



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

**Programa de Estudios de Posgrados**

**EFECTO DEL GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO  
DISPONIBLE EN UN SISTEMA INMOVILIZADO  
MICROALGA-BACTERIA BAJO RÉGIMEN  
HETEROTRÓFICO PARA LA ELIMINACIÓN DE AMONIO Y  
FOSFATOS**

**TESIS**

**Que para obtener el grado**

**Maestro en Ciencias**

**Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales**

**(Orientación en Biotecnología)**

**P r e s e n t a**

**Emmanuel José Vidaña Ávila**

**La Paz, Baja California Sur, Marzo 2014**

## 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 febrero del 2014, 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:

**“EFECTO DEL GLICEROL COMO FUENTE DE CARBONO DISPONIBLE EN UN SISTEMA INMOVILIZADO MICROALGA-BACTERIA BAJO RÉGIMEN HETEROTRÓFICO PARA LA ELIMINACIÓN DE AMONIO Y FOSFATOS”.**

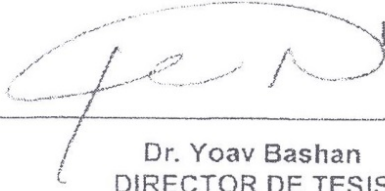
Presentada por el alumno:

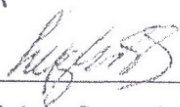
**EMMANUEL JOSÉ VIDANA ÁVILA**

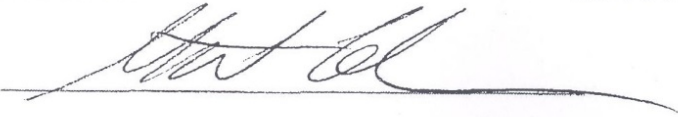
Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN BIOTECNOLOGÍA

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. Luz Estela Gonzales de Bashan  
CO-TUTOR

  
Dr. Michael F. Cohen  
CO-TUTOR

  
DRA. Elisa Serviere Zaragoza  
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**COMITÉ TUTORIAL**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. Yoav Bashan**

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.**

**Co-tutor**

**Dra. Luz Estela González de Bashan**

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.**

**Co-tutor**

**Dr. Michael F. Cohen**

**Sonoma State University**

**COMITÉ REVISOR DE TESIS**

**Dr. Yoav Bashan**

**Dra. Luz Estela González de Bashan**

**Dr. Michael F. Cohen**

**JURADO DEL EXAMEN DE GRADO**

**Dr. Yoav Bashan**

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.**

**Dra. Luz Estela González de Bashan**

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.**

**Dr. Michael F. Cohen**

**Sonoma State University**

**SUPLENTE**

**Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez**

**Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C**

## Resumen

El acelerado crecimiento demográfico y el desarrollo industrial conllevan al aumento sustancial de descargas de aguas residuales, generando de esta manera un gran impacto negativo en la sociedad y en el medio ambiente, trayendo problemas de salud pública y daños a través de los cuerpos receptores de agua. Los compuestos que más problemas de contaminación producen son el amonio y los fosfatos. Estos compuestos son responsables de la eutrofización (crecimiento extraordinario de algas) de ríos, lagos y mares, por lo que es necesario un tratamiento eficiente para remover estos dos contaminantes. Por lo tanto, en el presente trabajo se demuestra el potencial de la microalga *Chlorella vulgaris* y de la bacteria *Azospirillum brasilense*, al estar inmovilizados en conjunto en esferas de alginato para remover los compuestos de amonio y fosfatos. Los microorganismos fueron sometidos a un régimen heterotrófico, usando glicerol como fuente de carbono y utilizando medios para comprobar su efectividad como: Medio Residual Sintético (MRS), Agua Residual Real Estéril (ARRE) y Agua Residual Real (ARR) sin esterilizar. Los resultados de este trabajo mostraron que es necesario agregar solamente 1% de glicerol como fuente de carbono al medio para eliminar tanto el amonio y los fosfatos, mostrando su efectividad en reactores de 100 mL, 600 mL y 50 L. El sistema microalga-bacteria en reactores de 100 mL mostró eficazmente la remoción de amonio y fosfatos en Agua Residual Real Estéril. Sin embargo usando Agua Residual (ARR) sin esterilizar, tanto en volúmenes de 100mL como de 600mL no se observaron cambios significativos usando o no el sistema microalga-bacteria. De esta manera se encontró que los microorganismos endógenos tienen potencial remediador de amonio y fosfatos. En biorreactores de 50 L se obtuvieron eliminaciones significativas de amonio y fosforo solamente adicionando glicerol al agua residual. De esta manera se bioestimulan las poblaciones bacterianas endógenas y se obtienen resultados satisfactorios en corto plazo.

**Palabras clave:** Tratamiento de aguas residuales, sistema microalga-bacteria; crecimiento heterotrófico, microorganismos endógenos.

**Abstract**

Rapid population growth and industrial development lead to substantial increase in wastewater discharges, thus generating a large negative impact on society and the environment, bringing public health problems and damage from source through pathways to water body receptors. Ammonium and phosphates are the compounds that produce more pollution problems. These compounds are responsible for eutrophication (extraordinary algal growth) of rivers, lakes, and seas; thus an efficient treatment is necessary to remove these two pollutants. Therefore, this study demonstrates the potential of both the microalga *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasilense* when immobilized jointly in alginate beads for removing ammonia and phosphate compounds. The microorganisms were subjected to a heterotrophic regime using glycerol as a carbon source and using means to prove effectiveness, such as: Synthetic Residual Mean (MRS, for its abbreviation in Spanish), Real Sterile Wastewater (ARRE, for its abbreviation in Spanish), and Real Unsterilized Wastewater (ARR, for its abbreviation in Spanish). The results showed that it is necessary to add only 1% glycerol as a carbon source to the medium to remove both ammonium and phosphate, showing its effectiveness in 100 mL, 600 mL, and 50 L reactors. The microalgae-bacteria system in 100-mL reactors showed effective removal of ammonium and phosphate in Real Sterile Wastewater. However, using unsterilized wastewater with both 100-mL and 600-mL volumes, no significant change was observed with or without using the microalga-bacteria system. Thus we found that endogenous microorganisms have potential remedial ammonium phosphates. In 50-L bioreactors significant ammonium and phosphorus removal was obtained by adding only glycerol to wastewater thus biostimulating the endogenous bacterial populations and obtaining satisfactory results in a short term.

**Key words:** Wastewater treatment, microalgae-bacteria system, heterotrophic growth, endogenous microorganisms

## Dedicatorias

*A mis padres por elegirme como su hijo, por su apoyo incondicional todos los días, de creer simpe en mi, son mi fuente de inspiración para seguir adelante en mi superación profesional e intelectual, esto no hubiera sido posible sin su totalidad apoyo, los amo eternamente. Gracias por todo Mustafá Vidaña Hernández, María Magdalena Ávila Carrasco.*

*A mi abuelita Bernardina Carrasco Acosta por elegirme con su nieto y por el apoyo brindado todos los días, por compartir risas y por acompañarme siempre en todo momento la amo.*

*A mis hermanos por estar siempre al pendiente de mí, por su compañía, por sus risas, por sus enojos, por compartir bellos momentos con toda la familia mil gracias los amo (Edgardo Nicolás, Ángel Omar, Ulises Rivelino).*

*A mis Compañeros/amigos de un gran viaje Blanca Romero, Juan José Cruz Arreola, Leobardo Medina Popoca, Francisco Corral, Isaac Adame, Gerardo Chew, Sergio B. Astorga Ortega; por su confianza, respeto, y aprendizaje un fuerte abrazo.*

*A mis amigos por siempre estar con migo en los buenos y malos momentos. Compartir siempre como familia en mi estancia en la Paz BCS. Estaré siempre eternamente agradecido: Edgar Amavizca, Juan Larrinaga, Cristina Galaviz, Juan Pablo Hernández, Tonatiuh Chávez, Jorge, Marian Camacho, Susana Luna, Ana maría, Ana Ruth Álvarez, Beatriz Meza, Cinthya Chávez, Fermín Mercado, Francisco Magallón, Edisa García Hernández, Elizabeth Guadalupe, Eva Ramírez, Ángel Hernández, Jano Martínez, Héctor Manuel, Héctor Genaro Ortiz Cano, Pilar Rivas García, Eliza Martínez, Salvador Reyes, Luz Ríos, Luz Alicia González, Mariana Pérez, Ayin Q. Alvarado Arellano, Oskar Palacios, Francisco Choix, Anahi, Oliva, María Esther Ojeda, Jaime Holguín, Estrella Chávez, Jesús Zarate, Luis Leiva, Dilian Anaguas, Ma. Guadalupe Castañeda González, Marcía Rodríguez.*

*A mis maestros Dr Yoav Bashan, Dra. Luz de Bashan, Dr Michael Cohe, Dr Macario Bacilio Jiménez, que son fuente de conocimiento y sabios de la investigación. Mis respetos y admiración.*

*Puede ser que en los últimos momentos de tu vida no tengas la opción de donde y con quien estar, pero tendrás la opción de decidir qué tan completamente los vivirás. La habilidad de tomar lo valioso de la vida es la misma que la de tomar lo más valioso de la comida, del aire y de las impresiones, las substancias necesarias para desarrollar tus cuerpos superiores. Si quieres tomar de tu vida lo más valioso para ti mismo, tiene que ser por el bien de lo superior; es suficiente dejar solo un poco para ti mismo. Trabajar en ti mismo por el bien de otros es una manera inteligente de recibir lo mejor de la vida para ti. Si no estás satisfecho con la última hora de tu vida, puede que tampoco lo estés con tu vida entera. Morir significa pasar a través de algo que es imposible repetir de nuevo. Gastar tu precioso tiempo en nada significa privarte de la oportunidad de extraer lo más valioso de la vida.*

*G.I. Gurdjieff.*

## Agradecimientos

Un especial agradecimiento para el Dr. Yoav Bashan y la Dra. Luz Estela de Bashan, Dr Michael Cohen, directores de esta tesis, gracias por la paciencia a lo largo de la realización de esta tesis, por sus ideas a lo largo de mis estudios de maestría.

A el Dr. Macario Bacilio Jiménez sus sugerencias y apoyo en los experimentos.

A todos los integrantes del grupo de microbiología ambiental del CIBNOR (a mis amigos Blanca, Juan Pablo, Luiz, Edgar, Choix, Oscar, Edgar, Betty, Ediza, Pau, Esmeralda, Cris, Manuel Moreno) gracias por su paciencia sus comentarios y sugerencias.

A la “Bashan Foundation”, USA. Por su apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada con número de registro 1021210030 y número de beca 392169.

Al posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) por las facilidades y la extensión de beca otorgada.

A la dirección de estudios de Posgrado, CIBNOR y su directora Dra. Elisa Serviere Zaragoza, Osvelia Ibarra Morales, por las correcciones y aportaciones a esta tesis.

A Lic. Tania Veronica Nuñez Valadez y Lic. Claudia Elizabeth Olachea León, por las atenciones y el buen servicio del departamento de posgrado.

Al Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR y sus técnicos: M en C. Juan Pablo Hernández Sánchez por su apoyo técnico en los equipos, por sus ideas en el diseño de experimentos, por su apoyo estadístico, por su amistad y apoyo en cada momento y mucha paciencia.

Dra. Blanca Romero López por su apoyo incondicional en el laboratorio, por su conocimiento aportados en cualquier duda, por su confianza, y por su entrega y dedicación en el acondicionamiento y funcionamiento del laboratorio, eres un gran ejemplo a seguir muchas gracias.

Al M en C. Manuel Moreno gracias por su apoyo y los aportes acertados para la realización de los experimentos, y el buen funcionamiento del laboratorio.

Al Lic. Horacio Sandoval Gómez responsable del Laboratorio de computo, gracias por su apoyo en el uso de las instalaciones de computo, aulas.

A la M. C. Diana Leticia Dorantes Salas, por su apoyo incondicional en el resumen de tesis y consejos en el aprendizaje del idioma inglés.



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

Al Dr. Francisco Magallón Barajas por su apoyo en el préstamo de equipo y aporte de ideas.

A la Lic. Ana María Talamantes Cota, Susana Luna García, María Esther Ojeda Castro y Elizabeth Guadalupe Sánchez Vázquez, por el servicio brindado, amistad incondicional, y en el buen funcionamiento de las instalaciones de la biblioteca.

Al Ing. Edgar Yuen Sánchez, por su apoyo en soporte técnico en la sala de video conferencias.

Al Dr. Ramón Jaime Holguín Peña, Lic. Marco Antonio Díaz Serna, M. en C. Amada Reyes Salinas, M. en C. Carlos Palacios Cardiel, por el apoyo brindado durante mi trabajo.

Al Lic. José Manuel Melero Astorga, por su apoyo en el laboratorio de cómputo de posgrado.

Al M. C. Delia Irene Rojas Posadas, por su apoyo incondicional en clases, apoyo en mi trabajo, una mujer ejemplar.

Al “taller de Maquinados” Jorge Cobos Anaya, Alfonso Alvares Casillas, Guillermo García Cortés, Carlos Soto Carrasco; por el apoyo de la realización de las piezas de birreactores.

## Contenido

|                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Lista de Figura .....                                                                                                                                                                                 | ix |
| Lista de Tablas .....                                                                                                                                                                                 | xi |
| 1. Introducción .....                                                                                                                                                                                 | 1  |
| 2. Antecedentes .....                                                                                                                                                                                 | 3  |
| 2.1. Generalidades .....                                                                                                                                                                              | 3  |
| 2.2. Agua Residuales .....                                                                                                                                                                            | 4  |
| 2.3. Composición típica de agua residual domestica (ARD) .....                                                                                                                                        | 5  |
| 2.4. Tratamiento de aguas residuales .....                                                                                                                                                            | 5  |
| 2.5. Nutrientes de las aguas residuales .....                                                                                                                                                         | 6  |
| 2.5.1. Nitrógeno .....                                                                                                                                                                                | 7  |
| 2.5.2. Fosforo .....                                                                                                                                                                                  | 7  |
| 2.5.3. Tratamiento terciario .....                                                                                                                                                                    | 8  |
| 2.6. La microalgas en el tratamiento de aguas residuales .....                                                                                                                                        | 8  |
| 2.6.4. Sistema co-inmovilizado de <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> .....                                                                                                                     | 11 |
| 2.6.5. Microalgas bajo régimen heterotrófico .....                                                                                                                                                    | 12 |
| 2.7. Glicerol como fuente de carbono .....                                                                                                                                                            | 13 |
| 4. Hipótesis de trabajo .....                                                                                                                                                                         | 14 |
| 5. Objetivo general .....                                                                                                                                                                             | 14 |
| 5.1. Objetivos particulares .....                                                                                                                                                                     | 14 |
| 6. Materiales y Métodos .....                                                                                                                                                                         | 15 |
| 6.1. Lugar de Muestreo del agua residual .....                                                                                                                                                        | 15 |
| 6.2. Diseño de muestreo .....                                                                                                                                                                         | 17 |
| 6.3. Análisis de Agua .....                                                                                                                                                                           | 17 |
| 6.4.1. <i>Chlorella vulgaris</i> .....                                                                                                                                                                | 18 |
| 6.4.2. <i>Azospirillum brasilense</i> .....                                                                                                                                                           | 19 |
| 6.4.3. Inmovilización de <i>C. vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizado) en esfera de alginato .....                                                                                      | 19 |
| 6.5. Diseño experimental .....                                                                                                                                                                        | 21 |
| 6.5.1. Métodos analíticos .....                                                                                                                                                                       | 25 |
| 6.5.2. Análisis Estadístico .....                                                                                                                                                                     | 33 |
| 7. Resultados .....                                                                                                                                                                                   | 33 |
| 7.1. Resultados primer objetivo .....                                                                                                                                                                 | 33 |
| 7.1.1. Concentración celular de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i> bajo régimen heterotrófico en Medio Residual Sintético adicionando 1% y 10% v/v de glicerol .....                    | 33 |
| 7.2. Resultados del segundo objetivo: Eliminación de amonio y fosfatos por el sistema microalga-bacteria bajo régimen heterotrófico en diferentes capacidades volumétricas 100ml, 600 ml y 50 L ..... | 36 |
| 7.2.1. Primera fase: Eliminación de amonio y fosfatos en el sistema microalga - bacteria ( <i>C. vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i> ) en Agua Residual Real Estéril .....                            | 36 |
| 7.2.2. Segunda fase: Eliminación de amonio y fosfatos en el sistema microalga-bacteria ( <i>C. vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i> ) en Agua Residual Real, en volumen de 100 ml .....                | 43 |

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.2.3. Tercera fase: Eliminación de amonio y fosfatos en el sistema microalga-bacteria ( <i>C. vulgaris</i> y <i>A. brasilense</i> ) en Agua Residual Real en volumen de 600 ml con 1% de glicerol. .... | 51 |
| 7.2.4. Cuarta fase: Eliminación de amonio y fosfatos por microorganismos nativos del Agua residual real en volumen de 50 L. al 1% de glicerol. ....                                                      | 58 |
| 7.2.5. Visualización de las poblaciones bacterianas (bacterias Gram Negativas y Positivas) empleando la Técnica de Hibridación fluorescente in situ (FISH). ....                                         | 62 |
| 8. Discusión. ....                                                                                                                                                                                       | 64 |
| 9. Conclusiones. ....                                                                                                                                                                                    | 70 |
| 10. Bibliografía. ....                                                                                                                                                                                   | 71 |
| Anexos. ....                                                                                                                                                                                             | 79 |
| Anexo 1. ....                                                                                                                                                                                            | 79 |
| Anexo 2. ....                                                                                                                                                                                            | 79 |

## Lista de Figura

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Ruta de asimilación de nitrógeno de organismos eucariotas fotosintéticos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 9  |
| <b>Figura 2.</b> Asimilación de fosfatos disponibles por microalgas en aguas residuales.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 10 |
| <b>Figura 3.</b> Punto de muestreo del proceso de tratamiento de aguas residuales.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 16 |
| <b>Figura 4.</b> Fotografía tomada vía satelital, de la PTAR del Municipio de la Paz, BCS, MÉXICO.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 17 |
| <b>Figura 5.</b> Proceso de inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato de calcio.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| <b>Figura 6.</b> a) Número células por mililitro de la microalga <i>C vulgaris</i> en los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A brasilense</i> (co-inmovilizada). b) Número de células por mililitro de <i>A. brasilense</i> en los tratamientos <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola, <i>A. brasilense</i> + <i>C. vulgaris</i> (co-inmovilizado). Medio Residual Sintético (MRS) adicionando 1 y 10 % v/v de glicerol, bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad) durante 120 horas de incubación. ....                                                                               | 35 |
| <b>Figura 7.</b> a) Concentración de amonio (mg/L) b) Concentración de fosfatos (mg/L). En los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizada), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y control Esfera sin m.o (microorganismos), en Agua Residual Real Estéril (ARRE) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad) durante 48 horas de incubación. ....                                                                                                                                                                                                           | 38 |
| <b>Figura 8.</b> a) Número de células por mililitro de <i>C vulgaris</i> en los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizado) b) Número de células por mililitro de <i>A. brasilense</i> en los tratamientos <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola, <i>A. brasilense</i> + <i>C. vulgaris</i> (co-inmovilizada). En Agua Residual Real Estéril (ARRE) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                                                                                          | 40 |
| <b>Figura 9.</b> a) Comportamiento de pH y b) concentración de oxígeno disuelto (mg/L OD) en los tratamientos, <i>C. vulgaris</i> , <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizado), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y dos controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real Estéril sin glicerol (ARRE - Gli), en Agua Residual Real Estéril (ARRE) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                                                                                                                            | 42 |
| <b>Figura 10.</b> a) Concentración de amonio (mg/L) y b) Concentración de fosfatos (mg/L) en los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizada), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli). En Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                                                                                 | 45 |
| <b>Figura 11.</b> a) Número de células por mililitro de <i>C vulgaris</i> . b) Número de células por mililitro de <i>A. brasilense</i> . c) Número de células por mililitro de Bacterias totales nativas. En los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizada), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación..... | 48 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 12.</b> a) Comportamiento de pH y b) Concentración de oxígeno (OD mg/L). En los tratamientos, <i>C. vulgaris</i> , <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizado), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real+ glicerol (ARR+ Gli) y Agua Residual sin glicerol (ARR – Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                                                  | 50 |
| <b>Figura 13.</b> a) Concentración de Amonio (mg/L) b) Concentración de Amonio (mg/L). En los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizada), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real+ Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli). En Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                        | 53 |
| <b>Figura 14.</b> a) Número de células por mililitro de <i>C vulgaris</i> . b) Numero de Células por mililitro de Bacterias totales nativas. En los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizada), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación..... | 55 |
| <b>Figura 15.</b> a) Comportamiento de pH b) Concentración de Oxígeno Disuelto (OD mg/L). En los tratamientos <i>C. vulgaris</i> inmovilizada sola, <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> (co-inmovilizada), <i>A. brasilense</i> inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                    | 57 |
| <b>Figura 16.</b> a) Concentración de Amonio (mg/L) b) Concentración de Fosfatos (mg/L) En los tratamientos Agua Residual Real + Glicerol (ARR +Gli) y control Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 24 horas de incubación.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 59 |
| <b>Figura 17.</b> a) Número de células por mililitro de Bacterias totales nativas b) Concentración de Oxígeno Disuelto (OD mg/L), c) Temperatura (°C) d) Comportamiento del pH. En los tratamientos: Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y control Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli), bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                                                                                                                                               | 62 |
| <b>Figura 18.</b> Micrografías de bacterias nativas presentes en el agua residual a) bacterias Gram negativas (-) y b) bacterias Gram positivas (+). Usando sonda universal para Eubacteria en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.....                                                                                                                                                                                                                                                             | 63 |

### Lista de Tablas

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla I.</b> Tipos de agua residual.....                                                                       | 4  |
| <b>Tabla II.</b> Niveles de tratamiento de aguas residuales . .....                                               | 6  |
| <b>Tabla III.</b> Características del efluente secundario, variables analizadas del agua residual<br>tratada..... | 18 |
| <b>Tabla IV.</b> Composición de buffer de lavado y buffer de hibridización. ....                                  | 29 |

## 1. Introducción

El crecimiento demográfico y el desarrollo industrial han ido en aumento trayendo como consecuencia un incremento de aguas residuales. La descarga de aguas residuales sin tratamiento produce una amenaza constante (de-Bashan y Bashan, 2004a; Salazar, 2009), provocando un impacto negativo en la sociedad y el medio ambiente en general, trayendo consigo problemas de salud pública, así como daños en cuerpos acuáticos.

En el proceso de tratamiento de aguas residuales (PTAR), amonio y fosfatos son los compuestos con mayor incidencia y problemáticos en el efluente de una PTAR, su eliminación genera altos costos. Estos compuestos son responsables de la eutrofización (crecimiento extraordinario de algas) de ríos, lagos y mares (Gonzalez y Bashan, 2000; de-Bashan y Bashan, 2004a; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006), por lo que es necesario un tratamiento terciario o avanzado generalmente no empleado en las plantas convencionales por sus costos altos. Los floculantes químicos como  $Zn^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Fe^{3+}$ , son utilizados en tratamientos terciarios para la remoción de fosfatos, pero estos no son rentables debido a sus costos elevados (de-Bashan y Bashan, 2004a).

El tratamiento de aguas residuales se basa en una serie de operaciones unitarias y de procesos biológicos para la depuración de los contaminantes orgánicos que son de origen doméstico y de naturaleza industrial (Vega de Kuper, 2007). El proceso usual de tratamiento de agua residual domestica puede dividirse en tres etapas: tratamiento primario, tratamiento secundario, tratamiento terciario o avanzado. Cada sección cumple una función importante en el tratamiento de aguas residuales.

En base a lo anterior, es importante considerar el uso potencial de procesos biológicos de bajo costo para el tratamiento terciario de efluentes. El uso de microalgas ha sido una operación estratégica en el tratamiento terciario, de importancia ambiental. Algunas especies de microalgas tienen la capacidad metabólica de poder crecer bajo régimen fototrófico o heterotróficos. Bajo régimen fototrófico, la microalga, convierte la energía solar en biomasa, asimilando nutrientes como nitrógeno y fosforo durante su crecimiento

(Gonzalez y Bashan, 2000; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006), mientras incorpora dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Taberner *et al.*, 2012). La desventaja de este sistema es el uso de la luz como fuente de energía, debido al aumento de la concentración de células que impide el paso de la misma y la obtención de bajas densidades celulares a mayor escala (Wen y Chen, 2003).

