

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR DE
ENSENADA**



**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN ACUICULTURA**

**REMOCIÓN DE NUTRIENTES INORGÁNICOS CON MICROALGAS
COINMOVILIZADAS EN QUITOSANO**

TESIS

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

SOCORRO JIMÉNEZ VALERA

Ensenada, Baja California, México, Noviembre de 2008

TESIS DEFENDIDA POR
Socorro Jiménez Valera
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director del Comité

Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez
Miembro del Comité

Dr. Helmut Maske Rubach
Miembro del Comité

Dra. Meritxell Riquelme Pérez
*Coordinador del Programa de Posgrado
en Ciencias con Orientación en
Acuicultura*

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales
Director de Estudios de Posgrado

Noviembre de 2008

RESUMEN de la tesis que presenta **Socorro Jiménez Valera**, como requisito parcial para la obtención del grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS** con orientación en **ACUICULTURA**. Ensenada, Baja California, México. Noviembre de 2008.

REMOCIÓN DE NUTRIENTES INORGANICOS CON MICROALGAS COINMOVILIZADAS EN QUITOSANO

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra

Director del Comité

El aumento de la actividad antropogénica ha causado un incremento en las descargas de aguas residuales que causan eutrofización. Por medio de métodos biológicos es posible contribuir al control de la eutrofización y entre estas metodologías, se encuentra el uso de microalgas inmovilizadas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de remoción de distintas formas químicas de nitrógeno y ortofosfatos al utilizar cultivos de células de microalgas y cianobacterias coinmovilizadas en cápsulas de quitosano.

Se utilizaron ocho cepas de microalgas y cianobacterias dulceacuícolas, fue caracterizado su crecimiento en cultivos monoespecíficos de: *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1). Las cepas se mantuvieron en cultivos estáticos, no axénicos con medio “f” y “2f” descrito por Guillard y Ryther (1962). El medio “2f” fue preparado para obtener una doble concentración de nutrientes similar a los efluentes de aguas residuales acuícolas. Para la cianobacteria *Spirulina maxima* (SPM1) se utilizó el medio de cultivo “f”, “2f” y el específico para *Spirulina* descrito por Sorokin y Krauss (1958).

Para los cultivos mixtos (cocultivos) de las cepas seleccionadas se utilizó medio “2f”. Todos los ensayos se realizaron por triplicado, a 20 ± 1 °C y con irradiancia continua de $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Durante la fase exponencial las mayores tasas de crecimiento (μ_{max}) correspondieron a las cepas CLMM1, SCX1 y SCX2. Sin embargo, los mayores valores de la tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) en los 10 días de cultivo fueron para las cepas SYX1 y SCO1. La cepa de SYX1 tuvo los mayores porcentajes de remoción de nitrógeno ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) en medio “f” (75%) y “2f” (85%). El resto de las cepas tuvieron porcentajes de remoción < 50% en ambos tipos de medio.

La remoción de los ortofosfatos fue similar para todas las cepas estudiadas en el medio “2f”. Sin embargo, la cepa de la cianobacteria SPM1 presentó la total remoción (100%) de ortofosfatos en ambos medios de cultivo (“f” y “2f”).

Con base en los resultados del crecimiento de las ocho cepas se seleccionaron las que tuvieron mayor tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) y mayor capacidad de remoción de nitratos y ortofosfatos para realizar cultivos mixtos. Las cepas seleccionadas fueron: *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), y *Chlorella vulgaris* (CLV1). Las mayores tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) las obtuvieron los cocultivos de SYX1-SCO1, SCO1-CLV1 y CLMG1-CLV1.

Las cepas utilizadas para la coinmovilización fueron SYX1-SCO1 y SYX1-CLV1, con las que se realizaron cultivos mono-específicos y cocultivos de células libres e inmovilizadas. El mayor biovolumen tanto en los cocultivos de células libres e inmovilizadas fue para las cepas SYX1-SCO1. El mayor porcentaje de remoción de nitrógeno (37%) fue para los cocultivos de las células libres de SYX1-SCO1 a las 36 h. En todos los tratamientos hubo remoción de ortofosfatos y el mayor porcentaje fue para las células coinmovilizadas de SYX1-CLV1 (36%) a las 36 h.

Hasta donde conocemos este es el primer estudio acerca del crecimiento de microalgas y cianobacterias mantenidas en cocultivos de células libres en el medio y coinmovilizadas en quitosano, para ver su potencial uso en el control de la eutrofización de aguas residuales.

Se concluye que es posible mantener cocultivos de las cepas *Synechococcus elongatus* y *Scenedesmus obliquus*, así como de las cepas *Synechococcus elongatus* y *Chlorella vulgaris* en forma libre y coinmovilizadas en quitosano.

Palabras clave: Remoción de nutrientes, coinmovilización, quitosano, aguas residuales.

ABSTRACT of the thesis presented by **Socorro Jiménez Valera**, as a partial requirement to obtain the **MASTER IN SCIENCE** degree with orientation in **AQUACULTURE**. Ensenada, Baja California, México. November 2008.

INORGANIC NUTRIENT REMOVAL WITH MICROALGAE COIMMOBILIZED WITH CHITOSAN

The increase of anthropogenic activity produces greater discharges of wastewater that cause eutrophication. The use of biological methods can decrease the eutrophication and some of these methods use the immobilization of microalgae. Our objective was to evaluate the ability of cell cultures of microalgae and cyanobacteria coimmobilized on chitosan capsules to remove different chemical forms of nitrogen and orthophosphate.

We used eight strains of freshwater microalgae and cyanobacteria. Their growth was characterized in monospecies cultures of *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1), and *Chlorella vulgaris* (CLV1). The strains were maintained in nonaxenic batches using the "f" and "2f" media of Guillard and Ryther (1962). The "2f" media was prepared to obtain nutrients concentrations similar to that of aquaculture wastewaters. For the cyanobacteria *Spirulina maxima* (SPM1) we used both the "f" and "2f" growth media and the specific *Spirulina* medium as described by Sorokin and Krauss (1958).

For all the mixed cultures (cocultures) of the strains selected we used the "2f" medium. All the assays were made in triplicate at 20 ± 1 °C with continuous light at $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

In the exponential phase the highest maximum growth (μ_{max}) was by the strains CLMM1, SCX1, and SCX2. However, the highest accumulated growth ($\Sigma\mu$) at day 10 of the cultures was in the strains of SYX1 and SCO1. The strains of SYX1 showed the highest nitrogen removal ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$) with the "f" medium (75%) and "2f" (85%). All the others strains had < 50% of nitrogen removal in both culture media.

The removal of orthophosphate was similar for all the strains studied in the "2f" medium. However, the cyanobacterium strain SPM1 had total orthophosphate removal (100%) in both culture media ("f" and "2f"). From the growth results of the eight strains we selected the strains that had the highest accumulated growth ($\Sigma\mu$) and the greatest nitrate and orthophosphate removal to be grown as mixed cultures. The strains that were selected were *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), and *Chlorella vulgaris* (CLV1). The highest accumulated growth ($\Sigma\mu$) was obtained in the cocultures of SYX1-SCO1, SCO1-CLV1, and CLMG1-CLV1. The strains used for the coimmobilization were SYX1-SCO1 and SYX1-CLV1, and were used in monospecies and mixed cultures of free and immobilized cell cultures. The highest biovolumes were obtained in the coculture of free and immobilized cells of SYX1-SCO1. The highest percentage of nitrogen removal (37%) was in the coculture of free cells of SYX1-SCO1 at 36 h. In all the treatments we had removal of orthophosphate, with the highest value by coimmobilized cells of SYX1-CLV1 (36%) at 36 h.

As far as to our knowledge this is the first study of the growth of microalgae and cyanobacteria maintained in cocultures of free cells and coimmobilized in chitosan to measure their potential use for decreasing wastewaters eutrophication.

We concluded that it is possible maintain cocultures of the strains *Synechococcus elongatus* and *Scenedesmus obliquus* and of the strains *Synechococcus elongatus* and *Chlorella vulgaris* in free and coimmobilized cell cultures with chitosan.

Keywords: Nutrient removal, coinmovilización, chitosan, wastewater.

DEDICATORIA

A mi madre Ma. del Carmen Valera Soto por apoyarme incondicionalmente a lo largo de mi carrera académica.

A mis hermanos Sabina y Martín por ayudarme ha alcanzar mi metas.

A mi sobrina Karla por sus dulces consejos.

A mi padre José Jiménez gracias por tu apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por sus valiosos consejos y enseñanzas durante la maestría y para la realización de esta tesis, además por brindarme tu amistad y apoyo en los momentos difíciles, mil gracias.

A los integrantes del comité Dr. Luis Fernando Bückle Ramírez y al Dr. Helmut Maske Rubach por sus valiosas observaciones y comentarios para la elaboración de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por otorgarme una beca para realizar mis estudios de maestría y por el apoyo económico para realizar esta investigación a través del proyecto CONACyT 45844.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por otorgarme una beca para finalizar la tesis y al Dr. David H. Covarrubias Rosales por el apoyo económico recibido a través de la Dirección de Estudios de Posgrado.

Al Biol. Norberto Flores Acevedo por su ayuda en los conteos celulares y en la fase experimental de remoción de nutrientes.

A mis compañeros de laboratorio Areli Carolina Muñoz Guerrero, Flor Sánchez, Jerónimo López Best, Edén Arce y Martín Darinel Pérez por su ayuda en el laboratorio y por brindarme su amistad.

A Bily por su ayuda y consejos en el proceso de inmovilización de las microalgas, gracias por tu amistad.

A mi amiga y consejera Vicky gracias por toda tu ayuda desde el inicio y hasta el final de la maestría, en la tesis, por estar conmigo en los momentos difíciles y sobretodo por tu amistad.

A mis amigos Gisel y Jorge por sus sabios consejos, por hacer más amigable mi estancia en Ensenada y por brindarme su invaluable amistad.

A mis amigos Getsemany, Marisol, Ana, Hayde, Gretel, Brenda, Fernando, Pablo, Marcel, Jesus y Luis gracias a todos por su apoyo y amistad.

A mis amigos de Xalapa por su apoyo y por alentarme para realizar la maestría.

