



Programa de Estudios de Posgrado

Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato
como protección contra condiciones adversas en un
tratamiento de agua residual

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

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

Presenta

Sergio Abraham Hernández Covarrubias

La Paz Baja California Sur, México, febrero del 2011

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:4 horas del día 23 del Mes de Febrero del 2011, 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:

"Inmovilización de microorganismos en esferas de alginato como protección contra condiciones adversas en un tratamiento de agua residual"

Presentada por el alumno:

Sergio Abraham Hernández Covarrubias

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

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

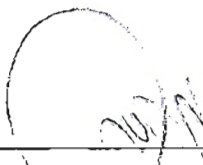
LA COMISION REVISORA



Yoav Bashan
DIRECTOR DE TESIS



Felipe de Jesus Ascencio Valle
CO-TUTOR



Maria Concepcion Lora Vilchis
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité tutorial y revisor de tesis

Dr. Yoav Bashan

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S. C.

Director de Tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S. C.

Asesor

Dra. María Concepción Lora Vilchis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; S. C.

Asesora

Jurado en la defensa de Tesis

Dr. Yoav Bashan

Dr Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. María Concepción Lora Vilchis

Suplente:

Dr. Macario Bacilio Jiménez

Resumen

El tratamiento biológico terciario de aguas residuales expone a los agentes de biorremediación a la depredación y competencia por la microflora y principalmente microfauna presentes en el agua residual, lo cual reduce su eficiencia. Por lo que la protección contra la competencia es vital. Sin embargo se ha asumido, todavía sin pruebas experimentales, que la inmovilización en matrices de polímeros, por ejemplo esferas de alginato, brinda una barrera física entre los microorganismos inmovilizados y la comunidad microbiológica hostil presente en el agua residual. El objetivo de este trabajo fue: (1) demostrar que la cantidad de los microorganismos utilizados no se ve afectada por la exposición a agua residual; (2) determinar el tipo de protección que ofrece la inmovilización de microorganismo en esferas de alginato; (3) Analizar la eliminación de nutrientes del sistema microalga-bacteria en agua residual doméstica. En el presente trabajo se utilizó como modelo de estudio el sistema microalga-bacteria (*Chlorella sorokiniana*-*Azospirillum brasilense*) co-inmovilizado para el tratamiento terciario de aguas residuales, propuesto por el grupo de microbiología ambiental del CIBNOR. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con agua residual doméstica proveniente de la planta de tratamiento de La Paz, B.C.S., México. El crecimiento de la microalga no se vio disminuido por la exposición al agua residual sino se registró un crecimiento mayor al reportado anteriormente para medio residual sintético. La co-inmovilización también mostro tener efectos positivos en la microalga estimulando su crecimiento. Por medio de microscopia de fluorescencia e Hibridación Fluorescente in Situ (FISH) se logró determinar la ubicación de *A. brasilense* y de las demás bacterias en la esfera de alginato, logrando establecerse que las bacterias que no son *A. brasilense* quedan detenidas en la superficie de la esfera, mientras que en el interior solo se encuentra *A. brasilense* y *C. sorokiniana*. El sistema microalga-bacteria mostro ser eficiente en la eliminación de amonio y fosfato del agua residual, aunque no hubo una diferencia evidente comparado con el tratamiento de solo microalga. Se registro un aumento en la concentración de nitratos, lo cual pudiera atribuirse a procesos de nitrificación llevados a cabo por bacterias presentes en el agua residual. Se recomienda realizar más estudios encaminados a mejorar la eficiencia del sistema para la eliminación de nutrientes en agua residual real.

Palabras clave: *Sistema microalga-bacteria, protección de células inmovilizadas, tratamiento terciario de aguas residuales.*

Abstract

Tertiary treatment of biological wastewater exposes treating agent(s) to competition and predation by large populations of microflora but mainly by microfauna residing in the wastewater; this effectively reduces their efficiency. Therefore, protection against competition is vital. It is assumed, yet without experimental proof, that immobilization in a polymer matrix, such as beads, will provide a physical barrier between the treating agents and the microbiologically-hostile wastewater environment. Our objectives were to: (1) Demonstrate that the internal population of wastewater treating agents within the bead is not reduced upon expose to wastewater; (2) Determine the kind of protection that immobilization provide (3) Quantify how much tertiary treatment is performed. In the present study we use as a model the microalgae-bacteria co-immobilized system for tertiary wastewater treatment as a model, proposal by the environmental microbiology group of CIBNOR. All of this has been done using wastewater from the municipal treatment plant of La Paz, B.C.S., Mexico. When placed in wastewater, populations of *C. sorokiniana* in the beads increased over time. Joint immobilization with *A. brasilense* further increased the population size of the microalgae and mitigated the decline of *A. brasilense* populations over time. Evaluation of bacterial population of jointly-immobilized beads, using FISH, revealed that exterior populations was made of unidentified bacteria where the inside population was composed solely of *A. brasilense* Immobilization in alginate beads provides a separation barrier between wastewater treating agents and the micro- and macro-organisms inhabiting wastewater, which allows uninterrupted tertiary wastewater treatment. The microalgae-bacteria system show to be efficient in the removal of ammonia and phosphates from wastewater, although there are no difference with the treatments with just microalgae. It was show an increase in the concentration of nitrates in all treatments except the control, this increase could be related to nitrification process carry out by wastewater indigenous bacteria. It's recommended more studies aimed to improve the system efficacy for nutrient removal.

Keywords: *Microalgae-Bacteria system, immobilized cells-protection, tertiary wastewater treatment.*

Dedicatoria

A mis padres por su apoyo incondicional

A mis hermanos por estar siempre unidos

A mis sobrinos por ser el futuro de la familia

*El nacimiento de la ciencia
fue la muerte de la superstición.
Thomas Henry Huxley*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Al posgrado del CIBNOR por la extensión de beca otorgada y el apoyo para asistir al XVII International Conference on Bioencapsulation en Porto Portugal.

A las siguientes instituciones y laboratorios que brindaron la ayuda para hacer este trabajo posible:

- Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.
- Laboratorio de Microbiología Ambiental del CIBNOR y sus técnicos Dra. Luz Estela González de-Bashan, al M. en C. Juan Pablo Hernández Sánchez, M. en C. Manuel Moreno Legorreta, Biol. Patricia Vázquez Correa.
- Laboratorio de Microscopía Electrónica del CIBNOR y su técnico Ariel Cruz Villacorta.
- Dirección de estudios de Posgrado, CIBNOR, y su directora Dra. Elisa Serviere Zaragoza.
- Laboratorio de cómputo y su técnico el Lic. Horacio Sandoval Gómez.

Quisiera expresar mi infinito agradecimiento para el Dr. Yoav Bashan y la Dra. Luz Estela González, directores de esta tesis, gracias por su guía y paciencia a lo largo de la realización de esta tesis, son un ejemplo a seguir como investigadores.

A todo el grupo de microbiología ambiental del CIBNOR, gracias por todos los comentarios y sugerencias que han enriquecido esta tesis muchas gracias a todos.

A mis asesores el Dr. Felipe Ascencio y la Dra. Concepción Lora por sus acertadas observaciones y sugerencias a lo largo de esta investigación.

A mi familia por ser la base de mi crecimiento y un gran apoyo siempre, gracias por ayudarme a creer y desarrollarme como ser humano.

A todos mis amigos que conocí en La Paz gracias por cada momento mágico compartido y palabra de aliento, a todos y cada uno les guardo un gran aprecio.

Contenido

1. Introducción	1
1.1. Protección de células inmovilizadas contra estrés ambiental	4
1.2. Sistema de co-inmovilizado microalga-bacteria para tratamiento terciario de aguas residuales	4
2. Antecedentes	5
2.1. Inmovilización de células	5
2.2. Tratamiento de aguas residual con microalgas inmovilizadas	5
2.3. Protección de células inmovilizadas contra estrés ambiental y depredación	7
2.4. Sistema de co-inmovilizado microalga-bacteria para tratamiento terciario de aguas residuales	9
3. Justificación	12
4. Objetivo	13
4.1. Objetivos particulares	13
5. Hipótesis	14
6. Materiales y métodos	15
6.1. Colecta de agua residual	15
6.1.1. Análisis del agua residual	15
6.2. Microorganismos, condiciones de cultivo e preparación del sistema microalga-bacteria	15
6.3. Conteo de microorganismos	16
6.4. Aislamientos, descripción e identificación de colonias	17
6.5. Determinación del tipo de protección que ofrece a los microorganismos la inmovilización en alginato	17
6.5.1. Diseño experimental	17
6.5.2. Verificación de la presencia de protozoarios por microscopia óptica de luz	18
6.5.3. Lavado de esferas	18

6.5.4 Ubicación espacial de bacterias en las esferas de alginato mediante la técnica de Hibridización Fluorescente <i>In Situ</i> (FISH)	18
6.5.5. Visualización	20
6.5.6. Determinación del porcentaje de <i>A. brasilense</i> en las imágenes de fluorescencia	21
6.5.7. Visualización de la superficie de la esfera por SEM	21
6.5.8. Experimento de células en suspensión	22
6.6. Eliminación de nutrientes por sistema microalga-bacteria en agua residual doméstica	23
6.6.1. Conteo de microorganismos	24
6.6.2 Análisis cinéticos	24
6.6.3. Análisis estadísticos	24
7. Resultados	25
7.1. Análisis preliminar de agua residual	25
7.2. Conteo de <i>A. brasilense</i>	26
7.3. Número de bacterias totales en la esfera (<i>A. brasilense</i> + todas las demás)	26
7.3.1 Número de bacterias cultivables en las esferas (todas las bacterias excepto <i>A. brasilense</i>)	29
7.3.2. Conteo de bacterias en el agua residual	29
7.4. Aislamientos, descripción e identificación de colonias	30
7.5. Determinación del tipo de protección que ofrece a los microorganismos la inmovilización en alginato (Ubicación espacial de <i>Azospirillum brasilense</i> y otras bacterias en la esfera de alginato)	32
7.6. Observación de la superficie de la esfera de alginato por SEM	39
7.7. Verificación de la presencia de protozoarios por microscopía óptica de luz	43
7.8. Experimento en suspensión	44
7.9. Eliminación de nutrientes por el sistema microalga-bacteria en agua residual doméstica	45
7.9.1. Crecimiento de <i>C. sorokiniana</i>	45

7.9.2. Eliminación de nutrientes en agua residual	46
7.9.3. Afinidad por el sustrato	48
7.9.4. Variación de pH	49
8. Discusión	52
9. Conclusión	59
10. Referencias	60

Lista de tablas

Tabla I. Ventajas y desventajas de la utilización de células inmovilizadas	2
Tabla II. Investigaciones relevantes sobre el uso de microalgas inmovilizadas para biorremediación de aguas residuales	7
Tabla III. Conteo de microorganismos y su método analítico	16
Tabla IV. Composición de buffer de lavado y buffer de hibridización	19
Tabla V. Variables analizadas durante los experimento de eliminación de nutrientes	23
Tabla VI. Análisis preliminar de agua residual	25
Tabla VII Descripción de las diferentes colonias encontradas	31
Tabla VIII. Tratamientos y porcentaje de eliminación de fosfato del agua residual	47
Tabla IX. Tratamientos y porcentaje de eliminación de amonio del agua residual	48
Tabla X. Afinidad por el sustrato por célula de <i>C. sorokiniana</i> (fosfatos)	48
Tabla XI. Afinidad por el sustrato por célula de <i>C. sorokiniana</i> (amonio)	49

Lista de figuras

Figura 1. Representación gráfica del principio utilizado para la identificación de <i>A. brasilense</i> por FISH	21
Figura 2. Gráfica de crecimiento de <i>A. brasilense</i> través del tiempo	26
Figura 3. Número de células/esfera de bacterias totales en los tratamientos	27
Figura 4. Número de células/esfera de bacterias totales	28
Figura 5. Número de UFC/esfera de bacterias totales	28
Figura 6. Número de bacterias en agua residual	30
Figura 7. Imagen de los morfotipos coloniales obtenidos	31
Figura 8. Superposición de imágenes de FISH de la orilla de esferas de 96 horas de tratamiento en agua residual	33
Figura 9. Superposición de imágenes de FISH del interior de esferas	35
Figura 10. Superposición de imágenes de FISH del interior de esferas después del tratamiento en agua residual	36
Figura 11. Superposición de imágenes de FISH	37
Figura 12. Imágenes de esferas de alginato después 96 horas de tratamiento de aguas residuales	38
Figura 13. Micrografías SEM de las esferas de alginato después del tratamiento en agua residual	40
Figura 14. Micrografías SEM de las esferas de alginato después de 96 horas de tratamiento en agua residual	41
Figura 15. Micrografías SEM de las esferas de alginato después del tratamiento en agua residual	41
Figura 16. Micrografías de las esferas de alginato después de 48 y 96 horas de tratamiento en agua residual	42
Figura 17. Protozoarios más representativos presentes en el tratamiento de agua residual	44
Figura 18. Crecimiento de células de <i>A. brasilense</i> en suspensión	45
Figura 19. Gráfica de cambio en el crecimiento de los microorganismos a través del tiempo	46
Figura 20. Variación en la concentración de pH en cada ciclo de incubación	50
Figura 21. Variación en la concentración de nitratos en cada ciclo de incubación	51

1. Introducción

Chlorella spp. (Chlorophyceae) es una microalga verde unicelular no móvil, ha sido una de las primeras microalgas aisladas en cultivo puro en 1890 por Martinus Beijerinck. *Chlorella* se ha utilizado en estudios de fotosíntesis y de respiración (Ilangovan *et al.*, 1998). Mucho del conocimiento en síntesis de carbohidratos en microalgas ha sido obtenido de este género (Hosomo *et al.*, 1994, Ramazanov & Ramazanov 2006). A partir del final de los años cuarenta se ha puesto especial atención al cultivo de esta microalga para la producción de compuestos como pigmentos para la industria de comida y aplicaciones en tratamiento de agua residual, (Oswald 1992).

Azospirillum spp. con excepción de *Rhizobia* es la bacteria-promotora de crecimiento en plantas (PGPB) más estudiada en la agricultura (Bashan & de-Bashan, 2005). *Azospirillum* se caracteriza por ser una bacteria de la rizósfera, fijadora de nitrógeno. En adición a su fijación de N₂ bajo condiciones microaerobias, desnitrifica bajo condiciones anaeróbicas o microaerofilicas y puede asimilar NH₄⁺, NO₃⁻, o NO₂⁻ (Hartmann & Zimmer, 1994) actúa como PGPB para numerosas especies de plantas (Bashan *et al.*, 2004), y también para microalgas como *Chlorella*.

La tecnología de inmovilización de enzimas microbianas, organelos y células se ha venido utilizando en una gran variedad de aplicaciones científicas e industriales (Cassidy *et al.*, 1996). La inmovilización de células ofrece ventajas en la industria de procesamiento de comida, en biotecnología y agricultura, biotransformación, fermentación y conversión de ácidos orgánicos, producción de aminoácidos y oligosacáridos, desnitrificación del agua, así como aplicaciones biomédicas (Zohar-Perez 2004) y en aplicaciones ambientales (Cassidy *et al.*, 1996) como el tratamiento terciario de aguas residuales (de-Bashan *et al.*, 2000, 2004, 2005).

Una célula inmovilizada es definida como una célula viva, a la cual por medios naturales o artificiales se le ha limitado el movimiento de su locación original, a cualquier parte de la fase acuosa de un sistema (Tampion & Tampion, 1987). Algunas de las ventajas y desventajas que ofrece la inmovilización se enlistan en la Tabla I.

Tabla I. Ventajas y desventajas de la utilización de células inmovilizadas

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> • Operación continua del reactor sin riesgo de lavado y pérdida de células 	<ul style="list-style-type: none"> • Problemas de difusión debido a la alta densidad celular y la baja solubilidad del oxígeno en el agua
<ul style="list-style-type: none"> • Separación sencilla de células del medio donde se encuentran 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en la fisiología celular que pudieran afectar la productividad
<ul style="list-style-type: none"> • Reutilización de las células 	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios en la composición de poblaciones microbianas, (pudiera ser un problema en aguas residuales)
<ul style="list-style-type: none"> • Menor volumen de los biorreactores 	<ul style="list-style-type: none"> • Altos costos de inmovilización
<ul style="list-style-type: none"> • Especies microbianas espacialmente separadas para realizar diferentes funciones en un mismo reactor 	
<ul style="list-style-type: none"> • Protección de los microorganismos inmovilizados de agentes tóxicos y estrés ambiental 	
<ul style="list-style-type: none"> • Fácil y menor costo de manejo 	

Dentro del campo de investigaciones sobre usos de células inmovilizadas destaca últimamente el uso de estas en aplicaciones ambientales, como nuevas formas de aplicación de pesticidas, biocontroles de plagas, degradación de compuestos contaminantes del suelo y agua, tratamiento terciario de aguas residuales, eliminación de metales pesados y recuperación de suelos erosionados por mencionar algunas. Algunos autores han mencionado que la inmovilización brinda protección contra bacteriófagos (Steenon *et al.*, 1987), protozoarios (o algún otro depredador) y toxinas (Tanaka *et al.*, 1994) que se encuentren en el ambiente. Las células pueden suplementarse con nutrientes co-inmovilizados (Stormo & Crawford 1992), pueden sobrevivir largos periodos de tiempo conservando su actividad fisiológica y pueden inmovilizarse grandes densidades celulares.

Uno de los problemas ocasionados por la excesiva descarga de nutrientes en aguas marinas y superficiales debido a actividades humanas es la eutrofización, problema común en muchos países (Crump, 1993). En algunas regiones es debido a la falta de infraestructura

para el tratamiento de aguas residuales (Olguín, 2003). El cultivo de la microalga en agua residual ofrece la ventaja de tratar el agua y al mismo tiempo producir biomasa algal (Mallick, 2002).

Uno de los inconvenientes relacionados con el cultivo de las microalgas y que han limitado sus aplicaciones en este campo es el derivado del cosechado. Varios grupos de investigación han desarrollado diferentes estrategias en el campo de inmovilización de células para reducir los costos relacionados con el cosechado (Olguín, 2003). La tecnología de inmovilización que consiste en confinar las células microalgales dentro de una matriz, ofrece una opción para solucionar este problema (Chevalier & de la Noue, 1985). Esta tecnología no solo previene el lavado de la biomasa en un biorreactor sino también ofrece una mayor facilidad de operación y una fácil recuperación de las células del medio (Mallick & Rai, 1993). La inmovilización de microalgas es una tecnología establecida que comenzó hace 40 años y se empezó a utilizar en el tratamiento de agua residual en los últimos 20 años (de-Bashan & Bashan, 2010).

Se han definido seis diferentes tipos de inmovilización: de enlaces covalentes, afinidad de inmovilización, adsorción, confinamiento en emulsiones líquido-líquido, captura detrás de membranas semipermeables y atrapamiento en polímeros (Mallick, 2002). Estos tipos de inmovilización pueden ser agrupados en pasivos (es aquella donde se utilizan las propiedades de algunos microorganismos de adherirse a superficies y crecer sobre ellas) y activos (utilizan agentes floculantes, adhesión química, y atrapamiento en gel) (Cohen 2001, Moreno-Garrido, 2008).

El método de confinamiento en gel es el más ampliamente usado, el cual puede realizarse en polímeros sintéticos (acrilamida, poliuretano, polivinil y resinas) o en polisacáridos naturales (alginato, carragenano, agar y agarosa) (Cassidy *et al.*, 1996, Mallick, 2002, Moreno-Garrido, 2008, de-Bashan & Bashan, 2010). Para la inmovilización de microalgas los polímeros naturales son los más utilizados, entre ellos el carragenano, agar y alginato. A pesar de que algunos polímeros naturales son menos estables y pueden llegar a disolverse en agua residual muy contaminada, mientras que los polímeros sintéticos no, además los

polímeros naturales son más vulnerables a la degradación ambiental por microbios. (de-Bashan & Bashan, 2010). Sin embargo, la difusión es mayor en los polímeros naturales y son menos peligrosos de producir (Leenen *et al.*, 1996).

1.1. Protección de células inmovilizadas contra estrés ambiental

Entre las ventajas de utilizar células inmovilizadas está el brindar protección a los microorganismos inmovilizados contra estrés ambiental (de-Bashan & Bashan, 2010 y Moreno-Garrido, *et al.*, 2002) así como evitar la depredación por el pastoreo de zooplancton (Faafeng *et al.*, 1994); sin embargo, hay poca evidencia para demostrar que existe una protección contra la depredación debido a la encapsulación de las células microbianas (Cassidy *et al.*, 1996) aunque se ha asumido sin pruebas experimentales que la inmovilización en matrices de polímeros (esferas de alginato), en el caso del tratamiento de agua residual podría brindar una barrera física entre los microorganismos y el medio sin la restricción de los depredadores.