Bajo régimen heterotrófico, las microalgas obtienen su energía y carbono de sustratos orgánicos, generando altas densidades celulares en poco tiempo, incorporando nutrientes como nitrógeno y fósforo para su crecimiento y eliminando la necesidad de la luz (De la Hoz Siegler *et al.*, 2012). Este régimen resulta innovador en el tratamiento de aguas residuales (Perez-García *et al.*, 2011). Una de las especies más utilizadas en el tratamiento de aguas residuales es *Chlorella vulgaris*. Esta microalga, debido a su gran diversidad metabólica, está relacionada con su modo de nutrición (trófica) para su crecimiento; asimismo tiene la habilidad de crecer bajo regímenes heterotrófico (Perez-García *et al.*, 2010, 2011).

La aplicación biotecnológica propuesta para tratamiento terciario es el sistema microalga-bacteria. Este sistema consiste en la inmovilización de dos microorganismos *C. vulgaris* y *A. brasilense* en una matriz de alginato. *Azospirillum brasilense* es una bacteria promotora del crecimiento en plantas (PGPB, por sus siglas en inglés) capaz de incrementar el rendimiento de diversas plantas, así como también *Chlorella* spp. (De-Bashan y Bashan, 2008). *A. brasilense* posee diversos mecanismos que afectan positivamente a *C. vulgaris*, incrementando, entre otras cosas, la absorción de Nitrógeno y Fósforo (de-Bashan y Bashan, 2010).

La inmovilización de microalgas-bacteria en esferas de alginato tiene una gran importancia en el proceso de tratamiento terciario de aguas residuales municipales, debido a que es una matriz de alta difusión de nutrientes, protegiendo a los microorganismo del interés de posibles depredadores (Covarrubias *et al.*, 2012), y facilitado la recuperación de las poblaciones de células generadas durante el tratamiento (de-Bashan y Bashan, 2004b).



La disponibilidad de una fuente de carbono orgánico es imprescindible para la eliminación de amonio y fosfatos (Torà *et al.*, 2011). Los sistemas integrales de bacterias-microalgas (Salazar, 2009) a partir de sustratos orgánicos como fuente de carbono y energía, representan una de las aplicaciones de mayor importancia en el área ambiental, permitiendo la bioaumentación de los microorganismos presentes y acelerando la reducción de amonio y fosfatos (Cotoruelo y Marqués, 1999; Salazar, 2009; Torà *et al.*, 2011). De esta manera, el glicerol es una alternativa potencial como fuente de carbono y energía de bajo costo para la bioestimulación de microorganismos presentes en el tratamiento de aguas residuales. El glicerol es asimilado por una gran variedad de microorganismos como bacterias, levaduras, algas y microalgas (da Silva *et al.*, 2009; Dobson *et al.*, 2012, Gancedo *et al.*, 1968); así mismo tiene la ventaja de ser fácilmente biodegradable y no es tóxico (SIDS, 2002), y se obtiene hoy en día en exceso de la producción de biodiesel (da Silva *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2012). Para satisfacer esta nueva demanda, se abre la posibilidad de aplicación en tratamiento de aguas como fuente de carbono de microorganismos para la eliminación de nutrientes como amonio y fosfatos en el proceso de tratamiento de aguas residuales.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Generalidades**

El agua es parte vital del planeta tierra y uno de los recursos más valiosos que cuenta el ser humano, siendo una sustancia fundamental para que ocurran las reacciones químicas que nos mantiene vivos y también afecta a la humanidad de muchas formas indirectas, modera la temperatura del planeta, permite transferir calor para muchos procesos industriales, determina la fertilidad agrícola (Vega de Kuper, 2007). Sin embargo, este recurso es cada vez más afectado, debido al aumento del número de habitantes en el país con el consecuente aumento en el consumo. Solo un bajo porcentaje de agua residual es tratada, constituyendo este un grave problema ambiental, debido que los efluentes residuales a los cuerpos de agua representa la principal causa de mortandad a nivel mundial, al poseer características favorables para la proliferación de microorganismos generadores de enfermedades (Suarez Marmolejo, 2010). Es importante aplicar tecnologías que permitan

reutilizar los caudales y/o regrésalos a la naturaleza con una condición aceptable, sin hacer un uso intensivo de energía y sin producir contaminantes (Lahera, 2010).

## 2.2. Agua Residuales

Según registros de CONAGUA (2011) en México se encuentran operando 2,029 plantas de tratamiento de aguas residuales municipales y existen 2,186 plantas de tratamiento de aguas residuales industriales en operación. Solo el 54.5% emplean el tratamiento secundario. Este proceso generalmente se enfoca a la eliminación de sólidos en suspensión y la oxidación de la materia orgánica. En este sentido, la descarga de los efluentes de las plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR) generalmente mantiene altas concentraciones de Nitrógeno y Fósforo, provocando lo que comúnmente conocemos como eutrofización, contaminando cuerpos de aguas, (esteros, lagunas, ríos, arroyos, etc.), cambiando su química y alterando gravemente a los ecosistemas presentes (Fisher *et al.*, 2006; ). Es importante considerar que en México las plantas de tratamiento y su tecnología para la operación del tratamiento de aguas no es suficiente para cubrir las necesidades, además de que son ineficientes en su operación (Lahera, 2010).

Las descargas de aguas residuales se pueden definir según sus características, como se observa en la Tabla I.

**Tabla I.** Tipos de agua residual (Adaptado de (Kujawa-Roeleveld y Zeeman, 2006).

| Tipo de agua             | Definición                                                                          | Características                                                            |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Agua residual domestica  | Producida en las diferentes actividades al interior de las viviendas, colegios etc. | Los contaminantes están presentes en moderadas concentraciones.            |
| Agua residual municipal  | Son las transportadas por el alcantarillado de una ciudad o población               | Contiene materia orgánica, nutrientes, patógenos, etc.                     |
| Agua residual industrial | Las resultantes de la descarga de industrias                                        | Alto contenido de nutrientes, patógenos, hormonas y residuos farmacéuticos |

|               |                                             |                                                                                                                                            |
|---------------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Agua negra    | Contiene orina y heces                      | Alto contenido de nutrientes, patógenos, hormonas y residuos farmacéuticos.                                                                |
| Agua amarilla | Es la orina transportada con o sin agua     | Alto contenido de nutrientes, productos farmacéuticos, hormonas y alta concentración de sales.                                             |
| Agua café     | Agua con pequeña cantidad de heces y orina  | Alto contenido de nutrientes, patógenos, hormonas y residuos                                                                               |
| Agua gris     | Provenientes de lavamanos, duchas lavadoras | Tiene pocos nutrientes y agentes patógenos y por el contrario presenta máxima de carga de productos para el cuidado personal y detergentes |

### 2.3. Composición típica de agua residual domestica (ARD)

El ARD está compuesta por un 99.9% de agua y un 0.1% de sólidos, de los cuales el 70% son orgánicos y el 30% son inorgánicos, como arenas, sales y metales, siendo éste 0.1% el que debe ser sometido a tratamiento en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR). La composición del agua residual está en función del uso, dependiendo tanto de las características sociales y económicas de la población así como del clima, la cultura y del uso del suelo entre otras (Suarez Marmolejo, 2010).

### 2.4. Tratamiento de aguas residuales

En ingeniería ambiental el término “tratamiento de aguas” es el conjunto de las operaciones unitarias de tipo físico, químico o biológico, cuya finalidad es la eliminación o reducción de la contaminación (Chuc-Altamirano, 2009). El proceso usual de tratamiento de aguas residuales se divide en diferentes etapas pre-tratamiento, tratamiento primario, secundario y terciario o avanzado (Vega de Kuper, 2007).

**Tabla II.** Niveles de tratamiento de aguas residuales (Suarez Marmolejo, 2010).

| Nivel                | Descripción                                                                                                                   | Tipo de Unidad                                                                                                                                                                       |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pretratamiento       | Remueve material causante de problemas operacionales como trapos, ramas, areniscas, material.                                 | Rejas, tamices, desarenadores, tanques de homogenización, trampas de grasas                                                                                                          |
| Primario             | Remueve una porción de sólidos suspendidos y de material orgánico, homogenización                                             | Sedimentador, unidades con inyección de aire, tanque séptico, Imhoff.                                                                                                                |
| Secundario           | Remueve material orgánica biodegradable disuelta o suspendida. Comprende tratamiento biológico.                               | Lodos activados, biodiscos, filtros percoladores, humedales, lagunas, reactores UASB.                                                                                                |
| Terciario o avanzado | Su objetivo fundamental es la eliminación de contaminantes que no se eliminan con los tratamientos biológicos convencionales. | Microfiltración, coagulación y precipitación, adsorción por carbono activado, cloración, osmosis, ozonización, electrodiálisis, eliminación de nitrógeno y fosforo (microorganismos) |

### 2.5. Nutrientes de las aguas residuales

Los componentes principales que conforman químicamente cualquier agua residual son C, N, O y P, conocidos como macro-nutrientes y elementos indispensable que pueden ser asimilados y metabolizados para el crecimiento de los organismos vivos. En el agua estos elementos los encontramos en forma de compuesto orgánicos e inorgánicos; los primeros contienen cadenas de 2 o más átomos de carbono. Los compuestos orgánicos asimilables por los organismos son los llamados nutrientes orgánicos y forman parte de la materia orgánica disuelta. Los segundos son compuestos que no contienen carbono que pueden estar formados por moléculas de nitrógeno y fósforo que son asimilables por los organismos llamados nutrientes inorgánicos (Madigan *et al.*, 2004).

### 2.5.1. Nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente con mayor incidencia en las aguas residuales, y se presenta en forma de nitrógeno orgánico, amonio, nitratos y nitrito. La proporción en que aparecen estos compuestos depende del origen del agua residual y del sistema de tratamiento al que es sometido. Según Broadbent y Reisenauer, (1990) las concentración de amonio en las aguas residuales típica suele oscila entre 5 y 40 mg. N/l y la de nitratos desde 0 hasta más 30 mg. N/l. A pH neutro, el 99% del amoniaco ( $\text{NH}_3$ ) se encuentra protonado formando el ión amonio ( $\text{NH}_4^+$ )(Pérez García, 2009).

La concentración de amoniaco aumenta cuando se incrementa el pH a valores mayores de 8.5 debido a la desprotonización del amonio por su constante de disociación (pK). La norma oficial mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996.1997, )establece el valor máximo de 60 mg/L de nitrógeno total en las descargas de agua residual a ríos y embalses naturales. La norma oficial mexicana (SECRETARÍA DE SALUD, 2000), 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 0.50 mg/L de  $\text{N-NH}_4^+$ , 0.05mg/L de  $\text{N-NO}_2$  y 10mg/L de  $\text{N-NO}_3$ .

Las altas concentraciones de nitrógeno en las descargas de aguas residuales puede generar problemas ambientales tales como toxicidad en animales en medio acuáticos, agotamiento del oxígeno disuelto debido que el amonio aumenta la demanda de oxígeno (1mg de amonio ejerce una demanda de oxígeno de 4.6mg de  $\text{O}_2$ ) y la eutrofización de ríos y lagos.

### 2.5.2. Fosforo

En las aguas residuales el fosforo se presenta en tres formas principales: ortofosfatos, polifosfatos y fósforo orgánico. Los ortofosfatos, se encuentran en equilibrio en tres formas diferentes: fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), fosfato monoácido ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), fosfato diácido ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y acido fosfórico no ionizado ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ). El  $\text{HPO}_4^{2-}$  predomina en pH cercanos a la neutralidad (Cotoruelo y Marquéz 1999). Las mayores aportaciones de fosfato a las aguas receptoras provienen de los escurrimientos de las tierras agrícolas y de los efluentes de agua residual domestica e industrial (Carpenter *et al.*, 1998). La concentración promedio de fósforo total (orgánico e inorgánico) en agua residual es de 10-20mg L<sup>-1</sup>, la gran mayoría del cual

proviene de los detergentes de uso doméstico (Bitton, 2005). 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. La norma oficial mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996.1997, ), establece un valor máximo de 30mg L-1 de fósforo total en las descargas de agua residual a ríos y embalses naturales según sea el caso.

### **2.5.3. Tratamiento terciario**

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

La eliminación de amonio y fosfatos son predominantes en plantas convencionales de tratamiento, por lo cual comúnmente se adicionan productos químicos, como el alumbre, cloruro férrico y algunos polímeros precipitando los iones fosfatos, y son retirados a través de la sedimentación. Sin embargo esta alternativa no es económicamente viable debido a las grandes cantidades de químicos requeridos. Con respecto a la eliminación de amonio, actualmente se han estado aplicando zeolitas por su efecto de adsorción (Fernández *et al.*, 2008).

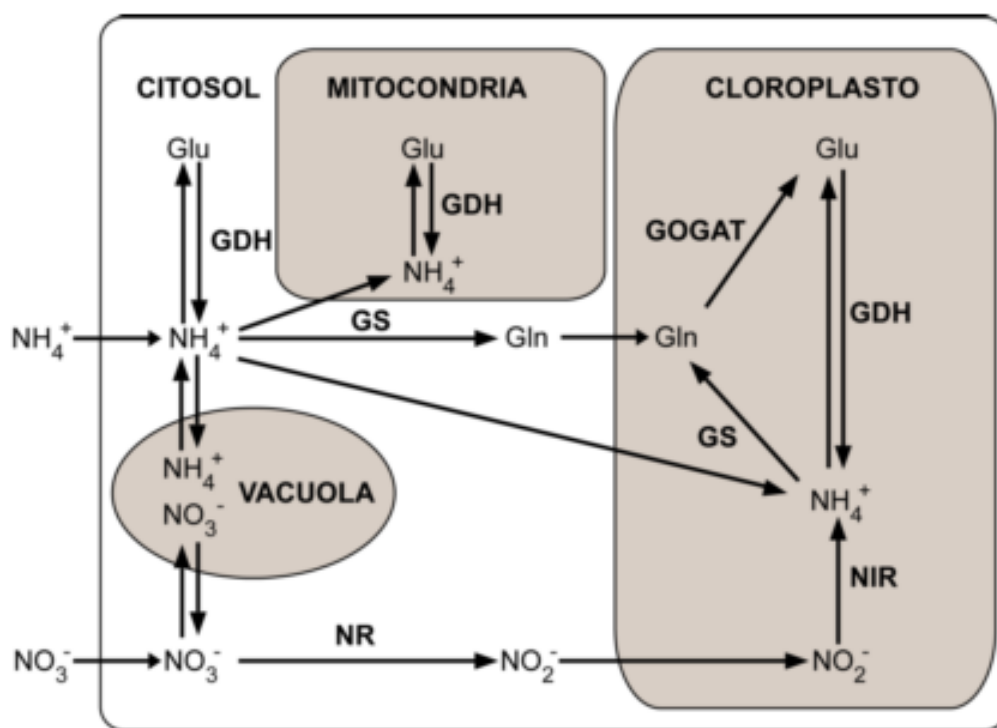
Una de las alternativas biotecnológicas para la eliminación de Amonio y fosfatos es el uso de microorganismos tales como microalgas. .

### **2.6. La microalgas en el tratamiento de aguas residuales**

En los últimos años la aplicación de sistemas biológicos para tratamiento de aguas, ha tenido un amplio desarrollo (Lincoln y Earle, 1990). En este sentido, las microalgas representan una de las mejores alternativas para la remoción de nitrógeno y fósforo inorgánico generados en el tratamiento secundario, además de tener la capacidad de remover metales pesados (De la Noüe *et al.*, 1992). Estos microorganismos son de bajo costo energético y su biomasa puede implementarse en alimentos y extracción de compuestos químicos (Monroy *et al.*, 1989; Salazar *et al.*, 2002).

### 2.6.1. Asimilación del nitrógeno en las microalgas

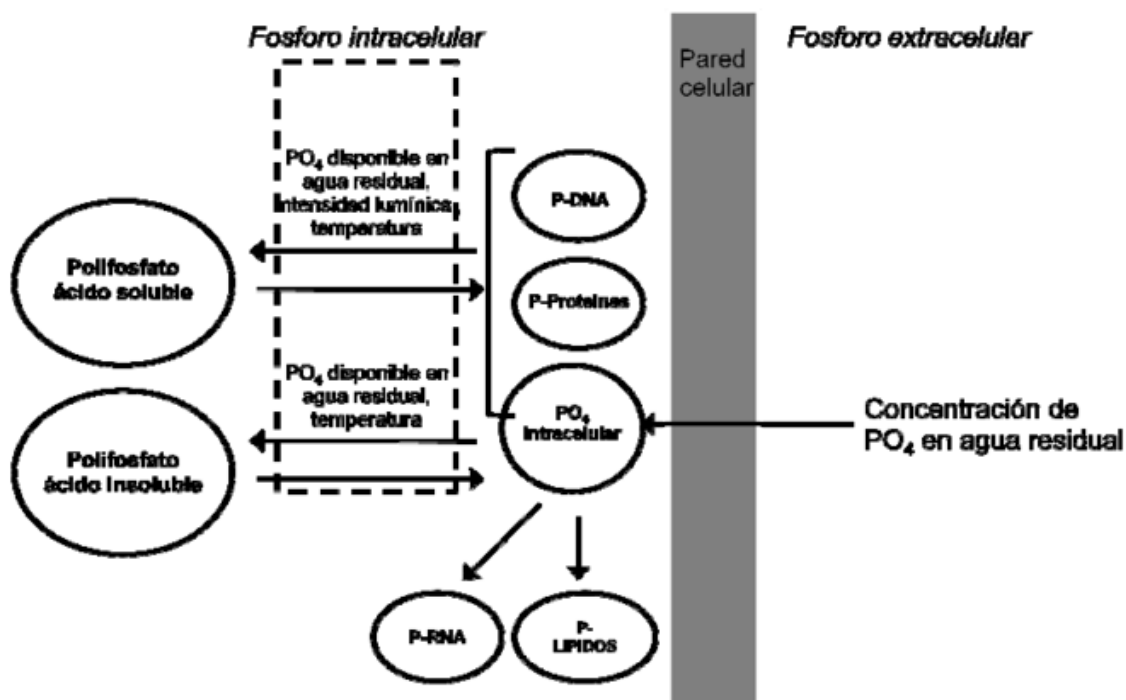
El Nitrógeno es un elemento fundamental en la formación de aminoácidos y ácidos nucleicos (Torrescano, 2009). La asimilación de Nitrógeno está regulada principalmente por reacciones enzimáticas. El metabolismo del nitrógeno se lleva a cabo en el citosol, en los cloroplastos y en las mitocondrias (Figura 1), e involucra dos rutas enzimáticas. La ruta más importante es la que involucra las reacciones secuenciales de la glutamina sintetasa (GS) y la glutamato sintasa (GOGAT). En esta reacción el amonio es incorporado a la glutamina. La glutamina dona una de sus aminas a oxoglutarato para producir dos moléculas de glutamato (Glu) mediante la transferencia de aminas, catalizada por la glutamato sintasa (GOGAT). La otra es una ruta auxiliar que consiste en una reacción reversible, en la que se desamina el glutamato y es catalizada por la glutamato deshidrogenasa (GDH) (Texto referenciado de la tesis de Santander, 2012).



**Figura 1.** Ruta de asimilación de nitrógeno de organismos eucariotas fotosintéticos (Inokuchi y Okada, 2002), figura referenciada de la tesis (Cruz, 2012).

### 2.6.2. Asimilación del fósforo en las microalgas

Una de las múltiples funciones del fósforo en la célula es que funciona como generador de químicos (enzimas) necesarios para romper compuestos orgánicos presentes en el agua residual (Torrescano, 2009). Parte del fósforo presente como ortofosfatos soluble, es utilizado por los microorganismos acuáticos, muchos de los cuales almacenan en su interior el exceso del mismo en forma de polifosfatos a modo de reserva (Cotoruelo y Marqués, 1999). En la microalga, el fósforo ingresa como ion fosfato  $\text{PO}_4^{-3}$ , y con la ayuda de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina. Lo cual implica dos principales vías: la producción de polifosfatos y la síntesis de fosfolípidos o ARN, necesarios para el metabolismo y crecimiento de la célula (Grobbelaar, 2004; Powell *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Asimilación de fosfatos disponibles por microalgas en aguas residuales (Powell *et al.*, 2009), Figura referenciada de la tesis (Cruz, 2012).



### **2.6.3. *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense***

*Chlorella vulgaris* es una microalga eucariota unicelular, de forma esférica o elíptica, de distribución cosmopolita, habitando cuerpos de agua dulce (Bulut *et al.*, 2011). Es una microalga ampliamente utilizada en el sector de la industria alimenticia y de biorremediación. Se ha demostrado que tiene una alta capacidad de remoción de nitrógeno y fosforo en el tratamiento de aguas residuales (Post *et al.*, 1994; González *et al.*, 1997). De la gran variedad de especies del género *Chlorella*, la especie *C. vulgaris* presenta una alta resistencia a cambios ambientales, estrés mecánico y elevadas concentraciones de contaminantes, incluyendo nitrógeno, fosforo y metales pesados (Palmer, 1969; Kaplan *et al.*, 1987). Debido a su metabolismo tiene la capacidad de crecer bajo régimen heterotrófico, mediante una fuente de carbono asimilable y biodisponible, lo que la hace un modelo biológico ideal para el estudio en su aplicación al tratamiento de aguas residuales (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

Se ha demostrado que para un mejor rendimiento en el crecimiento de microalgas acuáticas del género *Chlorella* es necesario asociarlos a una bacteria (de-Bashan y Bashan, 2008). Una de las bacteria de mayor uso es *Azospirillum brasilense*. Esta es una bacteria que habita en la rizosfera y es promotora del crecimiento en plantas (PGPB, por sus siglas en inglés) que contribuye en la fijación de nitrógeno y además de producir una diversidad de fitohormonas (de-Bashan *et al.*, 2008), que alteran el metabolismo de la microalga y su fisiología en diferentes formas (Gonzalez y Bashan, 2000).

### **2.6.4. Sistema co-inmovilizado de *C. vulgaris* + *A. brasilense***

La inmovilización se define como la confinación o localización física de células intactas a una región definida en el biorreactor, manteniendo la actividad catalítica de las células (Karel *et al.*, 1985). Comúnmente se utilizan polímeros sintéticos (acrilamida, poliuretano, polivinilo y resinas) o polímeros naturales derivados de polisacáridos, (alginato, carragenano, agar y agarosa). La inmovilización de células es un sistema prometedor para el tratamiento de aguas residuales ya que brinda protección a los microorganismos de interés de agentes depredadores (Covarrubias *et al.*, 2010). Esto facilita la recuperación de

células generadas durante el tratamiento (Rezaee *et al.*, 2008), reduciendo así los costos en los procesos operativos (Karel *et al.*, 1985; De la Noüe *et al.*, 1992).

Una de las estrategias biotecnológicas para el tratamiento de aguas residuales es la co-inmovilización de *C. vulgaris* y *A. brasilense*. Estos microorganismos no se encuentran asociados en la naturaleza, y mediante esta tecnología se les obliga a interactuar, teniendo resultados importantes para su uso en tratamiento de aguas residuales. La positiva afectación de la bacteria hacia la microalga resulta en un incremento en el crecimiento celular, producción de ácidos grasos y contenido de lípidos (de-Bashan *et al.*, 2002), así como la remoción de amonio y fosfatos del agua residual. Uno de los mecanismos posibles al cual se le atribuye estos efectos positivos es la producción del ácido Indol-3-acético (IAA) por parte de la bacteria (de-Bashan *et al.*, 2008). de Bashan *et al.*, (2008) evaluaron la actividad enzimática de la Glutamato deshidrogenasa (GDH) y Glutamina sintetasa (GS) de *C. vulgaris*, observando que hay un aumento en el número de células y en la actividad de la enzima GS cuando la microalga está co-inmovilizada. Observándose al final del experimento, un aumento en la remoción de amonio y la actividad enzimática de GDH, pero no así en la densidad celular.