Y a todas las personas que me apoyaron de forma directa o indirecta durante la maestría y en la tesis, muchas gracias.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN ESPAÑOL	i
RESUMEN INGLÉS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	x
Capítulo I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1 ANTECEDENTES	6
Capítulo II. OBJETIVOS	10
II. 1. HIPÓTESIS	10
II. 2 OBJETIVOS	10
II. 2.1. Objetivo general	10
II. 2.2. Objetivos particulares	10
Capítulo III. MATERIALES MÉTODOS	11
III. 1. Características de las especies	11
III. 2. Cultivos de células libres en el medio	12
III. 2.1. Crecimiento de cultivos monoespecíficos	12
III. 2.2. Remoción de nutrientes de los cultivos monoespecíficos	13
III. 3. Cultivos mixtos de dos especies de microalgas	13
III. 4. Técnica de inmovilización	14
III. 4.1. Inmovilización con quitosano	14
III. 5. Viabilidad y crecimiento de cultivos de microalgas coinmovilizadas en quitosano	15
III. 5.1. Peso seco, peso orgánico y peso de ceniza	17
III. 5.2. Remoción de nutrientes inorgánicos	17
III. 6. Tratamiento estadístico de los resultados	17
Capítulo IV. RESULTADOS	19
IV. 1 Tasa de crecimiento de cultivos monoespecíficos	19
IV. 1.1. Evaluación del crecimiento por densidad óptica	19
IV. 2. Remoción de nutrientes de los cultivos monoespecíficos	28
IV. 3. Tasa de crecimiento de cultivos mixtos (cocultivos)	31
IV. 3. 1. Evaluación del crecimiento por conteos directos	32
IV. 4 Remoción de nutrientes de cultivos mixtos libres y de cultivos coinmovilizados	36
IV. 4.1. Tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$)	38
IV. 4.2. Evaluación de la biomasa	38

CONTENIDO (continuación)

IV. 4.3. Evaluación de la biomasa por biovolumen	45
IV. 4.4. Peso seco, peso orgánico y peso de ceniza	45
IV. 4.4 Remoción de nutrientes	46
Capítulo V. DISCUSIÓN	59
V. 1. Tasa de crecimiento de cultivos monoespecíficos	59
V. 1.1. Remoción de nutrientes de cultivos monoespecíficos	63
V. 2. Tasa de crecimiento de cultivos mixtos	65
V. 3. Remoción de nutrientes de cultivos mixtos libres y de cultivos coinmovilizados	67
V. 3.1. Viabilidad de las cepas coinmovilizadas	67
V. 4. Tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$)	70
V. 5. Remoción de nutrientes	71
Capítulo VI. CONCLUSIONES	75
Capítulo VII. RECOMENDACIONES	77
Capítulo VIII. LITERATURA CITADA	78

Lista de Figuras

Figura		Página
Figura 1.	Curva de crecimiento de <i>Spirulina maxima</i> (SPM1) mantenida en un sistema estático en medio Spirulina. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	23
Figura 2.	Curvas de crecimiento de <i>Spirulina maxima</i> (SPM1) mantenidas en sistema estático en un medio “f” (■) y en un medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	23
Figura 3.	Curvas de crecimiento de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	24
Figura 4.	Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	24
Figura 5.	Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	25
Figura 6.	Curvas de crecimiento de <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX2) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	25
Figura 7.	Curvas de crecimiento de <i>Chlamydomonas gleopara</i> (CLMG1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	26
Figura 8.	Curvas de crecimiento de <i>Chlamydomonas mexicana</i> (CLMM1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	26
Figura 9.	Curvas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	27

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
Figura 10.	Valores promedio de pH de las cepas de microalgas y cianobacterias cultivadas en medio “f”. Las cepas utilizadas corresponden a: <i>Spirulina maxima</i> (SPM1), <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX2), <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1), <i>Chlamydomonas mexicana</i> (CLMM1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1).	29
Figura 11.	Valores promedio de pH de las cepas de microalgas y cianobacterias cultivadas en medio “2f”. Las cepas utilizadas corresponden a: <i>Spirulina maxima</i> (SPM1), <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX2), <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1), <i>Chlamydomonas mexicana</i> (CLMM1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) y cultivadas en medio “f”.	29
Figura 12.	Valores promedio de la concentración inicial y final de NO ₂ +NO ₃ y su porcentaje de remoción de las cepas de cianobacterias y microalgas cultivadas en medio “f” (■) y “2f” (■). Las cepas utilizadas corresponden a: <i>Spirulina maxima</i> (SPM1), <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX2), <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1), <i>Chlamydomonas mexicana</i> (CLMM1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1). Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	30
Figura 13.	Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración inicial y final de PO ₄ , y el porcentaje de remoción de las cepas de cianobacterias y microalgas cultivadas en medio “f”(■) y en “2f” (■). Las cepas utilizadas corresponden a: <i>Spirulina maxima</i> (SPM1), <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX1), <i>Scenedesmus</i> sp. (SCX2), <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1), <i>Chlamydomonas mexicana</i> (CLMM1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1). Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	30

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
Figura 14.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) (◇) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	33
Figura 15.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1) (■) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	34
Figura 16.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) (□) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	34
Figura 17.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) (◇) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) (□) mantenidas en cocultivo en sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	35
Figura 18	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) (◇) y <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1) (■) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	35
Figura 19.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1) (■) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) (□) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	36
Figura 20.	Imágenes (a) cenobio de células libres de <i>Scenedesmus obliquus</i> , (b) células libres de <i>Synechococcus elongatus</i> vistas bajo microscopio compuesto (100x), (c) coenobio de <i>Scenedesmus obliquus</i> , y células de <i>Synechococcus elongatus</i> dentro de la matriz de quitosano, vistas bajo microscopio compuesto (100x), (d) esfera de quitosano con células coinmovilizadas de <i>Scenedesmus obliquus</i> y <i>Synechococcus elongatus</i> vista bajo microscopio estereoscópico (1.25x). Las imágenes fueron tomadas con una cámara “Evolution MP Color” y con el programa “Imagen Pro Discovery” Versión 4.5.	37

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
Figura 21.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) (◇) mantenidas en cocultivos en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	41
Figura 22.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) (◇) mantenidas en cultivos coinmovilizados en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	41
Figura 23.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) (◐) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	42
Figura 24.	Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (●) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) (◐) mantenidas en cultivos coinmovilizados en un sistema estático en medio “2f”.	42
Figura 25.	Curva de crecimiento de <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) mantenida en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	43
Figura 26.	Curvas de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) mantenidas en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	43
Figura 27.	Curvas de crecimiento de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) mantenidas en un sistema estático en medio “2f” con un inóculo inicial de 1.10. ml. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	44
Figura 28.	Curvas de crecimiento de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) mantenidas en un sistema estático en medio “2f” con un inóculo inicial de 7.36 ml. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).	44

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
Figura 29.	Valores promedio de pH de los tratamientos Medio (■) y Medio+Quitosano (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.	47
Figura 30.	Valores promedio de pH de los cocultivos <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) y <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) en forma libre (■) y coinmovilizados (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.	47
Figura 31.	Valores promedio de pH de los cocultivos <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) en forma libre (■) y coinmovilizados (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.	48
Figura 32.	Valores promedio de pH de los cultivos de las cepas <i>Scenedesmus obliquus</i> (■), <i>Chlorella vulgaris</i> (■), <i>Synechococcus elongatus</i> (1.10 ml) (□) y <i>Synechococcus elongatus</i> (7.36 ml) (≡) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.	48
Figura 33.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de NO ₂ +NO ₃ y su porcentaje de remoción de los cocultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1)- <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) de forma libre (■) y coinmovilizada (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	51
Figura 34.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO ₄ y su porcentaje de remoción de los cocultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1)- <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) de forma libre (■) y coinmovilizada (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	51

Lista de Figuras (continuación)

Figura		Página
Figura 35.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de NO_2+NO_3 y su porcentaje de remoción de los cocultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1)- <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) de forma libre (■) y coinmovilizada (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	52
Figura 36.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de los cocultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1)- <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) de forma libre (■) y coinmovilizada (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	52
Figura 37.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de NO_2+NO_3 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	53
Figura 38.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	53
Figura 39.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de NO_2+NO_3 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	54
Figura 40.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	54

Figura	Lista de Figuras (continuación)	Página
Figura 41.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de NO_2+NO_3 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (1.10 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	55
Figura 42.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (1.10 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	55
Figura 43.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de NO_2+NO_3 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (7.36 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	56
Figura 44.	Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1) (7.36 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.	56

Lista de Tablas

Tabla		Página
Tabla I.	Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de células ($\times 10^{-6}$ cel ml^{-1}), la tasa de crecimiento (μ_{max} divisiones por día), la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$, divisiones en 10 días) de las cepas de cianobacterias y microalgas cultivadas en medio “f” y “2f”. Los números distintos indican diferencias significativas entre las cepas (por la μ_{max}), 1>2>3>4 obtenidas por una prueba <i>a posteriori</i> Tukey. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas (por la $\Sigma\mu$), a>b>c obtenidas por una prueba <i>a posteriori</i> Tukey.	21
Tabla II.	Ecuaciones de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) con una n=30, obtenidas con los valores de densidad óptica y los recuentos directos de células los días de cultivo 0, 5 y 10 para cada especie de microalga y cianobacterias cultivadas en medio “f”.	22
Tabla III.	Ecuaciones de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) con una n=30, obtenidas con los valores de densidad óptica y los recuentos directos de células los días de cultivo 0, 5 y 10 para cada especie de microalga y cianobacterias cultivadas en medio “2f”.	22
Tabla IV.	Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de células ($\times 10^{-6}$ cel ml^{-1}), la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$, divisiones en 7 días) de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), <i>Chlamydomonas gloeopara</i> (CLMG1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) cultivadas en medio “2f” de forma mixta. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas, a>b>c (Prueba t-Student $\alpha=0.05$).	32
Tabla V.	Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de células ($\times 10^{-6}$ cel ml^{-1}), la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$, divisiones en 7 días) de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) cultivadas en medio “2f” de forma libre, mixta-libre y coinmovilizada. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas (por la $\Sigma\mu$), a>b>c obtenidas por una prueba <i>a posteriori</i> Tukey. Los números distintos indican diferencias significativas entre tratamientos (según la concentración celular) 1>2>3 obtenidas por una prueba <i>a posteriori</i> Tukey. * : dato único.	39

Lista de Tablas (continuación)

Tabla		Página
Tabla VI	Valores promedio \pm 1 error estándar del biovolumen ($\mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1} \times 10^6$) de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) y valor del factor de correlación entre cel ml^{-1} y el biovolumen cultivadas en medio “2f” de forma mixta y coinmovilizadas. * : dato único.	45
Tabla VII.	Valores promedio \pm 1 error estándar del peso seco, el peso orgánico y el peso de ceniza ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de las cepas de <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1), y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) cultivadas en medio “2f” en un cultivo estático. * : dato único.	46
Tabla VIII.	Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de nutrientes ($\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y PO_4 en $\mu\text{moles l}^{-1}$) y el porcentaje (%) de remoción de las cepas <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) cultivadas en medio “2f” de forma libre, mixta-libre y coinmovilizada. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas, $a > b > c$ obtenidas por una prueba <i>a posteriori</i> Tukey. * : dato único.	57
Tabla IX.	Valores promedio de: la proporción inicial y final de nutriente/biovolumen ($\mu\text{moles l}^{-1} / \mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1}$) ($\times 10^{-6}$) de las cepas <i>Synechococcus elongatus</i> (SYX1), <i>Scenedesmus obliquus</i> (SCO1) y <i>Chlorella vulgaris</i> (CLV1) cultivadas en medio “2f” en un sistema estático de forma libre, mixta-libre y coinmovilizada. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas, $a > b > c$ obtenidas por una prueba <i>a posteriori</i> Tukey.	58

Capítulo I

I. INTRODUCCIÓN

La producción de aguas residuales a gran escala es el resultado del incremento de la actividad humana, que genera desechos de distintos tipos: domésticos, industriales, agrícolas, pesqueros y acuícolas. Los desechos usualmente son vertidos en los cuerpos de agua (río, lago o mar), donde pueden causar problemas de eutrofización (exceso de nutrientes) (Hammer, 1975).

En algunas regiones del mundo la eutrofización por actividad acuícola, causa graves problemas al medio ambiente (Olguin, 2003). La acuicultura es una industria que se ha expandido rápidamente ya que la producción mundial continúa creciendo, tanto en volumen como en proporción del suministro mundial de diversos productos como el pescado para consumo humano directo. La producción acuícola en el 2002 (51.4 millones de toneladas, de la que China representó el 71%) fue un 6.1% superior a la del año 2000. En el 2002 el sector de la acuicultura (sin incluir el de China), contribuyó con 12 millones de toneladas de pescado para consumo humano. Considerando que la acuicultura se encuentra en plena expansión sus efluentes pueden ser el mayor aporte de contaminación de un ecosistema costero (FAO, 2002; Jones *et al.*, 2001).

Para mejorar la calidad de los efluentes existen distintos tipos de tratamientos de las aguas residuales, según propone Oswald (1988):

- Tratamiento primario o fisicoquímico, consiste en técnicas de sedimentación y floculación, para remover las partículas sólidas.
- Tratamiento secundario que se utiliza para bajar la carga orgánica de compuestos orgánicos solubles, utilizando lodos activados.