1.2. Sistema co-inmovilizado de microalga-bacteria para tratamiento terciario de aguas residuales

Una nueva forma de tratamiento de aguas residuales utilizando microalgas es la de inmovilizarlas de manera conjunta con bacterias. Un ejemplo es la co-inmovilización de *Chlorella vulgaris* con la bacteria *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato. Siguiendo el principio que *Chlorella vulgaris* es una microalga que ha sido comúnmente utilizada para el tratamiento terciario de aguas residuales, principalmente en la eliminación de compuestos nitrogenados y fosforados, además de metales pesados (Akazu *et al.*, 1992 y Gonzalez *et al.*, 1997), mientras que la bacteria *Azospirillum brasilense* ha probado ser una bacteria promotora de crecimiento en plantas (PGPB). Se asume que la bacteria ocasione un efecto benéfico en *Chlorella vulgaris* cuando ambos se encuentran co-inmovilizados en esferas de alginato, lo anterior ya se ha comprobado en diferentes estudios donde se ha visto un incremento en su tasa de crecimiento, eliminación de nutrientes (amonio y fósforo

soluble) además de un incremento en lípidos y pigmentos (de-Bashan *et al.*, 2000, 2002 y 2005).

El propósito de este trabajo es determinar si la inmovilización de microorganismos para tratamiento de agua residual en esferas de alginato brinda algún tipo de protección física contra las condiciones adversas (depredación y competencia) presentes en el agua residual utilizando como modelo de tratamiento el sistema de co-inmovilizado microalga-bacteria.

2. Antecedentes

2.1. Inmovilización de célula

En el campo de estudio de inmovilización de células sobresalen el trabajo de Chibata & Tosa (1981), quienes realizaron una revisión en extenso sobre el uso de células inmovilizadas, incluyen diferentes métodos de inmovilización, hablan sobre la producción de químicos por células inmovilizadas, mencionan además de las ventajas de tener células inmovilizadas en lugar de solo enzimas, mencionan diferentes procesos de producción de biomateriales por células inmovilizadas y al final se refieren muy brevemente a estudios sobre inmovilización de células de plantas y animales, por su parte Fukui & Tanaka (1982) realizaron una revisión en extenso sobre inmovilización de células microbianas, en la cual incluyen las técnicas de inmovilización más recientes de su época, mencionan también la bioconversión de compuestos altamente lipofílicos y compuestos insolubles en agua por células inmovilizadas, señalan que utilizar células inmovilizadas es una ventaja sobre tener solamente enzimas ya que se evita tener que extraer y purificarlas además de que es relativamente sencillo llevar a cabo reacciones que necesiten varios pasos ya que la célula completa puede llevar a cabo todo el proceso.

2.2. Tratamiento de agua residual con microalgas inmovilizadas

Existen un gran número de investigaciones realizadas con microalgas inmovilizadas para el tratamiento de agua residual entre las cuales destacan la realizada por Leenen *et al.*(1996), quienes realizaron una revisión sobre las características y el criterio de selección que deben de tener los materiales para inmovilización de células en tratamientos de agua residual.

Mencionan las características óptimas que debe tener al material de inmovilización y además realizaron una comparación entre polímeros sintéticos y naturales, encontrando que en el caso de inmovilización de células de bacterias nitrificantes se obtiene mejores resultados con el uso de materiales sintéticos. Por su parte Mallick (2002); realizó una revisión sobre el potencial biotecnológico de las microalgas inmovilizadas para eliminar nutrientes (nitrógeno y fósforo) además de metales pesados, menciona a la matriz de inmovilización como un tercer componente del sistema (el agua y la microalga son los otros dos), también reviso el efecto de la inmovilización sobre la microalga específicamente en crecimiento, morfología, metabolismo, reproducción, eliminación de nutrientes y eliminación de metales pesados.

En investigaciones más recientes Abed-Hammed *et al.*, (2007) realizaron una revisión sobre los potenciales usos biotecnológicos de las microalgas inmovilizadas, detallando algunas técnicas de inmovilización y mencionan además los efectos de esta sobre la función de la célula, enfocándose en el uso de las microalgas para tratamiento de aguas residuales específicamente en la eliminación de nutrientes y metales pesados, señalando que el uso de células inmovilizadas ofrece una ventaja cuando se trabaja con biorreactores. Mientras que Moreno-Garrido (2008) realizó una revisión sobre la inmovilización de microalgas haciendo énfasis en las técnicas de inmovilización y sus usos generales, dentro de las cuales se mencionan la producción de metabolitos de interés, como una herramienta para manejar colecciones de microalgas, como fuente de energía, agentes de biorremediación, además de mencionar el uso de microalgas y bacterias co-inmovilizadas para el tratamiento de agua residual.

Por último de-Bashan & Bashan (2010), Realizaron una revisión extensa sobre los aspectos prácticos de la inmovilización de microalgas para eliminar contaminantes del agua, con énfasis en la eliminación de nutrientes y el uso de microalgas y bacterias co-inmovilizadas, mencionan también la eliminación de metales pesados y contaminantes industriales y ofrecen algunas recomendaciones sobre futuras investigaciones potenciales acerca del tema. En la Tabla II se mencionan más investigaciones relevantes sobre el uso de microalgas

inmovilizadas para biorremediación de aguas residuales, en la tabla se menciona la especie así como la matriz utilizada, su respectiva referencia y aplicación específica.

Tabla II. Investigaciones relevantes sobre el uso de microalgas inmovilizadas para biorremediación de aguas residuales.

Organismo	Matriz de inmovilización	Aplicación	Referencia
<i>Phormidium</i>	Quitosan	Eliminación de N	De la Nou & Pauw. (1988)
<i>Phormidium laminosum</i>	Laminas de polivinilo	Eliminación de NO ₃ , NO ₂ y PO ₄	Garbisu <i>et al.</i> (1994)
<i>Phormidium uncinatum</i>	Laminas de polivinilo	Eliminación de NO ₃	Gil & Serra (1993)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Chitosan y Konjac fluor	Eliminación de N y P	Kaya & Picard (1996)
<i>Phormidium laminosum</i>	Fibras huecas	Eliminación de NO ₃ y PO ₄	Sawayama <i>et al.</i> (1998)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Carragenina	Eliminación de N y P	Lau <i>et al.</i> (1997)
<i>S. intermedius</i>	Esferas de alginato	Eliminación de N y P	Jimenez-Perez <i>et al.</i> (2004).
<i>Nannochloris</i> sp			
<i>Nannochloropsis gaditana</i>	Esferas de alginato	Eliminación de metales	Moreno-Garrido <i>et al.</i> (2002)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esferas de alginato	Eliminación de N y P	Ruiz-Marin <i>et al.</i> (2010)
<i>S. obliquus</i>			
<i>Chlorella vulgaris</i>	Esferas de alginato	Eliminación de N y P	Tam & Wong. (2000)
<i>Chlorella vulgaris</i>	Alginato,	Eliminación de N y P	Travieso <i>et al.</i> (1996)
<i>Chlorella kessleri</i>	carragenano,		
<i>S. quadricauda</i>	poliestireno y poliuretano		
<i>Scenedesmus</i> sp.	Esferas de alginato	Eliminación de N y P	Zhang <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus bicellularis</i>	Alginato	Eliminación de N y P	Kaya <i>et al.</i> (1995)

2.3. Protección de células inmovilizadas contra estrés ambiental y depredación.

Cuando se trata de aplicaciones ambientales se sabe que los agentes inmovilizados se encuentran expuestos a condiciones ambientales muy variables (pH, desecación, temperatura, exposición a sustancias tóxicas y depredación). Los protozoarios son principales depredadores de algas unicelulares y filamentosas, bacterias y hongos (Mara & Hora, 2003, Hammer, 1977). Continuación se presentan las investigaciones más relevantes. Bailliez *et al.* (1985); realizaron un estudio sobre el crecimiento y la producción de hidrocarburos de la microalga *Botryococcus braunii*, estudiaron también la estructura de la esfera mediante microscopía electrónica de transmisión y barrido encontrando en la superficie una gran cantidad de protuberancias, las cuales suelen fracturarse debido al crecimiento de las colonias de microalga debajo, en algunos casos estas fracturas llevan a la

liberación de la microalga al medio, aunque solo un pequeño porcentaje de la biomasa logra liberarse (4%).

Kuek & Armitage (1985) examinaron con microscopía electrónica de barrido esferas de alginato con *Aspergillus phoenicus* inmovilizado, el trabajo se centra en el crecimiento del hongo dentro y en la superficie de la esfera, además del efecto de abrasión que sufre la esfera durante la incubación, al analizar las características de la esfera observaron unos surcos que se forman debido al proceso de endurecimiento, los cuales sirvieron como punto de referencia para estimar la abrasión en las esferas, mencionan que el deterioro es un proceso gradual que comienza con la pérdida de la capa más externa de alginato la cual es más bien una membrana diferente a las demás capas y que en corto plazo una agitación vigorosa aumenta el deterioro. Por su parte Daintry *et al.* (1985), investigaron la estabilidad de células de microalga inmovilizadas en alginato, al analizar mediante microscopía electrónica de barrido, observaron que en la superficie se forman protuberancias las cuales son debido al crecimiento de la microalga debajo, analizaron diferentes propiedades físicas del alginato cuando someten las esferas a diferentes pH y concentraciones de fosfato, logrando obtener esferas estables a un pH de 5.5 y 5 μ M de fosfato.

Chen & Huang (1987), analizaron el efecto del crecimiento de *Trichosporon cutaneum* en esferas de alginato de calcio, enfocándose en la estructura de la esfera y la difusión de oxígeno, al analizar mediante microscopía electrónica de barrido la superficie de la esfera encontraron que con el tiempo se forman unos poros en forma de cráteres los cuales pudieran ser una vía de escape de las células inmovilizadas.

van Elsas *et al.* (1992), investigaron la supervivencia y colonización de raíz por células encapsuladas en esferas de alginato de *Pseudomonas fluorescens*, después de ser introducidas al suelo. Estos autores sugirieron que las células del inoculante se encuentran protegidas por un periodo de tiempo extendido ya que al parecer las esferas actúan como un sitio de protección artificial a las células inmovilizadas.

Cassidy *et al.* (1996); hicieron una revisión sobre las aplicaciones ambientales de células inmovilizadas enfocándose en las aplicaciones en suelo. Señalaron que una de las

características de la esfera es la de brindar un microambiente a las células inmovilizadas, lo cual las protege de estrés ambiental (shock osmótico, térmico, cambios en el pH) además de brindar protección contra los depredadores (protozoarios) aunque también señalaron que existe poca evidencia que compruebe lo anterior.

Zohar-Perez *et al.* (2003), estudiaron la protección que brinda la matriz de alginato a los microorganismos inmovilizados contra la radiación UVC, concluyendo que la protección contra radiación UVC, esta determinada por las propiedades de transmisión UV, de la matriz seca, sugirieron que para una máxima protección, los microorganismos deberían ser inmovilizados en esferas de alginato-glicerol adicionadas con caolín.

Zohar-Perez *et al.* (2004), estudiaron mediante microscopia confocal laser la distribución de *E. coli* y *Trichoderma asperellum* inmovilizadas en esferas de alginato encontrando que esta no es homogénea.

2.4. Sistema co-inmovilizado de microalga-bacteria para tratamiento terciario de aguas residuales

A partir del año 2000 el grupo de microbiología ambiental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, propone la co-inmovilización de la microalga *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* con la bacteria promotora de crecimiento en plantas (PGPB) *A. brasilense* en esferas de alginato como una estrategia para el tratamiento terciario de aguas residuales. A partir de entonces el grupo ha realizado investigaciones encaminadas a un mejor entendimiento de la interacción microalga-bacteria y el mejoramiento del tratamiento terciario de depuración. Dentro de las investigaciones mas importantes para el presente trabajo se encuentra la de Gonzales & Bashan (2000), analizaron el efecto en el crecimiento de *C. vulgaris* cuando se encuentra co-inmovilizado con *A. brasilense* en esferas de alginato en medio residual sintético, encontrando que esta asociación producen un incremento significativo en el número de la microalgas.

Lebsky *et al.* (2001), analizaron la asociación del *C. vulgaris* cuando se encuentra inmovilizada con *Phyllobacterium marsinarun* en esferas de alginato y con *Azospirillum*

brasilense mediante microscopía de transmisión, realizaron un seguimiento de la interacción de los microorganismos dentro de la esfera por 10 días, sugiriendo que dependiendo de la bacteria utilizada el crecimiento de la microalga se afecta, cuando utilizaron *P. marsinarum* la microalga entra en un período de senescencia mientras que cuando se inmoviliza con *A. brasilense* permanece en una fase de crecimiento continuo.

de-Bashan *et al.* (2002^a), analizaron la eliminación de iones de fósforo y amonio de medio residual sintético por parte del sistema de co-inmovilizado, en tres condiciones de cultivo: en lote, continuo y semicontinuo, encontraron que la asociación promueve una mayor eliminación de estos iones, siendo la condición semicontinua la que mejor resultados ofrece seguida de las otras condiciones.

de-Bashan *et al.* (2002^b), analizaron el efecto del co-inmovilizado en tres cepas de *Chlorella* (*C. vulgaris* y *C. sorokiniana*) encontraron un cambio significativo en el crecimiento de las microalgas, variedad de ácidos grasos producidos, contenido de lípidos, citología de la célula y tamaño de las células lo que indica que la asociación induce cambios significativos en el metabolismo de la microalga.

de-Bashan *et al.* (2004), evaluaron el desempeño del sistema de co-inmovilizado en agua real proveniente la planta tratadora de aguas residuales de la Paz, BCS, México, encontraron que la asociación si promueve un incremento en la eliminación de amonio y fosfato del agua.

de-Bashan *et al.* (2005), analizaron el crecimiento y la capacidad de remover nitrógeno de *C. vulgaris* cuando se encuentra co-inmovilizada con *A. brasilense*, en ese estudio específicamente analizaron la respuesta a diferentes formas de nitrógeno: nitrito y amonio, pH y la presencia de una fuente de carbón, encontraron dos fenómenos independientes afectados directamente por estas variables, el primero un incremento en el tamaño en el número de microalgas sin un incremento en la capacidad de absorber nitrógeno por parte de las células individuales, o el segundo fenómeno un incremento en la capacidad de las células de absorber nitrógeno sin que esto conlleve a un incremento en la población total de las mismas.

Hernández *et al.* (2005), observaron que la absorción de fósforo y crecimiento de dos especies de *Chlorella* en MRS y co-inmovilizadas con *A. brasilense*, se ven significativamente incrementadas después de ser sometidas a un ayuno de tres días en solución salina, encontraron que la asociación con *A. brasilense* mitiga los efectos negativos del ayuno.

de-Bashan *et al.* (2008), realizaron un estudio del potencial de una cepa de *C. sorokiniana* aislada de la planta de tratamiento de agua residual de La Paz B.C.S., México, para resistir altas temperaturas y tolerancia a luz solar, encontraron que la microalga alcanza un mayor número de células a la temperatura de 40-42°C y la intensidad luminosa de 2500 $\mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, también encontraron que cuando la microalga se inmoviliza con *A. brasilense* la población de la microalga crece más rápido y además remueve más amonio que cuando se encuentra la microalga sola.

de-Bashan & Bashan (2008), proponen al sistema de co-inmovilizado *C. vulgaris*-*A. brasilense* como un modelo experimental para estudiar las interacciones planta bacteria sin la interferencia de contaminante bacterianos externos

Pérez-García *et al.* (2010), evaluaron la eliminación de nutrientes por parte del sistema de co-inmovilizado bajo diferentes regímenes de crecimiento en medio residual sintético, los regímenes evaluados fueron: autotrófico, mixotrófico y heterotrófico, encontraron que la mayor eficiencia para eliminar fosfatos ocurre en el tratamiento de *Chlorella*-*Azospirillum* bajo régimen autotrófico mientras que para la eliminación del amonio el tratamiento de *Chlorella* inmovilizada sola, fue el tratamiento más eficiente en régimen heterotrófico.

3. Justificación

Se han realizado un gran número de investigaciones sobre los usos de microalgas inmovilizadas para el tratamiento de agua residual, además de que se ha mencionado la protección que brinda la matriz de inmovilización contra la depredación y la competencia por parte de protozoarios y otras bacterias presentes en agua residual, sin embargo hasta la fecha esto no se ha comprobado. En el presente trabajo se utilizó como modelo el sistema de inmovilizado microalga-bacteria (*Chlorella-Azospirillum*) el cual ha comprobado ser eficiente en la eliminación de amonio y fósforo de un medio residual sintético, y aunque se han realizado estudios donde se indica su eficiencia en la eliminación de nutrientes del agua residual real, no existen trabajos donde se estudie la interacción de este sistema con los microorganismos presentes en el agua residual.

4. Objetivo

Determinar si la inmovilización de microorganismos para tratamiento de agua residual en esferas de alginato (*C. sorokiniana* UTEX 2805 y *A. brasilense* Cd DSM 1843) brinda algún tipo de protección contra las condiciones adversas (depredación y competencia) presentes en el agua residual doméstica.

Objetivos particulares

- a) Determinar si existe una reducción en la población de la microalga *C. sorokiniana* y la bacteria *A. brasilense* co-inmovilizadas en esferas de alginato debido a la exposición a agua residual doméstica
- b) Determinar el tipo de protección que ofrece la inmovilización de microorganismo en esferas de alginato.
- c) Analizar la eliminación de nutrientes del sistema microalga-bacteria en agua residual doméstica.

5. Hipótesis

La inmovilización de la bacteria *A. brasilense* y la microalga *C. sorokiniana* en esferas de alginato protege a estos microorganismos cuando se utilizan en el tratamiento de agua residual doméstica, actuando como una barrera física entre los dos microambientes, permitiendo así un tratamiento de agua residual ininterrumpido.

6. Materiales y métodos

6.1. Colecta de agua residual

La toma de muestra de agua residual doméstica se llevo a cabo en la "Planta de tratamiento de agua residual del municipio de La Paz, Baja California Sur, México". Se recolectaron 2 bidones con capacidad de 60 litros de la caja receptora de los efluentes procedentes de los sedimentadores secundarios, antes de recibir la inyección de cloro para su desinfección

6.1.1. Análisis del agua residual

El agua colectada se analizo en el laboratorio de análisis químico de aguas del CIBNOR para determinar la cantidad de nutrientes (NO_2 , NO_3 , NH_4^+ y PO_4^{3-}), y las variables físico-químicas (pH, conductividad, salinidad, sólidos suspendidos totales y sólidos disueltos).

6.2. Microorganismos, condiciones de cultivo y preparación del sistema microalga-bacteria

Se utilizo la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 y la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DMS 1843). Los microorganismos se cultivaron separadamente siguiendo la metodología descrita por de-Bashan *et al.* (2004) en detalle. La inmovilización de los microorganismos se realizó siguiendo la técnica descrita por de-Bashan *et al.* (2005), la cual consiste brevemente en mezclar 20 ml de cultivo axénico de *C. sorokiniana* con una concentración aproximada de 7.5×10^6 cel/ml con 80 ml de una solución estéril de alginato al 2%, (solución formada por alginato de media y alta viscosidad en una proporción de 3:1 respectivamente) esta solución se agito vigorosamente por 15 minutos hasta la homogenización. La solidificación del gel se realizó decantando gota a gota la solución alginato-células en una solución estéril de CaCl al 2% mediante una bomba peristáltica, Master Flex® (Mod. No. 7523-30. Barnant Co, Barrington U.S.A.) Se procedió de manera similar en el caso de *A. brasilense* partiendo de una concentración inicial de 10^9 UFC/ml. Para la preparación de los co-inmovilizados (*C. sorokiniana* y *A. brasilense*) se utilizo la misma concentración de ellos que la utilizada en los inmovilizados individuales, mezclada en una proporción de 1:1 (10 ml de cada uno).

Para determinar si existe una reducción en la población de *C. sorokiniana* y *A. brasilense* inmovilizadas y co-inmovilizada en esferas de alginato debido a la exposición a agua residual se determinó la población de los agentes de biorremediación de la siguiente manera

6.3. Conteo de microorganismos

Se realizaron conteos de microorganismos en la esfera (5 esferas disueltas cada una en 1ml de NaHCO₃ al 4%) y en el agua residual al comienzo del experimento y al final de cada ciclo de incubación (48 horas de tratamiento continuo). El tipo de conteo y su respectivo método se encuentran en la Tabla III. Para estas determinaciones se utilizaron un set de esferas lavadas con agua destilada estéril y otro no, esto para remover las posibles bacterias adheridas a la superficie de la esfera.