#### **2.6.5. Microalgas bajo régimen heterotrófico**

Las microalgas bajo régimen heterotrófico utilizan materia y energía de los compuestos orgánicos. *Chlorella* spp. específicamente tiene la capacidad de crecer en una diversidad de fuentes de carbono, como glucosa, glicerol y acetato (Perez-García *et al.*, 2011). Una de las ventajas al utilizar el régimen heterotrófico es que no hay la necesidad de la luz para el desarrollo celular (Apt y Behrens, 1999). Además de que su operación es simple, produce altas densidades por unidad de volumen (Chen, 1996; Lee, 2004). Por tal motivo, este régimen particular puede ser más rentable que los autotróficos (De la Hoz Siegler *et al.*, 2012).

Perez-García *et al.*, (2010) evaluaron el sistema co-inmovilizado bajo diferentes regímenes: autotrófico, mixotrófico y heterotrófico y observaron que bajo el régimen heterotrófico se obtiene una mayor remoción de amonio del agua, que en cualquiera de los otros dos regímenes. Este trabajo resultó en una biotecnología propuesta por el grupo de

microbiología ambiental del CIBNOR para el tratamiento de aguas residuales, utilizando el sistema de co-inmovilizado bajo el régimen heterotrófico (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

### **2.7. Glicerol como fuente de carbono**

El glicerol es un alcohol simple (1.2.3 propanotriol) también llamado glicerina. Es el principal subproducto que se obtiene durante la desnitrificación de aceites vegetales y grasas animales. Por su amplia disponibilidad es un sustrato barato que puede ser utilizado en el cultivo de una gran diversidad de microorganismos como bacterias, levaduras, algas y microalgas (da Silva *et al.*, 2009; Dobson *et al.*, 2012, Gancedo *et al.*, 1968). Así mismo tiene la ventaja de ser fácilmente biodegradable y no es tóxico (SIDS, 2002), se obtiene hoy en día en exceso de la producción de biodiesel (da Silva *et al.*, 2009; Guerrero *et al.*, 2012). Se ha utilizado como combustible alimentación para animales, y en la producción de biogás (Rétfalvi *et al.*, 2011). El glicerol puede sustituir carbohidratos tradicionales, tales como sacarosa, glucosa, y almidón, en algunos procesos industriales de fermentación (da Silva *et al.*, 2009). El glicerol está presente en muchas aplicaciones en la cosmética, pintura,, alimentación, tabaco, productos farmacéuticos, pulpa y papel (Dobson *et al.*, 2012); los beneficios que ofrece es barato y abundante (da Silva *et al.*, 2009). La promesa hoy en día es en el uso en tratamiento para eliminar contaminantes del agua, debido a que ayuda en la bioestimulación de microorganismos presentes en el agua, quienes lo utilizan como una fuente de carbono (Grabińska -loniewska *et al.*, 1985; Kloverpris y Wenzel, 2007; Guerrero *et al.*, 2012).

### 3. Justificación

Puesto que los métodos fisicoquímicos empleados actualmente representan un alto costo económico, proponemos emplear el sistema co-inmovilizado *C. vulgaris*-*A. brasilense* como estrategia biotecnológica para eliminar el amonio y los fosfatos del agua residual a través del **uso de glicerol como fuente de carbono para incrementar** la eliminación de esos contaminantes **bajo condiciones heterotróficas**, por lo que el proceso biotecnológico permitirá incrementar, simplificar, y potencialmente reducir los costos.

### 4. Hipótesis de trabajo

Si el sistema inmovilizado de *C. vulgaris*-*A. brasilense*, bajo condiciones heterotróficas, **favorece** la eliminación de amonio y fosfatos, resultando además en el aumento de la biomasa de la microalga, entonces el uso de glicerol como fuente de carbono, en nuestro sistema, **incrementará** la eliminación de amonio y fosfatos.

### 5. Objetivo general

Determinar la eficiencia del sistema co-inmovilizado microalga-bacteria en la eliminación de amonio y fosfatos, utilizando glicerol como fuente de carbono bajo régimen heterotrófico.

#### 5.1. Objetivos particulares

- 1.- Evaluar el crecimiento de la microalga y la bacteria a concentraciones de 1% y 10% de glicerol bajo régimen heterotrófico en medio residual sintético (MRS).
2. Determinar la eficiencia de eliminación de amonio y fosfatos bajo régimen heterotrófico, usando glicerol como fuente de carbono en diferentes volúmenes (100ml, 600ml y 50L).

## 6. Materiales y Métodos

Para cumplir los objetivos de la investigación se ha planteado una estrategia con 2 etapas.

1.- Crecimiento en la concentración celular del sistema *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado) en concentración 1% y 10% de glicerol, bajo régimen heterotrófico en Medio Residual Sintético.

- Monitoreo durante 120 hrs del crecimiento del Co-inmovilizado *C.vulgaris-A. brasilense*.
- El porcentaje de glicerol con mayor crecimiento del co-inmovilizado con respecto a *C. vulgaris*, se llevara a posteriores tratamientos con Agua Residual Real.

2.- Evaluar la eliminación de amonio y fosfatos, en diferentes capacidades volumétricas usando glicerol como fuente de carbono en los componentes del sistema co-inmovilizado.

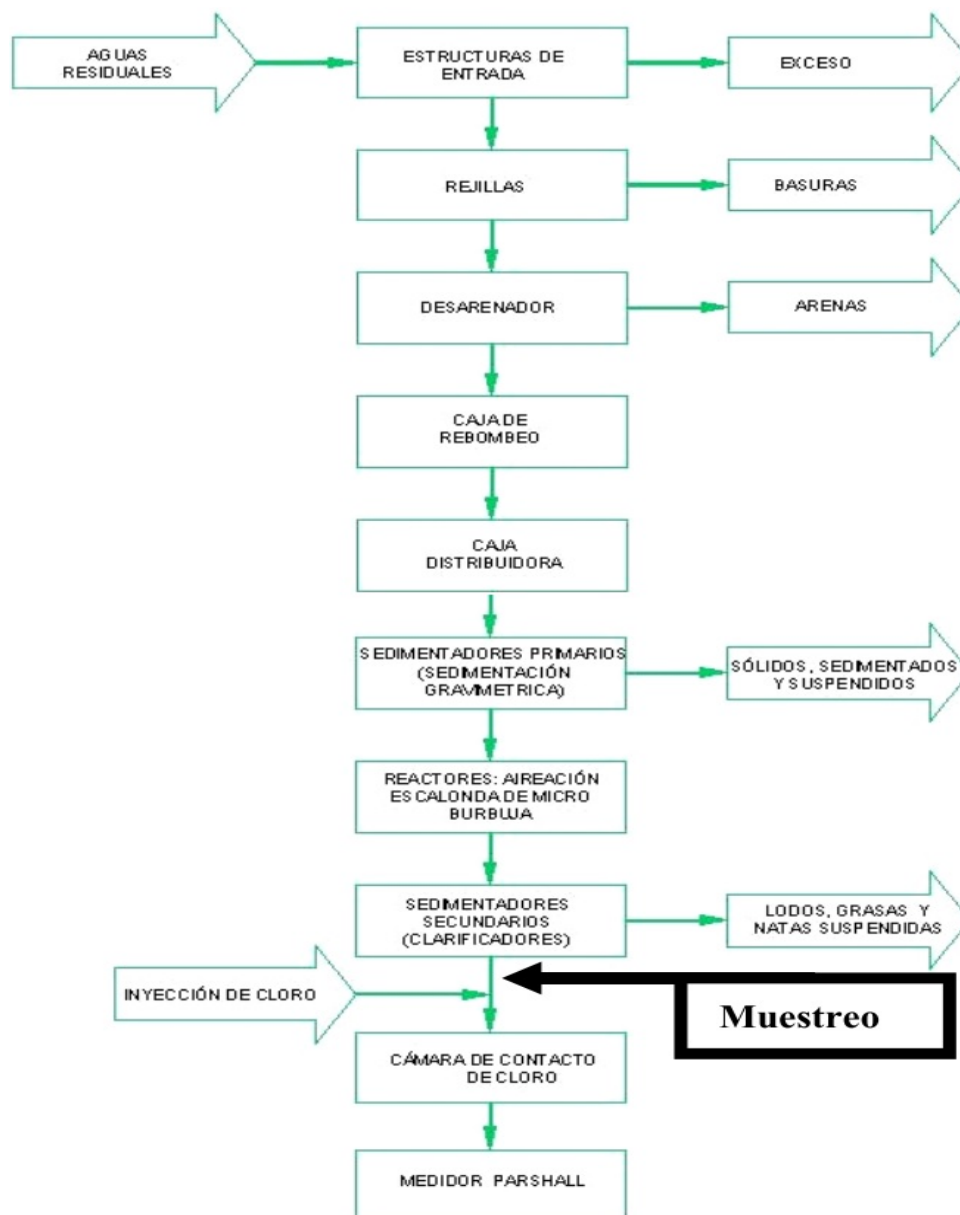
Esta etapa se realizó en 4 fases:

- 1.- Agua Residual Estéril (ARE), al 1% v/v de glicerol en 100 mL, duración 48 hrs.
- 2.- Agua Residual Real (ARR), al 1% v/v de glicerol en 100 mL.
- 3.- Agua Residual Real, al 1% v/v de glicerol en 60 mL.
- 4.- Agua Residual Real, al 1% v/v de glicerol en 50 L, duración 24 hrs por microorganismos nativos del agua residual real.

### 6.1. Lugar de Muestreo del agua residual

La muestra recolectada del agua residual para ser empleada en este estudio, fue tomada de la Planta de Tratamiento de Agua Residual del Municipio de La Paz, Baja California Sur, México. Esta planta tiene un flujo promedio de 300 L•s<sup>-1</sup> de agua residual cruda, proveniente de la red de alcantarillado de la ciudad de La Paz. El agua residual generada en la ciudad de La Paz es principalmente de origen doméstico (OOMSAPAS, 2008). La planta de tratamiento opera con un sistema convencional de lodos activados (OOMSAPAS, 2008). Las muestras fueron tomadas en la “caja receptora” de los efluentes provenientes de los

sedimentadores secundarios, antes de recibir la inyección de cloro para su desinfección. Este efluente será referido en adelante como como efluente secundario.



**Figura 3.** Punto de muestreo del proceso de tratamiento de aguas residuales (Pérez García, 2009).



**Figura 4.** Fotografía tomada vía satelital, de la PTAR del Municipio de la Paz, BCS, MÉXICO

### 6.2. Diseño de muestreo

Los muestreos se realizaron entre la semana Lunes-Viernes, el horario fue alrededor de las 11:00 am en los meses de Marzo-Septiembre, la muestras fueron transportadas en bidones de plástico con capacidad de 50 L. para su posterior análisis en el laboratorio.

### 6.3. Análisis de Agua

Los bidones para la toma de muestra fueron previamente lavados en el agua residual, posteriormente se procedió a la toma de muestra. Después de la obtención de la muestra, fueron llevadas a las instalaciones del CIBNOR. Los análisis de amonio, fosfato, así como temperatura, pH y oxígeno disuelto se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Ambiental. En la Tabla 4 se presentan las variables analizadas del efluente secundario en diferentes muestreos y sus respectivos métodos.

**Tabla III.** Características del efluente secundario, variables analizadas del agua residual tratada.

| Variable              | Unidad | Muestreo PTAR(1) | Muestreo PTAR (2) | Muestreo PTAR (3) | Método                                              |
|-----------------------|--------|------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>Fisicoquímicas</b> |        |                  |                   |                   |                                                     |
| <b>Amonio</b>         | mg/L   | 34.163 ± 2.15    | 31.18 ± 0.73      | 34.90 ± 1.28      | Método del fenato (Solorzano, 1969).                |
| <b>Fosfatos</b>       | mg/L   | 24.05 ± 1.44     | 24.05 ± 1.44      | 23.80 ± 1.3       | Método del ácido ascórbico (Murphy and Riley 1962). |
| <b>Oxígeno</b>        | mg/L   | 2.91 ± 0.21      | 3.01 ± 0.40       | -                 | Oxímetro YSI-500 A.                                 |
| <b>pH</b>             | pH     | 7.68 ± 0.23      | 7.75 ± 0.16       | 7.60 ± 0.36       | Potenciómetro YSI-63.                               |
| <b>Temperatura</b>    | °C     | 26.9 ± 1         | 27.5 ± 1          | 31.5 ± 1          | Potenciómetro YSI-63.                               |

Los resultados obtenidos muestran que las variables físico-químicas son estables, Estas condiciones, describen que el agua del efluente secundario de la PTAR del La Paz BCS. México es ideal para un tratamiento terciario por su estabilidad de los efluentes.

#### 6.4. Condiciones de cultivo y Diseño de experimentos

##### 6.4.1. *Chlorella vulgaris*

La microalga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (UTEX 2714) fue mantenida en refrigeración en placas de agar enriquecido con caldo nutritivo (Sigma) en condiciones axénicas en el medio de crecimiento C30, el cual presento la siguiente composición (en mg/l): 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): 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 a 130 r.p.m., 27-30°C y una intensidad de luz de 60 µE m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>. Para preparar la microalga, se tomo una asada del cultivo en placas de agar-caldo nutritivo o bien se tomaron 10 ml de cultivo de la microalga crecida en medio C30 y se inocularon en 90 ml del medio C30 estéril. Este inóculo se mantuvo durante 5-7 días bajo las condiciones ya mencionadas para obtener un cultivo de microalgas en fase de crecimiento exponencial y se realizaron conteos directos hasta alcanzar una concentración de 1x10<sup>6</sup> cel/ml.



#### **6.4.2. *Azospirillum brasilense***

La bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 7030 Braunschweig, Germany), se mantuvo en placas de agar enriquecido con caldo nutritivo (Sigma). Para preparar la bacteria, se inoculó un asada en 50 ml de medio BTB con glicerol, el cual presenta la siguiente composición (en g/l): 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, glicerol;8, extracto de levadura;5, se ajustó el pH a 7 con KOH 1M; y se incubó a 27-30°C, agitación constante de 120 r.p.m. durante 24h. De este pre-inoculo se tomaron 2 ml y se inocularon en 50 ml del mismo medio BTB con glicerol bajo las mismas condiciones ya descritas, esto para obtener un cultivo de la bacteria en crecimiento exponencial.

#### **6.4.3. Inmovilización de *C. vulgaris* y *A. brasilense* (co-inmovilizado) en esfera de alginato**

Los cultivos de microalgas (100 ml) y bacterias (50ml) que se obtuvieron, fueron centrifugados por 5 minutos a 6000 rpm se realizaron lavados con 20ml de una solución salina al 0.85% (NaCl), este procedimiento se repitió dos veces. Al final de los lavados los microorganismos se re-suspendieron en 20 ml de la misma solución salina.

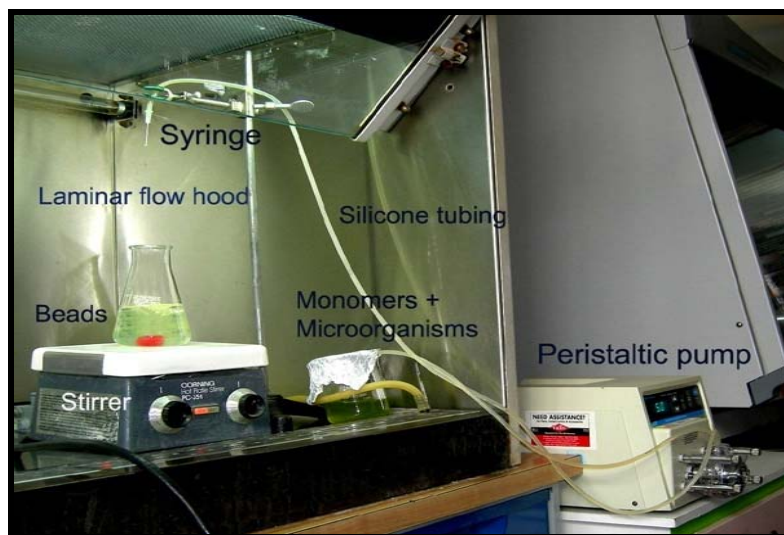
Para inmovilizar y co-inmovilizar los microorganismos, se preparó una solución de alginato al 2% en 80 ml de agua destilada. Para ello se utilizó una relación 3:1 de alginato de media densidad (1.5 g) y alta densidad (0.5 g), se mezclaron ambos alginatos y se agregaron poco a poco en el agua destilada, se agitaron hasta formar un gel homogéneo y posteriormente fueron esterilizados.

Para inmovilizar la microalga se añadieron los 20 ml de cultivo de microalga re-suspendida en la solución salina, en la solución de alginato estéril se agitaron hasta homogenizar; para inmovilizar la bacteria inicialmente se ajustó la densidad óptica de la solución a 1, lo cual corresponde a una concentración de 10<sup>9</sup> UFC, posteriormente se añadieron los 20 mL de la solución salina con la bacteria en la solución de alginato estéril y se homogenizaron.

Para co-inmovilizar ambos microorganismos en la esfera de alginato, se siguió el mismo procedimiento, por lo que se re-suspendieron por separado la microalga y la bacteria en 10

mL de la solución salina, de esta forma se obtuvieron los 20 ml que se agregaran a los 80 mL de la solución de alginato estéril y se homogenizaron.

Una vez que obtenida las soluciones de alginato con 1. bacteria, 2. microalga 3. microalga-bacteria, se procedió a la inmovilización mediante la ayuda de una bomba peristáltica y a través de una manguera de silicón y una aguja estéril, las gotas de solución de alginato homogenizada con los microorganismos se recibieron en 100 ml de una solución endurecedora de cloruro de calcio al 2% y se dejaron por 30 minutos en dicha solución, posteriormente las esferas fueron enjuagadas dos veces con la solución salina 0.85%, y finalmente obtenidas las esferas con los microorganismos inmovilizados y co-inmovilizados fueron sometidos a un crecimiento secundario en una solución de caldo nutritivo diluido al 10% con la solución salina, por 24h, 27-30°C, 130 r.p.m., con una intensidad de luz de  $60 \mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$ .



**Figura 5.** Proceso de inmovilización de microalgas y bacterias en esferas de alginato de calcio.

Una vez obtenidas las esferas de alginato de calcio con los microorganismos, se obtuvieron los siguientes tratamientos, de acuerdo a sus objetivos:

- 1) *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola
- 2) *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada)

- 3) *A. brasilense* inmovilizada sola
- 4) Esfera sin microorganismos (control +)
- 5) Agua residual + glicerol (control +)
- 6) Agua residual sin glicerol (control -)

### 6.5. Diseño experimental

Se realizaron 2 experimentos que se detallan a continuación.

#### 1. Crecimiento de *C. vulgaris* + *A. brasilense* en MRS

Cada tratamiento fue inoculado con ocho gramos de esferas en 100 mL en medio residual sintético (MRS), el cual simula las características minerales del agua residual (de Bashan *et al.*, 2002) y presenta la siguiente composición en (mg/l): NaCl; 7, CaCl<sub>2</sub>; 4, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O;2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;21.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;8.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>;33.4, NaCl<sub>4</sub>;191.

Los experimentos se realizaron en cultivos en lote, en frascos Erlenmeyer de 250 ml, con un volumen de 100 mL de MRS; fueron sometidos a crecimiento heterotrófico con las siguientes condiciones: 130 r.p.m., 28°C y se añadieron 1% y 10% de glicerol al MRS como fuente de carbono durante 5 días (120 hrs). El experimento se realizó en completa oscuridad, con 4 tratamientos: 1) *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola, a concentración 1% de glicerol.

2) *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), a concentración de 1% de glicerol.

3) *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola, a concentración de 10% de glicerol

4) *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), a concentración de 10% de glicerol.

Cada tratamiento conto con 3 réplicas, y el experimento se repitió tres veces. Cada 24 horas se tomaron análisis para el conteo de células microalgales. Los resultados fueron comparados con una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tuckey a  $p \leq 0.05$ .

El porcentaje de glicerol con el que se obtuvo la mayor concentración celular microalgal se llevó a condiciones de Agua Residual Real, provenientes del efluente secundario de la PTAR del Municipio de La Paz, BCS, México, donde se evaluó la eliminación de amonio y fosfatos en diferentes capacidades volumétricas.

## **2. Eliminación de Amonio y fosfatos en Agua Residual Real**

El experimento se llevó a cabo en 4 fases:

### ***Fase 1: Eliminación de amonio y fosfatos con el sistema microalga-bacteria en agua residual real estéril***

Cada tratamiento, fue inoculado con ocho gramos de esferas en 100 ml en Agua Residual Real Estéril (ARRE). Los experimentos se realizaron en cultivos en lote, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de 100 ml de MRS, agregando 1% de glicerol como fuente de carbono, en crecimiento heterotrófico con las siguientes condiciones: 130 r.p.m., 28°C, durante 2 días (48 hrs) y en completa obscuridad. Se hicieron 4 tratamientos, se realizaron 3 réplicas, con 3 repeticiones. La toma de muestra se hizo cada 24 horas. Análisis realizados: conteo de células, concentración de amonio, concentración de fosfatos, pH, oxígeno disuelto. Los resultados fueron comparados con una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

Los tratamientos realizados fueron:

- 1) *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola.
- 2) *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada).
- 3) *A. brasilense* inmovilizada sola.
- 4) Esfera sin microorganismos.

Posteriormente se realizaron experimentos con Agua Residual Real en volumen de 100 ml el sistema microalga-bacteria.

### ***Fase 2: Eliminación de amonio y fosfatos con el sistema microalga-bacteria en Agua Residual Real (ARR)- 100 mL***

Cada tratamiento fue inoculado con ocho gramos de esferas en 100 mL en Agua Residual Real (ARR) sin esterilizar. Los experimentos se realizaron en cultivos en lote, en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con un volumen de 100 ml de ARR agregando 1% de glicerol como fuente de carbono, bajo condiciones de crecimiento heterotrófico con las siguientes condiciones: 130 r.p.m., 28°C, durante 2 días (48 hrs) y en completa oscuridad. El experimento contó con 6 tratamientos, se realizaron 3 réplicas, y 3 repeticiones. La toma de muestra se hizo cada 12 horas. Análisis realizados: conteo de células (*C. vulgaris*, *A. brasilense*, bacterias totales), concentración de amonio, concentración de fosfatos, pH, oxígeno disuelto. Los resultados fueron comparados con una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron:

- 1) *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola.
- 2) *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada).
- 3) *A. brasilense* inmovilizada sola.
- 4) Control 1: Esfera sin microorganismos.
- 5) Control 2: Agua Residual Real + glicerol.
- 6) Control 3: Agua Residual Real sin glicerol

### ***Fase 3: Eliminación de amonio y fosfatos del Agua Residual Real (ARR)- 600 mL***

Cada tratamiento fue inoculado con 48 gramos de esferas en 600 mL en Agua Residual Real (ARR). Los experimentos se realizaron en cultivos en lote, en matraces Erlenmeyer invertidos de 1 L de capacidad (Anexo 1), con un volumen de trabajo de 600 mL de ARR y adición de 1% de glicerol como fuente de carbono. Las condiciones de crecimiento heterotrófico fueron las siguientes: aireación como agitación, 28°C, durante 2 días (48 hrs). El experimento se realizó en completa oscuridad y conto con 6 tratamientos, se realizaron

3 réplicas, con 3 repeticiones. La toma de muestra se realizó cada 12 horas. Los análisis realizados fueron: conteo de células (*C. vulgaris*, bacterias totales), concentración de amonio, concentración de fosfatos, pH, oxígeno disuelto. Los resultados fueron comparados con una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron:

- 1) *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola.
- 2) *Chlorella vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada).
- 3) *A. brasilense* inmovilizada sola.
- 4) Control 1: Esfera sin microorganismos.
- 5) Control 2: Agua Residual + glicerol.
- 6) Control 3: Agua Residual sin glicerol

#### **Fase 4: Eliminación de amonio y fosfatos del Agua Residual Real por bacterias nativas**

Cada experimento se realizó en un reactor triangular en 50 L con Agua Residual Real (ARR), adicionando 1% de glicerol como fuente de carbono, bajo condiciones de crecimiento heterotrófico. Las condiciones de crecimiento fueron: aireación continua,  $29 \pm 2$  °C durante 2 días (48 horas). El experimento se realizó en completa oscuridad y con 2 tratamientos, se realizaron 3 réplicas, con 3 repeticiones. Los biorreactores son de acrílico oscuro, en forma de prisma triangular invertido, con dimensiones 70 x 60 x 33 cm (lado x lado x altura) (González *et al.*, 1997) (Anexo 2). La toma de muestra se hizo cada 12 horas. Los análisis realizados fueron conteo celular (bacterias totales), Hibridación fluorescente in situ (FISH) para observar el cambio cualitativo en comunidad bacteriana, concentración de amonio, concentración de fosfatos, pH, oxígeno disuelto, temperatura. Los resultados fueron comparados con una prueba ANOVA de una vía con un análisis pos-hoc de Tukey a  $p \leq 0.05$ .