- Tratamiento terciario en el cual todos los compuestos orgánicos solubles, productos de la oxidación, son removidos mediante métodos físicos, químicos o biológicos.
- Tratamiento cuaternario que consiste en utilizar la coagulación química y filtración por carbón activado, para degradar los compuestos orgánicos refractarios e inorgánicos tóxicos.
- Tratamiento mediante ósmosis inversa, electrodiálisis y destilación solar se eliminan las sales inorgánicas, compuestos orgánicos residuales y los metales pesados.

En México la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), instituyó la NOM-001-SEMARNAT-1996 y la NOM-002-SEMARNAT-1996, que son normas que establecen los valores máximos de algunas de las variables como material orgánico, detergentes, metales traza, entre otros, permitidos para poderse descargar al mar. Para el nitrógeno total los valores permitidos por la NOM-001-SEMARNAT-1996 y NOM-002-SEMARNAT-1996 son 25 mg l^{-1} en descarga diaria promedio y 15 mg l^{-1} en promedio mensual y para el fósforo total son 10 mg l^{-1} el promedio diario y 5 mg l^{-1} para la descarga promedio mensual.

Considerando esta clasificación de aguas residuales es necesario adaptar sistemas de acuicultura que permitan una mayor productividad y al mismo tiempo no dañen el medio ambiente. La solución a estos problemas podría ser la utilización de métodos biológicos, que incluyen el uso de microalgas para el tratamiento de efluentes. La utilización de cultivos microalgales resultan ser una alternativa de tratamiento terciario de aguas residuales (Asano *et al.*, 2000; Salazar, 2006; Aguilar-May, 2006).

Las microalgas son capaces de fijar dióxido de carbono por fotosíntesis; pueden absorber metales pesados, remueven eficientemente nutrientes como el nitrógeno (amonio y formas oxidadas inorgánicas) y el fósforo (ortofosfatos), ya que en altas concentraciones de causan problemas de eutrofización en los cuerpos de agua receptores. La biomasa microalgal producida para el tratamiento de estos efluentes terciarios puede usarse también como alimento y pigmentos entre otras posibles aplicaciones (de la Noüe *et al.*, 1990; Lee y Choul-Gyun, 2002; Chacón *et al.*, 2004).

Para el tratamiento biológico con microalgas es importante considerar algunos parámetros como son: el tipo de efluente, la carga orgánica, la temperatura, la intensidad luminosa, el género de microalgas y el tipo de cultivo (monoalgal o mixto) (Salazar, 2006).

El tratamiento de aguas residuales por medio de cultivos de microalgas tiene la desventaja de requerir grandes superficies con poca profundidad para permitir una eficiente penetración de la luz. Un problema adicional es la recuperación posterior de la biomasa microalgal producida, por lo cual una propuesta de solución a ésta problemática es el uso de microalgas inmovilizadas (Chevalier y de la Noüe, 1985).

La inmovilización de microalgas dentro de una matriz es una manera de resolver el problema de la cosecha de la biomasa y de optimizar el espacio para el cultivo. La inmovilización por confinación de células dentro de las matrices se lleva a cabo por polimerización de un material gelificante, el cual se caracteriza por ser poroso o fibroso (Yang y Wang, 1990). La inmovilización de microalgas (procariotas y eucariotas) a través de soportes de hidrogel es un método simple no destructivo que preserva las propiedades metabólicas y fisiológicas de las células (Romo y Pérez-Martínez, 1997). Las células vivas inmovilizadas tienen ciertas ventajas con respecto a las células suspendidas: la separación final de células es innecesaria y la actividad metabólica puede permanecer constante por periodos prolongados (meses a años) (Cañizares *et al.*, 1994). El uso de sistemas de inmovilización con microalgas y cianobacterias, puede ser una posible solución para disminuir las altas concentraciones de amonio contenido en las aguas residuales (Cañizares *et al.*, 1993).

Existen diversos tipos de matrices para la inmovilización de microorganismos, entre ellas se encuentran el uso de polímeros sintéticos como el poliuretano, entre otros y los biopolímeros naturales que son materiales abundantes y respetuosos con el medio ambiente además de ser eficientes y menos costosos (Díaz de Apodaca *et al.*, 2007). Los polímeros naturales más utilizados son: alginato quitosano, carragenano y agar (Abram *et al.*, 2004). La matriz de alginato es una de las más usadas, no es tóxica y permite el crecimiento de ciertos organismos al interior de la matriz, además la inmovilización con alginato es una técnica sencilla y de bajo costo económico. Sin embargo, el alginato tiene una baja estabilidad en presencia de citrato y fosfatos (Moreno-Garrido *et al.*, 2005). El carragenano

tiene un alto costo económico, además de requerir elevadas temperaturas (30 a 50 °C) para la inmovilización y ser inestable en presencia de iones de Na⁺ (Robinson *et al.*, 1986).

El quitosano es uno de los polisacáridos más abundantes en la naturaleza y se encuentra principalmente en las paredes celulares de algunos hongos. Este biopolímero se prepara por desacetilación de los grupos acetamida de la quitina que es un polímero natural extraído de los caparazones de los crustáceos como cangrejos y camarones además de insectos. El método más usado para la producción del quitosano es la hidrólisis de la quitina en medio alcalino, usualmente hidróxido de sodio o de potasio, mantenido con altas temperaturas (valores superiores a 60 °C) (Díaz de Apodaca *et al.*, 2007; Lárez-Velásquez, 2003).

El quitosano es el único polisacárido catiónico natural con características especiales en numerosas aplicaciones y es soluble en diferentes medios así como en ácidos inorgánicos (Lárez-Velásquez, 2003).

En los últimos años se han encontrado excelentes resultados en el uso de la quitina y de sus derivados los quitosanos por su capacidad de absorber iones metálicos, además se utiliza como agente antimicrobiano y en el tratamiento de efluentes (Shirai, 1996). Entre las propiedades más importantes de los quitosanos para la inmovilización de células destaca su alta estabilidad y resistencia a la humedad, su actividad quelante y su solubilidad en ácidos orgánicos diluidos tales como acético maleico y glicólico. Es de especial importancia el uso del quitosano en procesos de preconcentración, separación y purificación de elementos traza (Abram *et al.*, 2004).

Entre algunos de los géneros de microalgas y cianobacterias utilizados para la inmovilización se encuentran las microalgas filamentosas *Spirulina* y *Phormidium*, las cuales han sido inmovilizadas con el propósito de fijar nitrógeno y fósforo provenientes de efluentes secundarios y para la producción de hidrógeno entre otros usos. *Scenedesmus* ha sido usada para la producción de polisacáridos sulfatados y combustible, así como en el tratamiento terciario de aguas residuales (de la Noüe y Proulx, 1988; de la Noüe *et al.*, 1990; Kaya y Picard, 1996). Recientemente se han realizado estudios sobre coinmovilización de microalgas con bacterias o levaduras para la producción de α -amilasa, alcohol e hidrógeno (de la Noüe *et al.*, 1990).

Es importante resaltar las interacciones entre bacteria-microalga ya que constituyen una alternativa para el control de proliferaciones de bacterias y fitoplancton causantes de daños a los ambientes naturales y sistemas cerrados de cultivo.

Se han realizado diversas investigaciones tanto en laboratorio como en *in situ* que han demostrado fenómenos de estímulo e inhibición de crecimiento en microalgas y/o bacterias. Las bacterias pueden incrementar el crecimiento microalgal mediante la producción de algunas vitaminas, a su vez las sustancias orgánicas producidas por el fitoplancton en condiciones naturales son utilizadas por bacterias como sustrato de crecimiento, también existe un efecto antagonista entre bacteria-fitoplancton en el cual algunos componentes de las comunidades bacterianas son capaces de lisar células microalgales (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

Así como las interacciones entre bacteria-microalga son importantes también los son las interacciones entre microalgas en la cual dos o más especies pueden ocupar el mismo nicho ecológico puesto que el hábitat es heterogéneo por las fluctuaciones temporales y espaciales que ocurren en el medio ambiente, pudiendo de esta manera coexistir las microalgas en equilibrio ya que cada una se ve limitada por diferentes recursos.

Esta coexistencia entre microalgas sucede tanto en cultivos como en el medio natural tal como lo reporta Tilman (1977) el cual cultivo dos especies de diatomeas *Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana* en cultivos semicontinuos a diferentes proporciones de silicatos y diferentes concentraciones de fosfatos en la cual con una proporción alta de Si:P se ve favorecida *Asterionella* y a una alta proporción de P:Si se favorece *Cyclotella* y cuando las proporciones son intermedias ambas especies coexisten (South y Whittick, 1987).

I.1. ANTECEDENTES

Existen diversos trabajos sobre inmovilización de microalgas relacionados con el tratamiento de aguas residuales entre los cuales destacan los siguientes:

de la Noüe y Chevalier (1985) que inmovilizaron dos especies de *Scenedesmus* de agua dulce en esferas de k-carragenano, y sus resultados fueron similares en cuanto a las curvas de crecimiento, remoción de nitrógeno y fósforo tanto en microalgas inmovilizadas como en células libres, por lo cual concluyeron que las microalgas crecen bien dentro de las esferas y que son fisiológicamente activas.

de la Noüe y Proulx (1988) que usaron agregados de *Phormidium* inmovilizados en quitosano para la remoción de nitrógeno (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) y fósforo (P-PO_4^{3-}) de efluentes secundarios. Los autores concluyeron que la eficiente remoción de fósforo (87.3%) y de nitrógeno (98%) con las microalgas protegidas por el quitosano previenen la abrasión y pueden asimilar los ortofosfatos y el nitrógeno inorgánico.

Chevalier y de la Noüe (1988) evaluaron los efectos de coinmovilizar la microalga *Scenedesmus obliquus* y la bacteria *Bacillus subtilis* en carragenano sobre la producción de la alfa amilasa. Los resultados muestran que el aumento de la enzima coincide con altas densidades de la bacteria pero con bajas densidades en la microalga.

Jeanfils *et al.* (1993) evaluaron el efecto de altas concentraciones de nitrógeno en el medio sobre el crecimiento y asimilación de nitrógeno en células libres e inmovilizadas de *Chlorella vulgaris*. Estos autores concluyeron que la microalga puede vivir en altas concentraciones (97mM) de nitratos, sin embargo, retardó el crecimiento y disminuyó la producción de biomasa celular. Los valores de máxima asimilación de nitrógeno se registraron en los primeros días del cultivo tanto en las células libres como en las que fueron inmovilizadas.

Romo y Pérez-Martínez (1997) inmovilizaron a *Pseudanabaena galeata* en esferas de alginato como un método de almacenaje sin adición de crioprotectores. Las esferas estuvieron almacenadas por un periodo de 14-18 meses y no tuvieron diferencias estructurales, fisiológicas y de crecimiento. Al comparar la preservación de células por distintas técnicas, encontraron que la inmovilización de células es un procedimiento recomendable por su alta viabilidad.

Chang (2001) evaluó la fisiología de *Scenedesmus quadricauda* inmovilizada en alginato después de ser almacenada por años y evaluó su aplicación para el control de la calidad de agua en un cultivo de tilapia. Las células inmovilizadas las mantuvo en completa oscuridad a 4 °C sin un medio enriquecido con nutrientes. Al reactivar las células fueron viables y al cultivarlas de nuevo el número de cenobios aumentó 40 veces. Además, fueron muy eficientes en la remoción de nutrientes en cultivos de tilapia, porque las concentraciones de amonio decrecieron significativamente con las células inmovilizadas.