Tabla III. Conteo de microorganismos y su método de evaluación

Conteos	Método analítico
<i>A. brasilense</i> dentro de la esfera	Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en caja de petri
<i>C. sorokiniana</i> dentro de la esfera	Conteo directo en microscopio con cámara Neubauer (Bright line counting chamber, Hausser Scientific Company Harsham, PA, USA).
Bacterias heterotróficas cultivables en el agua	Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en caja de petri
Bacterias totales en el agua	Conteo directo de células viables teñidas con Fluorescein diacetato (FDA)
Bacterias heterotróficas cultivables dentro de la esfera	Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) en caja de petri
Bacterias totales dentro de las esferas	Conteo directo de células viables teñidas con Fluorescein diacetato (FDA)

6.4. Aislamientos, descripción e identificación de colonias

De las cajas utilizadas para realizar el conteo se realizaron aislamientos de las colonias encontradas (excepto *C. sorokiniana* y *A. brasilense*) de cada colonia se describió su forma, color, elevación y margen.

6.5. Determinación del tipo de protección que ofrece a los microorganismos la inmovilización en alginato

Se realizaron bioensayos para determinar si la esfera de alginato brinda algún tipo de protección física a los microorganismos inmovilizados en ella, el cual consistió en exponer a la microalga *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 y la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843) inmovilizados individual y conjuntamente en esferas de alginato, a una mezcla de agua residual doméstica y agua proveniente de una laguna de oxidación en una proporción 90-10% respectivamente. Se utilizó agua proveniente de una laguna de oxidación por la gran cantidad de protozoarios y microorganismos presentes en ella; para ejercer una presión por depredación y competencia contra los microorganismos inmovilizados.

6.5.1. Diseño experimental

Los tratamientos utilizados con su respectiva nomenclatura fueron los siguientes

1. Sin esferas ni organismos (**control**)
2. Esferas sin organismos inmovilizados (**esferas**)
3. Esferas con *C. sorokiniana* inmovilizado (**Cs**)
4. Esferas con *A. brasilense* inmovilizado (**Abras**)
5. Esferas con *C. sorokiniana* y *A. brasilense* co-inmovilizados (**Cs +Abrs**)

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de tipo erlenmeyer de 250 ml por quintuplicado los cuales se inocularon con 4 g de esferas y 100 ml de agua residual. Los matraces se colocaron en una incubadora con luz modelo INNOVA 4340 de New Brunswick Scientific equipada con lámparas fluorescentes (intensidad luminosa de 60 μ E

m^2s^{-1}), en agitación constante (120 r.p.m.) y temperatura constante de 27°C . Los experimentos se realizaron bajo condiciones de cultivo semi-continuas, es decir las esferas se mantuvieron en incubación durante 48 horas en agua residual doméstica (1 ciclo), después la solución se decantó para la realización de los análisis correspondientes y se les agregó una nueva cantidad de agua residual. Este procedimiento se repitió 2 veces.

6.5.2. Verificación de la presencia de protozoarios por microscopía óptica de luz

Para confirmar la presencia de protozoarios se tomaron muestras de agua de cada tratamiento al final de los ciclos de incubación y se observaron al microscopio óptico de luz (OLIMPUS BX41) con un aumento de 40x. Se tomaron micrografías de los protozoarios vivos para su posterior identificación.

6.5.3. Lavado de esferas

Para eliminar las posibles bacterias adheridas en la superficie de la esfera se les realizaron 3 lavados consecutivos con una solución estéril de tween 20 al 4% y posteriormente con una solución salina estéril al 0.85% hasta asegurarse de haber eliminado cualquier residuo de la solución.

6.5.4. Ubicación espacial de bacterias en las esferas de alginato mediante la técnica de Hibridización Fluorescente *In Situ* (FISH)

Al final del bioensayo se tomaron un set de esferas lavadas y otro sin lavar a los cuales se les realizó el procedimiento de la técnica de FISH (Rothballer *et al.*, 2003; Daims *et al.*, 2005) el cual consistió brevemente en los siguientes pasos:

Fijación: Las esferas frescas seleccionadas se cortaron con mucho cuidado en tres partes utilizando un bisturí y bajo la vista en estereoscopio. Estas partes fueron adheridas a portaobjetos de vidrio con agarosa al 2%. Las laminillas fueron previamente preparadas y limpiadas con una solución de KOH etanólico, y cubiertas con una solución de gelatina (0.1% p/v de gelatina y 0.01% p/v de sulfato crómico de potasio). Una vez adheridas las esferas a las laminillas se les agregó una gota de paraformaldehído (PFA) al 4% en frío, y

se dejaron en incubación a 4°C por 1 hora, una vez terminado este periodo se retiró el PFA y se lavaron 2 veces con una solución de NaCl₂ al 0.85%.

Deshidratación: posterior a la fijación las esferas se deshidrataron utilizando tres concentraciones de etanol: 50, 80 y 96% consecutivamente, dejando las muestras por tres minutos en cada solución de etanol. Una vez culminado este tiempo, las muestras se secaron a temperatura ambiente durante 20-30 minutos.

Hibridización: A las muestras deshidratadas se les agregaron 4 sondas, se utilizó una mezcla equimolar de las sondas EUB-338 I (Amann *et al.*, 1990), II y III (Daims *et al.*, 1999) las cuales combinadas tienen una especificidad para casi todo el dominio *Bacteria*, estas sondas contienen el fluorocromo Cy3 adherido el cual fluoresce de color rojo y la sonda Abras 1420 (Stoffels *et al.*, 2001) con especificidad para *Azospirillum brasilense*, la cual tiene adherido el fluorocromo FITC que fluoresce de color verde. 4µL de la mezcla de EUB-338 I-II-II, y 4µL de Abras 1420 se mezclaron con 40µL de buffer de hibridación (Tabla IV) los cuales se agregaron sobre la muestra, una vez terminado lo anterior las muestras fueron colocadas en tubos de 50 ml que contenían papel secante empapado con buffer de hibridación (sin sonda), los tubos se llevaron a una cámara de hibridación VWR (Modelo 5430) por espacio de 2-3 horas a una temperatura constante de 46°C (todo este paso se realizó bajo la menor intensidad luminosa posible).

Tabla IV. Composición de buffer de lavado y buffer de hibridación. (El porcentaje mostrado en la parte superior de la tabla indica la concentración de formamida correspondiente en el buffer).

	35%	
% Formamida	Buffer de hibridación	Buffer de lavado
5MNaCl	0.36 mL	0.7 mL
1M Tris-HCl	0.04 mL	1 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	-----	0.5 mL
Formamida	0.7 mL	-----
SDS 10%	0.002 mL	0.05 mL
H ₂ O desionizada	0.9 mL	Completar a 50 mL

Lavado de la hibridación: Al terminar el tiempo en la cámara de hibridación, las laminillas fueron sumergidas en tubos de 50 ml con un buffer de lavado (Tabla IV) durante

5 minutos, el cual se calentó previamente en baño maría a 48°C. Posteriormente, se detuvo la hibridización agregando a cada laminilla unas gotas de agua desionizada a una temperatura de 4°C; después las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y bajo oscuridad total por espacio de 30-40 minutos. Previo a su observación al microscopio, se adiciono a cada muestra una gota de protector de fluorescencia Citrifluor AF-1 (Electron Microscopy Sciences, Hattfield, PA).

6.5.5. Visualización

La detección de bacterias del agua residual dentro de la esfera se llevó a cabo empleando un microscopio óptico de fluorescencia (OLIMPUS BX41), con un lente de inmersión de aceite con una magnificación de 100x. La fluorescencia se detectó por 2 canales diferentes: **Cy3** con un rango máximo de excitación de luz de 552nm y un rango máximo de emisión de luz de 565 nm que manifiesta la fluorescencia detectada en color rojo y el canal **FITC** con un rango máximo de excitación de luz de 395-475nm y un rango máximo de emisión de luz de 510nm el cual manifiesta la fluorescencia detectada en color verde. La captura de imágenes se realizó con una cámara digital (Evolution VF) integrada al microscopio, y las micrografías se procesaron con el apoyo de un analizador de imágenes (Image Pro Plus 6.3.1.542). El procesamiento de las imágenes consistió en la sobreposición de las imágenes tomadas con el filtro Cy3 (rojo) y FITC (verde). Debido a la especificidad de las sondas utilizadas para *FISH*, la fluorescencia detectada con el filtro Cy3 (color rojo) corresponde a todas las bacterias presentes en la muestra, mientras que la fluorescencia detectada con el filtro FITC (color verde) corresponde solo a *A. brasilense*. Partiendo de esto entonces la sobreposición de las dos imágenes nos darán como resultado la identificación de *A. brasilense* en color amarillo mientras que el resto de las bacterias en color rojo (Figura 1). En el caso de la microalga esta emite fluorescencia en todos los filtros debido a la presencia de sus pigmentos.

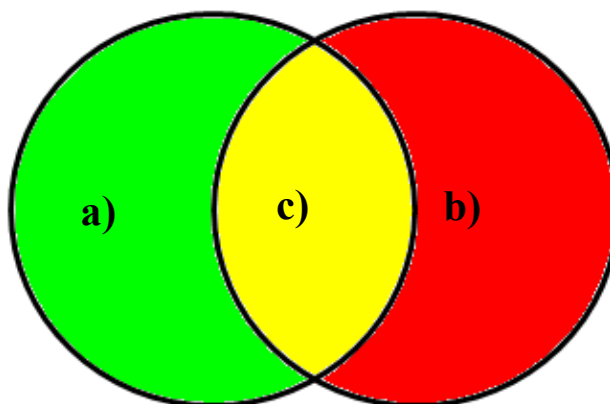


Figura 1. Representación gráfica del principio utilizado para la identificación de *A. brasilense* por FISH. a) Color verde correspondiente a la imagen tomada con el filtro FIT, b) Color verde correspondiente a la imagen tomada con el filtro Cy3. c) Color amarillo resultado de la superposición de las imágenes tomadas con los dos filtros.

6.5.6. Determinación del porcentaje de *A. brasilense* en las imágenes de fluorescencia

Se determinó el porcentaje de *A. brasilense* comparado con las demás bacterias en las imágenes superpuestas en amarillo, para esto se utilizó el software Orrala's micro-counting, el cual brevemente; consiste en un programa de reconocimiento de imágenes que identifica la matriz tricromática de la imagen (RGB; Red, Green, Blue), una vez hecho esto, superpone una capa de azul y transforma la imagen a un código binario para descartar el fondo de la imagen, después el usuario modifica el umbral de sensibilidad de acuerdo a lo observado en la imagen analizada y automáticamente el programa devuelve el porcentaje de fluorescencia de la imagen.

6.5.7. Visualización de la superficie de la esfera por SEM

Mediante microscopía electrónica de barrido se examinó la superficie de la esfera para detectar la presencia de poros y la población bacteriana en las esferas lavadas y sin lavar sobre la superficie de las esferas de alginato después de haber sido sometidas al tratamiento de depuración. Antes de ser observadas al microscopio las esferas fueron preparadas de la siguiente manera:

Fijación: las esferas se dejaron 5 horas en una solución de glutaraldehído al 5%, después de lavaron 2 veces con buffer HEPES 1 M a pH 7.2.

Deshidratación: después de haber sido lavadas las esferas se sometieron a un proceso de deshidratación el cual consistió en sumergirlas en soluciones de etanol con diferentes concentraciones, primero a 25% durante 10 minutos, después a 50% durante 30 minutos, 70% por 10 horas y al final en una solución de etanol al 100% durante 1 hora.

Secado: después de la deshidratación las muestras fueron deshidratadas hasta punto crítico utilizando un secador autosamdri-810 con dióxido de carbono líquido como fluido de transición.

Recubrimiento de metal y observación al microscopio electrónico: Las esferas fueron adheridas sobre una placa de aluminio las cuales fueron tratadas en un evaporador de vacío marca Denton Vacuum, modelo Desk II. Las muestras fueron retiradas hasta que alcanzaron los 50 mTorr de vacío; y, consecutivamente dentro del mismo aparato se recubrieron con iones Paladio a 40 mA durante 30 segundos por dos ocasiones. Las muestras se observaron con un microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3000N.

6.5.8. Experimento de células en suspensión

Se realizó un experimento con células de *A. brasilense* en suspensión para determinar la protección de la esfera de alginato, el experimento consistió en inocular 40 ml de MRS estéril con 5 ml de *A. brasilense* con una concentración de 1×10^9 y 5 ml de agua residual doméstica (sin esterilizar) proveniente de una laguna de oxidación, al control no se le adiciono agua de la laguna sino 5 ml de solución estéril de NaCl al 0.85%.

El experimento se realizó en matraces erlenmeyer de 150 ml, en agitación constante (120 r.p.m.) y una intensidad luminosa de $60 \mu\text{E m}^2\text{s}^{-1}$. Se monitoreó el crecimiento de *A. brasilense* a lo largo del tiempo (0, 2, 4, 6 y 24 horas de tiempo corrido)

6.6. Eliminación de nutrientes por sistema microalga-bacteria en agua residual doméstica

Se realizaron experimentos para determinar el desempeño del sistema en la eliminación de nutrientes del agua residual, los cuales consistieron en la inoculación de agua residual doméstica con los microorganismos *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 y la bacteria *Azospirillum brasilense* Cd (DSM 1843) inmovilizados en esferas de alginato.

Los experimentos de eliminación de nutrientes se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones que las descritas anteriormente con la excepción de que no hubo una mezcla con agua de la laguna de oxidación sino solo agua proveniente de la planta de tratamiento. La colecta de muestras para los análisis de nutrientes y las variables fisicoquímicas del agua se realizó al comienzo y el final de cada ciclo y se procedió de la misma manera con la toma de muestra de esferas para determinar el crecimiento celular de los microorganismos.

Se determinaron las variables de la Tabla V al comienzo del experimento y al final de cada ciclo para cada tratamiento, además del crecimiento celular de *C. sorokiniana* y *A. brasilense* por esfera.

Tabla V. Variables analizadas durante los experimento de eliminación de nutrientes

Variable	Método
pH	Potenciómetro convencional
Nitratos (NO_3)	Se determinó por el método de reducción de cadmio HACH® 1986
Amonio (NH_4^+)	Se determinó por el método colorimétrico del fenato (Solórzano, 1969) adaptado a microplaca por Hernández-López y Vargas-Albores (2003) a partir de muestras diluidas 1:100 en agua desionizada.
Fosfatos (PO_4^{3-})	Se determinó por el método del molibdovanaodato de amonio HACH® 1986

6.6.1. Cuento de microorganismos

Los conteos de *Chlorella sorokiniana* y *Azospirillum brasilense* se realizaron como se indica en la Tabla III.

6.6.2. Análisis cinéticos

A partir de los datos de crecimiento de *Chlorella sorokiniana* se calculó la afinidad por el sustrato (A_s) para el nutriente amonio y fosfato. La afinidad por el sustrato (también llamada actividad específica) es la cantidad de sustrato que cada célula está consumiendo por unidad de tiempo dado, los valores A_s reflejan la capacidad catalítica de la célula. Se expresa en ng por célula. Su cálculo se da a partir de la división de la cantidad de sustrato consumido ΔS en un intervalo de tiempo entre el número de células presentes al final del intervalo de tiempo (N_f) (Cooney, 1983):

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

(1)

6.6.3. Análisis estadísticos

Para la cuantificación *A. brasilense*, *C. sorokiniana*, eliminación de nutrientes, variación de pH, DQO se realizó un análisis de varianza de una vía ANDEVA con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ y una prueba de Tukey Pos Hoc, para ver si existen diferencias significativas dentro de los tratamientos. Se realizó una prueba *T de Student's* con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$ para ver si existen diferencias significativas entre tratamientos. Los resultados se analizaron con el software Statistica 6.0 de Windows, mientras que para la realización de las gráficas se utilizó el programa SIGMA PLOT 8.0. En los resultados se presenta el promedio más el error estándar.

7. Resultados

7.7. Análisis de agua residual

Los resultados del análisis preliminar del agua se muestran en la Tabla VI, donde la concentración de nutrientes fue de: 3.01 μM de nitratos, 100.38 μM de fosfatos y 2630 μM de amonio, mientras que el pH fue de 7.59, la salinidad de 1.1UPS, los sólidos suspendidos totales fueron 12.64 mg L^{-1} y la concentración de sólidos disueltos 944 mg L^{-1} .

Tabla VI. Resultados del análisis preliminar de agua realizado por el laboratorio de análisis químico de aguas del CIBNOR

Parámetro	Concentración
pH 7-10	7.59
Conductividad eléctrica mS/m	236.33
Salinidad UPS	1.1
Amonio μM	2630
Nitritos μM	1.18
Nitratos μM	3.01
Fosfatos μM	100.38
Fósforo total μM	101.40
Silicatos μM	1205
Dureza total mg L^{-1}	669.59
Alcalinidad CaCO_3 mg L^{-1}	422.37
Acidez CaCO_3 mg L^{-1}	63.92
Cloruros mg L^{-1}	391.40
Sulfatos mg L^{-1}	92.42
Sólidos suspendidos totales mg L^{-1}	12.64
Sólidos disueltos mg L^{-1}	944
Sólidos sedimentables mg L^{-1}	<0.100

Donde:

μM = micromoles por litro.

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

UPS = Unidades Practicas de Salinidad.

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

7.2. Conteo de *A. brasilense*

La figura 2 muestra el cambio en el número de UFC/esfera de *Azospirillum brasilense* a través del tiempo, existe una disminución en el número de UFC con respecto a la concentración inicial la cual fue de $5.61 \pm 1.2 \cdot 10^5$ UFC/esfera para el tratamiento de *Cs+Abras* y de $6.01 \pm 0.9 \cdot 10^5$ UFC/esfera para el tratamiento de *Abras*. La concentración al finalizar el segundo ciclo fue de $2.62 \pm 1.5 \cdot 10^5$ UFC/esfera para *Cs Abras* y de $3.6941 \pm 0.5 \cdot 10^5$ UFC/esfera para *Abras*. No hubo diferencia significativa entre tratamientos.

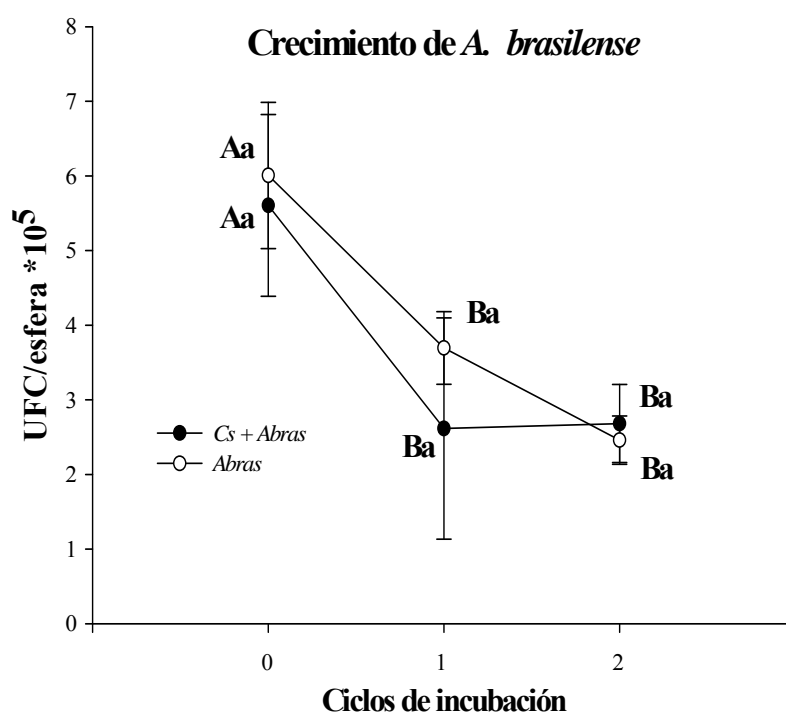


Figura 2. Grafica de crecimiento de *A. brasilense* a través del tiempo. Número de UFC/esfera de *A. brasilense* en el tratamiento *Cs+Abras* (—●—) y *Abras* (—○—). Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$. La diferencia entre letras minúsculas sobre cada punto denota una diferencia significativa entre tratamientos para una prueba *T de Student's* a $p \leq 0.05$

7.3. Número de bacterias totales en la esfera (*A. brasilense* + todas las demás)

Se determinó el número total de células de bacteria (*A. brasilense* + todas las demás) por esfera mediante la técnica de FDA, para los tratamientos de *Cs+Abras* y *Abras*. En la figura 3 se aprecia un aumento en la concentración de células, llegando a alcanzar un máximo de $6.62 \pm 0.7 \cdot 10^6$ células/esfera para el tratamiento de *Cs+Abras* y $6.5 \pm 0.4 \cdot 10^6$

células/esfera para el tratamiento de *Abras*, no hubo diferencia significativa entre tratamientos. Mientras que para el final del primer ciclo se presentaron diferencias significativas entre tratamientos con $3.63 \pm 0.2 \cdot 10^6$ células/esfera para *Cs+Abras* y $4.77 \pm 0.4 \cdot 10^6$ células/esfera para *Abras*, la concentración inicial fue de $2.25 \pm 0.3 \cdot 10^6$ células/esfera para *Cs+Abras* y $2.57 \pm 0.17 \cdot 10^6$ células/esfera para *Abras*, se encontró diferencia significativa entre tratamientos.