Los tratamientos fueron:

- 1) Agua Residual + glicerol.
- 2) Agua Residual sin glicerol

### **6.5.1. Métodos analíticos**

#### **Recuento celular *C. vulgaris*-*A. brasilense***

Para realizar los conteos de *Chlorella vulgaris* se tomaron 3 esferas por réplica y se disolvieron, cada esfera, en 1 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 4% durante 30 minutos, a temperatura ambiente. De esta disolución se realizaron conteos directos en microscopio con cámara Neubauer.

El conteo de células viables de la bacteria *A. brasilense* se realizó mediante tinción de Diacetato de Fluoresceína (FDA, por sus siglas en inglés) (Chrzanowski *et al.*, 1984), en microscopio con lámpara de fluorescencia, con el siguiente procedimiento: se tomaron 500  $\mu$ l de la disolución de la esfera en bicarbonato de sodio al 4%, y se centrifugaron por un minuto a 2000  $x$  g, se retiró el sobrenadante y se agregaron al pellet resultante 250  $\mu$ L de una solución de trabajo compuesta por Diacetato de Fluoresceína (20 mg de FDA en 10 mL de acetona, a 4°C) y Buffer de fosfato (relación FDA/Buffer, 1:10). Esta solución se mezcló con el precipitado celular, homogenizando con un vortex y posteriormente, se centrifugó nuevamente la muestra para retirar la solución de tinción. El precipitado celular se re-suspendió en 500  $\mu$ L de solución buffer y se mezcló hasta homogenizar. Finalmente, 10  $\mu$ L de la muestra fueron tomados para colocarse en un porta objetos. Se colocó un cubre objetos encima de la muestra y se procedió a realizar el conteo de células con el apoyo de un microscopio óptico de epifluorescencia (OLYMPUS BX41). La fluorescencia emitida se logró detectar con un filtro verde (FITC) el cual tiene un rango de excitación de luz de 460-490nm y un máximo de emisión de luz de 520IF. Los conteos celulares se realizaron directamente al microscopio, usando el objetivo de 100X, se tomando diez campos al azar,

y se cuantificaron las unidades celulares, cabe mencionar que se consideró la profundidad de la muestra.

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

### **Conteo de bacterias viables totales por Diacetato de Fluoresceína**

Durante el desarrollo del experimento de eliminación de nutrientes en Agua Residual Real, se tomaron muestras para realizar conteos de células bacterianas viables presentes y poder determinar alguna variación en el tamaño de la población, esto se realizó mediante tinción de FDA-. Las muestras fueron colectadas a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas respectivamente del experimento, tomando 10 mL de agua en tubos para centrífuga CORNING® estériles. En condiciones asépticas, las muestras de agua fueron filtradas (millipore®, tamaño de poro de 5.0 µm) para eliminar sólidos suspendidos y microorganismos de mayor tamaño al de las células bacterianas. Previo al filtrado, la muestra se homogenizó en vortex durante 1 min al máximo de velocidad, se recuperaron 2 mL del filtrado y se centrifugó a 13,000  $\times$  g durante 2 minutos, el sobrenadante fue retirado y se realizó un primer lavado, re-suspendiendo el precipitado con 500 µL de solución Buffer de fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: pH 7.2) y homogenizando nuevamente en el vortex durante 1 min al máximo de velocidad. Seguido a esto, se centrifugó por segunda vez la muestra con las mismas condiciones. Anteriormente descritas, y el sobrenadante fue retirado, lo cual se podría considerar como un segundo lavado: posteriormente, se llevó a cabo la tinción. El resto del procedimiento es similar al descrito anteriormente para el recuento de *Azospirillum*.

### **Visualización de las poblaciones bacterianas nativas mediante Hibridación Fluorescente in Situ**

Durante el desarrollo del experimento de eliminación de nutriente, en Agua Residual Real se tomaron muestras para visualizar el cambio de las poblaciones de bacterias gram



positivas y gram negativas, mediante la técnica Hibridación Fluorescente in Situ. (FISH por sus siglas en inglés) con sonda universal para Eubacterias. Las muestras fueron colectadas a las 0, 12, 24, y 48 horas respectivamente del experimento, tomando 40 mL de agua en tubos para centrifuga CORNING® estériles y se realizó siguiendo los siguientes pasos:

***Bacterias Gram Negativas (-):***

Fijación de cultivo: para fijar la biomasa bacteriana, se centrifugaron 40 mL de la muestra y se retiró el sobrenadante, posteriormente se hicieron 3 lavados sucesivos con 1x PBS (Buffer de fosfato salino) y el pellet celular se re-suspendió en 1 mL PFA (formaldehído al 4%) frío y se dejó en refrigeración por 3 horas. Las muestras se lavaron 3 veces con 1x PBS para eliminar el PFA, el pellet resultante se re-suspendió en una mezcla de etanol al 96% y 1x PBS en proporción 1:1. Las muestras se almacenaron en congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron utilizadas.

Montaje de la muestra ambiental: en láminas de microscopio previamente procesadas con gelatina, se colocaron  $3\mu\text{L}$  de la muestra ya fijada.

Deshidratación: Después de montaje de la muestra ambiental, estas se deshidrataron utilizando tres concentraciones de etanol: 50, 80 96%(v/v), dejando las muestras por tres minutos en cada concentración, consecutivamente. Una vez concluido este proceso, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

Hibridación: Las muestras deshidratadas se hibridaron con sonda universal para eubacterias EUB mix 338, marcada con el Cy3 que tienen fluorescencia de color rojo. A cada muestra se le añadieron  $40\mu\text{L}$  de buffer de hibridación (tabla 5), y se colocaron dentro de tubos Corning de 50 mL que contenían papel secante humedecido con buffer de hibridación, los tubos se introdujeron en la cámara de hibridación VWR (Modelo 5430) por un periodo de 2-3 horas a una temperatura constante de  $46^{\circ}\text{C}$  y en oscuridad.

Lavado de hibridación: finalizando el tiempo en la cámara de hibridación, las láminas fueron sumergidas en el buffer de lavado (Tabla 5) durante 10 minutos, el cual se calentó previamente en baño maría a 48°C. Posteriormente, se detuvo la hibridación agregando a las laminas agua des-ionizada a una temperatura de 4°C; después las laminas se secaron y se guardaron en una caja hermética para almacenarse en refrigeración hasta su posterior análisis. Previo a su observación en el microscopio óptico de Epifluorescencia, se adiciono una gota de protector de protector de fluorescencia Citrifluor AF-1 (Electron Microscopy Sciences, Hattfield, PA).

Nota: Para la muestra inicial (hora cero) fue necesario utilizar papel filtro debido a la poca cantidad de bacterias en el efluente secundario. 40 mL de agua residual real se filtraron utilizando un matraz kitasato, un filtro de porcelana y bomba de vacío. -. Llevando a cabo el procedimiento antes mencionado, se delimito en un radio de ~1 cm para posteriormente realizar la técnica de FISH antes mencionada

#### ***Bacterias Gram positivas (+):***

Fijación de cultivo: para fijar la biomasa bacteriana Gram (+), se centrifugaron 40 mL de la muestra y se retiró el sobrenadante; posteriormente se hicieron 3 lavados sucesivos con 1x PBS (Buffer de fosfato salino) y el pellet celular se re-suspendió en 2 mL etanol al 96% frío y se dejó en refrigeración por 3 horas.

Montaje de la muestra ambiental: se realizó retirando la muestra del congelador y colocando 3µL de muestra en cada lámina, por triplicado.

Deshidratación: Después de montaje, las muestras se deshidrataron utilizando tres concentraciones de etanol: 50, 80 96%(v/v), dejando las muestras por tres minutos en cada solución de etanol, consecutivamente. Una vez concluido este proceso, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Por ser bacterias gram +, es necesario una segunda deshidratación, para lo cual se agregaron a la muestra 40µL de lisozima (10mg/mL), y se incubó por 30 min a 37°C. Subsiguientemente es necesario que

la muestra sea pasada a una segunda deshidratación en las concentraciones de etanol de 50, 80, y 96 % (v/v) por tres minutos cada una. Al final, la muestra se dejó secando por 20-30 minutos.

**Hibridación:** Las muestras deshidratadas se hibridaron con la sonda universal para Eubacteria EUB mix 338, marcada con un fluorocromo. Estas sondas de oligonucleótidos tienen adheridas el fluorcromo Cy3 que tienen fluorescencia de color rojo. La hibridación se hizo siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente para bacterias gram-.

**Tabla IV.** Composición de buffer de lavado y buffer de hibridización.

| % Formamida        | 35%                   |                  | 45%                     |                  |
|--------------------|-----------------------|------------------|-------------------------|------------------|
| Tipo de buffer     | Buffer de hibridación | Buffer de lavado | Buffer de hibridización | Buffer de lavado |
| 5M NaCl            | 360 µL                | 700 µL           | 360 µL                  | 300 µL           |
| 1M Tris/HCl pH 8.0 | 40 µL                 | 1000 µL          | 40 µL                   | 1000 µL          |
| Formamida          | 700 µL                | -----            | 900 µL                  | -----            |
| 0.5 M EDTA pH 8.0  | -----                 | 500 µL           | -----                   | 500 µL           |
| 10% SDS            | 2 µL                  | 50 µL            | 2 µL                    | 50 µL            |
| ddH <sub>2</sub> O | 900 µL                | Completar a 50 n | 700 µL                  | Completar a 50 n |

### Medición de Amonio y Fosfatos

La concentración de iones fosfato fue analizada a partir de 5 mL de muestra tomada de cada unidad experimental, las muestras fueron tomadas a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas con modificaciones respectivas. Se realizó una dilución 1:10 con agua desionizada y la determinación de la concentración se realizó por el método del ácido ascórbico (Murphy y Riley, 1962) adaptado a la microplaca por Hernández-Lopez y Vargas-Albores, 2003. La concentración de iones amonio se realizó a partir de 5 mL de muestra, diluido 1:10 con agua desionizada. Para esta determinación se empleó el método colorimétrico del fenato (Solorzano, 1969) adaptado a microplaca por (Hernández-Lopez y Vargas-Albores, 2003)

### Medición de pH y Temperatura

Para la medición del parámetro del pH y temperatura se utilizó un potenciómetro YSI-63

### Medición de Oxígeno


Para la medición de la concentración de oxígeno mg/L se utilizó Oxímetro YSI-500 A.

### Resumen: Diseño de experimentos

#### Matraces de 250 ml

#### Régimen heterotrófico

#### Volumen 100 mL

| Tratamientos                                               | Medio Residual Sintético (MRS)<br>(1 y 10% de glicerol)                                           |
|------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Alginato de calcio (sin microorganismos)                   | ○ ○ ○                                                                                             |
| <i>Azospirillum brasilense</i> inmovilizada                | ○ ○ ○                                                                                             |
| <i>Chlorella vulgaris</i> inmovilizada                     | ○ ○ ○                                                                                             |
| <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> co-inmovilizadas | ○ ○ ○                                                                                             |
|                                                            | <br>Replicas |

### Matraces de 250 ml

#### Régimen Heterotrófico

#### Volumen 100 mL

Agua Residual Real Estéril (ARRE)

Tratamientos

(1% de glicerol)

Alginato de calcio (sin microorganismos)

○ ○ ○

*Azospirillum brasilense* inmovilizada

○ ○ ○

*Chlorella vulgaris* inmovilizada

○ ○ ○

*C. vulgaris* + *A. brasilense* co-inmovilizadas

○ ○ ○  
} Replicas

Replicas

### Matraces de 250 mL

#### Régimen Heterotrófico

#### Volumen 100 mL

Agua Residual Real (ARR)

Tratamientos

(1% de glicerol)

*Chlorella vulgaris* inmovilizada

○ ○ ○

*Azospirillum brasilense* inmovilizada

○ ○ ○

*C. vulgaris* + *A. brasilense* co-inmovilizadas

○ ○ ○

Alginato de calcio sin microorganismos (control)

○ ○ ○

Agua Residual Real + Glicerol (control)

○ ○ ○

Agua Residual Sin Glicerol (control)

○ ○ ○  
} Replicas

Replicas

**Reactor 1L****Régimen Heterotrófico****Volumen 600 mL**

|                                                            | Agua Residual Real (ARR) |
|------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Tratamientos                                               | (1% de glicerol)         |
| <i>Chlorella vulgaris</i> inmovilizada                     | ○ ○ ○                    |
| <i>Azospirillum brasilense</i> inmovilizada                | ○ ○ ○                    |
| <i>C. vulgaris</i> + <i>A. brasilense</i> co-inmovilizadas | ○ ○ ○                    |
| Alginato de calcio sin microorganismos (control)           | ○ ○ ○                    |
| Agua Residual Real + Glicerol (control)                    | ○ ○ ○                    |
| Agua Residual Real Sin Glicerol (control)                  | ○ ○ ○                    |
|                                                            | ⏟                        |
|                                                            | Replicas                 |

**Reactor 60 L****Régimen Heterotrófico****Volumen 50 L**

|                                           | Agua Residual Real (ARR) |
|-------------------------------------------|--------------------------|
| Tratamientos                              | (1% de glicerol)         |
| Agua Residual Real + Glicerol (control)   | ○ ○ ○                    |
| Agua Residual Real Sin Glicerol (control) | ○ ○ ○                    |
|                                           | ⏟                        |
|                                           | Replicas                 |

### 6.5.2. Análisis Estadístico.

Los resultados fueron analizados por una prueba ANOVA de una vía, seguida de un análisis a posteriori LSD,  $P < 0.05$ ; todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA, versión 6.

## 7. Resultados

### 7.1. Resultados primer objetivo

Todas las Figuras se describen de la siguiente manera: los puntos indican la media muestral. Los bigotes señalan el error estándar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Las diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en la misma hora, basados en 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 6.

#### 7.1.1. Concentración celular de *Chlorella vulgaris* y *A. brasilense* bajo régimen heterotrófico en Medio Residual Sintético adicionando 1% y 10% v/v de glicerol

##### Concentración celular de *Chlorella vulgaris*

En este experimento se mide la concentración celular de *C. vulgaris* en los tratamientos de *C. vulgaris* inmovilizada sola, y *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola (Figura 6a).

A la hora inicial *C. vulgaris* inmovilizada sola en MRS con 1 y 10 % v/v de glicerol presento una población de  $0.73 \times 10^6 \pm 0.16$  Cel/mL y *C. vulgaris* co-inmovilizada al 1%,  $0.875 \times 10^6 \pm 0.025$  Cel/mL, sin mostrar diferencias significativas entre los tratamientos. Por otro lado *C. vulgaris* co-inmovilizada al 10 % de glicerol presento  $0.91 \times 10^6 \pm 0.40$  Cel/mL, siendo diferente a *C. vulgaris* inmovilizada sola al 1 y 10 % v/v de glicerol; sin embargo en

*C. vulgaris* co-inmovilizada al 1% v/v de glicerol no hay diferencias significativas. *C. vulgaris* inmovilizada sola en concentración al 1 % v/v de glicerol a las 72 horas. Presento la mayor concentración celular de  $1.78 \times 10^6 \pm 0.13$  Cel/mL, comprada con los demás tratamientos. Por otro lado en *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado) a concentraciones del 1 y 10 % de glicerol la concentración celular es igual a lo largo del tiempo, sin diferencias significativas, obteniendo la mayor concentración celular a las 120 horas con  $2.51 \times 10^6 \pm 0.18$  Cel/mL. y  $2.45 \times 10^6 \pm 0.02$  Cel/mL respectivamente. *C. vulgaris* inmovilizada sola en MRS con 10 % v/v de glicerol presenta la menor concentración celular, siendo a las 120 horas la menor concentración celular entre las horas del tratamiento y entre los tratamientos con  $0.65 \times 10^6 \pm 0.5$  Cel/mL.

Con este experimento se demuestra que *C. vulgaris* genera una mayor concentración celular cuando esta co-inmovilizada creciendo en MRS con 1 y 10 % v/v, por lo cual hay un efecto de *A. brasilense* sobre la microalga. En *Chlorella vulgaris* inmovilizada sola, el crecimiento celular es mayor cuando el porcentaje de glicerol es al 1 % v/v de glicerol.

### **Concentración celular de *A. brasilense***

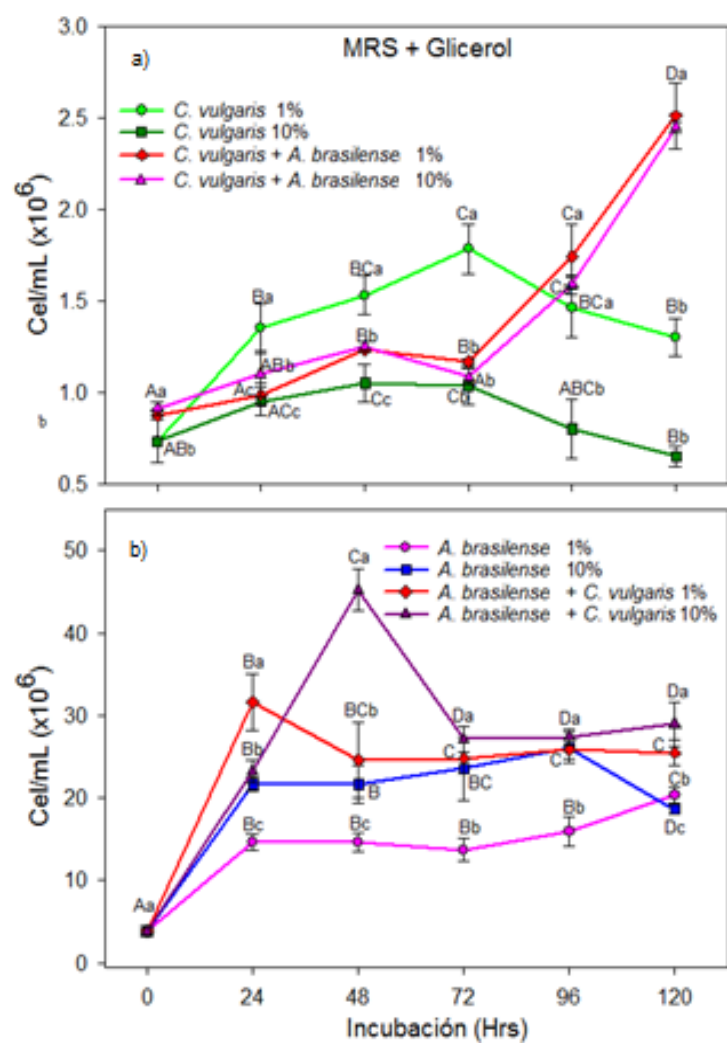
En este experimento se midió la concentración celular de *A. brasilense* en los tratamientos de *A. brasilense* inmovilizada sola, y *C. vulgaris* + *A. brasilienses* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola (Figura 6b).

La concentración celular de *A. brasilense* a la hora inicial (hora cero), fue similar en todos los tratamientos ( $3.81 \times 10^6 \pm 0.36$  Cel/mL). A las 24 horas, el tratamiento *A. brasilense* Co-inmovilizado en MRS con 1 % v/v de glicerol presenta una concentración celular de  $31.61 \times 10^6 \pm 3.49$  Cel/mL, siendo estadísticamente mayor comparada con los demás tratamientos. Por otro lado, a las 48 horas el tratamiento *A. brasilense* co-inmovilizada a concentración del 10 % v/v de glicerol presentó una concentración celular de  $45.2 \times 10^6 \pm 2.57$  Cel/mL siendo mayor comparada con los demás tratamientos. En los tratamientos *A. brasilense* inmovilizada sola y *A. brasilense* co-inmovilizada a concentración de 1 y 10 % v/v a partir de las 72 horas y hasta las 120 horas, el crecimiento se mantiene constante,



presentando a las 120 horas  $25.46 \times 10^6 \pm 1.60$  Cel/mL y  $28.96 \times 10^6 \pm 2.68$  Cel/mL respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre tratamientos.

Los resultados demuestran que hay un efecto positivo en *A. brasilense* cuando esta co-inmovilizada, en MRS con 1 y 10% de glicerol.



**Figura 6. a)** Número células por mililitro de la microalga *C. vulgaris* en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada). **b)** Número de células por mililitro de *A. brasilense* en los tratamientos *A. brasilense* inmovilizada sola, *A. brasilense* + *C. vulgaris* (co-inmovilizado). Medio Residual Sintético (MRS) adicionando 1 y 10 % v/v de glicerol, bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad) durante 120 horas de incubación.

## **Conclusiones del experimento**

Debido que no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento de la microalga *C. vulgaris* co-inmovilizada al 1 y 10 % de glicerol, se seleccionó el 1 % de glicerol para trabajar en los análisis posteriores, por lo que se optimizan mayor recurso de glicerol como fuente de carbono en mayor volumen de trabajo.

### **7.2. Resultados del segundo objetivo: Eliminación de amonio y fosfatos por el sistema microalga-bacteria bajo régimen heterotrófico en diferentes capacidades volumétricas 100ml, 600 ml y 50 L**

A continuación se presentan los resultados obtenidos del segundo objetivo. Para realizarlo, se siguió la estrategia de subdividir los objetivos en cuatro fases, siguiendo el orden de los experimentos en diferentes capacidades volumétricas.

Las Figuras se describen de la siguiente manera: todos los puntos indican la media muestral. Los bigotes señalan el error estandar. Las letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las horas de un tratamiento. Las diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos en la misma hora, basados en 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 6.

#### **7.2.1. Primera fase: Eliminación de amonio y fosfatos en el sistema microalga - bacteria (*C. vulgaris* y *A. brasilense*) en Agua Residual Real Estéril**

En este experimento se midió la eliminación de amonio y fosfatos, concentración celular, pH, y oxígeno disuelto (OD) en cuatro tratamientos: *C. vulgaris* inmovilizada sola, y *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola y como control esferas sin microorganismos, haciendo notar que según los resultados obtenidos en experimentos anteriores, el 1% de glicerol fue seleccionado para seguir con las siguientes capacidades volumétricas.