Lebsky *et al.* (2001) evaluaron la interacción entre la microalga *Chlorella vulgaris* en esferas de alginato con la bacteria *Phyllobacterium myrsinacearum* y con *Azospirillum brasilense* promotora del crecimiento de plantas. La interacción fue monitoreada con microscopio electrónico por 10 días. Este estudio sugiere que hubo interacciones comensales entre la especie de microalga y las dos especies de bacterias. Observaron que en el transcurso del tiempo las bacterias afectan el crecimiento del cultivo de la microalga, ya sea inhibiendo su crecimiento o con su reproducción.

Cruz-Fraga (2003) inmovilizó células de *Arthrospira maxima* colonizando la matriz de membranas de quitosano, obteniendo una alta viabilidad y crecimiento de los cultivos. Al mantener *A. maxima* en forma libre y también inmovilizada se logró una remoción del 100% a partir de una concentración de 2 mg l⁻¹ de amonio y fósforo a las 12 horas de cultivo. El autor menciona que las membranas de quitosano no fueron la mejor opción de inmovilización ya que existió una liberación de células al medio.

Chacón *et al.* (2004) evaluaron a *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. para la remoción de N-NH₄⁺, P-PO₄³⁻ y la disminución de la DQO (demanda química de oxígeno) de las aguas residuales del sistema de estabilización de la Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela. Los bioensayos los tuvieron bajo las mismas condiciones de fotoperíodo, temperatura y sin aireación durante 27 días. Al final del experimento obtuvieron una remoción total de amonio en todos los cultivos con agua residual, mientras que la remoción máxima para fosfatos, en *Chlorella* sp. fue de 44% en el agua residual esterilizada y de 48.7% para *Scenedesmus* sp. en el agua residual no esterilizada. En esta investigación concluyeron que ambas especies son una buena alternativa para mejorar la calidad del agua en el tratamiento de aguas residuales.

de-Bashan *et al.* (2004) coinmovilizaron en esferas de alginato a la bacteria *Azospirillum brasiliense* junto con *Chlorella vulgaris* o con *C. sorokiniana* para utilizarlas en la remoción de nitrógeno y fósforo presentes en aguas residuales domésticas. La coinmovilización de la bacteria con las microalgas resultó en un incremento significativo en el crecimiento de ambas microalgas, así como en un 100% de remoción de amonio, un 94% de nitrato, y un 92% de fósforo en 6 días, comparado con un 75% de amonio, 84% de nitrato y 89% de fósforo cuando solo utilizaron la microalga para la remoción y concluyeron que la coinmovilización puede usarse para el tratamiento de aguas residuales.

Aguilar-May (2006) describió un nuevo procedimiento para la inmovilización de células de *Synechococcus* sp. en matrices de quitosano y comparó el crecimiento entre células libres e inmovilizadas. En este trabajo se menciona que las células de *Synechococcus* sp. pueden ser inmovilizadas en cápsulas de quitosano y que mantienen tasas similares de crecimiento comparado con los cultivos de células libres.

Aguilar-May *et al.* (2007) relacionaron el crecimiento de cultivos de *Synechococcus* sp. inmovilizadas en cápsulas de quitosano con el grosor de las cápsulas y con el tiempo de exposición de las cápsulas al NaOH utilizado para la gelificación. Las cápsulas que obtuvieron después de 80 s de exposición a una solución de 0.1 N de NaOH, resultaron en un mejor crecimiento respecto a los cultivos de células libres (6.9 y 5.2 divisiones en 10 días respectivamente).

Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2008) evaluaron el crecimiento de *Synechococcus elongatus* y la remoción de nitratos y fosfatos en células libres e inmovilizadas en quitosano. Obtuvieron el mayor crecimiento en células libres en comparación con las inmovilizadas, en tanto que la remoción de nitratos fue similar en células libres (161.3 $\mu\text{moles l}^{-1}$ ó 45%) e inmovilizadas (145.2 $\mu\text{moles l}^{-1}$ ó 39%). La remoción de los fosfatos fue mayor en células libres (95.2 $\mu\text{moles l}^{-1}$ ó 89%) que en células inmovilizadas (82.5 $\mu\text{moles l}^{-1}$ ó 78 %). Concluyeron que las células de *S. elongatus* inmovilizadas en quitosano pueden remover eficientemente nitratos y fosfatos y tiene una tasa de crecimiento similar a las células libres.

Fierro-Reséndiz *et al.* (2007) evaluaron el efecto de inmovilizar células de *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. en esferas de quitosano al 2%, obteniendo células viables después del proceso de inmovilización. La cepa de *Scenedesmus* sp. fue la especie que tuvo mayor crecimiento, por lo cual fue utilizada para remover nitrógeno y fosfatos de un medio de cultivo simulando un efluente de aguas de desecho acuícola. En este caso la remoción de nitratos fue del 70% y de fosfatos del 94% a las 12 horas. Además, lograron mantener viable por siete meses a *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. inmovilizadas en esferas de quitosano, almacenada en oscuridad y a una temperatura de 4 °C.

En el presente estudio se evaluó la eficiencia de las microalgas coinmovilizadas en quitosano para la remoción de nitrógeno y fósforo con el fin de proponer un método alternativo y eficiente para el tratamiento terciario de las aguas residuales. Además de investigar posibles asociaciones exitosas entre dos especies de microalgas con distintos requerimientos de nitrógeno y fósforo de acuerdo a la que proporcione mejores tasas de crecimiento y la mayor remoción de nutrientes.

Capítulo II

II. OBJETIVOS

II. 1 HIPÓTESIS

Las microalgas coinmovilizadas removerán con mayor eficiencia los compuestos de nitrógeno y fósforo de aguas residuales con respecto a las microalgas libres en el medio.

II. 2 OBJETIVOS

II. 2.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de remoción de distintas formas químicas de nitrógeno y fósforo al utilizar cultivos de microalgas coinmovilizada en cápsulas de quitosano.

II. 2.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar dos especies de microalgas que puedan coexistir con base en el crecimiento poblacional.
2. Evaluar el efecto de la concentración de nutrientes en el medio sobre cultivos monoespecíficos y mixtos.
3. Evaluar el efecto del tamaño de las células en el crecimiento de cultivos de dos especies mantenidos en forma libre y coinmovilizados en quitosano.
4. Evaluar la capacidad de remoción de distintas formas químicas de nitrógeno y fósforo al utilizar cultivos de dos especies mantenidos en forma libre y coinmovilizadas en cápsulas de quitosano.

Capítulo III

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 1. Características de las especies

Para realizar este estudio se utilizaron ocho cepas, entre ellas dos de cianobacterias y seis de microalgas que corresponden respectivamente a: *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1). Las especies fueron obtenidas de la Colección Particular del Laboratorio de Biología y Cultivo de Microalgas del Centro de Investigación y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

Spirulina maxima (Setchell et Gardner en Gardner 1917) es una cianobacteria filamentosa, no ramificada, el tricoma mide de 7 - 9 micras de ancho y las células miden de 5 – 7 micras de largo. Los filamentos son móviles con numerosos aerótopos y la forma helicoidal del tricoma es característica de este género (3-8 hélices). Esta especie crece rápidamente y tolera tanto altas como bajas salinidades (Borowitzka y Lesley, 1988; Komarek y Anagnostidis, 2005).

Synechococcus elongatus (Nägel 1849) es una cianobacteria de forma esférica, con un tamaño promedio de 2.7 micras además forma cadenas de hasta 6 células según la fase de crecimiento. Esta especie tiene altas tasas de crecimiento (1.5 divisiones por día) en cultivos estáticos en un medio "f" a una temperatura de 24 ± 1 °C, un fotoperíodo de 12:12 horas luz : oscuridad y a una irradiancia de $110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Aguilar-May, 2002).

Scenedesmus obliquus (Turpin) Kützing 1833 son células que forma un cenobio que es un agregado de células que consta de 2 a 4 células fusiformes con ápices acusados en series lineales o sublineales con tamaño promedio de 3 a 9 micras de ancho y de 10 a 21 micras de largo y su pared celular es lisa sin espinas (Tiffany y Briton, 1971).

Scenedesmus sp. (Meyen, 1829) son microalgas que se caracterizan por el arreglo bidimensional de células 2, 4, 8 o hasta 16 en un agregado llamado cenobio con un tamaño promedio de 4 a 6 micras. Las células son de forma elipsoidal, obtusa, acusada y algunas con espinas (Borowitzka y Lesley, 1988).

Chlamydomonas gloeopara Rodhe y Skuja 1948 son células esféricas muy pequeñas, aisladas o en grumos. Sus dimensiones son de 5.5 a 11 micras de diámetro.

Chlamydomonas mexicana Lewin 1957 son células de forma ovoide consta de dos vacuolas contráctiles apicales, un pirenoide lateral, su cloroplasto es en forma de copa y tiene dos flagelos.

Su hábitat es dulceacuícola y crecen en grupos de 2-3 células, tiene un diámetro de 5.5 a 11 micras (Trujillo, 1993; <http://www.bio.utulsa.edu/deepestgreen/Chlamydomonadales.html>).

Chlorella vulgaris Beyerinck 1890 son células esféricas con un diámetro de 5 a 10 micras, forma de 2 a 8 autoesporas (Tiffany y Briton, 1971).

III. 2. Cultivos de células libres en el medio

III. 2.1 Crecimiento de cultivos monoespecíficos

Se prepararon cultivos monoespecíficos de las ocho cepas para conocer el crecimiento poblacional. Los cultivos se realizaron siguiendo la secuencia clásica en sistemas estáticos (sin renovación de medio) (Stein, 1973), transfiriendo los cultivos a un volumen sucesivamente mayor desde tubo de ensayo (10 ml) hasta matraz Erlenmeyer (125 ml). Los medios de cultivo utilizados fueron el medio “f” descrito por Guillard y Ryther (1962), y una doble concentración de nutrientes al medio por lo que se nombró medio “2f”. Para la cianobacteria *Spirulina maxima* (SPM1) se utilizó el medio de cultivo “f”, “2f” y el específico para *Spirulina* descrito por (Sorokin y Krauss, 1958). Los medios de cultivo fueron esterilizados en una autoclave a 121 °C y 1.05 kg m⁻² de presión durante 15 min.

El inóculo de células para los cultivos monoespecíficos provino de un cultivo de fase exponencial de crecimiento. Los cultivos se mantuvieron por triplicado en una cámara climática con temperatura de 20 ± 1 °C y a luz continua a una irradiancia de 110 μE m⁻² s⁻¹ proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Silvana F40CW).

Para cada condición experimental se evaluó diario y durante al menos 10 días la cantidad de biomasa producida, mediante evaluación de la densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 550 nm utilizando un espectrofotómetro (Hach modelo DR/400 UV-VIS) y por medio de recuentos directos en los días 0, 5 y 10 con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX31).

Con los datos de densidad óptica, se realizaron las curvas de crecimiento y se calculó la tasa de crecimiento máxima (μ_{\max}) durante la fase exponencial utilizando las ecuaciones propuestas por Fogg y Thake (1987). Además, se calculó la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) según lo descrito por Nieves *et al.* (1998), que considera la suma de las tasas de crecimiento por día (μ) que son adicionadas a la del día previo para obtener $\Sigma\mu = \mu_1 + \mu_2 + \dots + \mu_n$ durante el período de cultivo (n).