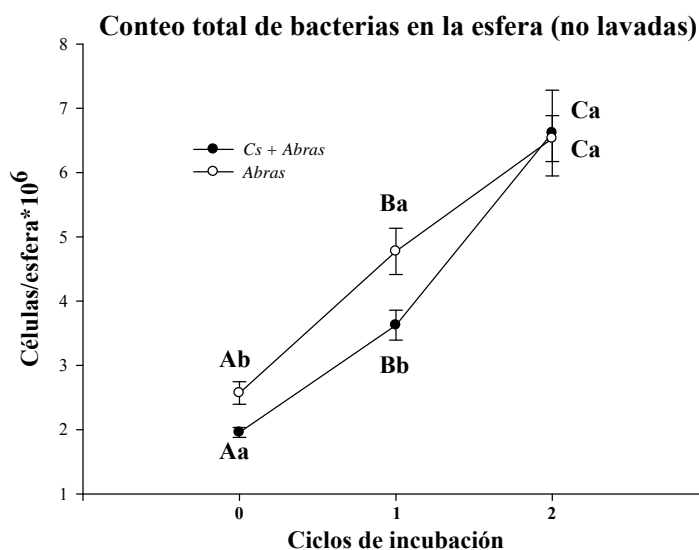


Figura 3. Número de células/esfera de bacterias totales en los tratamientos *Cs+Abras* (—●—) y *Abras* (—○—) para cada ciclo de incubación (esferas no lavadas). Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$. La diferencia entre letras minúsculas sobre cada punto denota una diferencia significativa entre tratamientos para una prueba T de Student's a $p \leq 0.05$.

Se determinó también el número de bacterias totales dentro de la esfera por tratamiento entre sets (lavadas vs no lavadas) el cual se presenta en la figura 4. En el tratamiento *Abras* (Fig. 4a), no se encontró diferencia significativa entre sets para ningún tiempo de muestreo, pero si se registro un aumento significativo dentro de los sets alcanzando un máximo de $6.52 \pm 0.4 \cdot 10^6$ células/esfera al 2 ciclo, $4.77 \pm 0.4 \cdot 10^6$ células/esfera al 1 ciclo y con una concentración inicial de $2.57 \pm 0.2 \cdot 10^6$ células/esfera. En el tratamiento *Cs+Abras* (Fig. 4b) se presentan diferencias significativas entre sets al final del 2 ciclo de incubación; el número de esferas para el set de esferas no lavadas fue de $6.61 \pm 0.7 \cdot 10^6$ células/esfera al 2 ciclo, $3.63 \pm 0.2 \cdot 10^6$ células/esfera al 1 ciclo y con una concentración inicial de $1.96 \pm$

$0.1 \cdot 10^6$ células/esfera. Mientras que número de esferas para el set de esferas lavadas fue de $4.41 \pm 0.3 \cdot 10^6$ células/esfera al 2 ciclo, $4.1 \pm 0.2 \cdot 10^6$ células/esfera al 1 ciclo y con una concentración inicial de $1.96 \pm 0.1 \cdot 10^6$ células/esfera.

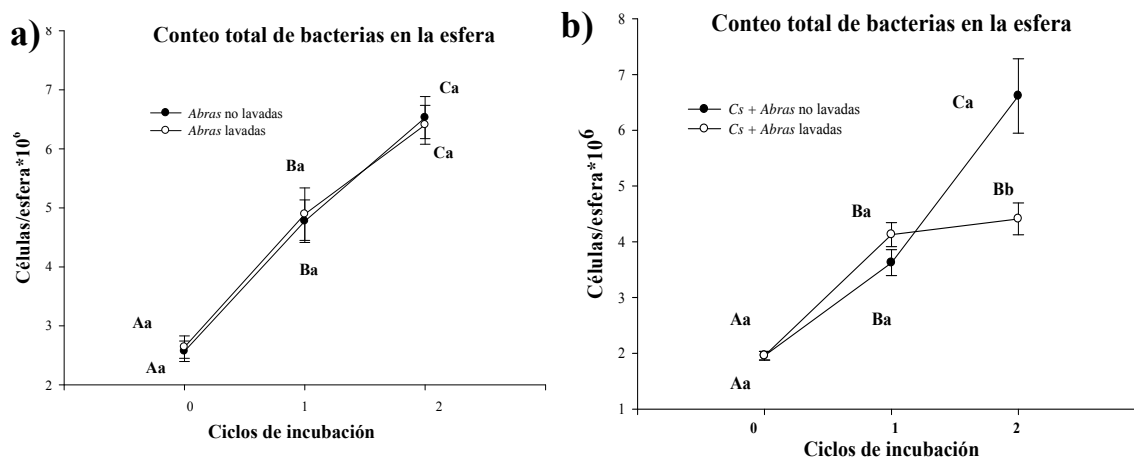


Figura 4. Número de células/esfera de bacterias totales. **a)** en los sets *Abrás* no lavadas (—●—) y lavadas (—○—) para cada ciclo de incubación. **b)** en el tratamiento *Cs+Abrás* no lavadas (—●—) y lavadas (—○—) para cada ciclo de incubación. Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$. La diferencia entre letras minúsculas sobre cada punto denota una diferencia significativa entre tratamientos para una prueba T de Student's a $p \leq 0.05$.

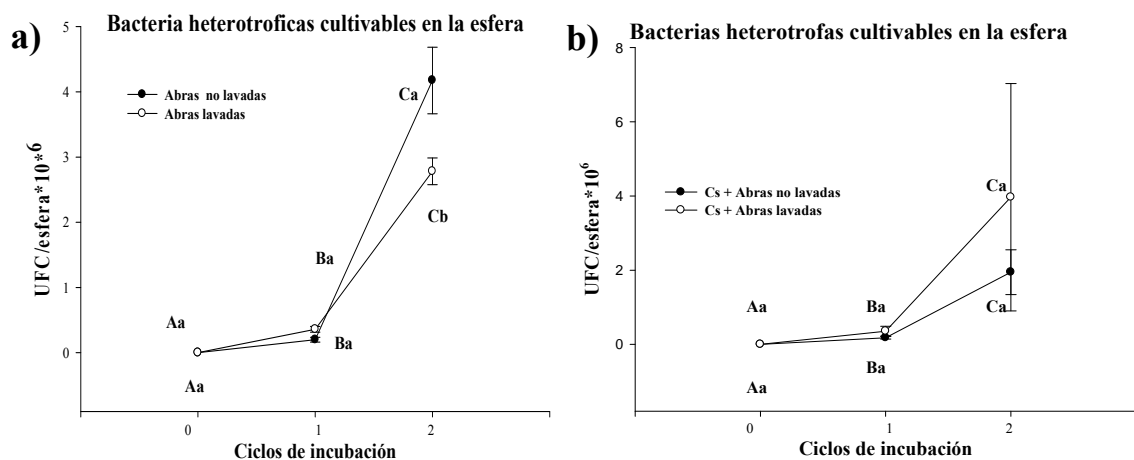


Figura 5. Número de UFC/esfera de bacterias totales. **a)** en los sets de *Abrás* no lavadas (—●—) y lavadas (—○—) para cada ciclo de incubación. **b)** en los sets de *Cs+Abrás* no lavadas (—●—) y lavadas (—○—) para cada ciclo de incubación. Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$. La diferencia entre letras minúsculas sobre cada punto denota una diferencia significativa entre tratamientos para una prueba T de Student's a $p \leq 0.05$.

7.3.1. Número de bacterias cultivables en las esferas (todas las bacterias excepto *A. brasilense*)

Se determinó el número de bacterias cultivables heterótrofas en las esferas por medio de recuento en placas de agar NB. La figura 5a corresponde al tratamiento *Abras* set de esferas lavadas y no lavadas, para este tratamiento no se encontró diferencias significativas entre sets al final del 2 ciclo de incubación. Se registró un aumento significativo dentro de los sets alcanzando un máximo de $4.17 \pm 0.5 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de esferas sin lavar y $2.78 \pm 0.2 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de lavadas. Al final del 1 ciclo se registro una concentración de $0.20 \pm 0.04 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set sin lavar y $0.36 \pm 0.04 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de lavadas, no hubo diferencias entre los sets. La figura 5b también muestra el número de bacterias cultivables dentro de la esfera para el tratamiento de *Cs+Abras* sets de esferas lavadas y no lavadas, se encontró un aumento significativo dentro de los sets, pero no se encontró una diferencia entre sets, al final del 2 ciclo se registro una concentración de de $1.95 \pm 0.6 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de esferas sin lavar y $3.95 \pm 3.06 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de lavadas. Al final del 1 ciclo se registro una concentración de $0.18 \pm 0.03 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de esferas sin lavar y $0.36 \pm 0.13 \cdot 10^6$ UFC/esfera para el set de lavadas.

7.3.2. Conteo de bacterias en el agua residual

Se determinó el número de bacterias totales en el agua residual mediante la técnica de FDA, que se presenta en la figura 6. La concentración inicial en el agua fue de $0.44 \pm 0.05 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, después del primer ciclo de incubación las concentraciones de los tratamientos fueron: *control* $0.69 \pm 0.08 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *esferas* $2.87 \pm 0.41 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *Cs* $1.98 \pm 0.09 \cdot 10^7$ células mL⁻¹. *Cs+Abras* $2.18 \pm 0.11 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *Abras* $0.013 \pm 0.001 \cdot 10^7$ células mL⁻¹. Para este ciclo de incubación no se encontró diferencias significativas entre la concentración inicial y los tratamientos *control* y *Abras*, pero estos si presentaron diferencias con respecto a los tratamientos de *esferas*, *Cs* y *Cs+Abras* (Fig. 6). Después del segundo ciclo de incubación las concentración de los tratamientos fueron: *control* $0.68 \pm 0.06 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *esferas* $2.26 \pm 0.09 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *Cs* $2.06 \pm 0.29 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *Cs+Abras* $0.02 \pm 0.001 \cdot 10^7$ células mL⁻¹, *Abras* $0.79 \pm 0.03 \cdot 10^7$

células mL^{-1} . Para este ciclo de incubación no se encontró diferencias significativas con respecto a la concentración inicial entre los tratamientos *control*, *esferas* y *abras*, pero estos si presentaron diferencias entre *Cs* y *Cs+Abrás*.

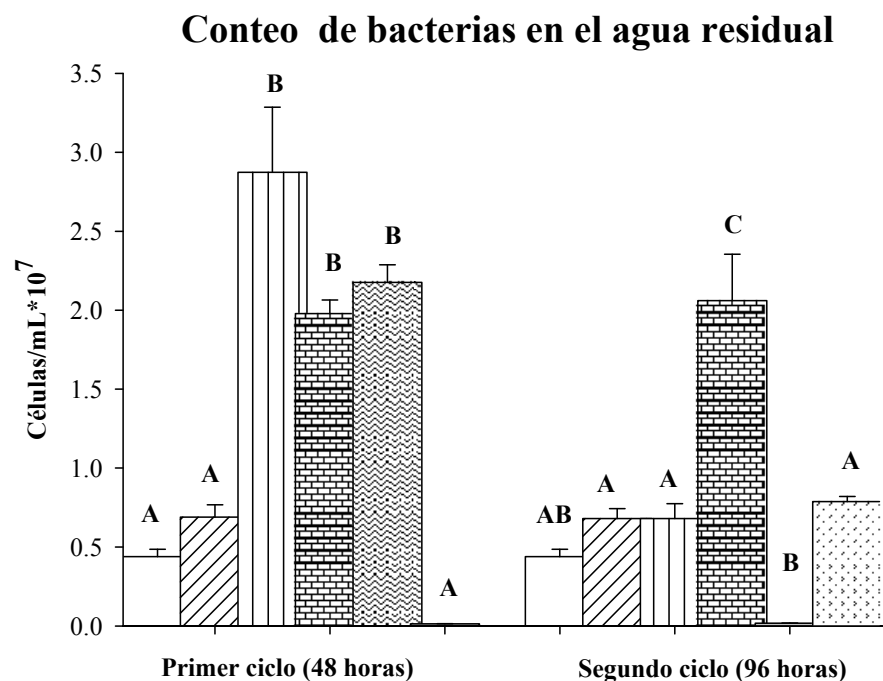


Figura 6. Conteo de bacterias en agua residual. □) Concentración inicial. ▨) *control* □) *esferas* ▩) *Cs* ▪) *Cs+Abrás* ▫) *Abrás*. Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$

7.4. Aislamientos, descripción e identificación de colonias

Se obtuvieron 4 morfotipos coloniales correspondientes a bacterias presentes en el agua residual de los cuales solo dos se pudieron aislar y resembrar en medio sólido. En la figura 7 se presentan los 2 morfotipos más abundantes y además los únicos que se pudieron aislar: una colonia amarilla y otra blanca, mientras que en la Tabla VI se presenta la descripción de las diferentes colonias observadas.

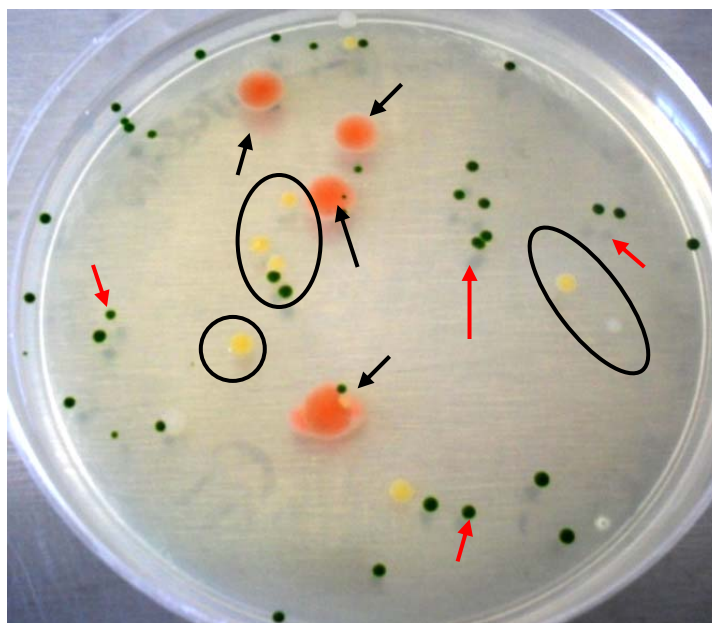


Figura 7. Imagen de los morfotipos coloniales obtenidos. Las colonias de *A. brasilense* y *C. sorokiniana* se encuentran señalados con una flecha negra y otra roja respectivamente, las colonias que se encuentran en círculos corresponden a los morfotipos aislados

Tabla VII Descripción de las diferentes colonias encontradas. En la tabla se registra el color, elevación, margen y forma además de la clave asignada para cada colonia

Clave	Color	Elevación	Margen	Forma
a1	amarillo	convexa	entero	circular
b1	blanco	plana	entero	circular
r2	Rosa tenue	plana	ondulado	irregular
b2	blanco	elevada	lobada	irregular

7.5. Determinación del tipo de protección que ofrece a los microorganismos la inmovilización en alginato (ubicación espacial de *Azospirillum brasilense* y otras bacterias en la esfera de alginato)

A partir de las imágenes de FISH sobrepuestas de las micrografías con los filtros Cy3 (rojo) y FITC (verde), se determinó la ubicación espacial de *A. brasilense* en la orilla y la parte mas interna de la esfera de alginato. En la figura 8 se muestra la orilla de la esfera de alginato en esferas lavadas y sin lavar con una solución de tween al 4%. Se distingue *A. brasilense* agrupado en agregados celulares mientras que las demás bacterias se encuentran dispersas o agrupadas en bandas. En la imagen se distingue la parte exterior a la esfera y la orilla de la misma. Los porcentajes de *A. brasilense* comparado con otras bacterias en las imágenes con esferas lavadas son de: a) 6.64%, b) 28.4%, c) 24.46%, d) 17.56% con un promedio de 19.27% mientras que en las esferas sin lavar los porcentajes son: e) 0.57%, f) 2.97%, g) 0.52%, h) 0.08%, con un promedio de 1.04%.

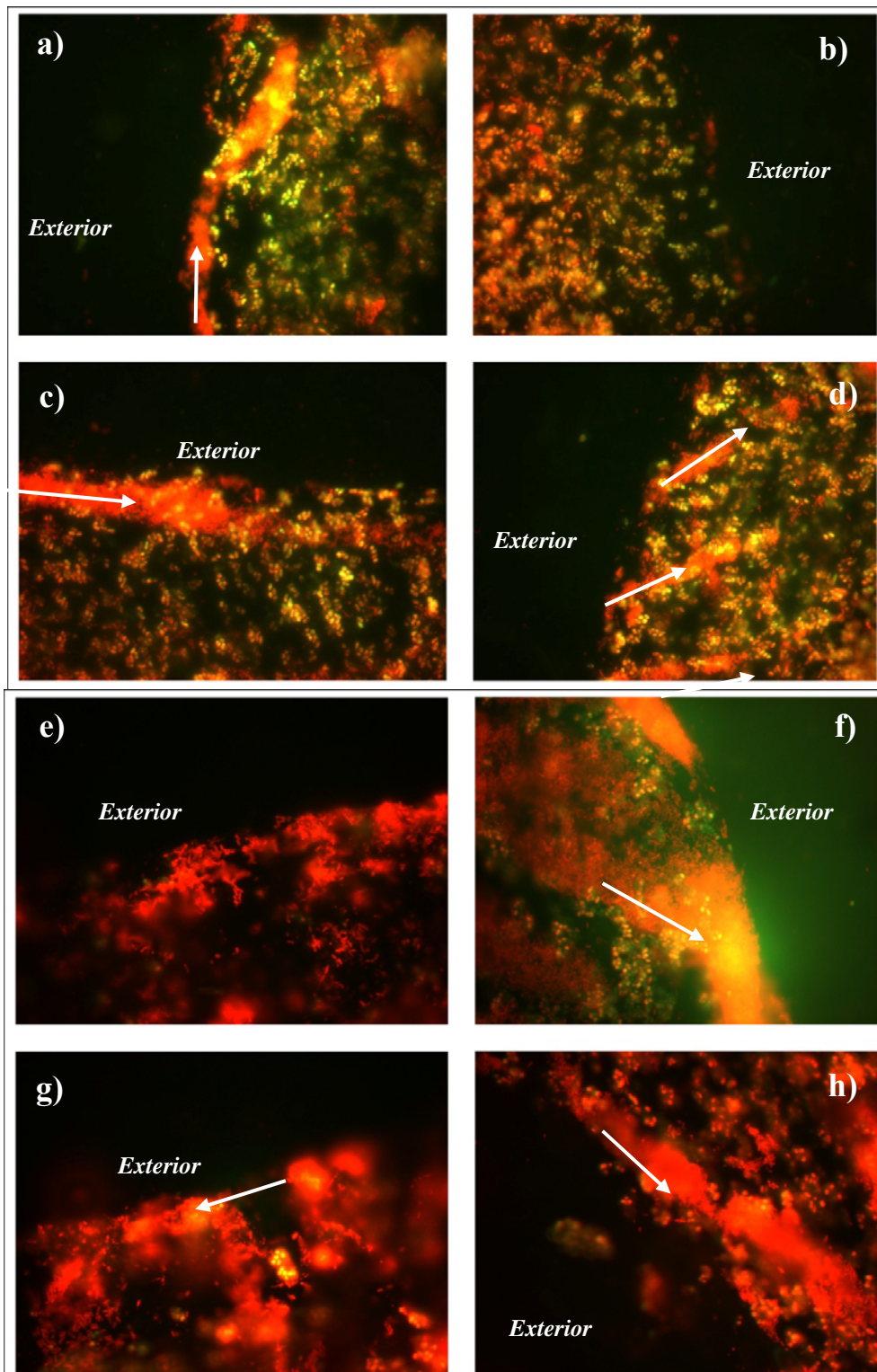


Figura 8. Superposición de imágenes de FISH de la orilla de esferas lavadas y sin lavar con tween después de 96 horas de tratamiento en agua residual. **a, b, c, d)** esferas lavadas. **e, f, g, h)** esferas sin lavar. *Azospirillum brasilense* se encuentra de color amarillo y de color rojo las demás bacterias. Las flechas de color blanco señalan el agrupamiento en bandas por parte de las bacterias que no son *A. brasilense*.

Las figuras 9a, b, c, d muestran el interior de la esfera de alginato lavadas con tween 20, mientras que las figuras 9e, f, g, h, corresponden a esferas sin lavar. En las esferas lavadas el porcentaje de *A. brasilense* es 11.8% para el inciso a, y 0.18% para el inciso c, En las figuras 9b, d, el porcentaje de *A. brasilense* es del 100%. En las imágenes se distingue *A. brasilense* formando clústeres mientras que las demás bacterias se encuentran dispersas (c) o agrupadas en bandas (a). En las esferas sin lavar (Fig.9e, f, g) solo se distingue la presencia de *A. brasilense*, mientras en la figura 8h se distinguen unas bandas en color rojo muy desvanecidas las cuales pueden indicar que se encuentran en otro plano de enfoque del microscopio (es decir en una región mas exterior de la esfera). Todas las imágenes de la figura 9 corresponden al tratamiento *Abras* excepto el inciso e, el cual corresponde al tratamiento de co-inmovilizado microalga-bacteria por lo que se puede distinguir a *C. sorokiniana* también de color amarillo, (la microalga tiene autofluorescencia debido a sus pigmentos por lo que emite fluorescencia en todos los canales) en la imagen se observa a la microalga formando clústeres al igual que la bacteria.

