Arabinosa	++
	D-Fructosa	+++
	Alcoholes	Manitol *
Glicerol		++
Etanol		++
Ácidos orgánicos	Acetato	-
	Fumarato	++
	Succionato	++
	Piruvato	++
	Acido Cetoglutárico	++
	DL-Malato	+++
	DL-Lactato	+++
	2-Cetogluconato	+++

Las fuentes de carbono fueron añadidas a una concentración de 5g/l a placas de agar DDN

- = No crecimiento

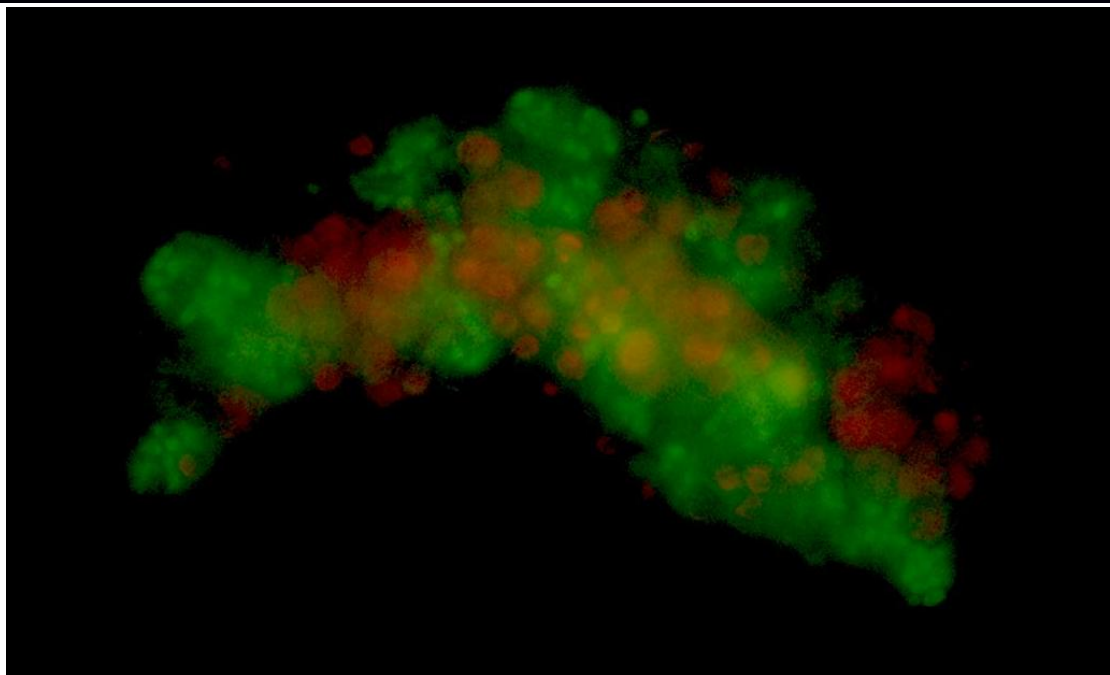
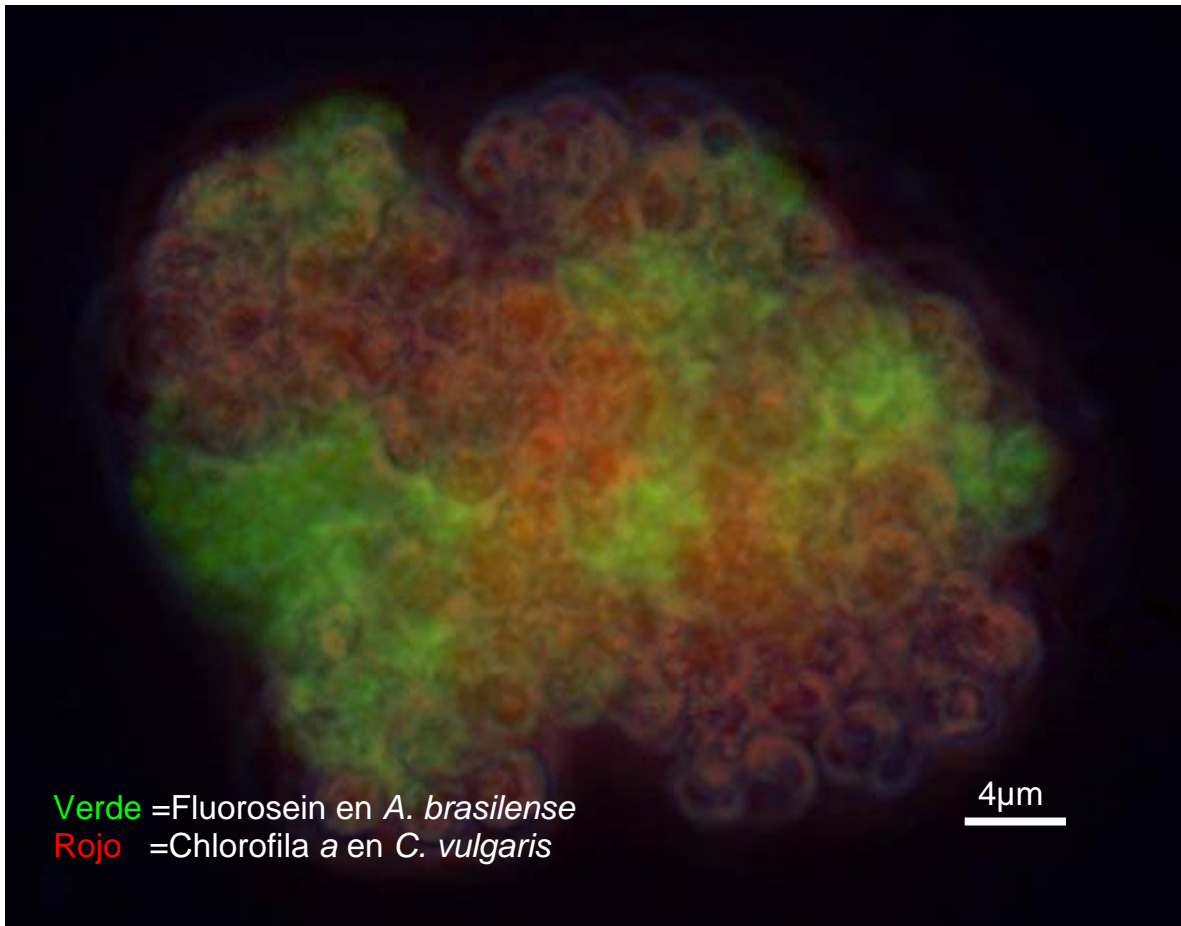
+ = Poco crecimiento

++ = Buen crecimiento

+++ = Excelente crecimiento.



*ANEXO 9*





**Matrices invertidos funcionando como biorreactores**