III. 2.2. Remoción de nutrientes de los cultivos monoespecíficos

Para estudiar la capacidad de remoción de nutrientes de cada cepa, se tomó una submuestra (30 ml) de un volumen de medio al inicio y al final del cultivo. En las muestras recolectadas se analizaron la cantidad de biomasa producida como ya está descrito en la sección III.2.1., el pH y la concentración de nutrientes en el medio. Para cada muestra se evaluó la concentración de los nutrientes: nitratos, nitritos y ortofosfatos siguiendo las técnicas espectrofotométricas descritas para un Hach DR/4000 UV-VIS. Los nitratos se evaluaron por el método de reducción de cadmio, los nitritos por el método de diazotización y ortofosfatos por el método de ácido ascórbico (Hach, 1997).

III. 3. Cultivos mixtos de dos especies de microalgas

Con base en los resultados del crecimiento de las ocho cepas se seleccionaron las especies que tuvieron mayor tasa de crecimiento y mayor capacidad de remoción de nitratos y fosfatos. Las especies seleccionadas fueron: *Synechococcus elongatus*. (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), y *Chlorella vulgaris* (CLV1).

Se ensayaron cultivos mixtos de dos especies (cocultivos) de las cepas seleccionadas y morfológicamente diferentes para determinar la coexistencia con base en el crecimiento

poblacional de cada cepa. Estos experimentos se utilizaron para evidenciar las relaciones alelopáticas entre las especies.

Los cultivos mixtos se hicieron por triplicado en matraz Erlenmeyer (125 ml) con 100 ml de medio considerando lo descrito por Guillard y Ryther (1962), y para evitar una posible limitación por nutrientes se utilizó el doble de la concentración de nutrientes (medio “2f”). Para cada caso los cultivos monoespecíficos se acondicionaron previamente a la concentración de nutrientes en el medio por al menos 10 días. El inóculo de células para los cultivos mixtos provino para cada cepa de un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Los cultivos se mantuvieron bajo las mismas condiciones de luz y de temperatura como lo descrito en la sección III.2.1. y los recuentos de células se realizaron de forma análoga a lo indicado en la sección anterior.

III. 4. Técnica de inmovilización

Con los resultados que se obtuvieron de la caracterización del crecimiento de los cultivos mixtos (dos especies de microalgas), se seleccionaron aquellas cepas de las especies que pudieron coexistir exitosamente y las que obtuvieron la mayor tasa de crecimiento específica. Las especies seleccionadas se utilizaron para su posterior coinmovilización en una matriz orgánica que se elaboró con quitosano.

III. 4.1. Inmovilización con quitosano

El quitosano que se utilizó en este estudio se obtuvo a partir del exoesqueleto de camarón, que fue elaborado en el laboratorio de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) en Hermosillo, Sonora, México.

Se concentró volumen de cultivo de cada especie de microalga mantenida en la fase exponencial se concentro en una centrifuga a 3500 rpm (2465 g) refrigerada a 4 °C (marca Eppendorf 5810R). Las células concentradas de cada par de especies se mezclaron con una solución de quitosano que fue preparada con una mezcla de hojuelas de quitosano al 2% disueltas en ácido acético al 1% y ajustando los valores de la solución a un pH de 4. Los cultivos concentrados de cada par de especies fueron resuspendidos en una solución de

quitosano siguiendo el procedimiento descrito para inmovilización de células por Aguilar-May *et al.* (2007).

Las esferas se obtuvieron mediante el goteo de la mezcla de quitosano y microalgas, dicha mezcla se vertió en una bureta, que goteó a través de una punta de micropipeta de 200 μl con un diámetro externo de 1.5 mm. Las esferas de quitosano con las microalgas inmovilizadas fueron lavadas en una solución de NaOH ajustado a un pH de 7.5-8.0 (Rodríguez-Sánchez y Rha, 1981; Kaya y Picard, 1996).

Con el propósito de tener un control del efecto de la matriz del polímero de quitosano-microalgas se prepararon esferas sin células, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente.

III. 5. Viabilidad y crecimiento de cultivos de microalgas coinmovilizadas en quitosano

Las cápsulas elaboradas con las células coinmovilizadas en quitosano se mantuvieron en dos litros de medio de cultivo “f/2” por un periodo de al menos 12 horas a 20 °C y 110 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, para disminuir el estrés de las células por efecto del proceso de inmovilización.

Se diseñaron cuatro tratamientos por triplicado para los cocultivos de células libres y coinmovilizadas. Los cuatro tratamientos consistieron en:

- a) Medio de cultivo sin células el cual se utilizó como control de las transformaciones químicas de los nutrientes.
- b) Medio de cultivo sin células y con cápsulas de quitosano que se utilizó como control de las transformaciones químicas de los nutrientes y las cápsulas de quitosano.
- c) El medio de cultivo y de los cocultivos de células libres, fueron los tratamientos experimentales para evaluar la eficiencia de la remoción de nutrientes por las células.
- d) El medio de cultivo con cápsulas que contenían células coinmovilizadas, para el tratamiento experimental que evaluó la eficiencia de remoción de nutrientes de las células y del quitosano.

Las células coinmovilizadas se mantuvieron en frascos con 500 ml con un medio de agua de desecho artificial ('2f'). El medio "2f" fue diseñado para simular las concentraciones de nitrógeno y fósforo en aguas de desechos acuícolas y equivalen a concentraciones similares de nitrógeno y fósforo del medio descrito por Guillard y Ryther (1962). El medio "2f" se preparó con agua potable y se esterilizó como fue descrito en la sección III.2.1.

En los tratamientos que se adicionaron cápsulas con células coinmovilizadas y cápsulas de quitosano sin células; para cada experimento se adicionó 1000 cápsulas. Para los tratamientos con células libres (cultivos monoespecíficos y cultivos mixtos) se adicionó una cantidad equivalente de inóculo al mencionado para los cultivos de células coinmovilizadas. Todos los ensayos se montaron por triplicado, bajo las condiciones de mantenimiento de los cultivos descritas en el inciso III.2.1.

Para evaluar el crecimiento de los cultivos monoespecíficos y mixtos se hicieron recuentos de la densidad de células durante siete días. Para los conteos se utilizó un contador de partículas (Multisizer 3, Beckman Coulter) utilizando una solución isotónica (Isoton II). Para los cultivos de células coinmovilizadas el crecimiento se evaluó por medio de recuentos directos del número de células tal como fue descrito en la sección III.2.1. Para efectuar el conteo de las células coinmovilizadas, fue necesario disolver previamente las cápsulas de quitosano en una solución de ácido acético al 90% y aplicar ultrasonido por tres min. Con los datos de los recuentos de células, se evaluó la tasa de crecimiento específica (μ) (Fogg y Thake, 1987) y la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) (Nieves *et al.*, 1998).

Con un microscopio estereoscópico y un microscopio invertido (Olympus modelos SZX7 y CKX31) se observó las características de las cápsulas y del crecimiento de las células en el interior de la cápsula.

Además de los conteos directos se midió el biovolumen para cada cepa para calcular la cantidad de la biomasa que ocupaba cada cepa en los cultivos mixtos tanto libres como coinmovilizados. El cálculo del biovolumen para las células libres se realizó con un contador de partículas (Multisizer 3, Beckman Coulter) que considera una calibración interna que toma como referencia el factor de forma y el volumen de la muestra. Debido a que el quitosano podría obstruir la apertura del contador de partículas, el cálculo del biovolumen de las células inmovilizadas se realizó coconsiderando la forma y el tamaño de

cada cepa con una correspondiente figura geométrica (Sun y Liu, 2003). Para el cálculo del tamaño de las células se midieron al menos treinta individuos de cada cepa por tratamiento.

III. 5.1. Peso seco, peso orgánico y peso de ceniza

Al inicio de los cultivos se evaluó el peso orgánico seco y el peso de las cenizas para cada cepa, estas medidas se realizaron según la técnica propuesta por Sorokin (1973). Se tomó por triplicado una alícuota de cada cultivo y se filtró a través de filtros de fibra de vidrio (PALL A/E) de 4.7 cm de diámetro que fueron previamente calcinados a 470 °C. Las muestras se mantuvieron en una estufa a 60 °C hasta obtener valores de peso constante. Para determinar el contenido de cenizas, las muestras fueron incineradas en una mufla a 470 °C por 4 horas, y por diferencias entre el peso seco constante y el peso de cenizas.

III. 5.2. Remoción de nutrientes inorgánicos

Para conocer la capacidad de remoción de los nutrientes de cada tratamiento descrito en la sección III. 2.2., se tomó una submuestra de un volumen de medio “2f” con la siguiente frecuencia de muestreo: 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Previo a la evaluación de la concentración de nutrientes las muestras se filtraron a través de filtros de fibra de vidrio (PALL A/E) de 4.7 cm de diámetro. En las muestras recolectadas se analizaron la cantidad de biomasa producida como ya está descrito en la sección III. 5.1., así como el pH y la concentración de nutrientes en el medio. En cada muestreo se evaluó la concentración de los nutrientes: nitratos, nitritos y fosfatos siguiendo las técnicas espectrofotométricas descritas para un Hach DR/4000 UV-VIS. Los nitratos se evaluaron por el método de reducción de cadmio, los nitritos por el método de diazotización y ortofosfatos por el método de ácido ascórbico (Hach, 1997).

III. 6. Tratamiento estadístico de los resultados

Para evaluar las diferencias en el crecimiento de los cultivos monoespecíficos se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para los valores de la tasa de crecimiento (μ_{\max}) y para los valores de la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$) y para evaluar las diferencias

entre cepas en el crecimiento de cultivos mixtos (dos especies) se utilizó una prueba “t-Student”.

Con las posibles diferencias en el crecimiento de los cultivos de células libres y coinmovilizadas, se aplicó un análisis de covarianza (ANCOVA) con los valores de la concentración de células y el tiempo.

Para comparar las posibles diferencias en la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma \mu$) de los cultivos de células libres y coinmovilizadas, se utilizó una prueba “t-Student” considerando los posibles pares de los tratamientos utilizados.

Para evaluar las posibles diferencias en la capacidad de remoción de cada uno de los compuestos nitrogenados de los cultivos de células libres y coinmovilizados, se aplicó un análisis de varianza de dos vías (ANOVA).

Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó un análisis *a posteriori* de Tuckey (Zar, 1984).

Para todos los análisis estadísticos se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan estas pruebas y que son la linealidad de los residuos, la normalidad y la homogeneidad de varianzas (Sokal y Rohlf, 1979 y Zar, 1984).

Se trabajó con el programa estadístico STATISTICA® versión 6.0 (Stat Soft Inc., 2002) y se consideró un valor de significancia de 0.05.

Capítulo IV

IV. RESULTADOS

IV.1 Tasa de crecimiento de cultivos monoespecíficos

Las tasas de crecimiento máximas tanto para cianobacterias como para microalgas fueron significativamente diferentes entre cepas para el medio “f” ($F= 13.56, P<0.05$) y para el medio “2f” ($F= 39.34, P<0.05$) (Tabla I). La cepa CLMM1 tanto en el medio “f” como en “2f” fue significativamente mayor al resto de las cepas. No hubo diferencias significativas entre los medios de cultivo a excepción de las cepas SCX1 y SCX2 que fueron significativamente mayores en el medio “f”.

En cuanto a las tasas de crecimiento acumulada tanto para cianobacterias como para microalgas fueron significativamente diferentes entre las cepas ($F= 20.152, P<0.05$) pero no así entre los dos tipos de medio (“f” y “2f”) (Tabla I). La cepa de SPM1 si presentó diferencias significativas entre el medio “f” y el medio de cultivo “2f” ($P <0.05$).

La cepa SPM1 tuvo su mayor tasa de crecimiento acumulada en el medio “f” (Tabla I y Figuras 1 y 2) en comparación con los otros dos tipos de medio de cultivo utilizados (Medio Spirulina y “2f”). La mayor tasa de crecimiento acumulada para SPM1 ocurrió con el medio “2f”.