La figura 10, muestra la superposición de imágenes de fluorescencia para el tratamiento de *Cs+Abras*. En la figura se aprecia clústeres de *C. sorokiniana* y *A. brasilense* juntos. Para las figura 10a, b, c, d, e, f el porcentaje de *A. brasilense* es del 100%. Debido a la autofluorescencia de la microalga se dificulta observar la presencia de otras bacterias en los tratamientos que la contienen. Solo se presenta esta imagen a manera de ejemplificación con las micrografías más nítidas obtenidas.

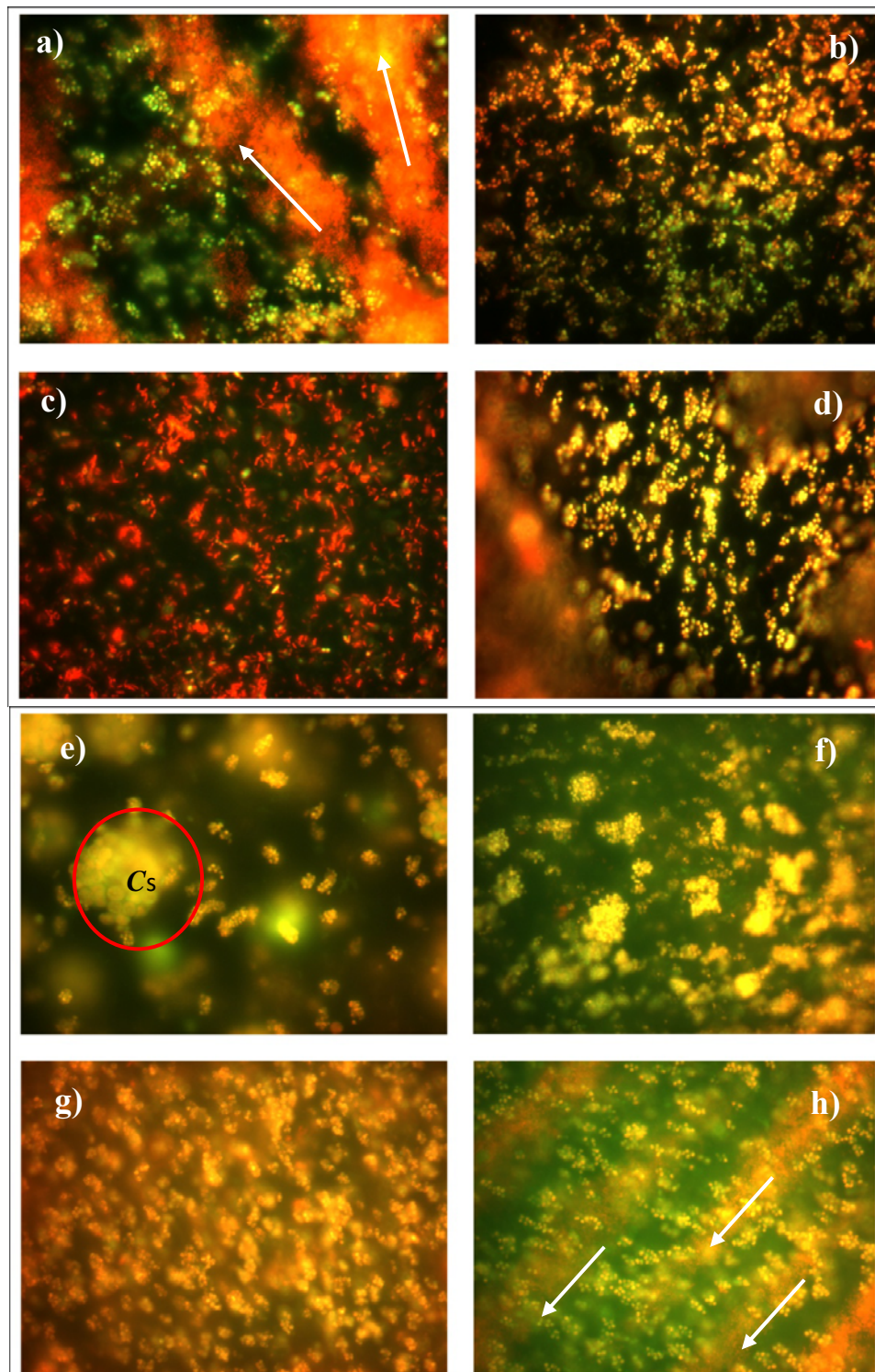


Figura 9. Superposición de imágenes de FISH del interior de esferas lavadas y sin lavar con tween después de 96 horas de tratamiento en agua residual. **a, b, c, d)** esferas lavadas. **e, f, g, h)** esferas sin lavar. El inciso **e** corresponde al tratamiento de *Cs+Abra* (*C. sorokiniana* se encuentra señalada en el círculo rojo). *Azospirillum brasilense* se encuentra de color amarillo y de color rojo las demás bacterias. Las flechas de color blanco señalan el agrupamiento en bandas por parte de las bacterias que no son *A. brasilense*.

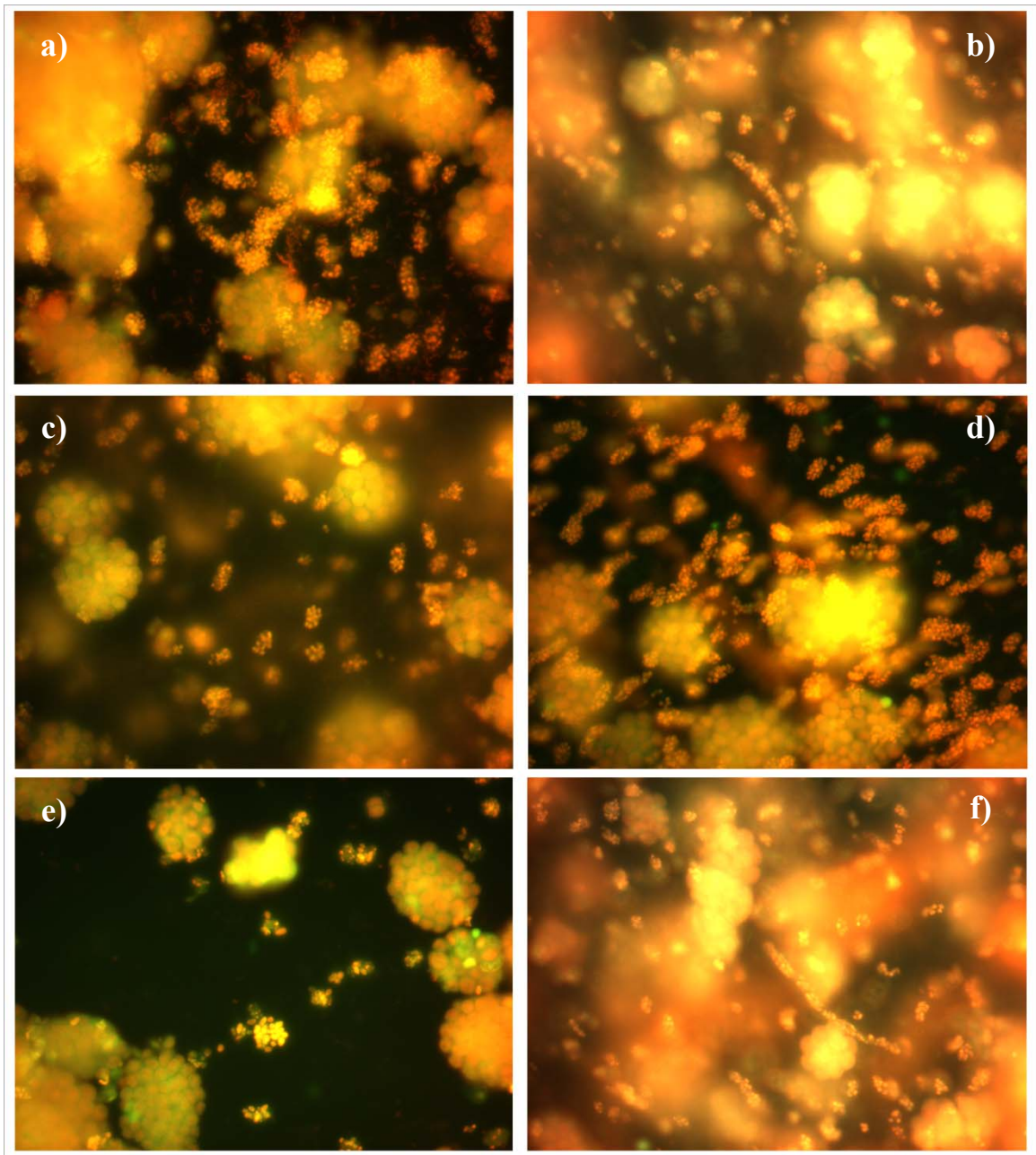


Figura 10. Superposición de imágenes de FISH del interior de esferas después del tratamiento en agua residual. *A. brasilense* y *C. sorokiniana* se encuentra de color amarillo mientras que las demás bacterias de color rojo.

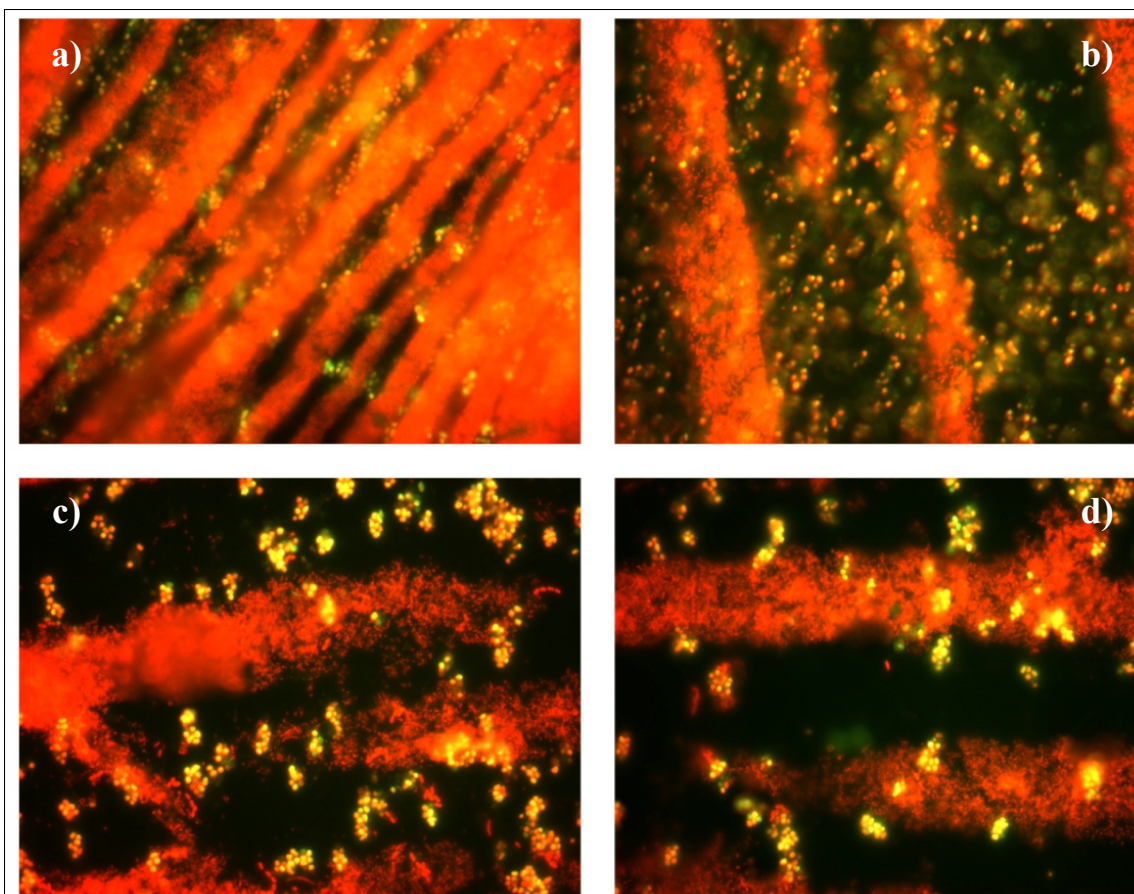


Figura 11. Superposición de imágenes de FISH. Patrón de bandas observado repetidas veces en las esferas. *Azospirillum brasilense* se encuentra de color amarillo y de color rojo las demás bacterias.

En muchas de las micrografías obtenidas se aprecian un patrón de agrupamiento en forma de bandas por las bacterias que no son *A. brasilense*, lo anterior se representa en la figura 11 donde esto se observa muy claramente. En algunas de las imágenes las bandas se encuentran en gran número y abarcando casi la totalidad de ella (Fig. 11a), el tamaño y el grosor de las mismas puede ser variable, en la figura se aprecia claramente los clústeres de *A. brasilense*. Como una manera de explicar el agrupamiento en bandas por parte de las bacterias que no son *A. brasilense* se analizó al microscopio estereoscópico esferas frescas y fijadas para FISH. Los resultados de las observaciones están representados en la figura 12, el inciso a) muestra una esfera fresca antes de ser sometida al tratamiento y la herramienta que se utiliza para su manipulación (una pinza), el inciso b) muestra una esfera seccionada para su posterior fijación, como se aprecia en la figura la esfera no es

unidimensional por lo que al ser un objeto esférico y el alginato transparente se pueden observar diferentes capas de la esfera al variar el enfoque en el microscopio. Los incisos c, d, e, f corresponden a esferas fijadas para FISH.

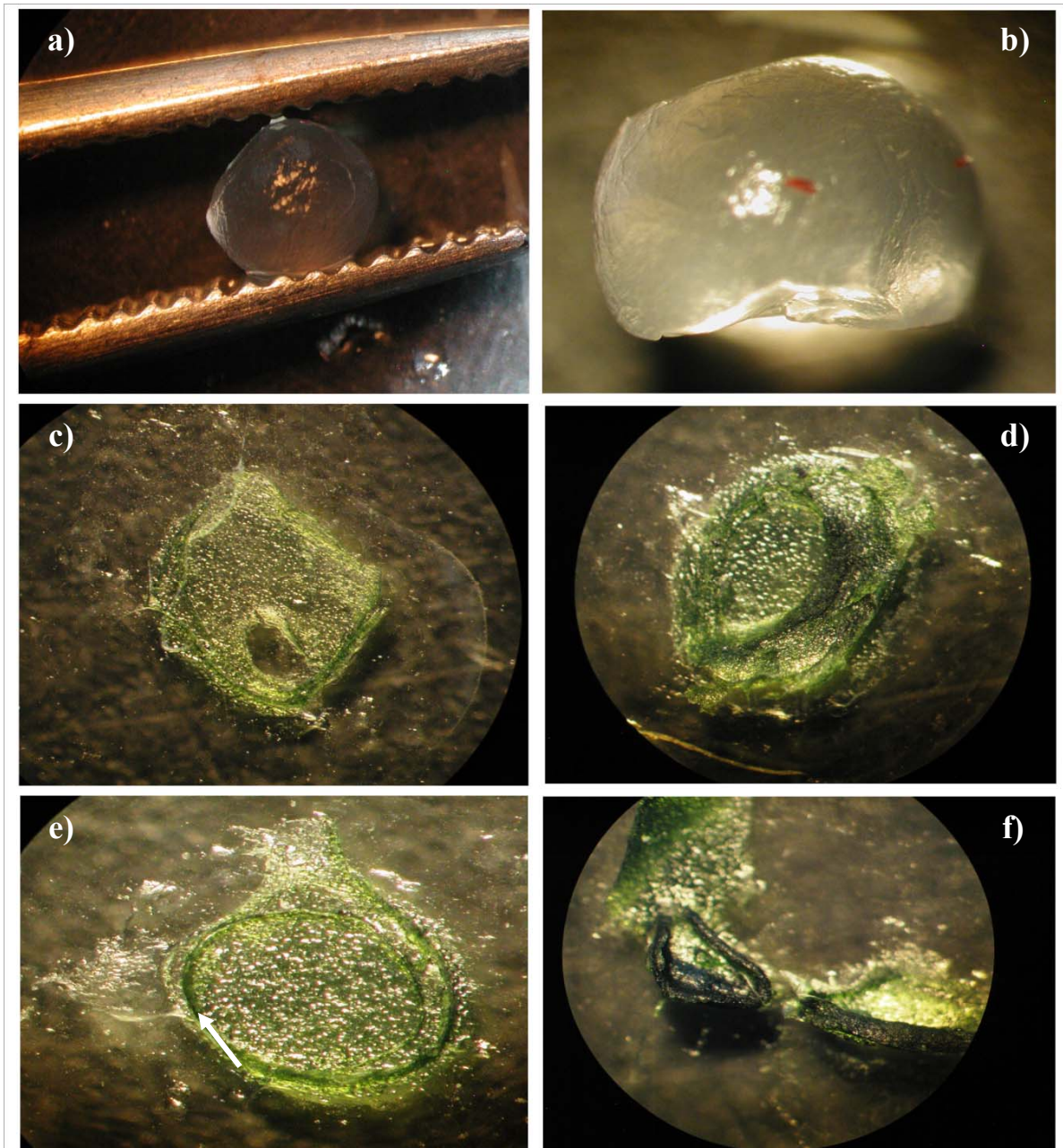


Figura 12. Imágenes de esferas de alginato después 96 horas de tratamiento de aguas residuales. **a)** esfera fresca siendo manipulada para su posterior fijación **b)** esfera seccionada **c) d) e) f)** esferas fijadas para FISH.

7.6. Observación de la superficie de la esfera de alginato por SEM

Se observó la superficie de la esfera de alginato para determinar si existen poros y si estos son lo suficientemente grandes para que bacterias presentes en el agua residual puedan penetrar dentro de la esfera a través de ellos. También se observó el incremento en el deterioro de la esfera. En figura 13 se presentan diferentes imágenes de la esfera de alginato en las cuales se aprecia después del primer ciclo de incubación (Fig. 13 a, c) y después del segundo ciclo (Fig. 13 b, d). En la figura 13a, b, se muestra la imagen de una esfera completa después del primer y segundo ciclo de incubación respectivamente; se puede distinguir una diferencia entre ciclos: mientras que después del primero la esfera presenta una forma bien definida y una superficie mas lisa, después del segundo ciclo se observa que la esfera presenta hundimientos y comparada con el primer ciclo la superficie es mucho mas rugosa. En los incisos c, d, se aprecian mejor la superficie. También se observaron en la esfera pequeñas protuberancias esféricas las cuales sobresalen de la superficie como pequeños abultamientos los cuales contienen *C. sorokiniana* en su interior (inciso c). En la imagen del inciso d (96 horas), no se distinguen estos abultamientos debido a lo que parece ser el desgaste en la superficie de la esfera, la cual se observa muy rugosa comparada con la imagen de las 48 horas. Al realizar un acercamiento a la esfera se observa la presencia de bacterias sobre su superficie (incisos e, f) se distinguen diferentes morfologías celulares como cocos, bacilos, espirilos y bastones. El inciso e muestra un acercamiento a la superficie de la esfera después de 48 horas de tratamiento, en la imagen se observan algunas bacterias y los abultamientos de microalga mientras que en inciso f que corresponde después de 96 horas de tratamiento residual, se observan una cantidad muy grande de bacterias comparada con el inciso e, las bacterias cubren en su totalidad la superficie de la esfera evitando la observación de detalles de la misma.