### **Eliminación de Amonio**

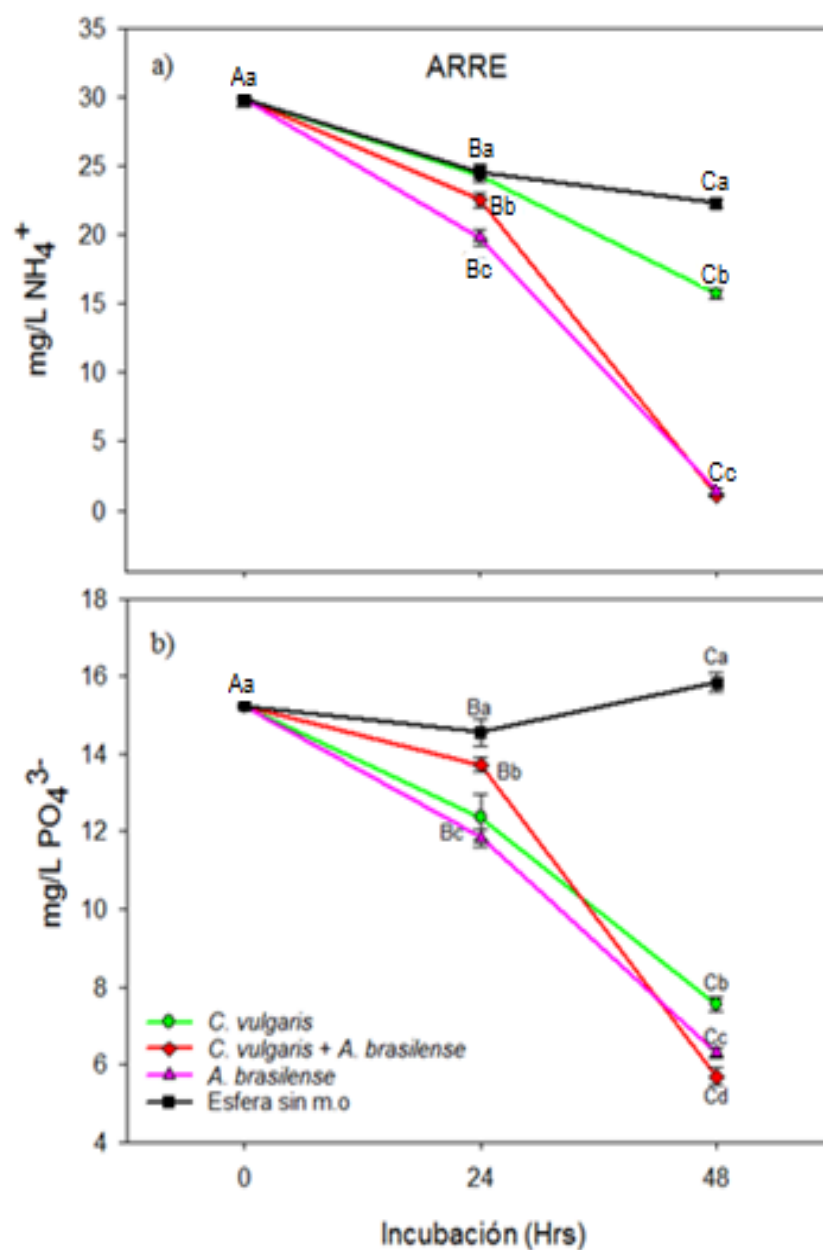
En la Figura (7a) se muestra la tendencia de eliminación de amonio, presentando una concentración inicial  $29.86 \pm 0.55$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ . En los tratamientos de *A. brasilense* inmovilizada sola y *C. vulgaris* (co-inmovilizada) a las 48 horas, se encontró una concentración final de  $1.43 \pm 0.19$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ , y  $1.07 \pm 0.10$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  respectivamente, sin encontrar diferencias estadísticas significativas y representando un porcentaje de eliminación alrededor del 96 % con respecto al valor inicial. Es de notar que en *C. vulgaris* inmovilizada sola la concentración final del amonio fue de  $15.76 \pm 0.34$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  representando el 54 % de eliminación de amonio en el medio.

Con este experimento se demuestra que los tratamiento *C.vulgaris* (co- inmovilizado) y *A. brasilense* inmovilizada son los de mayor eliminación de amonio en 48 horas en agua residual estéril

### **Eliminación de Fosfatos**

En la Figura (7b) se muestra la eliminación de fosfatos. A la hora cero el ARRE presentó una concentración de  $15.28 \pm 0.07$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ . Los tratamientos *C. vulgaris* co-inmovilizada y *A. brasilense* inmovilizada presentan la mayor eliminación a las 48 horas, con una concentración final de  $5.67 \pm 0.21$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  y  $6.29 \pm 0.18$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  respectivamente encontrando diferencias significativas entre los tratamientos. Representando una eliminación del 62 % y el 58.83 % con respecto a la concentración inicial, respectivamente. *C. vulgaris* sola a las 48 horas presento una concentración final de  $7.54 \pm 0.18$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  lo que corresponde a una eliminación del 50.65 %.

Con este experimento se demuestra que los tratamientos co-inmovilizado (*C. vulgaris* + *A. brasilense*) y *A. brasilense* inmovilizada sola, muestran la mayor eliminación en 48 horas en agua residual estéril.



**Figura 7.a)** Concentración de amonio (mg/L) **b)** Concentración de fosfatos (mg/L). En los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y control Esfera sin m.o (microorganismos), en Agua Residual Real Estéril (ARRE) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad) durante 48 horas de incubación.

### **Concentración celular de *Chlorella vulgaris***

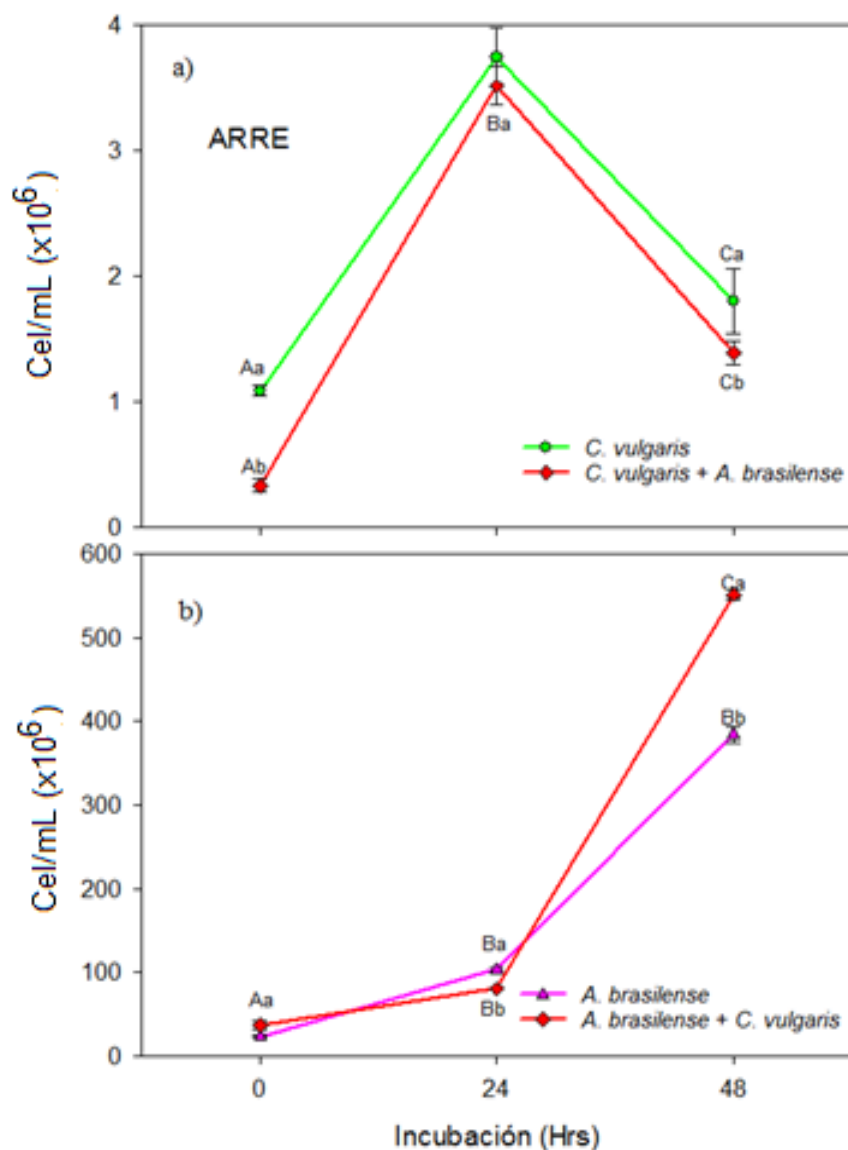
La Figura (8a) muestra la concentración celular de la microalga *C. vulgaris* en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), presentando a la hora inicial (hora cero) una concentración celular de  $1.08 \times 10^6 \pm 0.04$  Cel/mL y  $0.33 \times 10^6 \pm 0.05$  Cel/mL, encontrando diferencias significativas en los tratamientos. Sin embargo, en los dos tratamientos a las 24 horas se observó un crecimiento exponencial, presentando una concentración celular por parte de *C. vulgaris* inmovilizada sola de  $3.74 \times 10^6 \pm 0.69$  Cel/mL y *C. vulgaris* co-inmovilizada de  $3.51 \pm 0.37$  Cel/mL sin diferencias significativas. Por otro lado, a las 48 horas se observa una disminución significativa en los dos tratamientos observando la concentración celular por *C. vulgaris* inmovilizada sola  $1.8 \times 10^6 \pm 0.58$  Cel/mL y *C. vulgaris* s co-inmovilizada de  $1.39 \times 10^6 \pm 0.22$  Cel/mL.

El resultado muestra que a las 24 horas se da la mayor concentración celular de *C. vulgaris* inmovilizada sola en Agua Residual real Estéril

### **Concentración de *Azospirillum brasilense***

La Figura (8b) muestra la concentración celular de *A. brasilense* en los tratamientos *A. brasilense* inmovilizada sola y *A. brasilense* co-inmovilizada, en Agua Residual Real Estéril (ARRE). En el tratamiento de *A. brasilense* co-inmovilizada, a la hora inicial (hora cero) la concentración celular es de  $36.99 \times 10^6 \pm 5.91$  Cel/mL, y *A. brasilense* inmovilizada sola es de  $23.45 \times 10^6 \pm 0.90$  Cel/ mL, sin diferencias significativas entre ellos. En el tratamiento *A. brasilense* inmovilizada sola la concentración celular a las 24 horas es de  $103.53 \times 10^6 \pm 2.03$  Cel/mL, mayor estadísticamente comparada con *A. brasilense* co-inmovilizada, que muestra una concentración de  $80.52 \times 10^6 \pm 1.29$  Cel/mL. A las 48 horas, *A. brasilense* co-inmovilizada presenta una mayor concentración celular de  $551.26 \times 10^6 \pm 5.4$  Cel/mL comparada con *A. brasilense* inmovilizada sola, con concentración celular de  $384.35 \times 10^6 \pm 9.82$  Cel/mL.

Los resultados muestran que *A. brasilense* presenta una concentración celular mayor cuando esta co-inmovilizada a las 48 horas en ARRE.



**Figura 8. a)** Número de células por mililitro de *C. vulgaris* en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado) **b)** Número de células por mililitro de *A. brasilense* en los tratamientos *A. brasilense* inmovilizada sola, *A. brasilense* + *C. vulgaris* (co-inmovilizada). En Agua Residual Real Estéril (ARRE) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

## pH

En la Figura (9a) se muestra el comportamiento del pH en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y como controles Esfera sin microorganismos y Agua Residual Real Esteril sin glicerol (ARRE-Gli).

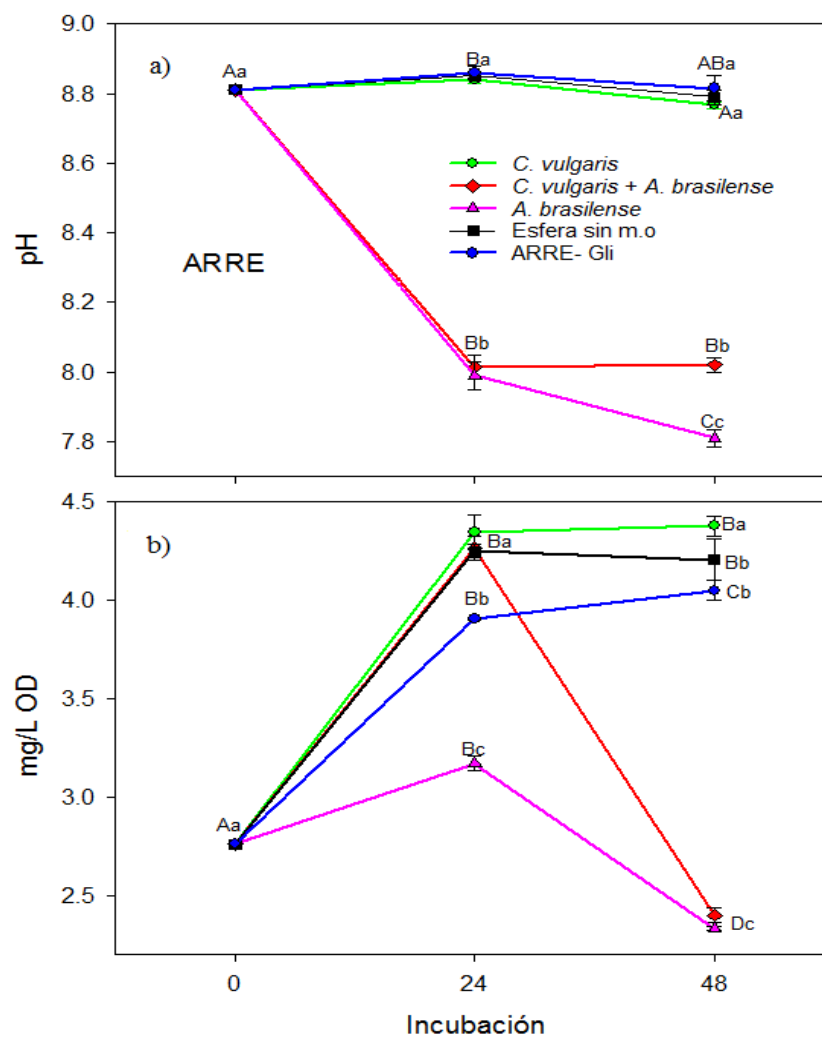
El pH inicial (hora cero) en todos los tratamientos fue de 8.85. En los tratamientos *C. vulgaris* co-inmovilizada y *A. brasilense* inmovilizada sola, se observa una disminución de pH de  $8.01 \pm 0.03$  y  $7.99 \pm 0.04$  respectivamente a las 24 horas, sin diferencias significativa. Sin embargo en *A. brasilense* inmovilizada sola, a las 48 horas, se observa un reducción significativa estadísticamente comprada con los otros tratamientos, presentando un pH de  $7.81 \pm 0.02$ , seguido por *C. vulgaris* co-inmovilizada con pH de  $8.02 \pm 0.02$ . Los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas en pH a las 48 horas.

## Oxígeno disuelto (OD mg/L)

En la Figura (9b) se muestra el comportamiento de oxígeno disuelto en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y dos controles Esfera sin microorganismos y Agua Residual Real Estéril sin glicerol (ARR-Glicerol)

Se observa que la concentración de oxígeno disuelto en todos los tratamientos a la hora inicial (hora cero) es de 2.7 mg/L. En todos los tratamientos, a las 24 horas se observa un aumento significativo en la concentración de OD, presentando mayor concentración en *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* co-inmovilizada y el control de esfera sola, con un valor promedio de  $4.21 \pm 0.01$  mg/L OD sin diferencias significativas. Sin embargo, la concentración de *A. brasilense* inmovilizada sola a las 24 horas fue de  $2.3 \pm 0.01$  mg/L OD. En los tratamiento de *C. vulgaris* co-inmovilizado y *A. brasilense* inmovilizada sola a las 48 horas la concentración de OD disminuyó, sin encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, con un promedio de oxígeno disuelto de  $2.3 \pm 0.04$  mg/L.

Los resultados muestran que el oxígeno disuelto en los tratamientos *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado) y *A. brasilense* inmovilizada presentan una disminución drástica a las 48 horas.



**Figura 9. a)** Comportamiento de pH y **b)** concentración de oxígeno disuelto (mg/L OD) en los tratamientos, *C. vulgaris*, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola y dos controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real Estéril sin glicerol (ARRE - Gli), en Agua Residual Real Estéril (ARRE) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.



## Conclusión del experimento

Los resultados demuestran que *C. vulgaris* co-inmovilizada, y *A. brasilense* solo presentan una mayor eliminación de amonio y fosfatos en 48 horas en ARRE. Se demostró también que el amonio no es convertido a amoniaco y que es consumido por los microorganismos en los tratamientos. Por tal motivo,- los experimentos posteriores se llevaron a cabo en Agua Residual Real (ARR), sin esterilizar

### 7.2.2. Segunda fase: Eliminación de amonio y fosfatos en el sistema microalga-bacteria (*C. vulgaris* y *A. brasilense*) en Agua Residual Real, en volumen de 100 mL

En este experimento se midió la eliminación de amonio y fosfatos, en 6 tratamientos: *C. vulgaris* inmovilizada sola, y *C. vulgaris* + *A. brasilenses* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola y como control esferas sin microorganismos, Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli), Agua Residual Real Sin Glicerol (ARR – Gli).

### Eliminación de Amonio

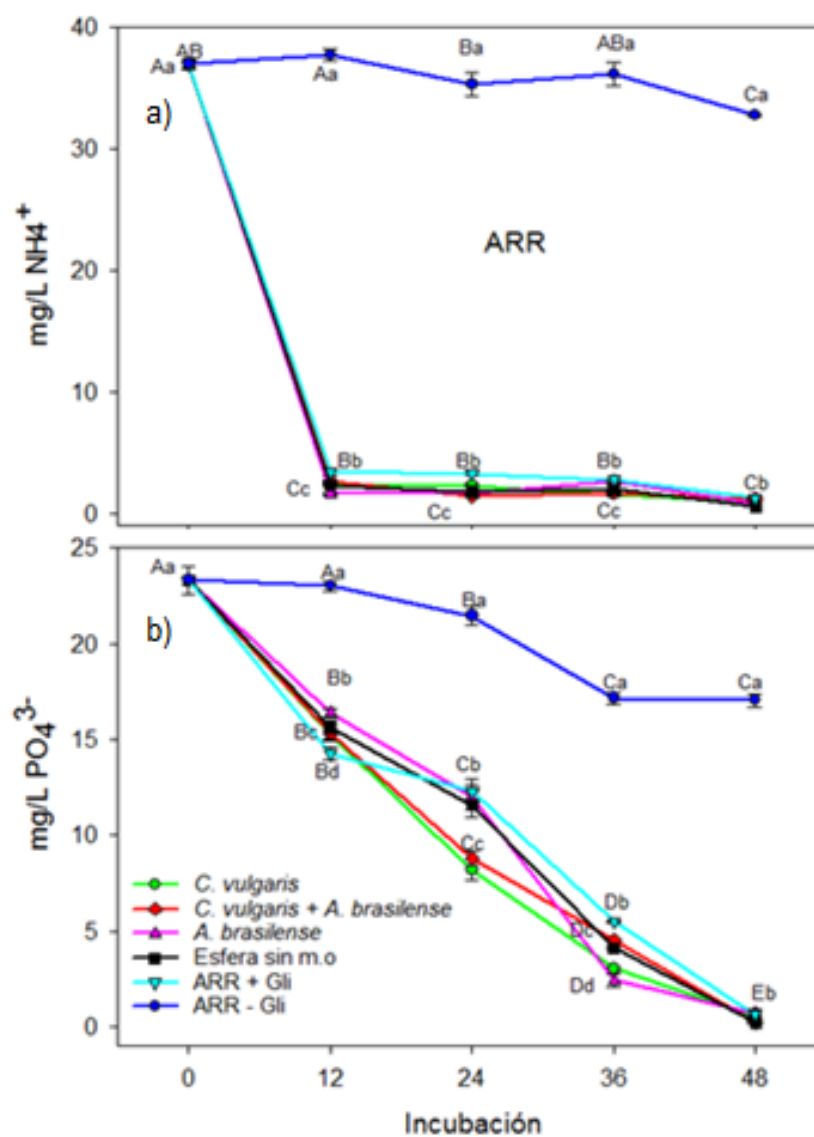
La Figura (10a) muestra la eliminación de amonio. La concentración inicial para todos los tratamientos fue de  $36.96 \pm 0.47$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ . A las 12 horas se observa una eliminación significativa en todos los tratamientos con excepción del tratamiento ARR- Gli. La concentración final en *C. vulgaris* co-inmovilizado fue de  $2.68 \pm 0.12$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  (con un porcentaje de eliminación del 92 %), en *C. vulgaris* inmovilizada sola fue de  $2.4 \pm 0.07$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  y en esfera sin microorganismos fue de  $2.3 \pm 0.04$  (con un porcentaje de eliminación del 93 %), en *A. brasilense* inmovilizada sola fue de  $1.65 \pm 0.03$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  (con un porcentaje de eliminación de 95 %), El ARR + Gli presenta una concentración final a las 12 horas de  $3.04 \pm 0.28$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  con un porcentaje de eliminación del 91% con respecto a la concentración inicial. En el control ARR - Gli, a las 48 horas, la concentración final fue de  $32.78 \pm 0.4$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ , con un porcentaje de eliminación de 11 % con respecto a la concentración inicial.

Los resultados muestran que en todos los tratamientos, con excepción del control, hay una disminución significativa de la concentración de amonio a las 12 horas, notando que al 1% de glicerol es óptimo en la eliminación del amonio del medio.

### **Eliminación de Fosfatos**

En la Figura (10b) se presenta la eliminación de los fosfatos. La concentración inicial (hora cero) fue de  $23.29 \pm 0.72$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$  en todos los tratamientos. En cinco tratamientos: *C. vulgaris*, *C. vulgaris* + con *A. brasilense*, *A. brasilense* inmovilizada sola y los controles Esferas sin microorganismos y ARR + Gli, hay una eliminación consecutiva a lo largo del tiempo, obteniendo la mayor eliminación, a las 48 horas con una concentración final promedio de  $0.47 \pm 0.10$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , representando el 97% de eliminación de fosfatos con respecto a la concentración inicial, sin diferencias significativas entre los tratamientos. En el tratamiento control ARR - Gli a las 48 horas su concentración final de amonio fue de  $17.04 \pm 0.36$  mg/L  $\text{PO}_4^{-3}$ , lo que representa el 25 % de eliminación de fosfatos con respecto a la concentración inicial.

Los resultados muestran que de manera similar al amonio, la eliminación de fosfato se presenta en todos los tratamientos, con excepción de control (ARR-Gli).



**Figura 10.** a) Concentración de amonio (mg/L) y b) Concentración de fosfatos (mg/L) en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR - Gli). En Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

### **Concentración celular de *Chlorella vulgaris***

En la Figura (11a) se observa la concentración celular de *C. vulgaris*, en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado). A la hora inicial (hora cero) la concentración celular es de  $0.54 \times 10^6 \pm 0.01$  Cel/mL y no presenta diferencias significativas entre los dos tratamientos-. *C. vulgaris* inmovilizada sola a las 36 y 48 horas presenta un aumento en la concentración celular significativa de  $1.6 \times 10^6 \pm 0.1$  Cel/mL y  $3.25 \times 10^6 \pm 0.21$  Cel/mL respectivamente. Estos valores son estadísticamente mayores que los de *C. vulgaris* co-inmovilizada, que presentan una concentración a las 36 horas de  $1.25 \pm 0.08$  Cel/mL y a las 48 horas  $2.3 \pm 0.05$  Cel/mL respectivamente.

Los resultados muestran que la microalga *C. vulgaris* inmovilizada sola crece mejor que *C. vulgaris* co-inmovilizada, en el ARR adicionada con glicerilo bajo condiciones heterotróficas

### **Concentración de *A. brasilense* inmovilizada sola y co-inmovilizada**

La Figura (11b) muestra la concentración celular de *A. brasilense* en los tratamientos de *A. brasilense* + *C. vulgaris* (co-inmovilizado) y *A. brasilense* inmovilizada sola.

A la hora inicial (hora cero), la concentración de *A. brasilense* + *C. vulgaris* (co-inmovilizado) es de  $36.99 \times 10^6 \pm 5.91$  Cel/mL. y de *A. brasilense* inmovilizada sola es de  $23.45 \times 10^6 \pm 0.90$  Cel/mL, por lo que estadísticamente es mayor la concentración de *A. brasilense* co-inmovilizada. A las 24 horas *A. brasilense* co-inmovilizado muestra una concentración de  $99.24 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^6$  Cel/mL y a las 48 horas de  $142.77 \times 10^6 \pm 13.59$  Cel/mL, por lo tanto, su concentración celular va en aumento en forma exponencial y estadísticamente la concentración celular es mayor comparada con *A. brasilense* inmovilizada sola. Presentando *A. brasilense* inmovilizada sola a las 24 horas una concentración de  $65.41 \times 10^6 \pm 5.01$  Cel/mL. y a las 48 horas una disminución significativa de  $54.13 \times 10^6 \pm 14.32$  Cel/mL.