En cuanto a la cepa SYX1 la mayor tasa de crecimiento acumulada fue en medio “f” (Figura 3 y Tabla I).

Con respecto a las cepas de microalgas SCO1, SCX1, SCX2, CLMG1 y CLMM1 tuvieron las mayores tasas de crecimiento en el medio “2f” (Figuras 4 a 9, Tabla I) mientras que la cepa CLV1 resultó su mayor tasa de crecimiento en medio “f” (Figura 8 y Tabla I).

IV. 1.1. Evaluación del crecimiento por densidad óptica

La cepa que tuvo la mayor densidad celular entre las cianobacterias y microalgas cultivadas fue SYX1 tanto en medio “f” como “2f” seguida por las cepas de *Scenedesmus* (SCO1,

SCX1 y SCX2) y por CLMM1 (Tabla I), el resto de las cepas resultaron en una densidad celular menor.

Paralelamente a los registros de densidad óptica de los cultivos de microalgas y cianobacterias se realizaron recuentos celulares en los días de cultivo 0, 5, y 10 lo que permitió obtener ecuaciones de regresión para cada cepa de microalga y cianobacteria así como el valor de r^2 (Tabla II y III). Esto permitió realizar una extrapolación de los valores de densidad óptica y el número de células para cada especie. En cuanto a las curvas de crecimiento de las cepas de cianobacterias y microalgas, las cepas SCO1, SCX1, SCX2, CLMG1, CLMM1, y CLV1 resultaron con variaciones en la curva de crecimiento (Figuras 4 a 9) y todas presentaron una fase de acondicionamiento. Las cepas de las cianobacterias SPM1 y SYX1 tuvieron las fases típicas de la curva de crecimiento en ambos medios (“f” y “2f”) y en el caso de la cepa SPM1 sucedió también en el medio Spirulina.

Tabla I. Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de células ($\times 10^{-6}$ cel ml^{-1}), la tasa de crecimiento en fase exponencial (μ_{max} divisiones por día), la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$, divisiones en 10 días) de las cepas de cianobacterias y microalgas cultivadas en medio “f” y “2f”. Los números distintos indican diferencias significativas entre las cepas (por la μ_{max}), 1>2>3>4 obtenidas por una prueba *a posteriori* Tukey. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas (por la $\Sigma\mu$), a>b>c obtenidas por una prueba *a posteriori* Tukey.

ESPECIES	INICIAL ("f")	FINAL ("f")	INICIAL ("2f")	FINAL ("2f")	μ ("f")	μ ("2f")	$\Sigma\mu$ ("f")	$\Sigma\mu$ ("2f")
<i>Spirulina maxima</i>	0.02 \pm 0.00	0.17 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.06 \pm 0.01	0.25 \pm 0.04 ³	0.27 \pm 0.07 ^{2,3}	3.01 \pm 0.05 ^a	2.62 \pm 0.34 ^{ab}
<i>Spirulina maxima</i> (medio <i>Spirulina</i>)	0.01 \pm 0.00	0.72 \pm 0.59			0.33 \pm 0.04		2.80 \pm 0.18	
<i>Synechococcus elongatus</i>	1.12 \pm 0.11	52.89 \pm 4.91	2.03 \pm 0.42	59.53 \pm 7.35	0.42 \pm 0.04 ^{2,3}	0.40 \pm 0.01 ²	3.01 \pm 0.13 ^a	3.17 \pm 0.02 ^a
<i>Scenedesmus obliquus</i>	0.49 \pm 0.08	1.93 \pm 0.09	0.45 \pm 0.08	2.24 \pm 0.41	0.28 \pm 0.01 ³	0.21 \pm 0.02 ³	2.23 \pm 0.14 ^b	2.37 \pm 0.16 ^b
<i>Scenedesmus</i> (SCX1)	0.89 \pm 0.11	1.48 \pm 0.09	0.84 \pm 0.31	3.93 \pm 0.26	0.44 \pm 0.09 ^{2,3}	0.18 \pm 0.02 ³	1.42 \pm 0.05 ^{bc}	1.81 \pm 0.11 ^{bc}
sp. (SCX2)	0.60 \pm 0.08	1.27 \pm 0.19	0.56 \pm 0.02	2.04 \pm 0.17	0.61 \pm 0.07 ^{1,2}	0.22 \pm 0.04 ^{2,3}	2.24 \pm 0.19 ^b	2.39 \pm 0.14 ^b
<i>Chlamydomonas gleopara</i>	0.13 \pm 0.02	1.08 \pm 0.33	0.08 \pm 0.02	1.04 \pm 0.28	0.21 \pm 0.13 ³	0.28 \pm 0.10 ^{2,3}	1.72 \pm 0.26 ^{bc}	1.77 \pm 0.59 ^{bc}
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	0.35 \pm 0.09	1.76 \pm 0.29	0.24 \pm 0.09	1.74 \pm 0.56	0.72 \pm 0.14 ¹	0.88 \pm 0.12 ¹	1.97 \pm 0.05 ^{bc}	2.05 \pm 0.20 ^b
<i>Chlorella vulgaris</i>	0.87 \pm 0.13	0.84 \pm 0.17	0.61 \pm 0.11	0.94 \pm 0.27	0.25 \pm 0.10 ³	0.27 \pm 0.02 ^{2,3}	1.62 \pm 0.24 ^{bc}	1.29 \pm 0.13 ^{bc}

Tabla II. Ecuaciones de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) con una $n=30$ para cada cepa, obtenidas con los valores de densidad óptica y los recuentos directos de células los días de cultivo 0, 5 y 10 para cada especie de microalga y cianobacterias cultivadas en medio "f".

ESPECIES	CEPAS	Ecuación de regresión	r^2
<i>Synechococcus elongatus</i>	SYX1	$Y = -7.48+171.09x$	1.00
<i>Scenedesmus obliquus</i>	SCO1	$Y = -0.06+9.20x$	0.90
<i>Chlamydomonas gleopara</i>	CLMG1	$Y = -0.13+10.91x$	0.92
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	CLMM1	$Y = -0.16+13.93x$	1.00
<i>Chlorella vulgaris</i>	CLV1	$Y = 0.83-0.46x$	0.02
<i>Scenedesmus</i> sp.	SCX1	$Y = 0.54+8.13x$	0.62
	SCX2	$Y = 0.36+5.13x$	0.90
<i>Spirulina maxima</i>	SMP1 (F)	$Y = -0.02+0.58x$	0.95
	SMP1	$Y = -0.16+1.44x$	0.98

Tabla III. Ecuaciones de regresión y el coeficiente de determinación (r^2) con una $n=30$ obtenidas con los valores de densidad óptica y los recuentos directos de células los días de cultivo 0, 5 y 10 para cada especie de microalga y cianobacterias cultivadas en medio "2f".

ESPECIES	CLAVE DE CEPAS	Ecuación de regresión	r^2
<i>Synechococcus elongatus</i>	SYX1	$Y = -6.91+194.90x$	1.00
<i>Scenedesmus obliquus</i>	SCO1	$Y = -0.11+11.73x$	0.97
<i>Chlamydomonas gleopara</i>	CLMG1	$Y = -0.31+12.13x$	1.00
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	CLMM1	$Y = -0.29+17.96x$	0.97
<i>Chlorella vulgaris</i>	CLV1	$Y = 0.32+6.36x$	0.86
<i>Scenedesmus</i> sp.	SCX1	$Y = -0.63+28.44x$	0.83
	SCX2	$Y = 0.09+8.96x$	0.96
<i>Spirulina maxima</i>	SMP1	$Y = 0.01+0.26x$	0.99

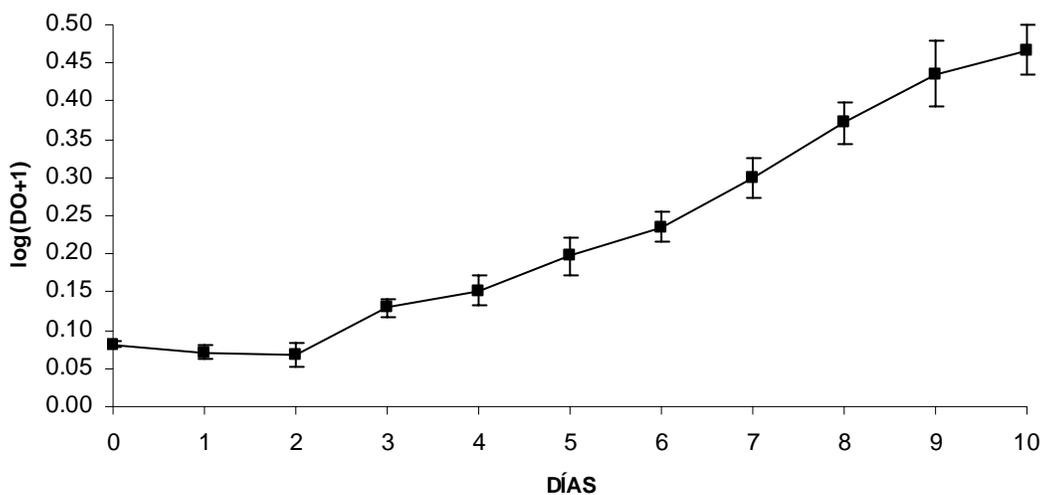


Figura 1. Curva de crecimiento de *Spirulina maxima* (SPM1) mantenida en un sistema estático en medio Spirulina. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

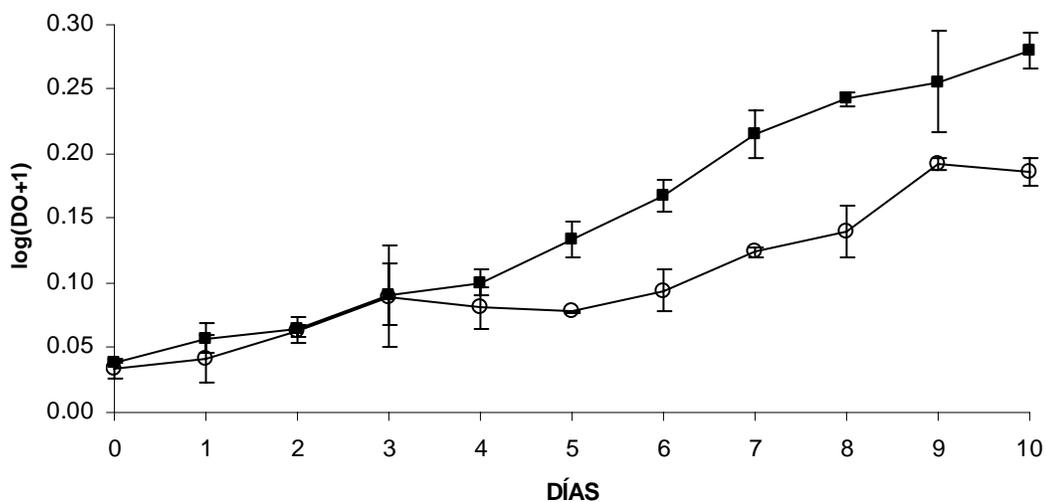


Figura 2. Curvas de crecimiento de *Spirulina maxima* (SPM1) mantenidas en sistema estático en un medio "f" (■) y en un medio "2f" (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3)