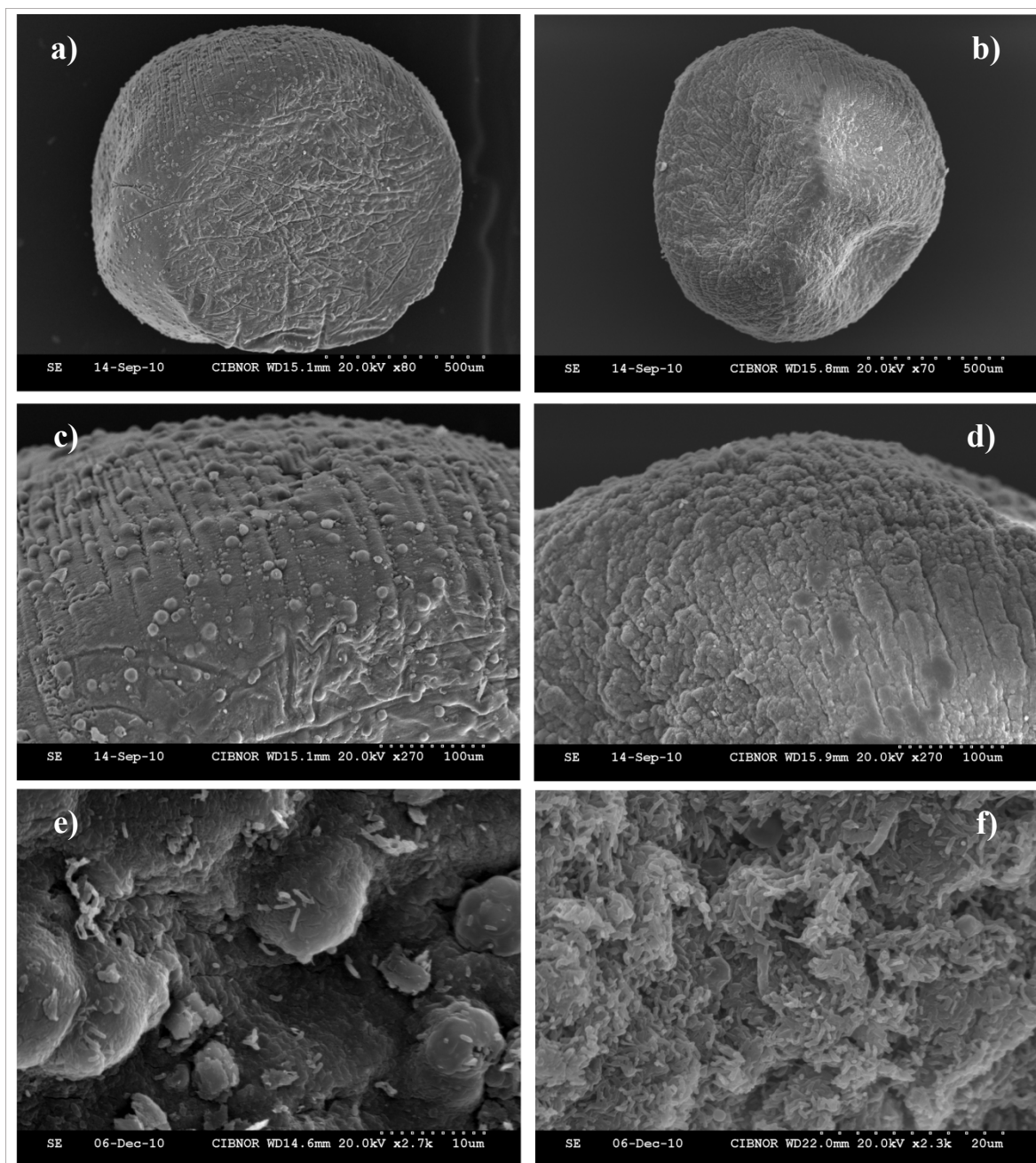


Figura 13. Micrografías SEM de las esferas de alginato después del tratamiento en agua residual **a)** imagen de la esfera completa después del primer ciclo de incubación. **b)** imagen de la esfera completa después del segundo ciclo de incubación. **c)** imagen de la superficie de la esfera después del primer ciclo de incubación **d)** imagen de la superficie de la esfera después del segundo ciclo de incubación. **e)** después de 48 horas de tratamiento. **f)** después de 96 horas de tratamiento.

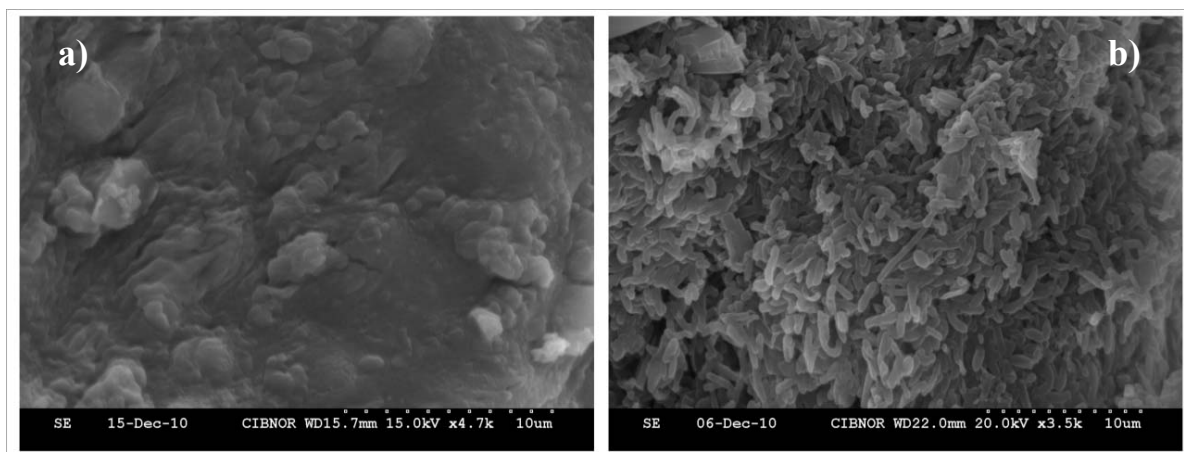


Figura 14. Micrografías SEM de las esferas de alginato después de 96 horas de tratamiento en agua residual. a) esfera lavada. b) esfera sin lavar.

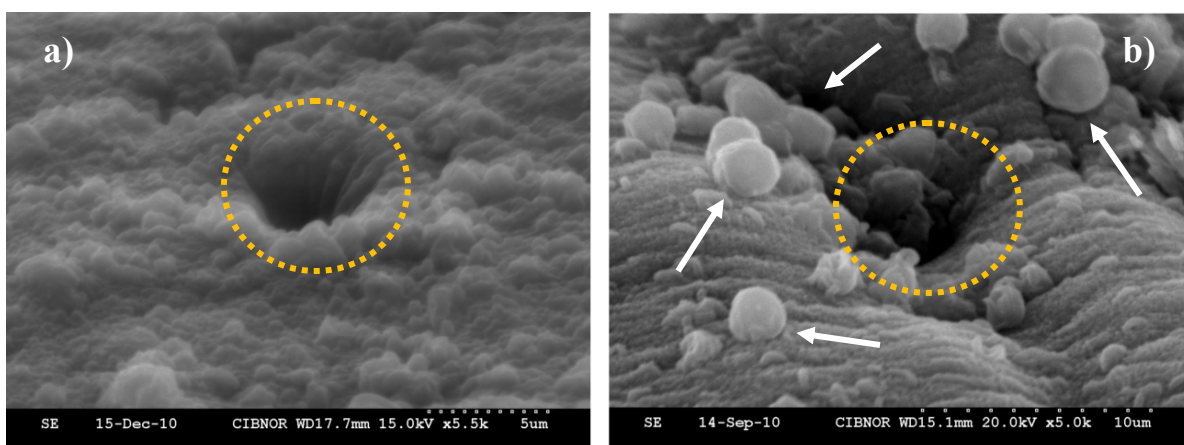


Figura 15. Micrografías SEM de las esferas de alginato después del tratamiento en agua residual. a) orificios de la esfera. b) orificio en la superficie de la esfera (se encuentra resaltada en un círculo amarillo) las flechas blancas señalan las presuntas células eucariotas.

Se observaron también en el microscopio electrónico un set de esferas lavadas con solución tween 20 esto para tratar de eliminar bacterias adheridas a la superficie de la esfera. El tratamiento corresponde al de *Abras* después de 96 horas en agua residual. En la figura 14 se observa la diferencia después del lavado con tween (inciso a), mientras que en las esferas sin lavar se siguen observando una gran cantidad de bacterias adheridas (inciso b), en el set de esferas lavadas hay muy pocas bacterias adheridas.

Se inspecciono la superficie de la esfera en busca de orificios por los cuales las bacterias presentes en el agua residual pueden penetrar al interior de las esferas. Se encontraron

orificios a lo largo de la esfera, de tamaño promedio de $0.514 \pm 0.132\mu\text{m}$. La figura 14 muestra dos de estos orificios en el inciso b se muestra lo que parece bacterias que se encuentran atoradas en la entrada del orificio, en la imagen se muestran también una células redondas de gran tamaño las cuales parecen pertenecer a células eucariotas posiblemente de microalgas presentes en el agua residual.

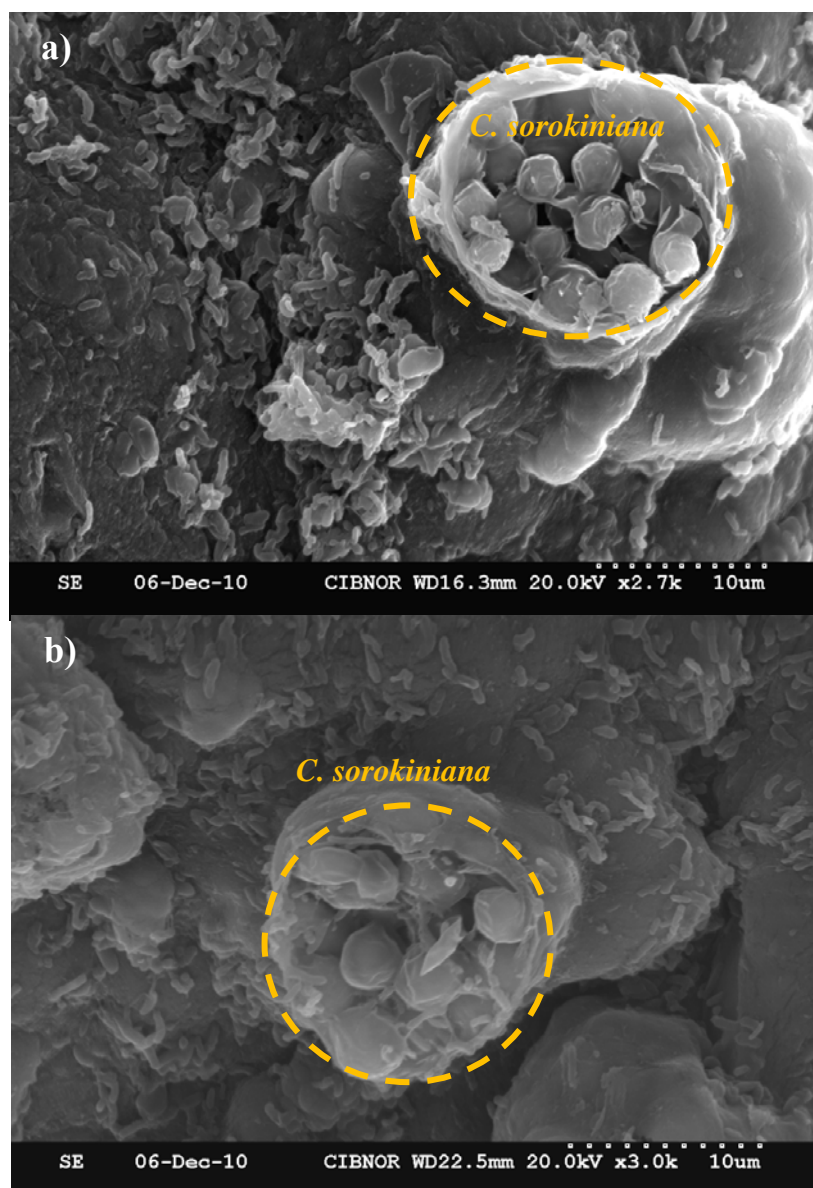


Figura 16. Micrografías de las esferas de alginato después de 48 y 96 horas de tratamiento en agua residual

Al inspeccionar las esferas al microscopio electrónico se observó que sobre la superficie tiene unos pequeños abultamientos formados debido al crecimiento de *C. sorokiniana* en el interior de la esfera. La figura 16 muestra estos abultamientos mas de cerca; la imagen corresponde a abultamientos fracturados es decir se puede ver que en su interior se encuentra *C. sorokiniana* formando agrupaciones, también se distingue algunas bacterias dentro de los abultamientos las cuales pudieran corresponder a *A. brasilense*. Se observan en las figuras una gran cantidad de bacterias en el exterior las cuales presentan diferentes morfologías celulares como cocos, bacilos, espirilos y bastones. La imagen muestra la posibilidad de la función del alginato como una barrera física que deja a los microorganismos externos fuera mientras que conserva a los microorganismos agentes de biorremediación (microalga-bacteria) dentro.

7.7. Verificación de la presencia de protozoarios por microscopia óptica de luz

Al término de cada ciclo de cultivo se tomaron muestras de agua las cuales se observaron al microscopio óptico para verificar la presencia de protozoarios los cuales pudieran ejercer una presión por depredación sobre los agentes de biorremediación (microalga y bacteria). Se encontraron una gran cantidad de microorganismos después de cada ciclo de incubación, en la figura 17 se muestran los mas abundantes, los cuales fueron: paramecios (a), cianobacterias (b), *Euplotes* sp. (c), gusanos segmentados (d), amiba de vida libre (e), protozooario sin identificar (f).

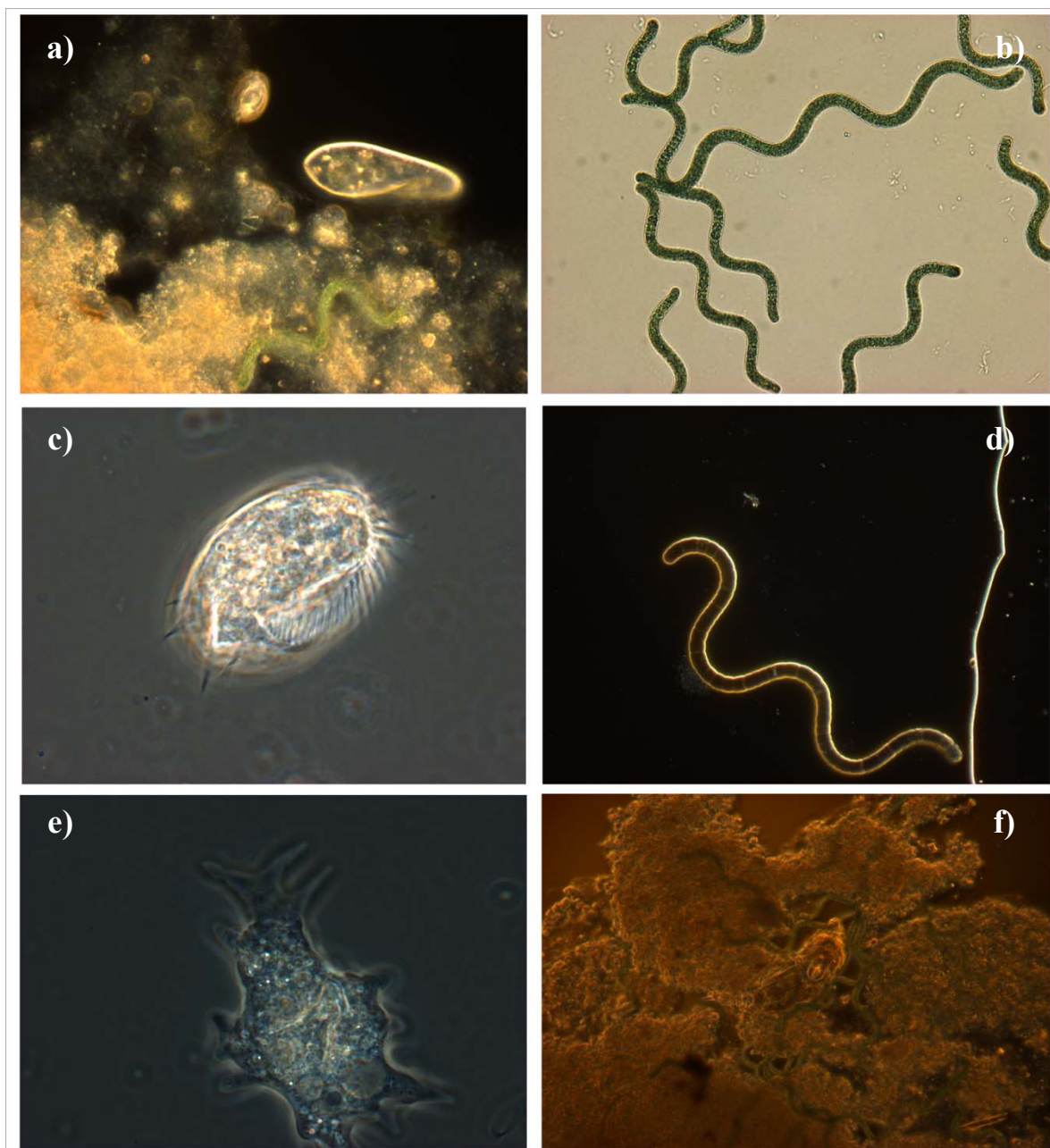


Figura 17. Microorganismos más representativos presentes en el tratamiento de agua residual a) paramecium, 40x. b) cianobacterias 40x. c) Euplotes, 100x. d) gusano segmentado, 40x. e) amiba de vida libre, 100x. f) protozooario sin identificar, 100x.

7.8. Experimento en suspensión

El bioensayo con células de *A. brasilense* en suspensión para determinar si estas sufrían un efecto negativo en su crecimiento, debido a la depredación y competencia de parte de los microorganismos presentes en el agua residual. Se encontró que el tratamiento de *A.*

brasilense presenta un aumento en el número de UFC a través del tiempo aunque es significativamente menor que en el control (*A. brasilense* en MRS) la concentración inicial promedio fue de $2 \cdot 10^7$ UFC ml⁻¹ y un máximo de $4.2 \cdot 10^7$ UFC ml⁻¹ para el tratamiento control mientras que para el tratamiento de *A. brasilense* en agua residual doméstica, fue de $3 \cdot 10^7$ UFC ml⁻¹, en la figura 18 se muestra la grafica que ejemplifica mejor el resultado.

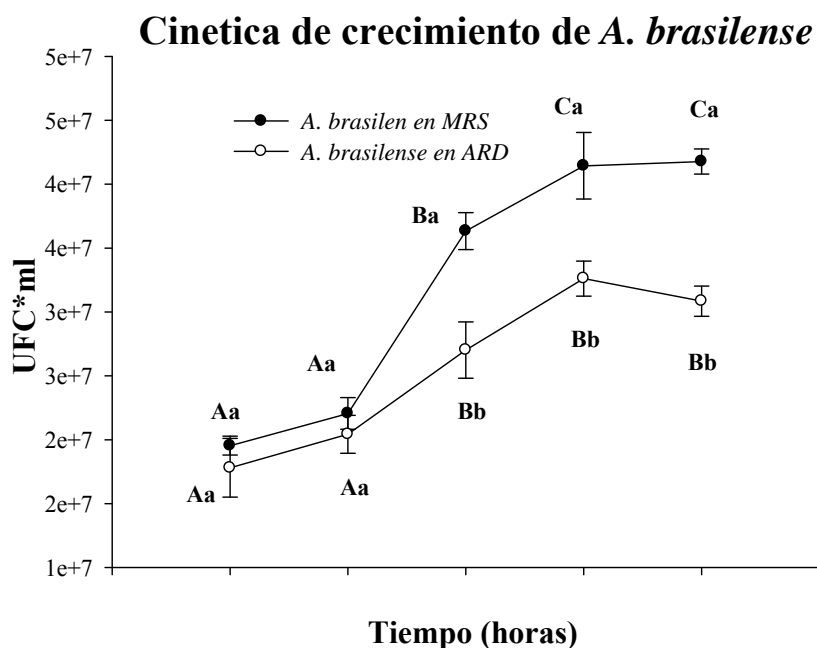


Figura 18. Crecimiento de células de *A. brasilense* en suspensión

7.9. Eliminación de nutrientes por el sistema microalga-bacteria en agua residual doméstica.

7.9.1. Crecimiento de *C. sorokiniana*

Se determinó el crecimiento de *C. sorokiniana* a través del tiempo cuando se encuentra inmovilizada sola y con *A. brasilense* (Figura 19). La mayor densidad de células se registró al finalizar el segundo ciclo de cultivo (96 horas) con $4.32 \pm 0.1 \cdot 10^6$ células/esfera y $5.21 \pm 0.2 \cdot 10^6$ células/esfera para los tratamientos de *Cs* y *Cs+Abras* respectivamente, se encontró diferencia significativa entre tratamientos. Al finalizar el primer ciclo se registró una densidad celular de $1.92 \pm 0.07 \cdot 10^6$ células/esfera para *Cs* y $1.58 \pm 0.07 \cdot 10^6$ células/esfera para *Cs+Abras* respectivamente, Se encontró diferencias significativas entre tratamientos.