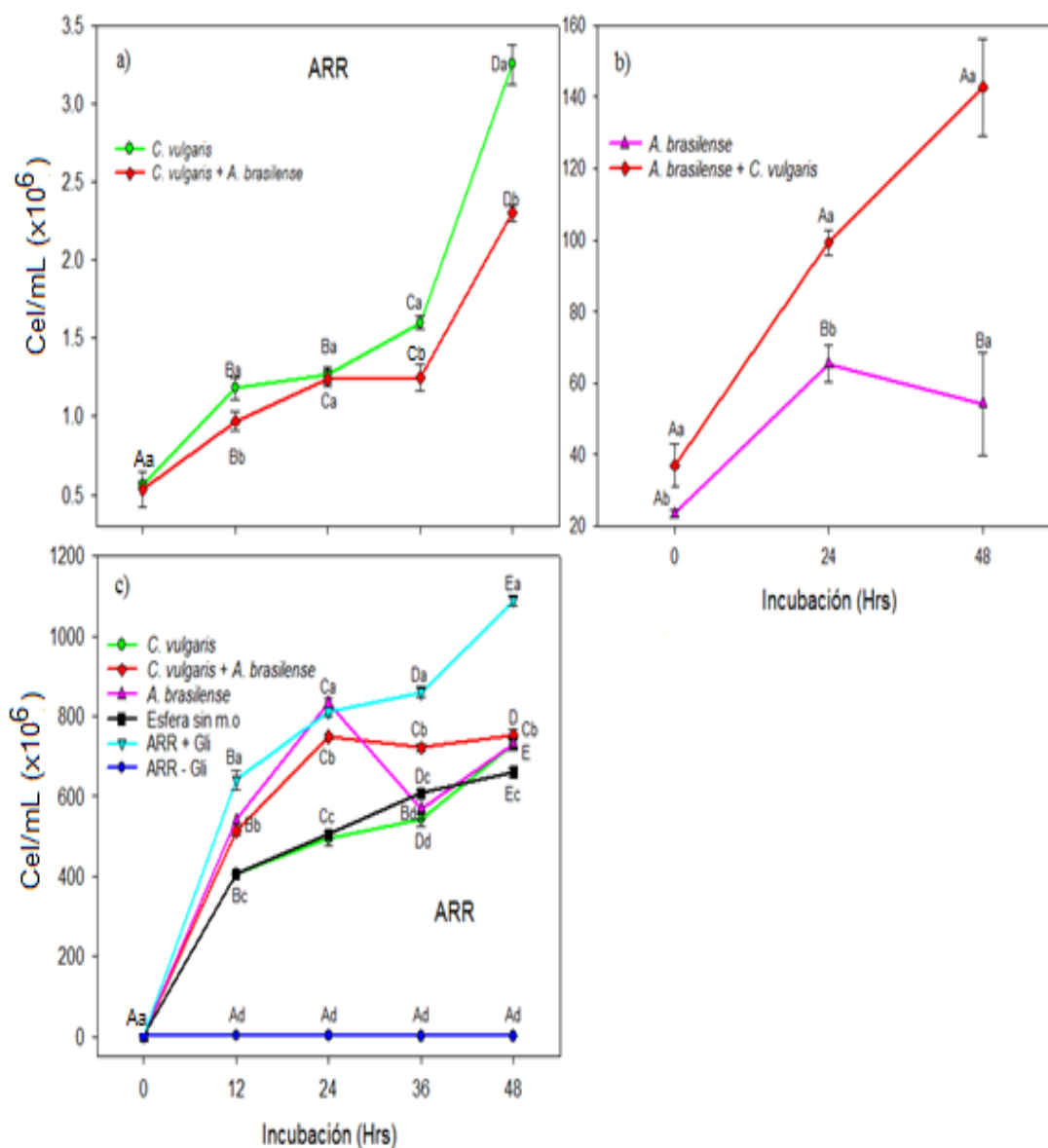
Los resultados muestran que *A. brasilense* presenta mayor crecimiento cuando se encuentra co-inmovilizada con la microalga *C. vulgaris* por lo que microalga pudiera estar beneficiando a la bacteria en las condiciones presentes.

### **Concentración de bacterias totales nativas presentes en el medio**

La Figura (11c) muestra los conteos celulares de bacterianas nativas a lo largo del tiempo en los seis tratamientos: *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola, en tres controles Esfera sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + glicerol (ARR+G) y Agua Residual sin glicerol (ARR-G).

Todos los tratamientos mostraron una concentración bacteriana total nativa a la hora inicial (hora cero) de  $0.66 \times 10^6 \pm 0.05$  Cel/mL. En todos los tratamientos, con excepción del control ARR- Gli, a las 12 horas hay un crecimiento bacteriano exponencial. El tratamiento ARR + Gli a las 12 y 48 horas, presenta la mayor concentración bacteriana totales nativa de  $640.58 \times 10^6 \pm 23.87$  Cel/mL y  $1088.09 \times 10^6 \pm 13.26$  Cel/mL respectivamente, comparada con los demás tratamientos. Es de notar que en el tratamiento control de ARR – Gli, el crecimiento bacteriano se mantiene constante representando a las 48 hrs.  $0.64 \times 10^6 \pm 0.03$  Cel/mL. Sin diferencias significativas en la concentración celular.

Los resultados muestran que todos los tratamientos, con excepción del tratamiento control (ARR - Gli), presentan una concentración bacteriana endógena que aumenta a lo largo del tiempo.



**Figura 11.** a) Número de células por mililitro de *C. vulgaris*. b) Número de células por mililitro de *A. brasilense*. c) Número de células por mililitro de Bacterias totales nativas. En los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR - Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

### **pH en Agua Residual Real**

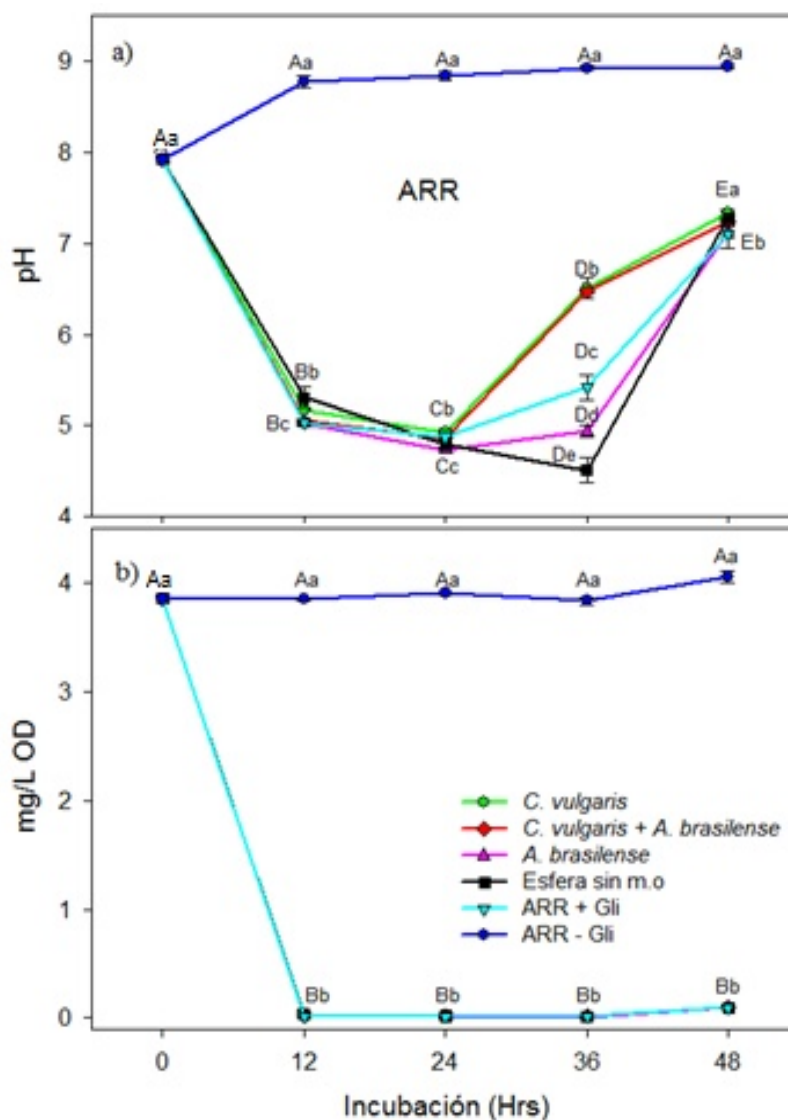
La Figura (12a) muestra el comportamiento del pH en los seis tratamientos, presentando un pH inicial de 7.92. En todos los tratamientos, con excepción del control ARR- Gli, a las 12 horas hay una disminución significativa de pH: En *C. vulgaris* inmovilizada sola de  $5.17 \pm 0.01$ , *C. vulgaris* co-inmovilizada de  $5.05 \pm 0.20$ , *A. brasilense* inmovilizada sola de  $5.03 \pm 0.02$ , Esfera sin microorganismos de  $5.31 \pm 0.11$  y ARR + Gli de  $5.03 \pm 0.02$ . Esta disminución continuo hasta las 24 horas, alcanzando un valor de  $\sim 4.83 \pm 0.33$  en todos los tratamientos. Por otro lado, a las 48 horas hay un aumento de pH en todos los tratamientos ( $\sim$  de  $7.26 \pm 8.48$ ), sin diferencias significativas entre los tratamientos. Es de notar que el pH en el tratamiento control ARR-Gli, aumenta a  $8.77 \pm 0.06$  a las 12 horas y se mantiene constante sin diferencias significativas a lo largo del tiempo.

Los resultados muestran -que el pH no influye en la volatilización del amonio como amoniaco y que este es consumido por los microorganismos presentes en el medio..

### **Oxígeno disuelto (OD mg/L)**

La Figura (12b) muestra el comportamiento en la concentración de oxígeno (OD), en los seis tratamientos. A la hora inicial (hora cero) todos los tratamientos presentan una concentración de OD de 3.85 mg/L. A las 12 horas, se observa en todos los tratamientos, con excepción del control ARR – Gli, el oxígeno disuelto presentando una disminución en la concentración OD con promedio de 0.02 mg/L, sin diferencias significativas a lo largo del tiempo.

Los resultados muestran coinciden con los resultados anteriores, donde a esa misma hora se presenta una mayor eliminación de amonio y de fosfatos significativa, con un crecimiento celular exponencial de las bacterias nativas, por lo que se requiere el oxígeno para la oxidación de la materia orgánica (glicerol) y parte de esta materia orgánica es sintetizada por nuevos microorganismos, por lo cual consumen todo el oxígeno disuelto presente en el medio.



**Figura 12.** a) Comportamiento de pH y b) Concentración de oxígeno (OD mg/L). En los tratamientos, *C. vulgaris*, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real+ glicerol (ARR+ Gli) y Agua Residual sin glicerol (ARR – Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.



## Conclusión del experimento

Observando los resultados no se encontraron diferencias significativas en eliminación de amonio y fosfatos, cuando está presente el sistema microalga-bacteria con el control ARR + Gli, por lo que los microorganismos nativos (bacterias) tienen habilidad de usar el glicerol como fuente de carbono eliminado el amonio y fosfatos del medio.

### 7.2.3. Tercera fase: Eliminación de amonio y fosfatos en el sistema microalga-bacteria (*C. vulgaris* y *A. brasilense*) en Agua Residual Real en volumen de 600 ml con 1% de glicerol

En este experimento se midió el comportamiento de eliminación de amonio y fosfatos en 6 tratamientos: *C. vulgaris* inmovilizada sola, y *C. vulgairs* + *A. brasilenses* (co-inmovilizado), *A. brasilense* inmovilizada sola y tres controles esferas sin microorganismos, Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli), Agua Residual Real Sin Glicerol (ARR – Gli).

### Eliminación de Amonio

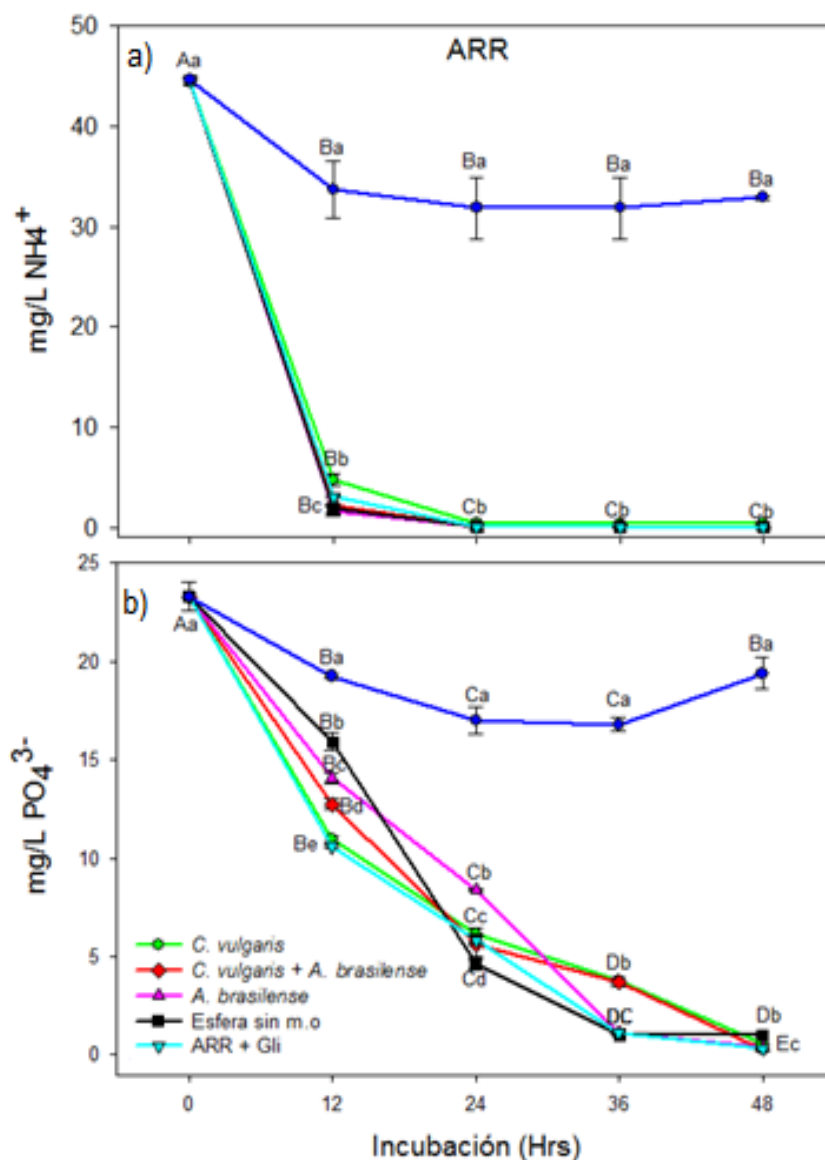
La Figura (13a) muestra la eliminación de amonio en agua residual real. La concentración inicial en todos los tratamientos es de  $44.57 \pm 0.33$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ . En todos los tratamientos, con excepción del control ARR – Gli, se observa la mayor eliminación de amonio a las 12 horas, presentando concentración final en *A. brasilense* inmovilizada sola de  $1.57 \pm 0.51$  mg/L que representa el 96 % de eliminación con respecto al valor inicial, seguido por *C. vulgaris* co-inmovilizada de  $2.16 \pm 0.16$  con el 95 % de eliminación, Esfera sin microorganismos con  $1.89 \pm 0.43$  mg/L con el 95 % de eliminación, ARR + Gli con  $3.06 \pm 0.10$  mg/L con 93 % de eliminación y *C. vulgaris* inmovilizada sola  $4.72 \pm 0.65$  mg/L con el 89 % de eliminación con respecto al valor inicial. Por otro lado a las 24 horas los mismos tratamientos, con excepción del control ARR-Gli, presentan una concentración promedio final de  $0.09 \pm 0.05$  mg/L lo cual representa una eliminación del 99 % con respecto al valor inicial. En el tratamiento ARR-Gli, la concentración final de amonio fue de  $32.92 \pm 0.22$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ , lo cual representa un porcentaje de eliminación del 26 % con respecto a la concentración inicial.

Los resultados muestran que en todos los experimentos, con excepción del control (ARR – Gli), hay una disminución importante en la concentración de amonio a las 12 horas.

### **Fosfatos en Agua Residual Real 600 mL**

En la Figura (13b) se muestra la eliminación de fosfatos presentes en el Agua Residual Real (ARR). La concentración al inicio (hora inicial) fue de  $23.29 \pm 0.72$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  en todos los tratamientos. Todos los tratamientos, con excepción del control ARR- Gli, presentan una eliminación progresiva a lo largo del tiempo, haciendo notar que a las 48 horas presentan la mayor eliminación, con una concentración final de *A. brasilense* inmovilizada sola de  $0.39 \pm 0.08$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  *C. vulgaris* Co-inmovilizada de  $0.29 \pm 0.02$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  ARR + Gli de  $0.31 \pm 0.05$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ , valores que representan ~98 % de eliminación con respecto al valor inicial. *C. vulgaris* inmovilizada sola presento una concentración final de  $0.58 \pm 0.04$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ , siendo el 97 % de eliminación y Esfera sin microorganismo la concentración final de  $1.00 \pm 0.05$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ , que representa el 95 % con respecto al valor inicial. Por otro lado, en el tratamiento ARR-Gli la concentración final a las 48 horas es de  $19.40 \pm 0.79$  que constituye el 16.70 % de eliminación con respecto al valor inicial.

Los resultados muestran un patrón similar a los obtenidos en volúmenes de 100 mL.



**Figura 13 a)** Concentración de Amonio (mg/L) **b)** Concentración de Amonio (mg/L). En los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real+ Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli). En Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

### **Concentración celular de *Chlorella vulgaris***

La Figura (14a) muestra la concentración celular de la microalga *C. vulgaris* en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola y *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada).

La concentración celular inicial de *C. vulgaris* inmovilizada sola fue de  $0.56 \times 10^6 \pm 0.01$  Cel/mL. y *C. vulgaris* co-inmovilizada de  $0.53 \times 10^6 \pm 0.11$  Cel/mL, sin diferencias significativas entre los tratamientos. A las 12 y 24 horas de incubación no se encuentran diferencias significativas entre los tratamientos *C. vulgaris* sola y *C. vulgaris* co-inmovilizada, mostrando a las 24 horas la concentración celular de  $1.17 \times 10^6 \pm 0.05$  Cel/mL y  $1.22 \times 10^6 \pm 0.65$  Cel/mL respectivamente. Por otro lado el crecimiento de *C. vulgaris* co-inmovilizada es de  $1.62 \times 10^6 \pm 0.06$  Cel/mL, estadísticamente mayor al obtenido en *C. vulgaris* inmovilizada sola, que es de  $1.51 \times 10^6 \pm 0.02$  Cel/mL. Sin embargo, a las 48 horas *C. vulgaris* inmovilizada sola presento una concentración celular mayor, con  $1.76 \times 10^6 \pm 0.12$  Cel/mL comparada con *C. vulgaris* co-inmovilizada, que disminuye significativamente su concentración celular a  $1.2 \times 10^6 \pm 0.05$  Cel/mL.

Los resultados muestran que, de manera similar a lo obtenido en volumen de 10 mL, el crecimiento de *C. vulgaris* es mayor cuando se encuentra inmovilizada sola.

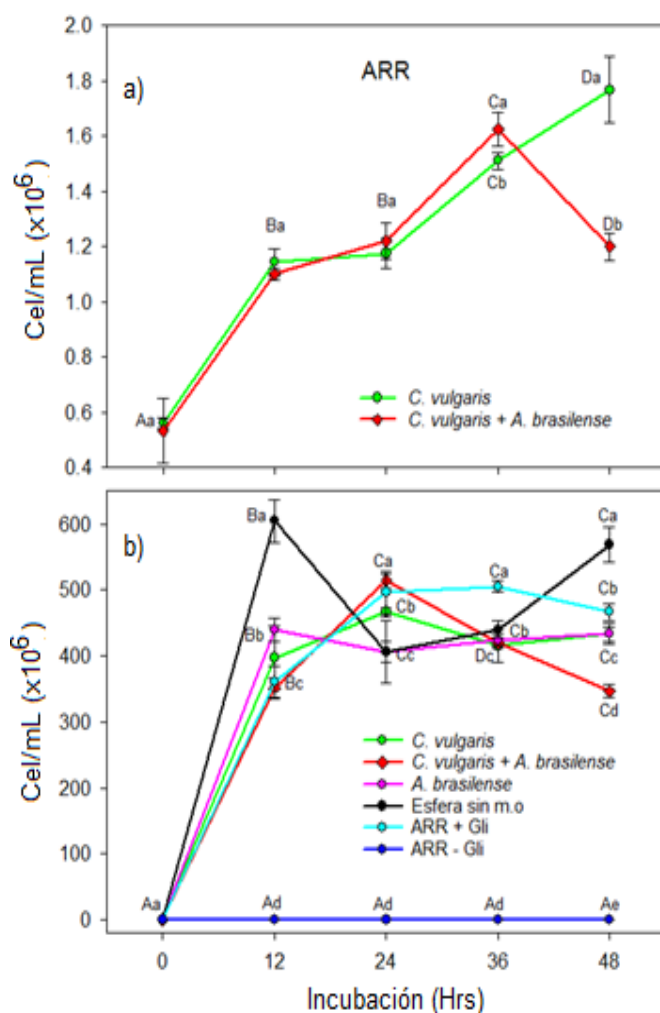
### **Concentración celular de Bacterias Totales nativas presentes en el ARR**

La Figura (14b) muestra el crecimiento de las Bacterias totales nativas presentes en el Agua Residual Real (ARR) en los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola, y como controles Esfera sin microorganismos, Agua residual real + glicerol (ARR + Gli), Agua residual real sin glicerol (ARR – Gli).

La concentración inicial bacteriana total inicial para todos los tratamientos fue de  $0.79 \pm 0.02$  Cel/mL. A las 12 horas la concentración celular muestra un crecimiento exponencial en todos los tratamientos, con excepción del control ARR – Gli. El tratamiento Esferas sin

microorganismos muestra la mayor concentración celular de  $604.49 \times 10^6 \pm 56.34$  Cel/mL, comparado con los demás tratamientos. La concentración celular a las 24 hrs y 48 hrs se mantiene en fase estacionaria, en todos los tratamientos, siendo el tratamiento esferas sin microorganismos el que presenta mayor crecimiento a las 48 horas de  $568.40 \times 10^6 \pm 46.88$  Cel/mL, con respecto a los demás tratamientos. En el tratamiento control ARR – Gli, la población bacteriana no crece, manteniendo una población constante, de  $0.38 \times 10^6 \pm 0.07$  Cel/mL.

Los resultados muestran que en todos los tratamientos, con excepción del tratamiento control (ARR - Gli), las bacterias totales endógenas crecen de manera exponencial a las primeras 12 horas.



## **pH**

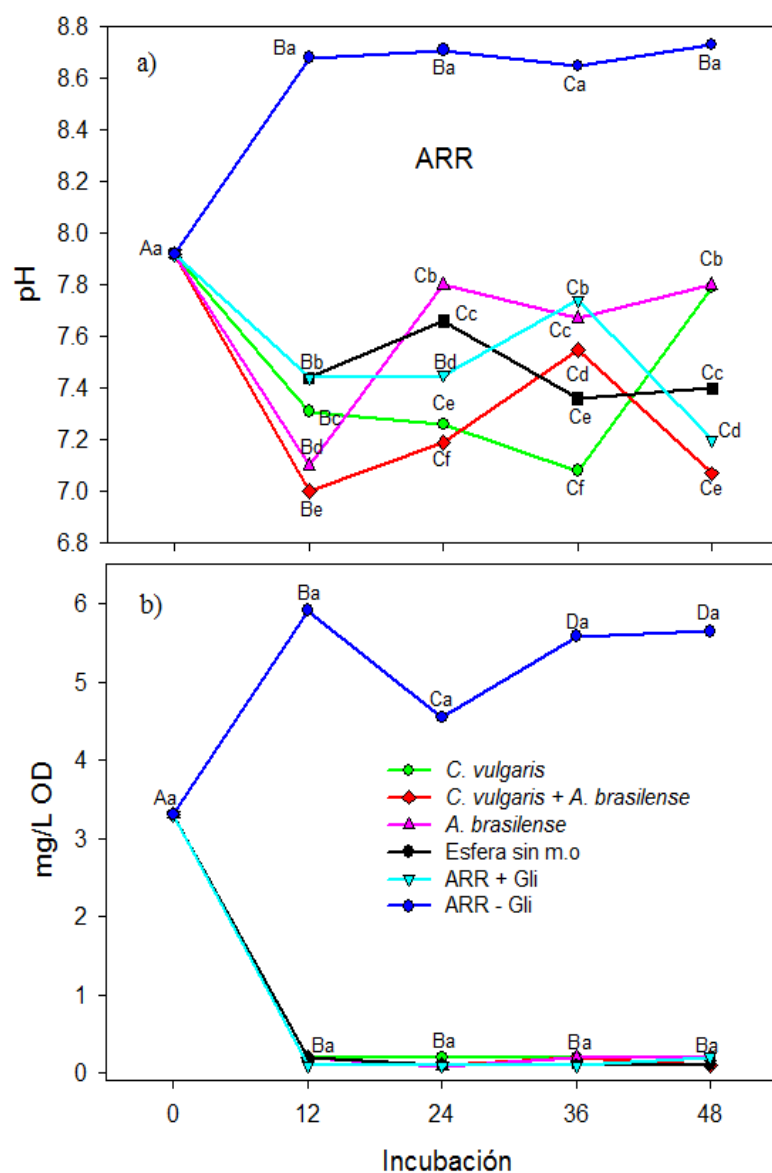
La Figura (15a) muestra el comportamiento del pH. En todos los tratamientos el pH inicial es de 7.92. A las 12 horas hay una disminución de este valor, en todos los tratamientos, con excepción de del control ARR – Glicerol. El registro más alto en el tratamiento Esferas sin microorganismos con pH 7.44 y el tratamiento *C. vulgaris* + *A. brasilense* (coinmovilizado) el más bajo con pH de 7.01. Sin embargo, en el tratamiento control ARR - Gli se observa un aumento de pH hasta 8.68, valor que se mantiene durante todo el experimento. Por otro lado el tratamiento *C. vulgaris* inmovilizada sola y *A. brasilense* inmovilizada sola, representan un pH de 7.8 y *C. vulgaris* co-inmovilizada muestra un pH de 7.0. Es de notar que el pH se mantiene neutral a lo largo del tiempo en los cinco tratamientos con excepción del tratamiento agua residual sin glicerol.