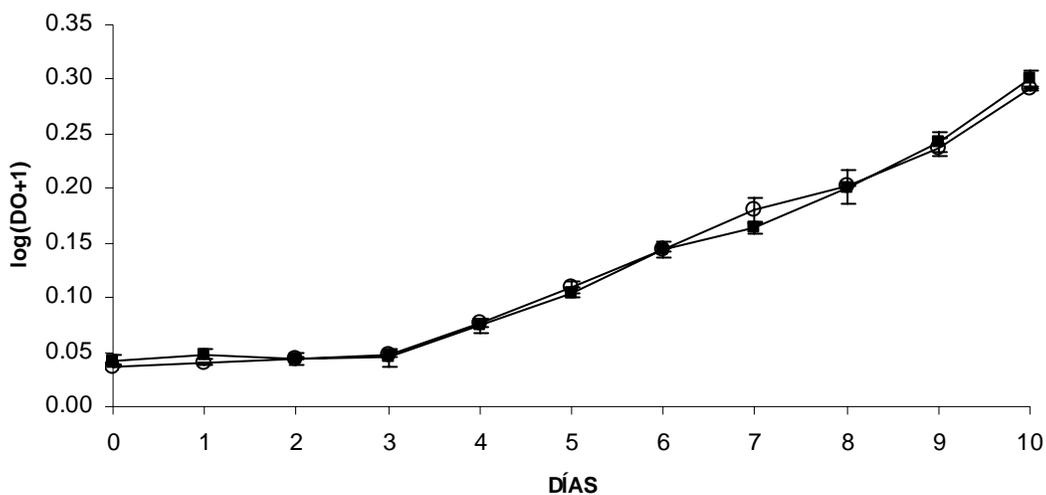


Figura 3. Curvas de crecimiento de *Synechococcus elongatus* (SYX1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

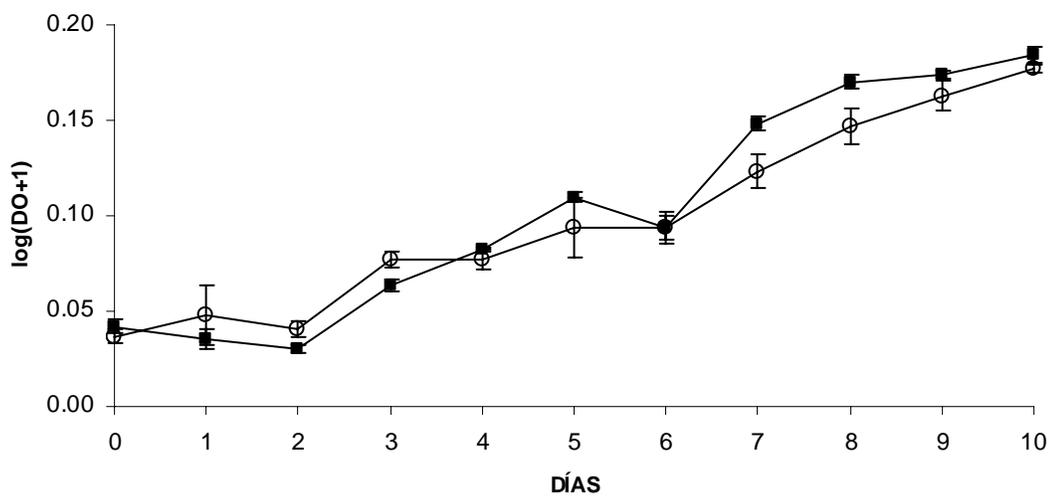


Figura 4. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* (SCO1) mantenidas en un sistema estático en el medio “f” (■) y en el medio “2f” (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

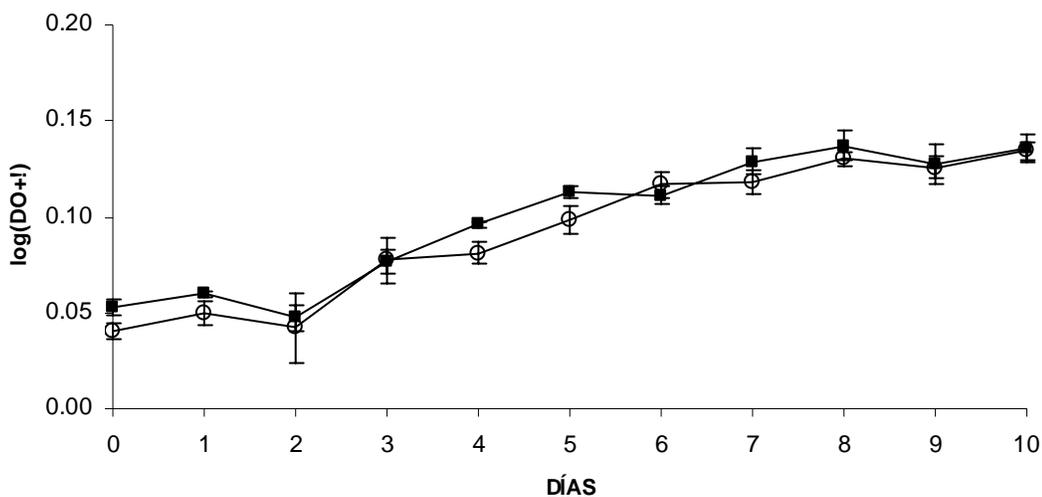


Figura 5. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus* sp. (SCX1) mantenidas en un sistema estático en el medio "1" (-■) y en el medio "2f" (-○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

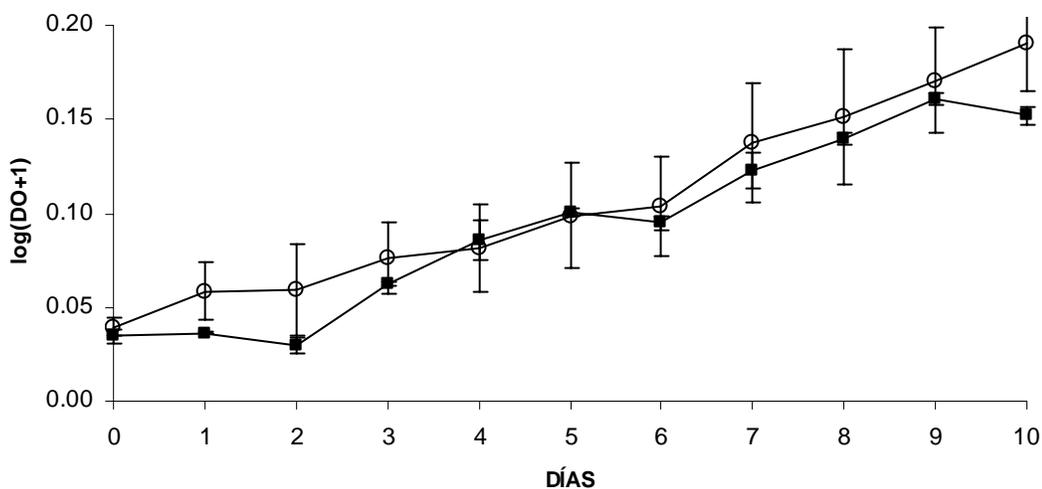


Figura 6. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus* sp. (SCX2) mantenidas en un sistema estático en el medio "1" (-■) y en el medio "2f" (-○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

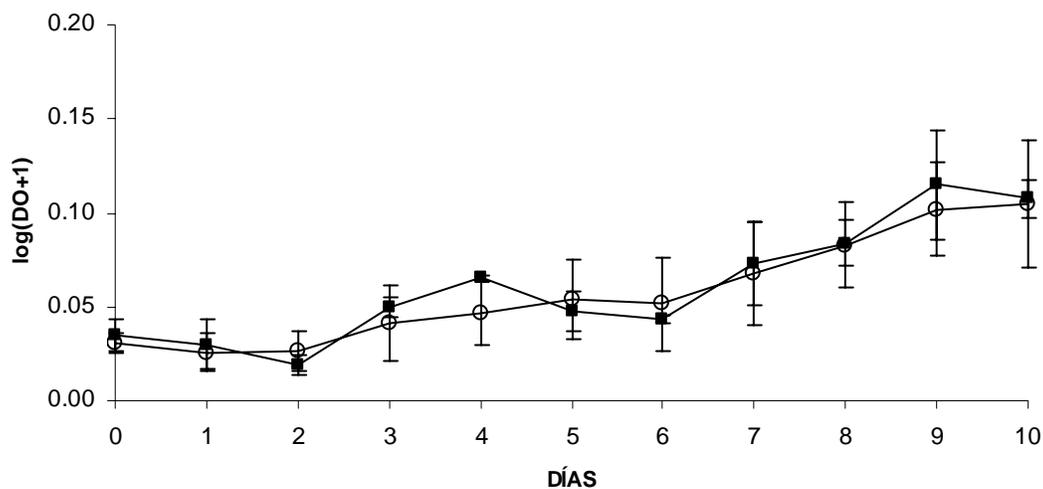


Figura 7. Curvas de crecimiento de *Chlamydomonas gleopara* (CLMG1) mantenidas en un sistema estático en el medio "1" (■) y en el medio "2f" (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

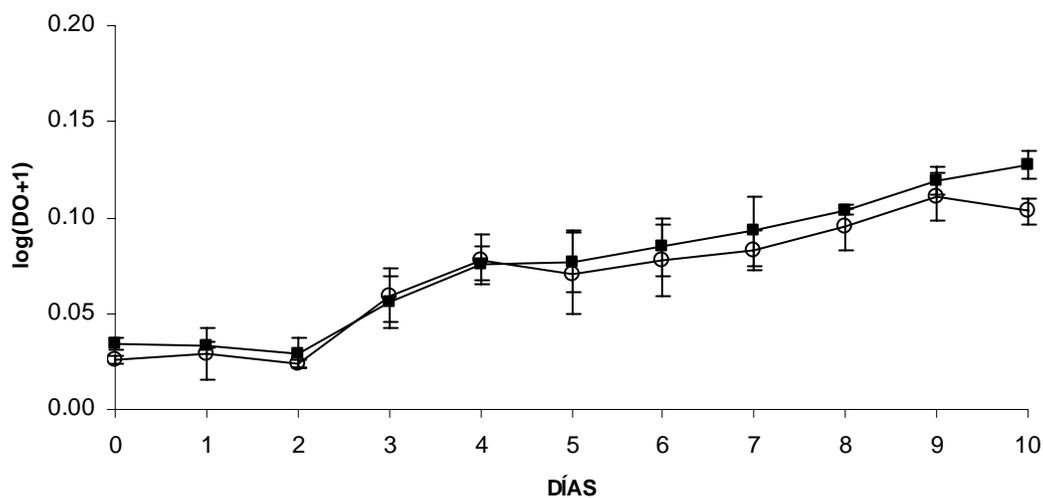


Figura 8. Curvas de crecimiento de *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) mantenidas en un sistema estático en el medio "1" (■) y en el medio "2f" (○). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

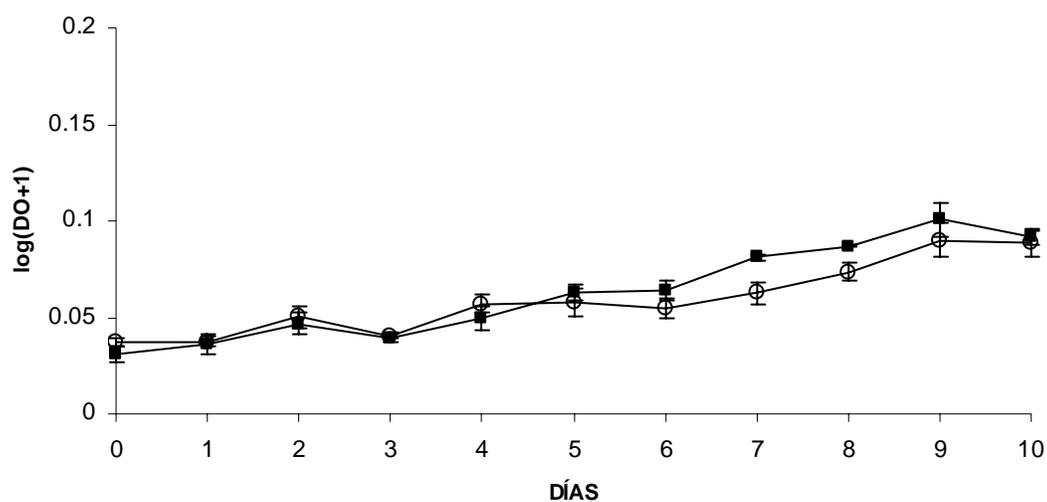


Figura 9. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* (CLV1) mantenidas en un sistema estático en el medio "1" (-■-) y en el medio "2f" (-○-). Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

IV. 2. Remoción de nutrientes de los cultivos monoespecíficos

Se evaluaron los valores de pH al final del cultivo (día 10) para las cepas de cianobacterias y microalgas mantenidas en dos medios de cultivo (“f” y “2f”). Los valores más altos de pH se registraron en la cepa SPM1 en ambos medios de cultivo, para el resto de las cepas los valores de pH fueron similares (Figuras 10 y 11).