La Figura 19b muestra el cambio en el número de UFC/esfera de *Azospirillum brasilense* a través del tiempo, existe una disminución en el número de UFC con respecto a la concentración inicial la cual fue de $2.63 \pm 0.4 \cdot 10^5$ UFC/esfera para el tratamiento de *Cs+Abras* y de $2.54 \pm 0.9 \cdot 10^5$ UFC/esfera para el tratamiento de *Abras*. La concentración al finalizar el segundo ciclo fue de $1.89 \pm 0.19 \cdot 10^5$ UFC/esfera para *Cs+Abras* y de $2.0 \pm 0.26 \cdot 10^5$ UFC/esfera para *Abras*. No hubo diferencia significativa entre tratamientos

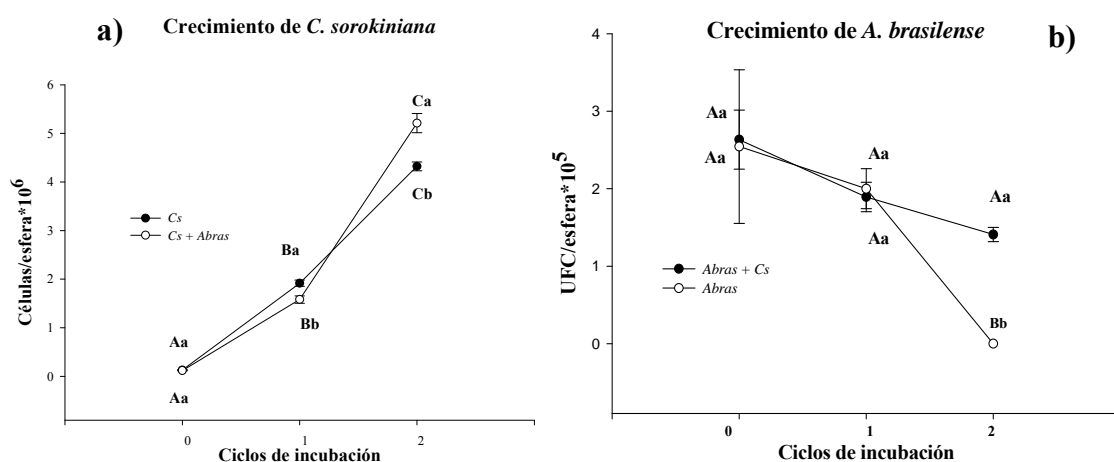


Figura 19 Grafica de cambio en el crecimiento de los microorganismos a través del tiempo. Número de células/esfera de *C. sorokiniana* en el tratamiento *Cs* (—●—) y *Cs+Abras* (—○—). **b)** Número de UFC/esfera de *A. brasilense* en el tratamiento *Cs+Abras* (—●—) y *Abras* (—○—). Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$. La diferencia entre letras minúsculas sobre cada punto denota una diferencia significativa entre tratamientos para una prueba *T de Student's* a $p \leq 0.05$

7.9.2. Eliminación de nutrientes en agua residual

Se determino la eliminación de amonio y fosfato en agua residual. El porcentaje de eliminación para el fosfato varió entre los tratamientos, siendo mayor en los tratamientos con *C. sorokiniana*; después del primer ciclo la mayor eliminación fue *Cs* con $64.6 \pm 2.33\%$ seguido de *Cs+Abras* con $52.2 \pm 2.42\%$ no hubo diferencia entre los demás tratamientos (Tabla VIII), para el 2º ciclo de incubación la mayor eliminación fue por parte del tratamiento *Cs+Abras* con $65.2 \pm 3.7\%$ el tratamiento de *Cs* también presento una eliminación considerable de $49.1 \pm 8.2\%$ pero esta no fue significativamente diferente de los demás tratamientos, en todos los casos hubo eliminación de fosfato.

Tabla VIII. Tratamientos y su porcentaje de eliminación de fosfato del agua residual (los valores de la tabla corresponden a los promedios de los resultados de dos replicas)

Tratamiento	48 horas	96 horas
Control	13.2 ± 4.25 ^a	36.2 ± 1.8 ^{ab}
esferas	25.0 ± 6.32 ^a	38.4 ± 3.0 ^{ab}
<i>Cs</i>	64.6 ± 2.33^b	49.1 ± 8.2^b
<i>Cs+Abras</i>	52.2 ± 2.42^c	65.2 ± 3.7^c
<i>Abras</i>	21.7 ± 6.47 ^a	29.8 ± 4.0 ^a

El porcentaje de eliminación de amonio fue diferente entre las replicas del experimento es por eso que se muestran los resultados de réplicas (Tabla IX). Los resultados del análisis de amonio fueron muy variables debido a que el amonio es un ion muy volátil. El porcentaje de eliminación de amonio después del primer ciclo para la réplica 1 fue mayor en los tratamientos de *Cs* y *Cs+Abras*, con 41.43 ± 3 y 34.13 ± 4.5 , respectivamente, no se encontraron diferencias significativas entre ellos; en los demás tratamientos tampoco se encontraron diferencias significativas. Después del segundo ciclo de incubación el tratamiento que más amonio eliminó fue el de *Cs+Abras* el cual tuvo un porcentaje de $79.9 \pm 3.3\%$, seguido de los tratamientos de solo esferas, *Cs* y *Abras* los cuales no presentaron diferencias significativas; el tratamiento control (solo agua) mostro un valor negativo, es decir una acumulación de amonio de 31.95 ± 3.5 porciento, siendo el único caso donde ocurrió. En la segunda replica la mayor eliminación de amonio sucedió en el tratamiento de *Cs* 82.6 ± 1 seguido por *Cs+Abras* 75.6 ± 1.2 , los demás tratamientos no mostraron diferencias significativas entre ellos, para el segundo ciclo de incubación la mayor eliminación ocurrió en el tratamiento de *Cs* con 75.6 ± 1.2 y *Abras* con 77.56 ± 2 no encontrándose diferencia entre estos dos tratamientos, porcentaje para los demás tratamientos fue menor y no se encontró diferencias entre ellos. En todos los casos hubo eliminación de amonio excepto en el tratamiento control de la primera replica, segundo ciclo.

Tabla IX. Tratamientos y su porcentaje de eliminación de amonio del agua residual

Tratamiento	48 horas	96 horas
Control	15.9 ± 2.6 ^a	-31.9 ± 3.5 ^a
esferas	22.1 ± 3.6 ^a	40.3 ± 5.2 ^b
<i>Cs</i>	41.4 ± 3.0^b	42.4 ± 5.3^b
<i>Cs+Abras</i>	34.1 ± 4.5^b	79.9 ± 3.3^c
<i>Abras</i>	41.5 ± 2.6 ^b	42.8 ± 2.9 ^b
2da replica		
Control	64.1 ± 1.7 ^a	67.3 ± 2.0 ^a
esferas	66.6 ± 2.0 ^a	68.5 ± 3.3 ^a
<i>Cs</i>	82.6 ± 1.0^b	82.5 ± 2.4^b
<i>Cs+Abras</i>	75.6 ± 1.2^c	74.8 ± 3.3^a
<i>Abras</i>	66.7 ± 1.9 ^a	77.6 ± 2.0 ^b

7.9.3. Afinidad por el sustrato

Se determino la afinidad por el sustrato por célula de *C. sorokiniana* para fosfato y amonio. No hubieron diferencias significativas entre tratamientos en la afinidad por el fosfato siendo mayor después del primer ciclo de incubación, con $3.58 \pm 0.13 \text{pg}^* \text{célula}$ para *Cs* y $3.6 \pm 0.17 \text{pg}^* \text{célula}$ para *Cs+Abras*, después del segundo ciclo de incubación las afinidad disminuyo en los dos tratamientos siendo de $1.05 \pm 0.17 \text{pg}^* \text{célula}$ para *Cs* y $1.2 \pm 0.07 \text{pg}^* \text{célula}$ para *Cs+Abras* (Tabla X).

Tabla X. Afinidad por el sustrato por célula de *C. sorokiniana* (fosfatos)

Tratamiento	48 horas	96 horas
<i>Cs</i>	3.58 ± 0.13^a	1.05 ± 0.17^b
<i>Cs+Abras</i>	3.6 ± 0.17^a	1.2 ± 0.07^b

No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en la afinidad por el amonio para la primera replica siendo mayor después del primer ciclo de incubación, con $12.17 \pm 1.9 \text{pg}^* \text{célula}$ para *Cs* y $14.79 \pm 1.6 \text{pg}^* \text{célula}$ para *Cs+Abras*, después del segundo ciclo de incubación las afinidad disminuyo en los dos tratamientos siendo de $5.34 \pm 1.04 \text{pg}^* \text{célula}$

para *Cs* y 5.24 ± 0.35 pg*célula para *Cs+Abras*. Para la segunda replica la afinidad fue después del primer ciclo de incubación de con 19.97 ± 0.42 pg*célula para *Cs* y 20.06 ± 0.45 pg*célula para *Cs+Abras*, después del segundo ciclo de incubación las afinidad disminuyo en los dos tratamientos siendo de 6.61 ± 0.19 pg*célula para *Cs* y 5.2 ± 0.23 pg*célula para *Cs+Abras* (Tabla XI).

Tabla XI. Afinidad por el sustrato por célula de *C. sorokiniana* (amonio)

Tratamiento	48 horas	96 horas
<i>Cs</i>	12.17 ± 1.9^a	5.34 ± 1.04^b
<i>Cs+Abras</i>	14.79 ± 1.6^a	5.24 ± 0.35^b
2da replica		
<i>Cs</i>	19.97 ± 0.42^a	6.61 ± 0.19^b
<i>Cs+Abras</i>	20.06 ± 0.45^a	5.2 ± 0.23^c

7.9.4. Variación de pH

Se registro la variación de pH antes y después de cada ciclo de incubación para todos los tratamientos, encontrándose un aumento significativo en todos los tratamientos con respecto valor del pH en el agua al inicio del ciclo. Después el primer ciclo de incubación el mayor valor de pH fue en el tratamiento de *Cs* con 8.95 ± 0.05 mientras que los demás valores se ubicaron entre el rango de 8.3-8.68. Después del segundo ciclo de incubación todos los tratamientos mostraron una diferencia significativa con respecto al pH del agua al inicio del ciclo el cual fue de 7.4 ± 0.08 , el rango de valores para los demás tratamientos estuvo entre 8.2-8.6, no encontrándose diferencias significativas claras entres los diferentes tratamientos. (Figura 20).

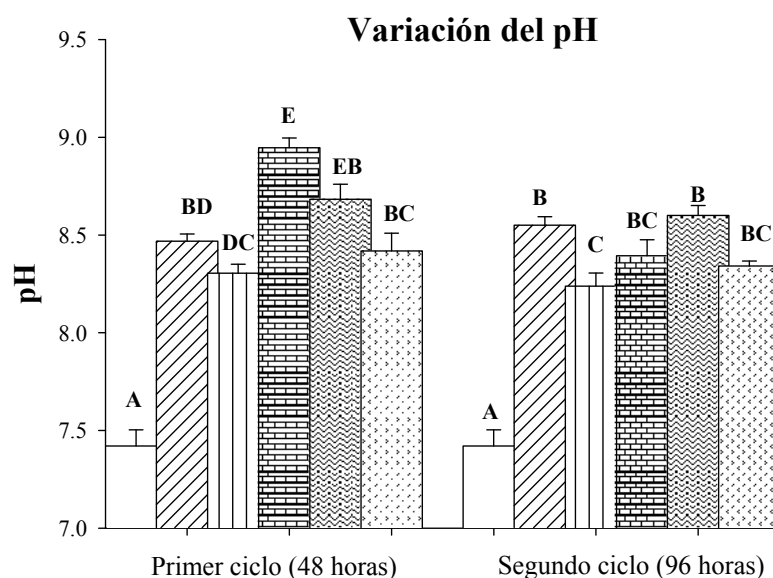


Figura 20. Variación en la concentración de pH en cada ciclo de incubación. □) Concentración inicial. ▨) control □) esferas ▩) Cs ▪) Cs+Abras ▫)Abrás. Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$

7.9.5. Variación en la concentración de nitratos

Se registro la variación de nitratos antes y después de cada ciclo de incubación para todos los tratamientos se encontró un aumento significativo en todos excepto el tratamiento control (sin esferas ni microorganismos). La concentración inicial en el agua fue de $1.6 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$, al finalizar el primer ciclo de incubación el tratamiento que presento la mayor concentración de nitratos fue el de *Cs+Abras* con $12.7 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1}$ los demás tratamientos estuvieron entre 4.8 y 7.1 mg L^{-1} , no se encontró diferencias significativas entre ellos. La concentración de nitratos después del segundo ciclo de incubación fue significativamente mayor para todos los tratamientos excepto para el control la cual fue de $1.5 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ Mientras que para los demás estuvo entre 9.2 y 14.2 mg L^{-1} , no se encontró diferencias significativas entre ellos (Figura 22).

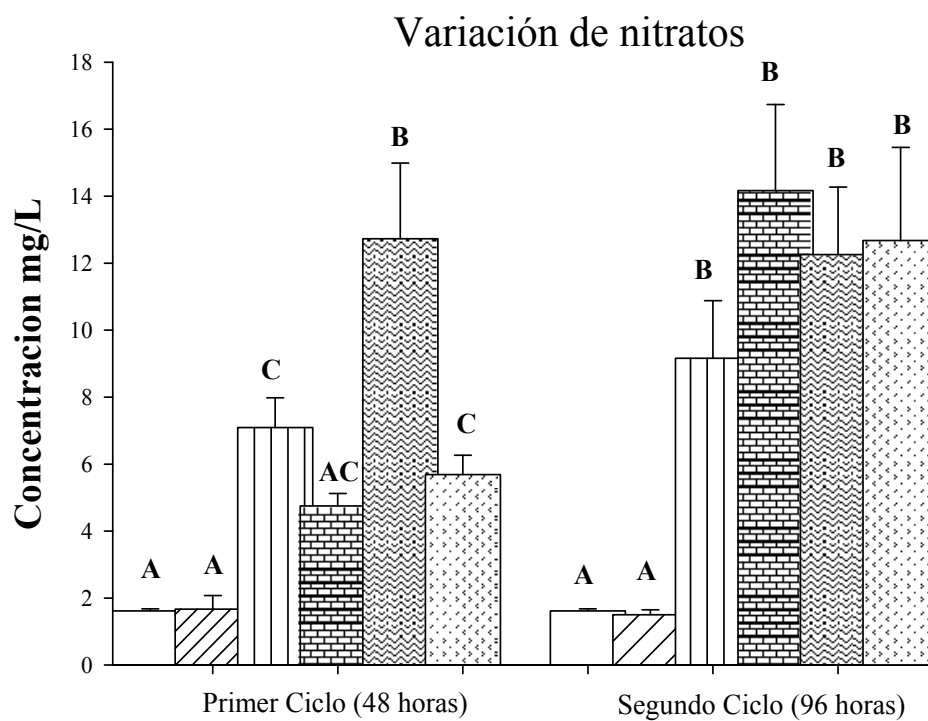


Figura 22. Variación en la concentración de nitratos en cada ciclo de incubación. □) Concentración inicial. ▨) control □) esferas ▩) Cs ▧) Cs+Abras ▦) Abras. Las letras mayúsculas diferentes sobre cada punto denotan una diferencia significativa dentro de un tratamiento para una prueba de ANDEVA de una vía a $p \leq 0.05$

8. Discusión

La inmovilización de microorganismos ofrece una amplia gama de ventajas para los organismos atrapados, dentro de las cuales se menciona la protección contra estrés ambiental, específicamente de ofrecer protección contra depredadores y ventajas competitivas frente a otros microorganismos (bacterias) por nutrientes; sin embargo como lo señala Cassidy *et al.* (1996) estas afirmaciones no son sustentadas por trabajo experimental. En el presente trabajo se estudió la protección brindada por la matriz de alginato desde la perspectiva de esta como una barrera física entre los organismos inmovilizados y el medio circundante, y se trató de aportar pruebas experimentales que sustenten esta hipótesis.

Mediante la técnica de Hibridización Fluorescente In Situ (*FISH*) se logro establecer el lugar exacto de *A. brasilense* y de las demás bacterias dentro de la esfera, el uso de esta técnica ya se ha reportado para la identificación y conteo de bacterias en muestras de suelo (Berteaux *et al.*, 2007) y la identificación de *A. brasilense* Sp245 y Sp7 en raíces de 3 diferentes variedades de trigo (Rothballer *et al.*, 2003), en el presente trabajo se encontró que las bacterias que no corresponden a *A. brasilense* son detenidas en las primeras capas de la esfera de alginato, aunque se conoce que esta matriz es permeable y permite el paso del agua a través de ella facilitando que los nutrientes disueltos (N y P) sean absorbidos por las microalgas inmovilizadas. Cassidy *et al.* (1996) mencionan que poros menores a 6 μm de diámetro podrían evitar el paso de depredadores debido a restricciones de tamaño, en este trabajo el tamaño promedio del poro fue mucho menor, sin embargo existe todavía la posibilidad de que algunas bacterias pudieran penetrar pues se conoce que algunas bacterias del genero *Mycoplasma* tienen un diámetro aproximado de 300 nm (Prescott *et al.*, 2000).

La degradación gradual de la esfera es un proceso ya reportado por varios autores el cual puede jugar un papel importante en la protección física de los microorganismos al verse comprometida la integridad de la matriz de inmovilización. Bailliez *et al.* (1985), Chen & Huang, (1987), Lebsky *et al.* (2001), señalan que el deterioro se debe al crecimiento de los microorganismos dentro de la esfera; reportan también formaciones sobre la superficie tipo

de protuberancia u abultamiento, similares a los aquí reportados, mencionan además que con el tiempo los abultamientos llegan a fracturarse formando poros en forma de cráter por los cuales pudieran liberarse células al medio; aunque Bailliez *et al.* (1985), estima que el porcentaje de liberación es mínimo (aproximadamente el 4%) en el presente trabajo también se observaron estas protuberancias fracturadas y se logró apreciar muy claramente a *C. sorokiniana* dentro de estas.

Lebsky *et al.* (2001), propusieron un modelo hipotético de la interacción de *C. vulgaris* co-inmovilizado con *A. brasilense* en esferas de alginato, al observar la matriz mediante microscopia electrónica de transmisión encontraron que después de 48 horas las paredes externas del alginato comienzan a deteriorarse dejando expuestas grandes cavidades en la periferia por las cuales se liberan una cierta cantidad de microorganismos, lo cual pudiera haber ocurrido en el presente trabajo, sin embargo no se determinó la liberación de microorganismos al medio.

La integridad de la esfera puede verse afectada debido a la sustitución de los iones de calcio que componen la matriz de inmovilización en soluciones que contengan fósforo o sodio, como lo señala Daintry *et al.* (1985), que menciona que la sustitución de iones ocasiona una disrupción y disolución en esferas de alginato, aunado a lo anterior se sabe que además existen bacterias con capacidad de degradar el alginato (Doubet *et al.*, 1982, Ertesvag *et al.*, 1998, Horn & Ostgaard, 2001) algunas de las cuales pudieran estar presentes en el agua residual, contribuyendo al deterioro de las esferas.

El lavado con la solución tween 20 permitió comprobar que en efecto muchas de las bacterias se encuentran en la superficie de la esfera. Sin embargo no todas las bacterias logran desprenderse, debido a que la solución tween 20 es solamente un surfactante que disminuye la tensión superficial por lo cual puede ser utilizado como detergente, en si no es un proceso de esterilización que elimine todas las bacterias adheridas (Willumsen *et al.*, 1998) a la superficie de la esfera si no que solo facilita el desprendimiento de aquellas que no se encuentran tan fuertemente adheridas.

En este trabajo se logró establecer que la esfera brinda protección contra depredación, ya que al despojar a *A. brasilense* de la esfera y enfrentarlos a protozoarios su crecimiento se vio reducido significativamente comparado con el control; Cassidy *et al.* (1996) mencionan que la depredación por protozoarios es un factor para la disminución de bacterias, también señalan que no existen estudios experimentales que comprueben la función de la matriz de inmovilización contra protozoarios, sin embargo, comparan las propiedades del suelo con las de una matriz de polímero mencionando que se comportan de manera similar. En este sentido England *et al.* (1993) mencionan que la localización espacial de las bacterias dentro del suelo influye en la susceptibilidad de ser depredadas, establece que las bacterias que se encuentran en las primeras capas de la esfera son más susceptibles a la depredación que las que se encuentran a mayor profundidad, lo anterior brinda un ejemplo de lo que pudiera estar ocurriendo en el presente trabajo, ya que las bacterias diferentes a *A. brasilense* solo se encuentran en la superficie y no logran penetrar dentro de la esfera.

La co-inmovilización de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* demostró tener un efecto positivo en el crecimiento de la microalga como ya se había reportado en investigaciones anteriores, aunque la concentración de células fue mayor a la reportada para la misma especie y co-inmovilizada con *A. brasilense* por de-Bashan *et al.* (2001, 2008), lo cual podría deberse a que en el presente trabajo se utilizó agua residual real sin esterilizar, ya que se sabe que en la naturaleza las microalgas se encuentran asociadas a bacterias las cuales aportan factores especiales para estimular el crecimiento (Day *et al.*, 1991). Esto coincide con Moronta *et al.* (2006) que reporta un mayor crecimiento de *C. sorokiniana* cuando se encuentra en condiciones no axénicas.