Los resultados muestran que el pH no influye en la volatilización del amonio como amoniaco y que este es consumido por los microorganismos presentes en el medio.

## **Oxígeno disuelto (OD mg/L)**

La Figura (15b) muestra el comportamiento del oxígeno disuelto (OD mg/L). Al inicio del experimento (hora cero) la concentración de oxígeno disuelto es de 3.3 mg/L para todos los tratamientos. En todos los tratamientos, con excepción del control ARR - Gli, a las 12 hora se presenta una disminución en la concentración de OD, sin diferencias significativas entre los tratamientos con  $0.18 \pm 0.04$  mg/L, a lo largo del tiempo. Por otro lado, en el tratamiento control ARR - Gli a las 12 horas se observa un aumento en la concentración de OD de 5.9 mg/L y a las 48 hrs se registra una concentración de oxígeno de 5.64 mg/L.

Los resultados muestran una disminución de OD, en todos los tratamientos a las 12 horas, con excepción del control (Agua Residual sin Glicerol).



**Figura 15. a)** Comportamiento de pH **b)** Concentración de Oxígeno Disuelto (OD mg/L). En los tratamientos *C. vulgaris* inmovilizada sola, *C. vulgaris* + *A. brasilense* (co-inmovilizada), *A. brasilense* inmovilizada sola y tres controles Esferas sin m.o (microorganismos), Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y Agua Residual Real sin glicerol (ARR - Gli), en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

## **Conclusiones del experimento**

Los resultados obtenidos en volumen de 600 mL son similares a los obtenidos en volumen de 100 mL, con la máxima eliminación de amonio a las 24 horas y los fosfatos a las 48 horas. Teniendo en cuenta que el tratamiento control ARR + Gli no muestra diferencias con los tratamientos del sistema microalga-bacteria, los experimentos en volumen de 50 L se realizó solo adicionando glicerol al ARR, esperando aumentar las comunidades bacterianas nativa presentes en el agua residual.

### **7.2.4. Cuarta fase: Eliminación de amonio y fosfatos por microorganismos nativos del Agua residual real en volumen de 50 L. al 1% de glicerol**

En este experimento se mide el comportamiento de eliminación de amonio y fosfatos, por los microorganismos nativos del agua residual real al 1% de glicerol v/v en 50 L, en dos tratamientos Agua Residual Real + Glicerol (ARR+ Gli), y el control Agua residual sin glicerol (ARR – Gli),

#### **Eliminación de amonio**

La Figura (16a) muestra el comportamiento de eliminación de amonio, observando una concentración inicial (hora cero) de  $35.42 \pm 0.54$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ . A las 12 horas, el tratamiento ARR + Gli presenta una disminución de amonio, con una concentración de  $19.55 \pm 0.83$  mg/L  $\text{NH}_4^+$  correspondiendo al 55 % de eliminación con respecto a la concentración inicial. Así mismo, a las 24 hrs se observa una disminución del 90 % con respecto al valor inicial, presentando una concentración final de  $3.32 \pm 0.31$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ . En el control Agua residual sin glicerol, la concentración final de amonio fue de  $31.53 \pm 0.61$  mg/L  $\text{NH}_4^+$ , que representa el 11% de eliminación con respecto al valor inicial.

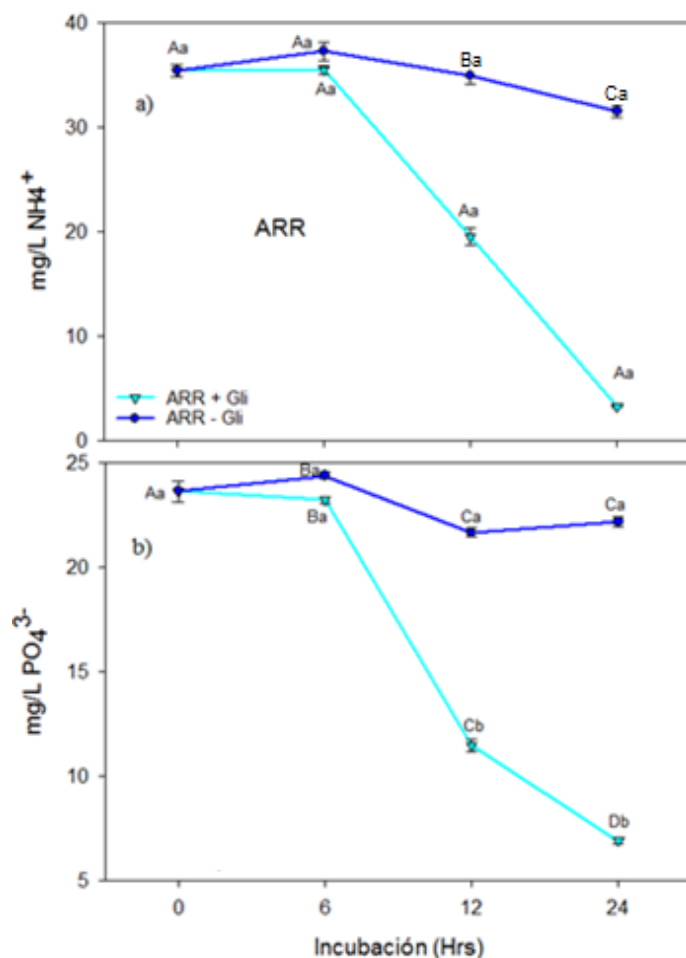
Los resultados muestran la eficiencia de las bacterias nativas presentes en el agua residual para reducir las concentraciones de amonio.



### Eliminación de fosfatos

La Figura (16b) muestra el comportamiento de eliminación de fosfatos, observando un concentración inicial (hora cero) de  $23.63 \pm 0.48$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ . A las 12 horas, el tratamiento ARR + Gli presenta una disminución significativa de fosfatos, con una concentración de  $11,48 \pm 0.31$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$ , eliminando el 49% de fosfatos en el medio. Así mismo, a las 24 horas la concentración final es  $6.92 \pm 0.38$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  eliminado el 70 % de fosfatos con respecto al valor inicial. El tratamiento control a las 48 horas presento una concentración final  $22.20 \pm 0.23$  mg/L  $\text{PO}_4^{3-}$  el porcentaje de eliminación es el 6 % con respecto al valor inicial.

Los resultados muestran la eliminación de fosfatos por las bacterias nativas presentes en el agua residual, lo cual, se puede observar una rendimiento de eliminación con solo el 1 % v/v de glicerol, presentando a las 24 horas una mayor eliminación con respecto a la concentración inicial.



**Figura 16.** a) Concentración de Amonio (mg/L) b) Concentración de Fosfatos (mg/L) En los tratamientos Agua Residual Real + Glicerol (ARR +Gli) y control Agua Residual Real sin glicerol (ARR – Gli) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 24 horas de incubación.

### **Concentración de Bacterias totales nativas**

La Figura (17a) muestra la concentración celular de las bacterias nativas totales presentes en los tratamientos, observando al inicio una concentración inicial de  $0.52 \times 10^6 \pm 0.03$  Cel/mL. A las 6 horas, el tratamiento ARR + Gli presenta un aumento en la concentración celular de  $1.98 \times 10^6 \pm 0.13$  Cel/mL, siendo significativamente mayor al control ARR – Gli con  $0.59 \times 10^6 \pm 0.41$  Cel/mL. A las 12 y 24 horas, en el tratamiento ARR + Gli se observa un crecimiento exponencial donde se presenta una concentración celular bacteriana de  $10.55 \times 10^6 \pm 1.32$  y  $17.59 \times 10^6 \pm 1.4$  Cel/mL, respectivamente. En el tratamiento control ARR- Gli, el crecimiento se mantiene a lo largo del tiempo, resultando a las 24 hrs. en una concentración de  $0.61 \pm 0.07$  Cel/mL.

Los resultados muestran que las bacterias nativas presentes en el agua residual, responden positivamente a la adición de 1% de glicerol.

### **Oxígeno disuelto**

La Figura (17b) muestra el comportamiento del oxígeno disuelto (OD), observando que la concentración de OD inicial es de  $7.09 \pm 0.40$  mg/L. A las 12 horas, el tratamiento ARR + Gli presenta una disminución significativa en la concentración de OD de  $0.05 \pm 0.01$  mg/L comparada con el control ARR – Gli de  $8.18 \pm 0.29$  mg/L. Así mismo, en el tratamiento ARR + Gli el OD se mantiene sin diferencias significativas a las 24 horas notando que el control ARR - Gli el OD aumenta significativa a las 6 horas con respecto a la concentración inicial con concentración de  $8.15 \pm 0.29$  mg/L. y el OD se mantiene sin diferencias significativas a lo largo del tiempo.

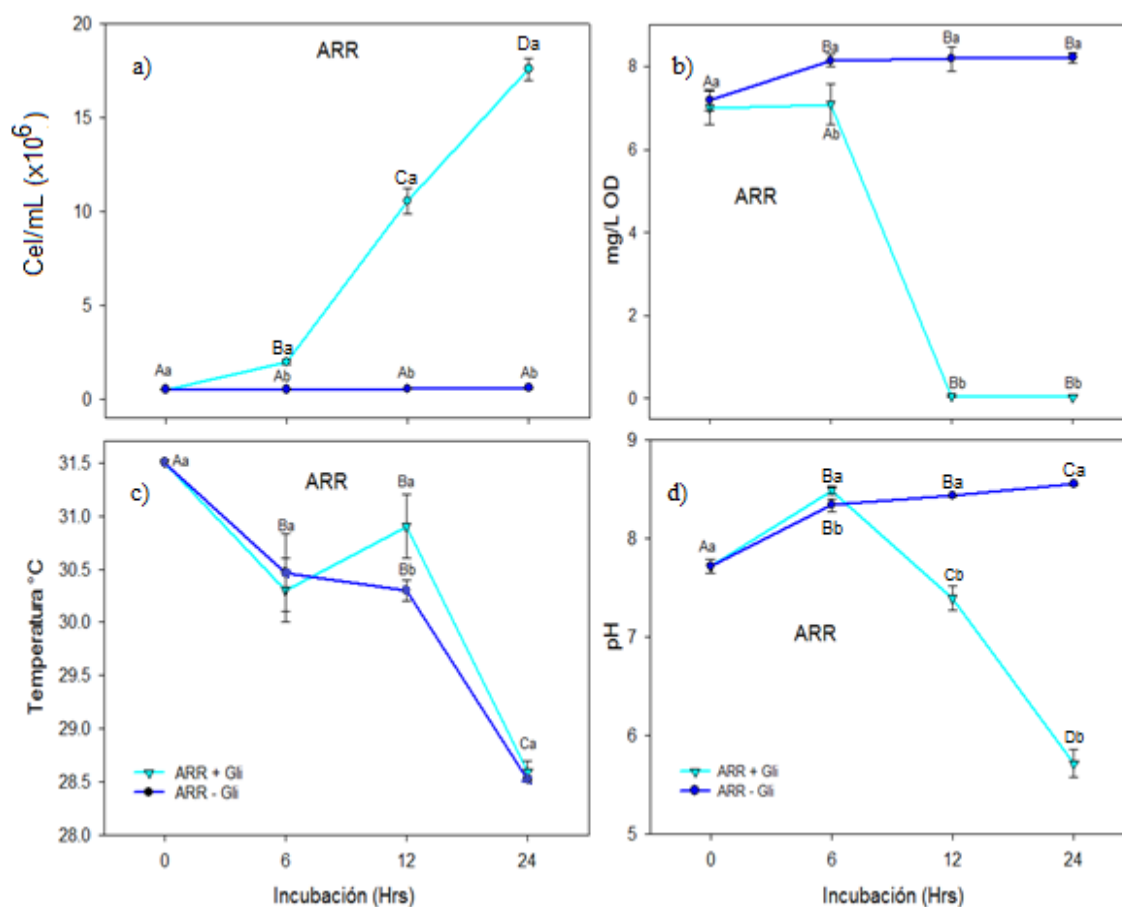
Los resultados muestran que en el tratamiento ARR + Gli, a las 12 horas, una disminución del OD, por lo que los microorganismos presentes están utilizando el oxígeno para la oxidación de la materia orgánica por lo cual la demanda de oxígeno es mayor. Este comportamiento es similar a volumen de 100 mL y 600 mL.

### **Temperatura**

En la Figura (17c) se muestra el comportamiento de la temperatura, observando que la temperatura inicial en los tratamientos es de 31.5 °C. A las 6 horas, tanto el tratamiento ARR + Gli como el control ARR - Gli presentan una disminución significativa con respecto a la temperatura inicial de  $30.3 \pm 0.3$  °C y  $30.46 \pm 0.36$  °C respectivamente, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Así mismo, a las 24 horas los tratamientos muestran una disminución de la temperatura de  $28.60 \pm 0.1$  y  $28.52 \pm 0.02$  respectivamente, notando que no hay diferencias significativas entre los tratamientos.

### **pH**

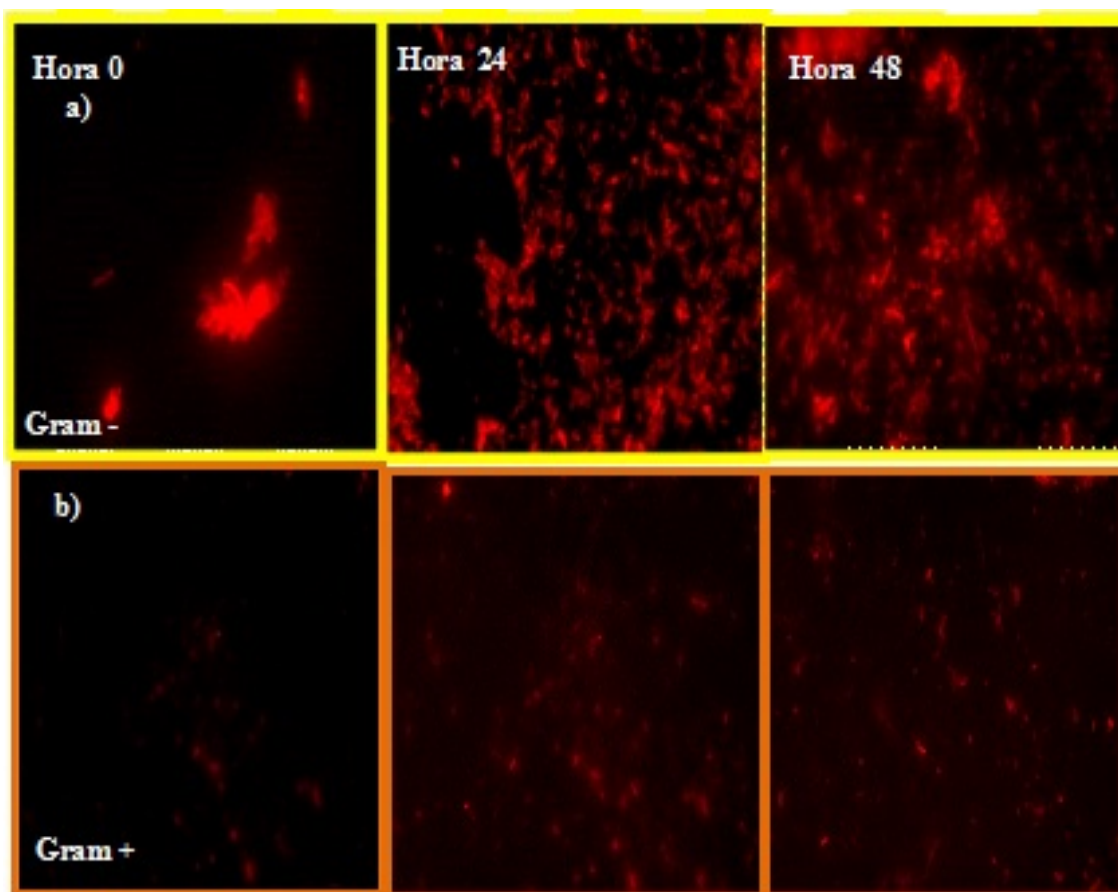
La Figura (17d) muestra el comportamiento de pH, observando una concentración inicial de pH de  $7.72 \pm 0.75$ . A las 12 horas, tanto el tratamiento ARR + Gli como el control ARR - Gli presentan un aumento en el pH de  $8.49 \pm 0.06$  y  $8.34 \pm 0.11$ ., respectivamente, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, en el tratamiento ARR + Glicerol se observa una disminución significativamente a las 12 y 24 hrs. con pH de  $7.39 \pm 0.12$  y  $5.71 \pm 0.14$  respectivamente. Notando que el control ARR - Gli el pH se mantiene resultando a las 24 hrs un pH de  $8.55 \pm 0.01$ .



**Figura 17.** a) Número de células por mililitro de Bacterias totales nativas b) Concentración de Oxígeno Disuelto (OD mg/L), c) Temperatura (°C) d) Comportamiento del pH. En los tratamientos: Agua Residual Real + Glicerol (ARR + Gli) y control Agua Residual Real sin glicerol (ARR - Gli), bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

### 7.2.5. Visualización de las poblaciones bacterianas (bacterias Gram Negativas y Positivas) empleando la Técnica de Hibridación fluorescente in situ (FISH)

Se evaluó cualitativamente el aumento en las poblaciones de bacterias nativas del agua residual, a diferentes tiempos (0, 24 y 48 horas) de incubación. Como se ve en la Figura (18 a,b) hay un aumento paulatino de las poblaciones de bacterias, tanto de Gram negativas como de Gram positivas, a las 24 y 48 horas de incubación, en el tratamiento ARR + Gli, en comparación con el control sin glicerol, donde no se pudieron observar las poblaciones bacterianas.



**Figura 18.** Micrografías de bacterias nativas presentes en el agua residual **a)** bacterias Gram negativas (-) y **b)** bacterias Gram positivas (+). Usando sonda universal para Eubacteria en Agua Residual Real (ARR) bajo régimen heterotrófico (completa oscuridad), durante 48 horas de incubación.

## 8. Discusión

El tratamiento de aguas residuales, es un área que en los últimos 50 años ha tenido un amplio desarrollo en varios países. Los trabajos se han enfocado principalmente al estudio de sistemas biológicos (bacterias, microalgas y cianobacterias) (Lincoln y Earle, 1990). Sin embargo, se han buscado alternativas innovadoras que apoyen en el proceso de sistemas biológicos, haciendo énfasis en la falta de carbono disponible para completar el proceso de remoción de nutrientes como amonio y fosfatos en PTAR, representando biotecnológicamente una alternativa ambiental. En aguas residuales urbanas, así como también en las aguas industriales (Fernández-Laba *et al.*, 2012).

Estudios innovadores como el sistema microalga-bacteria bajo régimen heterotrófico ofrece una alternativa biotecnología para el uso en tratamiento de aguas residuales, por consiguiente reportes señalan que el sistema beneficia la eliminación de amonio y fosfatos empleando fuentes de carbono externa especialmente con acetato y glucosa (Perez-García *et al.*, 2010).

Los estudios en sistemas heterotróficos que se han realizado hasta al momento son generalmente en medio residual sintético o agua residual real estéril en bajos volúmenes. Sin embargo, es importante conocer el comportamiento operacional a capacidades mayores y empleando agua residual real en la eliminación conjunta de fosfatos y amonio.

El presente estudio demuestra el uso de glicerol como una fuente de carbono externo de mayor disponibilidad y de menor costo, para ser empleada en el sistema microalga-bacteria bajo régimen heterotrófico, en la eliminación de amonio y fosfatos para procesos de tratamiento de aguas residuales. Es importante mencionar que los parámetros de pH, temperatura y oxígeno fueron monitoreados, mas no controlados.

Como parte de la estandarización del proceso de tratamiento de agua residual para el óptimo crecimiento de *C. vulgaris* para eliminación de amonio y fosfato, se seleccionó el porcentaje de 1 % v/v de glicerol, debido que los resultados obtenidos en la concentración celular de la microalga en Medio Residual Sintético, ya que no se observaron diferencias

significativas al 10% v/v de glicerol cuando se encuentra co-inmovilizada. Sin embargo, resultados en la concentración celular en la microalga *C. vulgaris* inmovilizada sola fue mayor en condiciones de 1% v/v de glicerol que al 10% v/v de glicerol, estos resultados concuerdan con lo obtenido por Liang *et al.* (2009), quienes observaron que altas concentraciones de glicerol generan un efecto inhibitorio. Sin embargo este efecto no se presenta cuando la microalga esta co-inmovilizada con *A. brasilense* en medio sintético con 10 % v/v de glicerol,. Esto puede verse reflejado por el aumento de la concentración celular a las 120 horas, inclusive mayor que cuando la microalga se encuentra sola al 1% v/v de glicerol. Reportes señalan que la bacteria funciona como mitigador de estrés sobre la microalga, produciendo fitohormonas, principalmente ácido indol acético que ayuda en la actividad metabólica y su crecimiento (Holguin, 2008).

Según los resultados de crecimiento de *A. brasilense*, se puede notar que la bacteria aumenta la concentración celular cuando está asociada con la microalga, siendo su concentración celular mayor que estando inmovilizada sola, efecto que se observa tanto en 1 como en 10% v/v de glicerol. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por (Perez-Garcia *et al.*, 2010), cuando la bacteria se inmoviliza en forma conjunta con *C. vulgaris* en condiciones heterotróficas usando como fuente de carbono glucosa, la población bacteriana es significativamente más grande. Posiblemente la microalga al estar co-inmovilizada beneficie a la bacteria secretando exudados, que son utilizados por las bacterias como fuente de energía y carbono, o como complemento nutricional (Holguin, 2008). ellas bacterias del género *Azospirillum* sp., son consideradas quimi-organotróficas (Rivera, 2008) y pueden asimilar diferentes fuentes de carbono (Bashan *et al.*, 2011), ya que cuentan con enzimas de la vía de Embden-Meyerhof-Parnas y de la vía de Entner-Doudoroff (Westby *et al.*, 1983), así como todas las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Martinez-drets *et al.*, 1984). Adicionalmente, tienen la capacidad de crecer autotróficamente con H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, proceso en el que participa la ribulosa-1,5- difosfato carboxilasa (Tilak *et al.*, 1986).

En Agua Residual Real Estéril, (ARRE) tanto el sistema co-inmovilizado como *A. brasilense* inmovilizada sola son los tratamientos más eficientes en la eliminación de

amonio, con porcentaje del 96%, mientras que *C. vulgaris* sola elimina el 54%. Estudios señalados por Perez-Garcia *et al.*, (2010), en condiciones heterotróficas usando como fuente de carbono glucosa y utilizando el mismo sistema microalga-bacteria, muestran que la mayor eliminación la obtuvo con *C. vulgaris* inmovilizada alcanzando el 44% en tres días, seguido por el Co- inmovilizado. Cabe mencionar que *A. brasilense* no presentó una eliminación significativa. Sin embargo, bajo las condiciones de este trabajo, *A. brasilense* presenta una eliminación de amonio importante. Esto puede deberse a que el glicerol es un sustrato donde la bacteria crece eficientemente (Bashan *et al.*, 2011), además de que puede utilizar el amonio para crecer (De-Bashan y Bashan, 2008). Por lo tanto, las altas concentraciones celulares bacterianas demandan mayor aporte de amonio.