El descenso en la población de *A. brasilense* inmovilizado corresponde con lo reportado anteriormente por de-Bashan *et al.*, 2002b, 2005, 2008, donde encuentran un descenso en la población de *A. brasilense* inmovilizado solo o co-inmovilizado con *C. vulgaris* o *C. sorokiniana*. Estos trabajos fueron realizados en medio residual estéril y sin embargo presentan la misma tendencia que el presente trabajo, por lo que se puede descartar que el descenso sea efecto de la presión por competencia por nutrientes con otras bacterias o depredación ejercida por protozoarios. Aunque un trabajo más reciente realizado por Perez-

Garcia *et al.* (2010) reportan un incremento general en la población de *A. brasilense* inmovilizado con *C. vulgaris* bajo diferentes regímenes de cultivo (heterotrófico, mixotrófico, autotrófico) siendo los tratamientos heterotrófico y mixotrófico donde se obtuvieron los mayores crecimientos de *A. brasilense*, lo cual se debe a la adición de fuentes de carbono externo para su cultivo.

A. brasilense dentro de las esferas se presentó agregado en clústeres lo cual coincide con lo reportado por Lebsky *et al.* (2001), donde señala que los clústeres se originan cuando se forma el gel, al principio se encuentran colonias separadas de microalgas y bacterias las cuales conforme pasa el tiempo migran a través del gel hacia las colonias de microalgas formando co-agregados celulares, aunque Zohar-Perez *et al.* (2004); encuentra que la distribución de *E. coli* inmovilizado en esferas de alginato no es homogénea sino que hay una mayor concentración en las orillas, debido a que el alginato al entrar en contacto con la solución de calcio para formar el gel se contrae con mayor fuerza en la superficie. Este es el único reporte donde se menciona este fenómeno.

El patrón de agregación en bandas de las bacterias que no son *A. brasilense* podría ser un artefacto de la técnica, al analizar la herramienta utilizada para la manipulación de las muestras (pinza dentada), la cual fácilmente podría haber dejado marcas en la esfera fresca, Aunque Kuek & Armitage en 1985, encuentran que las esferas muestran surcos a lo largo la esfera los cuales se forman durante el proceso de endurecimiento, esto coincide con el presente trabajo en el cual también se observaron. Estos surcos se encuentran a lo largo de la superficie de la esfera y podrían ofrecer un hábitat a las bacterias del agua residual explicando así el patrón en forma de bandas, sin embargo no se encontró dentro de la literatura reportes de trabajos anteriores similares los cuales pudieran ofrecer alguna otra explicación.

El sistema microalga-bacteria mostro ser eficiente a la hora de remover el fosfato del agua, eliminando mas del 50% en cada ciclo de incubación, aunque el tratamiento de solo microalga mostró una eficacia similar en la eliminación de fosfato, de-Bashan *et al.* (2002), encuentran un resultado similar en *C. vulgaris*; sin embargo en su trabajo utilizan agua

residual sintética para evitar la interferencia por bacterias presentes en el agua residual, esto podría explicarse por que en el presente trabajo hubo eliminación de fósforo en todos los tratamientos aunque en menor cantidad. Se sabe que en el agua residual existen microorganismos (bacterias, actinomicetos y hongos) que pudieran eliminar el fósforo (Bond *et al.*, 1999, Mino 2000, Onuki *et al.*, 2002, Seviour *et al.*, 2003, Bitton 2006,). Por otro lado la eliminación fue mayor del 50% para después de los dos ciclos de cultivo, solo después del segundo ciclo la eliminación con el co-inmovilizado fue significativamente mayor a la del inmovilizado, lo cual puede deberse a que en este ciclo la concentración de células también fue mayor en ese tratamiento.

La eliminación de amonio también demostró ser mayor en los tratamientos donde había microalga la cual fue de entre 55 al 70%, sin embargo mostro una misma tendencia que el fósforo, al encontrarse eliminación de amonio en todos los tratamientos. De la misma manera el tratamiento co-inmovilizado eliminó mas amonio después del 2 ciclo de incubación, se puede explicar este comportamiento al relacionarlo con el crecimiento de la microalga

En ambos casos de eliminación de nutrientes (amonio y fósforo) la afinidad por el sustrato resulto ser mayor después del primer ciclo para luego descender al final del segundo, lo cual puede deberse a lo que algunos autores mencionan efecto de autosombreado ya que esta disminución en la capacidad de absorber nutrientes coincide con un aumento en la densidad celular de la microalga. Ruiz-Marin *et al.*, (2010) reportan que la capacidad de la microalga se ve afectada cuando se incrementa la densidad celular pues las microalgas que crecen en la superficie llegan a bloquear el paso de luz hacia las que se encuentran debajo reduciendo sus capacidades metabólicas.

El pH del medio se vio afectado en todos los tratamientos, registrándose un incremento significativo lo cual coincide con lo encontrado por de-Bashan *et al.* (2002), Gonzalez & Bashan, (2000) y Tam & Wong, (2000), quienes reportan un incremento en el pH debido a la actividad fotosintética de la microalga, pues como resultado de la fotosíntesis ocurre una eliminación del CO₂ libre del medio. Lo que tiene como consecuencia un cambio en la

reacción de iones bicarbonato con el agua para generar más iones CO_2 y CO_3 . Los iones carbonato reaccionan con el agua para formar iones hidroxilos (OH) lo que conlleva un aumento en el pH. El alza en el pH depende de la capacidad amortiguadora del agua, la cual alcanza su máximo a pH 8.1– 8.3 en agua dulce (Shapiro, 1990). Debido a lo anterior un pequeño incremento en el pH a causa de la fotosíntesis resulta en una caída en la concentración de CO_2 libre en el medio. Por lo anterior el incremento en los tratamientos que no tenían microalga inmovilizada, pudo deberse a la presencia de microalgas en el agua residual como lo reporta de-Bashan *et al.* (2008); donde aíslan una cepa de *C. sorokiniana* de la misma planta de tratamiento donde se obtuvo el agua residual para este trabajo. Debido al régimen autotrófico de cultivo utilizado en este experimento, estas microalgas pudieran haber llegado a incrementar su población al grado de modificar el pH del medio, sin embargo esto no puede asegurarse ya que no se estimó la concentración de estas en el agua residual de los diferentes tratamientos.

En el presente trabajo se encontró que el sistema no es eficaz para remover nitratos del agua, por el contrario se registro un incremento en todos los tratamientos que contenían esferas de alginato, esto puede deberse a procesos de nitrificación llevados a cabo por bacterias del genero *Nitrosomas* o *Nitrobacter* como lo señala de-Bashan *et al.* (2004), o también por arqueas oxidadoras de amonio (Park *et al.*, 2006). La presencia de estos microorganismos en aguas residuales ha sido reportada anteriormente por Chouari *et al.* (2003), Park *et al.* (2006), Hallin *et al.* (2006). En este trabajo se hipotetiza que los tratamientos que contienen esferas pudieran brindar de alguna manera desconocida aun las condiciones adecuadas para el desarrollo de estos microorganismos, cabe mencionar que de ocurrir este proceso de nitrificación pudiera ofrecer otra explicación para la eliminación de amonio en los tratamientos que no contienen microalga, ya que durante la nitrificación el amonio se oxida a nitrito y posteriormente a nitrato. Sin embargo se necesitan más estudios como el aislamiento de estos microorganismos y la verificación de su presencia por medios moleculares para poder comprobar la hipótesis anterior.

9. Conclusión

- En el agua residual existe una gran cantidad y variedad de organismos que pueden competir con el sistema microalga-bacteria.
- La esfera de alginato funciona como una barrera entre los microorganismos del medio y los microorganismos inmovilizados.
- El crecimiento de *C. sorokiniana* no se ve afectado de manera negativa por la exposición a agua residual real.
- La co-inmovilización de *C. sorokiniana* con *A. brasilense* tiene un efecto benéfico en el crecimiento de la microalga.
- El sistema de microalga-bacteria es eficiente en la eliminación de amonio y fosfato de agua residual real, aunque se necesitan más estudios para mejorar su desempeño.

10. Referencias

1. Abdel Hammed MS & Hammouda OE. (2007). Biotechnological potential uses of immobilized algae. *International Journal of Agriculture & Biology*. 1: 183-192.
2. Amann M, Krumholz L & Sthal DA. (1990). Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172: 762-770.
3. Aksu Z, Sag Y & Kutsal T. (1992). The biosorption of copper (II) by *Chlorella vulgaris* and *Zoogloea ramigera*. *Environmental Technology*. 13: 579–86
4. Bailliez C, Largeau C, & Casadevall E. (1985). Growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* immobilized in calcium alginate gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 23: 99-105.
5. Bashan Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculants carriers for the slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied Environmental Microbiology*. 51: 1089-1098.
6. Bashan, Y. & de-Bashan LE. (2005). Bacteria/plant growth-promotion, p. 103–115. *In* D. Hillel (ed.), *Encyclopedia of soils in the environment*, vol. 1. Elsevier, Oxford, United Kingdom.
7. Bashan, Y, Holguin G, & de-Bashan LE. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology*. 50:521–577.
8. Berteaux J, Gloger U, Schmid M, Hartman A, & Scheu S. (2007). Routine fluorescent in situ hybridization in soil. *Journal of Microbiological Methods*. 69: 451-460.
9. Bond PL, Erhart R, Wagner M, Keller J, & Blackall LL. (1999). Identification of some of the major groups of bacteria in efficient and nonefficient biological phosphorus removal activated sludge systems. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4077-4084.
10. Cassidy MB, Lee H & Trevors JT. (2006). Environmental applications of immobilized microbial cells, a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 16: 79-101.

11. Chibata I & Tosa T. (1981). Use of immobilized cells. *Annual Reviews of Biophysics and Bioengineering*. 10: 197-216.
12. Chrzanowski TH, Crotty RD, Hubbard JG & Welch RP (1984). Applicability of the fluorescein diacetate method of detecting active bacteria in freshwater. *Microbial Ecology* 10: 179-185
13. Chevalier P & de la Nou J (1985). Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme and Microbiology Technology*. 7: 621-604
14. Chouari R, Le Paslier D, Daegelen P, Ginestet P, Weissenbach J & Sghir A. (2003). Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 7354-7363.
15. Conney CL (1983). Bioreactors: design and operation. *Science*. 219: 728-733.
16. Crump C (1993) *Dictionary of environment and development*. Cambridge (MA): MIT Press. 272 pp
17. Dainty AL, Goulding KH, Robinson PK, Simpkins I & Trevan MD. (1986). Stability of alginate-immobilized algal cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 28: 210-216.
18. Daims H, Bruhl A, Amman R, Schleifer K & Wagner M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Systematic and Applied Microbiology*. 22: 434-444.
19. Daims H, Stoecker K & Wagner M (2005). Fluorescence in situ hybridization for the detection of prokaryotes. En: *Molecular microbial ecology* Oborn AM, Smith C. 2005. Editorial Cromwell press, Trowbridge, UK. 381 pp.
20. de-Bashan LE, Hernandez JP, Morey T & Bashan Y (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as helpers for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research*. 38: 466-474.
21. de-Bashan LE, Moreno M, Hernandez JP & Bashan Y (2002^a). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae

- Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36: 2941-2948.
22. de-Bashan LE, Bashan Y, Moreno M, Lebsky VK & Bustillos JJ (2002b). Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. When co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 514-521.
 23. de-Bashan LE, Antoun H & Bashan Y (2005). Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology* 54: 197-203.
 24. de-Bashan LE, Trejo A, Huss VAR, Hernandez JP & Bashan Y (2008). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sun-light tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Biotechnology* 99: 4980-4989.
 25. de-Bashan LE, Moreno M, Hernandez JP & Bashan Y (2000). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36: 2941- 2948.
 26. de-Bashan LE & Bashan Y (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.
 27. de-Bashan LE & Bashan Y (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*. 110: 1611-1627.
 28. de-la Nöue J & Pauw N (1988). The potential of microalgae biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology Advances*. 6: 670-725
 29. Doubet RS & Quatrano RS (1982). Isolation of marine bacteria capable of producing specific lyases for alginate degradation. *Applied and Environmental Microbiology*. 44: 754-756.

30. England LS, Lee H & Trevor JT (1995). Bacterial survival in soil: effect of clays and protozoa. *Soil Biology and Biochemistry*. 25: 525-531.
31. Ertesvag H, Erlien F, Skjak-Braek G, Rehm BHA & Valla S (1998). Biochemical properties and substrate specificities of a recombinantly produced *Azotobacter vinelandii* alginate lyase. *Journal of Bacteriology* 15: 3779-3784.
32. Faafeng BA, van Donk E & Kallqvist ST (1994). *In situ* measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae *Journal of Applied Phycology*. 6: 302-308.
33. Fukui S & Tanaka A (1982) Immobilized microbial cells. *Annual Review of Microbiology*. 36: 145-172.
34. Garbisu C, Hall DO & Serra JL (1993). Removal of phosphate by foam-immobilized *Phormidium laminosum*. *J. Chemical Technology and Biotechnology*. 57, 181–189.
35. Gonzalez LE, Cañizare RO & Baena S (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource Technology*.60: 259-262.
36. Gonzalez LE & Bashan Y (2000). Increased growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coinmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1527-1531
37. Gil JM & Serra JL (1993). Nitrate removal by immobilized cells of *Phormidium uncinatum* in batch culture and continuous-flow photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* ;39:782– 7.
38. Hallin S, Throbaack IN, Dicksved J & Pell M (2006). Metabolic profiles and genetic diversity of denitrifying communities in activated sludge after addition of methanol or ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5445-5452.
39. Hammer MJ (1977). *Water and waste-water technology*. John Wiley & Sons. Canada, pp 61.

40. Hartmann, A & Zimmer W (1994). Physiology of *Azospirillum*, p. 15–39. In Y. Okon (ed.), *Azospirillum/plant associations*. CRC Press, Boca Raton, FL.
41. Hernandez-Lopez J & Vargas-Albores F (2003). A microplate to quantify nutrients (NO₂, NO₃, NH₄, and PO₄³⁻) in seawater. *Aquaculture Research*. 34: 1201-1204.
42. Hernandez JP, de-Bashan LE & Bashan Y (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology*. 38: 190-198.
43. Hammouda O, Gaber A & Abdelraouf N (1995). Microalgae and wastewater treatment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 31: 205-210
44. Horn SJ & Ostgaard K (2001). Alginate lyase activity and acidogenesis during fermentation of *Laminaria hyperborea*. *Journal of Applied Phycology*. 13: 143-152.
45. Hosono, H, Uemura I, Takumi T, Nagamune T, Yasuda T, Kishimoto M, Nagashima H, Shimomura N, Natori M & Endo I (1994). Effect of culture temperature shift on the cellular sugar accumulation of *Chlorella vulgaris* SO-26. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 78: 235–240.
46. Ilangovan K., Canizares-Villanueva RO, Gonzalez Moreno S, & Voltolina D (1998). Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 60: 936–943.
47. Jimenez-Perez MV, Sanchez-Castillo P, Romera O, Fernandez-Romero D, & Perez-Martinez C (2004). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology*. 34: 392-398.
48. Kaya MV & Picard G (1996). Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. *Bioresource Technology*. 56: 147-155.
49. Kaya MV, de la Noue J & Picard G (1995). A comparative study of four systems for tertiary wastewater treatment by *Scenedesmus bicellularis*: New technology for immobilization. *Journal of Applied Phycology*. 7: 85-95.

50. Kuek C & Armitage TM (1985). Scanning electron microscopic examination of calcium alginate beads immobilizing growing mycelia of *Aspergillus phoenicus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 7: 121-125
51. Kuon-Cheng C & Chuang CT (1988). Effects of the growth of *Trichosporon cutaneum* in calcium alginate gel beads upon structure and oxygen transfer characteristics. *Enzyme and Microbial Technology* 10: 284-292
52. Leenen EJTM, Dos Santos VAP, Grolle KCF, Tramper J & Wijffels RH (1996). Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment. *Water Resource*. 30: 2985-2996.
53. Lebsky VK, Gonzalez-Bashan LE & Bashan Y (2001). Ultrastructure of interaction in alginate beads between the microalgae *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and the plant growth-promoting bacteria *Azospirillum brasilense*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 1-8
54. Lau P, Tam NF & Wong YS (1997). Wastewater nutrients (N and P) removed by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*. 18: 893-899.
55. Mallick N (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *BioMetals* 15: 377-390.
56. Mallick N & Rai LC (1993). Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 9: 196-201.
57. Mara D & Horan N (2003). *The handbook of water and wastewater microbiology*. Academic Press. Elsevier.
58. Mino T (2000). Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry (Moscow)*. 65: 341-348.
59. Moreno-Garrido I (2008). Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresource Technology*. 99: 3949-3964.

60. Moreno-Garrido I, Codd GA, Gadd GM & Lubian LM (2002). Acumulación de Cu y Zn por células microalgales marinas *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae) inmovilizadas en alginato de calcio. *Ciencias Marinas*. 28: 107-119.
61. Moronta R, Mora R & Morales E (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista de la Facultad de Agronomía (LUZ)*. 23: 27-41.
62. Olguin EJ (2003). Phycorremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*; 22: 81-91
63. Onuki M, Satoh H & Mino T (2002). Analysis of microbial community that performs enhanced biological phosphorus removal in activated sludge fed with acetate. *Water Science and Technology*. 46: 145-154
64. Oswald, WJ (1992). Microalgae and wastewater treatment, p. 305-328. *In* M. A. Borowitzka and L. J. Borowitzka (ed.), *Microalgal biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom
65. Park HD, Wells GF, Bae H, Criddle CS & Francis CA (2006). Occurrence of ammonia-oxidizing archaea in wastewater treatment plant bioreactors *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 5643-5647.
66. Perez-Garcia O, de-Bashan LE, Hernandez JP & Bashan Y (2010). Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Journal of Phycology*. 46: 800-812.
67. Prescott LM, Harley JP & Klein DL (2000). *Microbiología*. McGraw Hill. Cuarta edición. Madrid España.
68. Ramazanov A & Ramazanov Z (2006). Isolation and characterization of a starchless mutant of *Chlorella pyrenoidosa* STL-PI with a high growth rate, and high protein and polyunsaturated fatty acid content. *Phycology Research*. 54: 255-259.
69. Ruiz-Marin A, Mendoza-Espinosa LG & Sepsenson T (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*. 101: 58-64.

70. Rothballer M, Schmid M & Hartmann A (2003). In situ localization and PGPR-Effect of *Azospirillum brasilense* strains colonizing roots of different wheat varieties. *Symbiosis*. 34: 261-279.
71. Sawayama S, Rao KK & Hall DO (1998). Nitrate and phosphate ion removal from water by *Phormidium laminosum* immobilized on hollow fibres in a photobioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 49: 463-468.
72. Seviour RJ, Mino T & Onuki M (2003). The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems. *FEMS Microbiology Reviews*. 27: 99-127.
73. Solorzano L (1969). Determination of ammonia in natural waters by the phenolhypoclorite method. *Limnology and Oceanography*. 14:799.
74. Steenson LR, Klaenhammer TR & Swarsgood HE (1987). Calcium alginate-immobilized cultures of lactic streptococci. *Journal diary of science*. 70.1121-1117
75. Stoffels M & Castellanos T & Hartmann A (2001). Design and application of new 16S rRNA-target oligonucleotide probes for the *Azospirillum-Skermanella-Rhodocista-cluster*. *Systematic and Applied Microbiology*. 24: 83-97.
76. Stormo KE & Cawford RL (1992). Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 727-730.
77. Tampion, J & Tampion MD (1987). *Immobilized Cells: Principles and Applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257 pp.
78. Tam NFY & Wong YS (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*. 107: 147-151.
79. Tanaka H, Ohta T, Harada S, Ogbonna JC & Yajima M (1994). Development of a fermentation method using immobilized cells under unsterile conditions. 1. Protection of immobilized cells against-microbial substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 41: 544-550
80. Travieso L, Benitez, Weiland P, Sanchez E, Dupeyron R & Dominguez AR (1996). Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Technology*. 55: 181-186.

81. van Elsas JD, Trevors JT, Jain D, Wolters AC, Heijnen CE & van Oberbeek (1992). Biology and Fertility of Soils. 14: 14-22.
82. Willumsen PA, Karlson U & Pritchard PH (1998). Response of fluoranthene-degrading bacteria to surfactants. Applied Microbiology and Biotechnology. 50: 475-483.
83. Zohar-Perez C, Chet I & Nussinovitch A (2004). Unexpected distribution of immobilized microorganism within alginate beads. Comunicación al autor. Publicado en Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
84. Zhang E, Wang B, Wang Q, Zhang S & Zhao B (2008). Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. Isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. Bioresource Technology. 99:3787-3793.