Por otro lado, es interesante resaltar que *A. brasilense* inmovilizada sola presentó una eliminación del 58.83% de fosfatos en Agua Residual Estéril, comparable al sistema co-inmovilizado. Esto podría explicarse por la alta asimilación al glicerol (Bashan *et al.*, 2011), generando altas concentraciones celulares en poco tiempo y provocando mayor demanda de fosfatos a su metabolismo, debido que el fósforo regula la actividad metabólica de carbono y la captación fijación de nitrógeno, al participar como co-factor de numerosas reacciones metabólicas (Rivera, 2008). Su escasez o ausencia puede inhibir el desarrollo de los microorganismos (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Este es un reporte nuevo para *A. brasilense* debido que este microorganismo no está reportado como posible microorganismo biorremediador de aguas residuales.

El sistema microalga-bacteria en ARRE presentó la mayor eliminación de fosfatos, a las 48 horas con 62 %, siendo mayor comparado por los resultados obtenidos por (Perez-Garcia *et al.*, 2010), usando glucosa como fuente de carbono, quienes reportan solo el 22.6%. Posiblemente en nuestro sistema se deba en gran medida por la bacteria *A. brasilense*.

Los resultados de pH mostraron valores iniciales de 8.85, y a las 48 horas se presentó una disminución en el tratamiento con *A. brasilense* de  $7.81 \pm 0.02$  y en el tratamiento *C. vulgaris* co-inmovilizada de  $8.02 \pm 0.02$ . Reportes señalan que el  $\text{pH} > 8$  influye en la precipitación del fosfato, y  $\text{pH} > 7$  en la volatilización de amonio (de-Bashan y Bashan, 2004b; Perez-Garcia *et al.*, 2010). Por lo tanto nuestro control esfera sin microorganismos,



nos hace inferir que el amonio y fosfatos son tomados por los microorganismos en los tratamientos que tienen fuente de carbono.

En agua Residual Real (ARR) sin Esterilizar todos los tratamientos, independientemente de si hay microalga, bacteria o los dos organismos co-inmovilizados, presentaron una eliminación de amonio de casi el 100 % en 12 horas y de fosfatos de 98 % en 48 horas. Estos resultados mostraron un patrón similar en reactores con capacidad de 100 y 600 mL. Esta eficiencia se le atribuye en gran medida a los microorganismos endógenos del agua residual, principalmente bacterias endógenas con gran potencial de eliminación de amonio (Grabińska -loniewska *et al.*, 1985; De Schryver y Verstraete, 2009; Torà *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012), y fosfatos (Castillo y Monz, 1999; Cruz *et al.*, 2013). Tomando en cuenta estos resultados, se probó el sistema en reactor de 50L y utilizando solo los microorganismos endógenos de la misma agua residual (sin el co-inmovilizado), con la misma concentración de glicerol (1%v/v). Observando registros de eliminación de amonio del 90% y fosfatos del 70% en 24 horas.

Los resultados obtenidos en reactores de 50 L, demuestran que los microorganismos endógenos juegan un papel importante en el medio. Este fenómeno involucra factores diversos, posiblemente se pueda explicar de la siguiente manera.

La eficiencia de eliminación de amonio y fosfatos está estrechamente relacionada con la fuente de carbono, ya que es asimilada por una gran cantidad de microorganismos en especial bacterias heterotróficas aerobias y facultativas (Grabińska -loniewska *et al.*, 1985). Indispensable para la generación de la síntesis celular. El oxígeno, el amonio y el fosfato son necesarios para que los microorganismos realicen la conversión de la materia orgánica a productos finales simples como los son dióxido de carbono y agua (Bitton y Florida, 2005).

La eliminación de fosfatos, como ya se dijo anteriormente es realizada por bacterias heterotróficas. Sin embargo podrían estar involucrados también organismos acumuladores potenciales de fosfatos (“luxury uptake”) (Cotoruelo y Marqués, 1999), que almacenan en forma de gránulos de polifosfatos denominados volutina (Schlegel y Zaborosch, 1997; Oehmen *et al.*, 2007) en el interior de la célula en condiciones aerobias (de-Bashan y

Bashan, 2004b). Esto posiblemente hace que los fosfatos del agua residual disminuyan drásticamente. Microorganismos como el género *Acinetobacter*, predominante en la sistemas de eliminación biológica de fosforo (EBP), son capaces de asimilar fosforo en proporciones superiores a las correspondientes, y son considerados bacterias acumuladoras de polifosfatos (Levin y Shaheen, 1967; Castillo y Monz, 1999; Cruz *et al.*, 2013). Cruz *et al.*, (2013) señalan que este género de bacterias se encuentran presente en este tipo agua, por lo cual, se le podría atribuir la alta eliminación de fosforo encontrada en este estudio. Sin embargo, (Cloete y Steyn, 1988) reportan que este género es solo responsable del 35% de la acumulación total de fosforo eliminado. Por lo tanto, posiblemente se encuentren otro tipo de género de bacterias potenciales de acumuladoras de fosforo en nuestro sistema. Reportes de (Bowker y Stensel, 1990), señalan que *Pseudomonas vesicularis* y *Klebsiella pneumoniae* son consideradas también acumuladoras de polifosfatos.

Es importante considerar que el oxígeno disuelto está relacionado directamente con los resultados encontrados. Los registros de oxígeno disuelto a las primeras doce horas muestran condiciones aerobias. Sin embargo después de las 12 horas el oxígeno disuelto se reduce a  $0.05 \pm 0.01$  mg/L, el cual, estas condiciones son consideradas como anóxicas (Wong *et al.*, 2003). Reportes señalan que la acumulación de fosforo también se lleva en condiciones anóxicas, siendo empleado nitrato como donador de electrones (Grabińska -łoniewska *et al.*, 1985; Castillo y Monz, 1999) generando bioacumulación de fosfatos (Fernández-Laba *et al.*, 2012).

La eliminación de amonio- se debe igualmente a las bacterias heterotróficas aerobias y facultativas (Grabińska -łoniewska *et al.*, 1985). La fuente de carbono (glicerol) puede ser asimilada por la mayoría de los microorganismos a través de la respiración (Sivakaminathan, 2012), generando un incremento en la tasa celular en poco tiempo (Zhao *et al.*, 2012; Kulikowska y Bernat, 2013). La mayor parte de la eliminación de amonio se consigue a través de la nitrificación y desnitrificación por bacterias heterotróficas facultativas (Grabińska -łoniewska *et al.*, 1985; Torà *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2012; Kulikowska y Bernat, 2013), responsables de la desnitrificación, en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales. Estos microorganismos son capaces de utilizar

nitritos/nitratos como aceptor terminal de electrones (Eisele y Ullrich, 1977) en su cadena respiratoria cuando exista materia orgánica suficiente, reduciéndolo a gas nitrógeno, y el material orgánico se oxida a dióxido de carbono y agua (Wong *et al.*, 2003). (Kulikowska y Bernat, 2013) reportan que el glicerol tiene ventajas como fuente de carbono para la desnitrificación, En general, la disminución del amonio es debido al proceso simultaneo de la nitrificación/desnitrificación (Akunna *et al.*, 1993; Kulikowska y Bernat, 2013) .

## 9. Conclusiones

1.-*Chlorella vulgaris* inmovilizada sola crece significativamente mejor en medio residual sintético adicionado con 1% de glicerol, mientras que su crecimiento se ve disminuido en medio residual sintético adicionado con 10 % v/v de glicerol.

2. La co-inmovilización de *C. vulgaris* con *A. brasilense* promueve el crecimiento de la microalga a partir de las 72 horas de cultivos, en concentración de glicerol de 1% y 10%.

3. La eliminación de amonio y fosfato demostró ser eficiente al adicionar 1% de glicerol al agua residual.

3.-Los resultados obtenidos en Agua Residual Real en términos de eliminación de amonio y fosfatos al adicionar 1% de glicerol, no mostraron diferencias significativas en ninguno de los tratamientos, en los volúmenes de 100 mL y 600 mL.

4.- La eliminación de amonio y fosforo en un reactor de 50 L fue eficiente sólo agregando el 1% de glicerol al agua residual, estimulando el crecimiento de las bacterias endógenas.

5.- Queda demostrado que el glicerol al 1% como única fuente de carbono, estimula las bacterias endógenas del agua residual, obteniendo resultados positivos, siendo la mayor a eliminación de amonio y fosfatos en 48 horas. Por lo tanto el glicerol es una fuente de carbono externa prometedora de bajo costo con grandes alcances para Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales a gran escala.

## 10. Bibliografía

- Akunna, J.C., C. Bizeau, y R. Moletta. 1993. Nitrate and nitrite reductions with anaerobic sludge using various carbon sources: Glucose, Glycerol, Acetic Acid, Lactic Acid and Methanol. *Water Research*. 27:1302–1312.
- Apt, K.E. y P.W. Behrens. 1999. Commercial developments in microalgal biotechnology. *Journal of Phycology*. 35:215–226.
- Bashan, Y., A. Trejo, y L.E. de-Bashan. 2011. Development of two culture media for mass cultivation of *Azospirillum* spp. and for production of inoculants to enhance plant growth. *Biology and Fertility of Soils*. 47:963–969.
- Bitton, G. y G. Florida. 2005. *Wastewater Microbiology* WILEY-LISS.(3era ed) Florida. 729p.
- Bowker, R. y H.D. Stensel. 1990. Phosphorus removal from wastewaters. *Pollution Technology Review*. Nowes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey, U.S.A.
- Broadbent, F.E. y Reisenauer H.M. 1990. Destino de los componentes del agua residual en el suelo y en los acuíferos: el nitrógeno y el fósforo. 331–346p.
- Bulut, M.Y., I. Oya, U. Leyla, K. Kemal, y D. Yaşar. 2011. The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *African Journal of Biotechnology*. 10:453–456.
- Carpenter, S.R., N.F. Caraco, D.L. Correll, R.W. Howarth, A.N. Sharpley, y V.. Smith. 1998. Nonpoint pollution of surface waters with phosphorus and nitrogen. *Ecological Applications*. 8:559–568.
- Castillo, P.A. y T. Monz. 1999. Consideraciones de diseño para la eliminación biológica de fósforo empleando procesos biopelícula. *Ingeniería del Agua*. 6(1):69–80.
- Chen, F. 1996. High cell density culture of microalgae in heterotrophic growth. *Trends in Biotechnology*. 14:421–426.
- Chuc-Altamirano, N.N. 2009. Reducción de la carga orgánica en el agua residual en una Planta Industrial mediante la aplicación de Fenton. Universidad Veracruzana. Tesis Mexico. 63p.
- Cloete, T.E. y Steyn P.L. 1988. The Role of *Acinetobacter* as a phosphorus removing agent in activated sludge. *Water Research*. 22:971–976.

- CONAGUA. 2011. Estadísticas del agua en México , edición 2011.
- Cotoruelo, M.L.M. y G.M.D. Marqués. 1999. Eliminación de nutrientes en aguas residuales. Dpto.Ingeniería Química.Facultad de Ciencias. Univerisdad de Málaga (I):139–146.
- Covarrubias, S.A., L.E. de-Bashan, y Y. Bashan. 2010. Immobilization of microorganisms in alginate beads as protection against hostile conditions when treating wastewater. XVIII International Conference on Bioencapsulation.Portugal 4–6p.
- Covarrubias, S.A., L.E. de-Bashan, M. Moreno, y Y. Bashan. 2012. Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93:2669–2680.
- Chrzanowski, T., R. Crotty, J. Hubbard, y R. Welch. 1984. Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microb Ecol*. 10:179–185.
- Cruz, I. 2012. Evaluación in situ del sistema inmovilizado *Chlorella vulgaris*-*Azospirillum brasilense* en el tratamiento terciario de agua residuale. Tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.,Mexico.65p
- Cruz, I., Y. Bashan, G. Hernández-Carmona, y L.E. de-Bashan. 2013b. Biological deterioration of alginate beads containing immobilized microalgae and bacteria during tertiary wastewater treatment. *Applied microbiology and biotechnology*. 97(22):9847–58.
- de-Bashan, L.E., H. Antoun, y Y. Bashan. 2008. Involvement of indole-3-acetic acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 947:938–947.
- Da Silva, G.P., M. Mack, y J. Contiero. 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 27:30–9.
- De la Hoz Siegler, H., W.C. McCaffrey, R.E. Burrell, y A. Ben-Zvi. 2012. Optimization of microalgal productivity using an adaptive, non-linear model based strategy. *Bioresource Technology*. 104:537–46.
- De la Noüe, J., G. Laliberté, y D. Proulx. 1992. Algae and wastewater. *Applied Phycology* 4:247–254.
- De Schryver, P. y W. Verstraete. 2009. Nitrogen removal from aquaculture pond water by heterotrophic nitrogen assimilation in lab-scale sequencing batch reactors. *Bioresource Technology*. 100:1162–7.

- Dobson, R., V. Gray, y K. Rumbold. 2012. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 39:217–26.
- de-Bashan, L.E. y Y. Bashan. 2004a. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer (1997-2003). *Water Research*. 38:4222–46.
- de-Bashan, L.E. y Y. Bashan. 2004b. Recent advances in removing phosphorus from wastewater and its future use as fertilizer ( 1997 – 2003 ). *Water Research*. 38:4222–4246.
- de-Bashan, L.E. y Y. Bashan. 2008. Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. *Applied and Environmental Microbiology*. 74:6797–6802.
- de-Bashan, L.E. y Y. Bashan. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresouruce Technology*. 101:1611–1627.
- de-Bashan, L.E., M. Moreno, J. Hernandez, y Y. Bashan. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36:2941–2948.
- Eisele, R. y W.R. Ullrich. 1977. Effect of glucose and CO(2) on nitrate uptake and coupled OH flux in *Ankistrodesmus braunii*. *Plant Physiology*. 59:18–21.
- Fernández, E.S., J.M. Garrido, F.E. Coda, R.O. Pujol, y S.C. Coma. 2008. Eliminación del nitrógeno amoniacal en aguas residuales sanitarias. *Técnica Industrial*. 273:44–49.
- Fernández-Laba, A.R., P. Letón García, R. Rosal García, M. Dorado Valiño, S. Villar Fernández, y J.M. Sanz García. 2012. Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. Universidad de Alcála del Círculo de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME). [issuu.com](http://issuu.com), 136p.
- Ferrera-Cerrato, R., N.G. Rojas-avelizapa, H.M. Poggi-varaldo, A. Alarcón, y R.O. Cañizares-Villanueva. 2006. Procesos de biorremediación hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48:179–187.
- Fisher, T.R., J.D. Hagry, W.R. Boynton, y M.R. Williams. 2006. Cultural eutrophication in the Choptank and Patuxent estuaries of Chesapeake Bay. *Limnology and Oceanography*. 51:435–447.

- Gancedo, C., J.M. Gancedo, y A. Sols. 1968. Glycerol Metabolism in yeasts. Pathways of utilization and production. *European Journal of Biochemistry* / 5:165–172.
- Gonzalez, L.E. y Y. Bashan. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1527–1531.
- González, L.E., R.O. Canizares, y S. Baena. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*. 60:259–262.
- Grabińska -loniewska, A., T. Słomczyński, y Z. Kańska. 1985. Denitrification studies with Glycerol as a carbon source. *Water Research*.. 19(12):1471–1477.
- Grobbelaar, J.U. 2004. Algal Nutrition, mineral nutrition. En: Blackell Publishing (eds.) *Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford. 97p.
- Guerrero, J., C. Tayà, A. Guisasola, y J. Baeza. 2012a. Glycerol as a sole carbon source for enhanced biological phosphorus removal. *Water Research*. 46:2983–91.
- Hernández-Lopez, J. y F. Vargas-Albores. 2003. A microplate technique to quantify nutrients. *Aquaculture Reserch*. 1201–1204.
- Holguin, G. 2008. La comunicación entre bacterias y plantas. *Ciencia*. 72–78.
- Inokuchi, R., K.I. Kuma, T. Miyata, y M. Okada. 2002. Nitrogen-assimilating enzymes in land plants and algae: phylogenic and physiological perspectives. *Physiologia Plantarum*. 116:1–11.
- Kaplan, D., D. Christiaen, y S.M. Arad. 1987. Chelating properties of extracellular polysaccharides from *Chlorella* spp *Applied and Enviromental Microbiology*. 53:2953–2956.
- Karel, F.S., S.B. Libicki, y R. Robertson. 1985. The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical Engineering Science*. 40:1321–1354.
- Kloverpris, J. y H. Wenzel. 2007. Modelling global land use and social implications in the sustainability assessment of biofuels. *Biofuel Assessment Conference*. 12(June):86899.



- Kujawa-Roeleveld, K. y G. Zeeman. 2006. Anaerobic treatment in decentralised and source-separation-based sanitation concepts. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 5:115–139.
- Kulikowska, D. y K. Bernat. 2013. Nitritation-denitritation in landfill leachate with glycerine as a carbon source. *Bioresource Technology*. 142:297–303.
- Lahera, V. 2010. Infraestructura sustentable: las plantas de tratamiento de aguas residuales. *QUIVERA*. 12:
- Lee, Y.-K. 2004. *Algal nutrition-Heterotrophic carbon nutrition*. Oxford. 116p.
- Levin, G. V. y D.G. Shaheen. 1967. Metabolic removal of phosphate from sewage effluent. *Biotechnology and Bioengineering*. 9:457–470.
- Liang, Y., N. Sarkany, y Y. Cui. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnology Letters*. 31:1043–1049.
- Lincoln, E.P. y J.F.K. Earle. 1990. Wastewater treatment with microalgae. En: Akatsuka I. (ed.). *Introduction to Applied Phycology*. The Hague: SPB Academic Publication. 429-446 pp
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, D.A. Stahl, y D.P. Clark. 2004. *Brock, Biología de los organismos*. Madrid. 137p.
- Martinez-drets, G., D.E.L. Gallo, C. Burpee, y R.H. Burris. 1984. Catabolism of carbohydrates and organic acids and expression of nitrogenase by azospirilla. *Journal of bacteriology*. 159(1):80–85.
- Metcalf y Eddy, Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F. L., Stensel, H.D. 2002. *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. USA. 1030p.
- Monroy, O., Salanazar, y M. Ramos. 1989. Análisis comparativo de la eficiencia de tratamiento entre el cultivo de microalgas y lirio acuático. En I informe semestral de ejecución de proyecto. *Combustibles por fermentación: Biometanación rápida de residuos orgánicos*. Oficina de la Secretaría General de la OEA.
- Murphy, J. y J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural water. *Analytica Chimica Acta*. 27:31–36.
- 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.

- Oehmen, A., P.C. Lemos, G. Carvalho, Z. Yuan, J. Keller, L.L. Blackall, y M. a M. Reis. 2007. Advances in enhanced biological phosphorus removal: from micro to macro scale. *Water Research*. 41:2271–3000.
- OOMSAPAS. 2008. 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>
- Palmer, C.M. 1969. A composite rating of algae tolerant organic pollution. *Journal of Phycology*. 5:78–82.
- Pérez García, R.O. 2009. Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de aguas residual un sistema inmovilizado Microalga-Bacteria en crecimiento Autotrófico, Heterotrófico y Mixotrófico. Tesis. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C., Mexico. 130p.
- Perez-Garcia, O., Y. Bashan, y M. Esther Puente. 2011. Organic carbon supplementation of sterilized municipal wastewater is essential for heterotrophic growth and removing ammonium by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Phycology*. 47:190–199.
- Perez-Garcia, O., L.E. de-Bashan, J.-P. Hernández, y Y. Bashan. 2010. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 46:800–812.
- Post, A.F., I. Cohen, y E. Romem. 1994. Characterization of two *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae) strains isolated from wastewater oxidation ponds. *Journal of Phycology*. 30:950–954.
- Powell, N., A. Shilton, Y. Chistia, y S. Prat. 2009. Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*. 43:4207–4213.
- Rétfalvi, T., A. Tukacs-Hájos, L. Albert, y B. Marosvölgyi. 2011. Laboratory scale examination of the effects of overloading on the anaerobic digestion by glycerol. *Bioresource Technology*. 102:5270–5275.
- Rezaee, A., H. Godini, y H. Bakhtou. 2008. Microbial cellulose as support material for the immobilization of denitrifying bacteria. *Environmental Engineering and Management Journal*. 7:589–594.

- Rivera, R.D.M. 2008. Optimización de un medio de cultivo para la producción de un inoculante con base en *Azospirillum brasilense* C16. Tesis. Universidad Francisco de Paula Santander, Colombia.84p.
- Salazar, G.M. 2009. Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales, mediante el uso combinado de digestión anaerobia y microalgas. Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales. 16–22.
- Salazar, M., V. Bernal, y E. Martínez. 2002. Tratamiento de efluentes anaerobios con microalgas clorofitas ( *Chlorella vulgaris* y *Sphaerocystis* sp ). XI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Depto. de Biotecnología.
- Schlegel, H.G. y C. Zaborosch. 1997. Microbiología General. Ediciones Omega, S.A. Barcelona.606p.
- SECRETARÍA DE SALUD. 2000. Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. 73–79p.
- SIDS, O. 2002. INTRODUCTION GLYCEROL CAS N ° : 56-81-5. 56–81p.
- Sivakaminathan, S. 2012. Biomass and lipid production from heterotrophic and mixotrophic fed-batch cultivation of microalgae *Chlorella protothecoide* Using Glycerol. Tesis. Clemson University. EUA. 125p.
- Solorzano, L. 1969. Determination of ammonia in natural waters by the phenol hypochlorite method. *Limnol Oceanogr.* 14:799–801.
- Steenhoudt, O. y J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology.* 24:487–506.
- Suarez Marmolejo, C.L. 2010. Tratamiento de aguas residuales municipales en el Valle del Cauca. Tesis. Universidad del Valle.Colombia.102p.
- Taberero, A., E.M. Martín del Valle, y M. a. Galán. 2012. Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae heterotrophic culture: Scale-up and economics. *Biochemical Engineering Journal.* 63:104–115.
- Tilak, K.V.B.R., K. Schneider, y H.G. Schlegel. 1986. Autotrophic growth of nitrogen-fixing *Azospirillum* species and partial characterization of hydrogenase from strain CC. *Current Microbiology.* 13:291–297.

- Torà, J., J. Baeza, J. Carrera, y J. Oleszkiewicz. 2011. Denitritation of a high-strength nitrite wastewater in a sequencing batch reactor using different organic carbon sources. *Chemical Engineering Journal*. 172:994–998.
- Torrescano, J.L. 2009. Parámetros de operación en el proceso de tratamiento de agua residual por lodos activados. *Aquaforum*. 52:14-19.
- Vega de Kuper, J.C. 2007. *Química Del Medio Ambiente*.(Castellano).Alfa Omega. Chile.. 236p.
- Wen, Z.-Y. y F. Chen. 2003. Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology Advances*. 21:273–294.
- Westby, C., S. Cutshall, y G. V. Vigil. 1983. Metabolism of various carbon sources by *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology* 156:1369–1372.
- Wong, C.H., G. W. Barton, y J.P. Barford. 2003. The nitrogen cycle and its application in Wastewater treatment. En: Mara D. y Horan N. (1 eds.) *Water and Wastewater Microbiology*(English). 427–438p.
- Zhao, Y., B. Zhang, C. Feng, F. Huang, P. Zhang, Z. Zhang, Y. Yang, y N. Sugiura. 2012. Behavior of autotrophic denitrification and heterotrophic denitrification in an intensified biofilm-electrode reactor for nitrate-contaminated drinking water treatment. *Bioresource Technology*, 107:159–65p.

## Anexos

### Anexo 1: Matraces invertidos funcionando como birreactores



### Anexo 2: Bioreactor triangular con capacidad de 60L. Este biorreactor se lleno con 50 L de agua residual real trada, en condiciones heterotroficas (en total seguridad).