Se evaluó al final de los cultivos (día 10) de cianobacterias y microalgas, la remoción de nitrógeno inorgánico (NO_2+NO_3) y los ortofosfatos (PO_4) y se calculó el porcentaje de remoción.

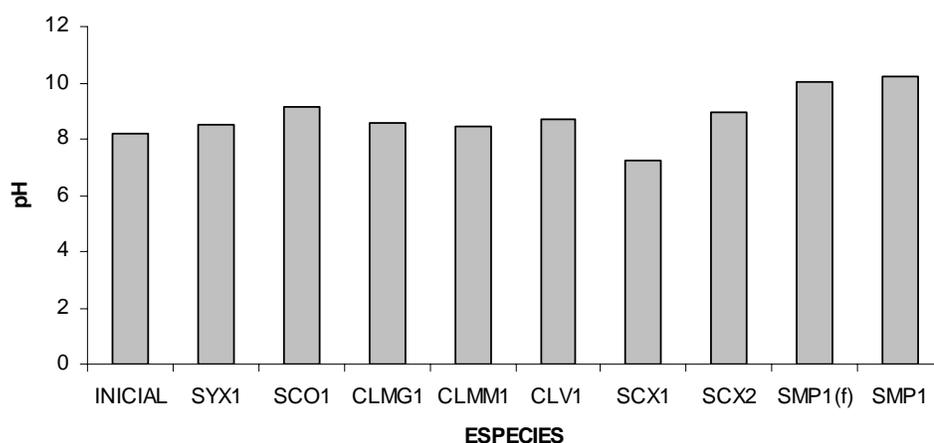
La mayor remoción de nitrógeno se registró en la cepa SYX1 para ambos tipos de medio (75% en medio “f” y 85% en medio “2f”) seguido por la cepa SCO1 (52%) en medio “f” y en medio “2f” por la cepa SCX2 (30%) (Figura 12).

La cepa que tuvo producción de nitrógeno fue SPM1 en los medio de cultivo “f” y “2f” y en el medio de cultivo Spirulina (Figura 12).

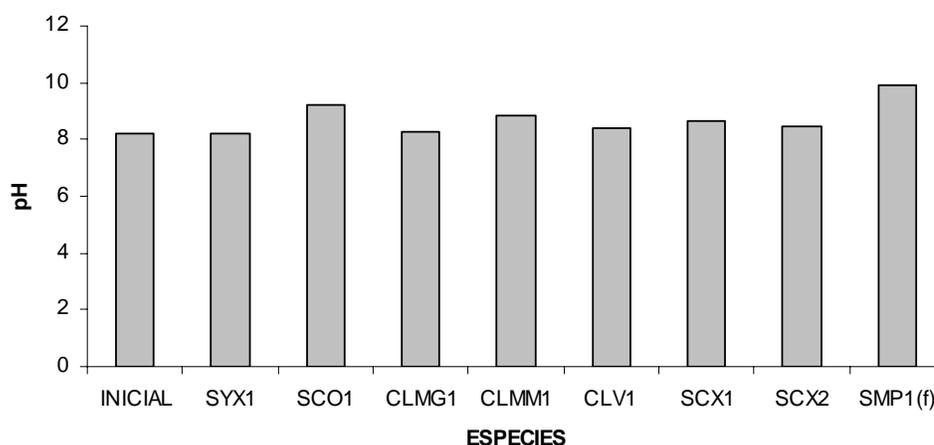
Con respecto a los ortofosfatos en todas las cepas hubo remoción en ambos medios de cultivo (“f” y “2f”). La cepa de la cianobacteria SPM1 presentó la mayor remoción (100%) en ambos medios de cultivo (“f” y “2f”) (Figura 13).

Las cepas que también tuvieron un porcentaje alto de remoción fueron SCO1 para medio de cultivo “f” y CLV1 para el medio “2f”.

En el medio “f” en la mayoría de las cepas el porcentaje de remoción fue $>50\%$ y en el medio “2f” el porcentaje de remoción fue $<$ al 50% (Figuras 13).



Figuras 10. Valores promedio de pH de las cepas de microalgas y cianobacterias cultivadas en medio "F". Las cepas utilizadas corresponden a: *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1).



Figuras 11. Valores promedio de pH de las cepas de microalgas y cianobacterias cultivadas en medio "2f". Las cepas utilizadas corresponden a: *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1).

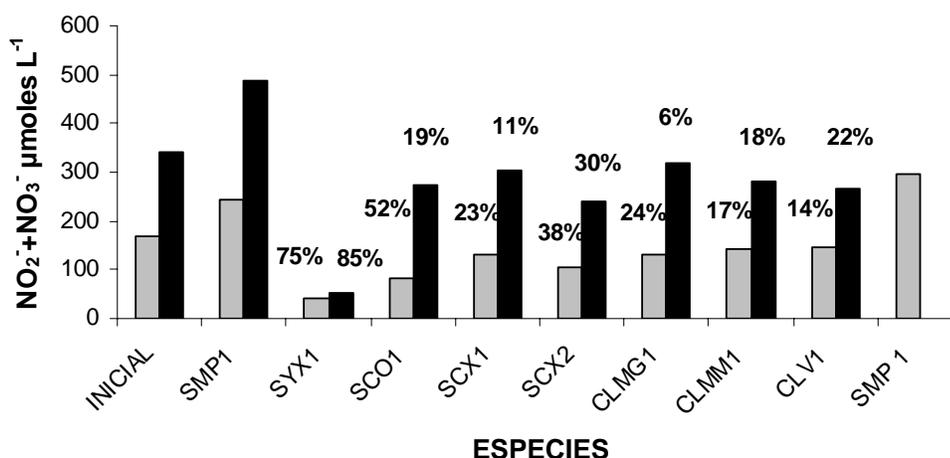


Figura 12. Valores promedio de la concentración inicial y final de NO_2+NO_3 y su porcentaje de remoción de las cepas de cianobacterias y microalgas cultivadas en medio “F” (■) y “2F” (■). Las cepas utilizadas corresponden a: *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1). Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

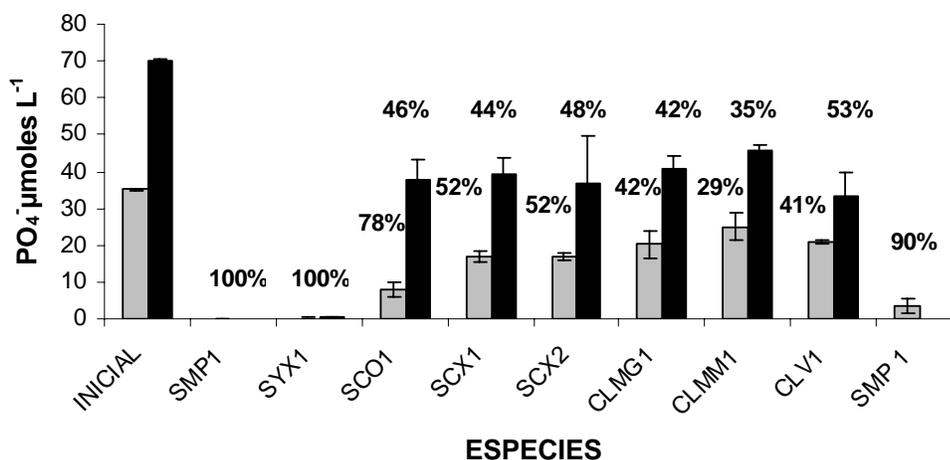


Figura 13. Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración inicial y final de PO_4 , y el porcentaje de remoción de las cepas de cianobacterias y microalgas cultivadas en medio “F” (■) y en “2F” (■). Las cepas utilizadas corresponden a: *Spirulina maxima* (SPM1), *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1). Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

IV. 3. Tasa de crecimiento de cultivos mixtos (cocultivos)

Se realizaron cultivos mixtos (cocultivos) de las cepas que obtuvieron las mayores tasas de crecimiento y el mayor porcentaje de remoción de los nutrientes, aun cuando la cepa SPM1 tuvo una alta tasa de crecimiento y un alto porcentaje de remoción de fosfatos no se eligió para los cultivos mixtos por sus requerimientos específicos de nutrientes en el medio de cultivo. Los cultivos mixtos (cocultivos) fueron los descritos a continuación por pares de especies:

- Synechococcus elongatus* (SYX1) - *Scenedesmus obliquus* (SCO1)
- Synechococcus elongatus* (SYX1) - *Chlamydomonas gloeopara* (CLG1)
- Synechococcus elongatus* (SYX1) - *Chlorella vulgaris* (CLV1)
- Scenedesmus obliquus* (SCO1) - *Chlorella vulgaris* (CLV1)
- Scenedesmus obliquus* (SCO1) - *Chlamydomonas gloeopara* (CLG1)
- Chlamydomonas gloeopara* (CLG1) - *Chlorella vulgaris* (CLV1)

Las mayores tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) las obtuvieron los cocultivos de las cepas SYX1-SCO1, las cepas de SCO1-CLV1 y las cepas CLMG1-CLV1 (Tabla IV). Las curvas de crecimientos de estas cepas tuvieron un crecimiento antagónico, por lo que cuando una de las cepas tuvo una mayor tasa de crecimiento acumulada la curva de crecimiento de la otra especie fue menor (Tabla IV).

Las cepas de los cocultivos de SYX1-SCO1 fueron significativamente diferentes entre ellas ($t = -3.29$) ($P < 0.05$) al igual que las cepas SCO1-CLMG1 ($t = 9.43$) ($P < 0.05$) con respecto a los valores de sus tasas de crecimiento acumuladas.

Los cocultivos de las cepas SYX1-CLMG1, SYX1-CLV1, SCO1-CLV1 y las cepas CLMG1-CLV1 no fueron significativamente diferentes con su respectiva combinación de cepa en cultivo mixto (Tabla IV).

IV. 3.1. Evaluación del crecimiento por conteos directos

Las mayores densidades celulares la obtuvieron las cepas SYX1-CLMG1, SYX1-CLV1 y SYX1-SCO1 (Tabla IV), donde la densidad celular siempre fue mayor para la cepa SYX1 con respecto a la otra cepa (Figuras 14 a 16).

Tabla IV. Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de células ($\times 10^6$ cel ml^{-1}), la tasa de crecimiento acumulada ($\sum\mu$, divisiones en 7 días) de los cultivos mixtos indicados por pares de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) cultivadas en medio “2f” de forma mixta. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas, $a > b > c$ (Prueba t-Student $\alpha = 0.05$).

CLAVE DE CEPAS	INICIAL	FINAL	$\sum\mu$
SYX1	4.17 \pm 0.16	7.39 \pm 0.24	0.83 \pm 0.08 ^b
SCO1	0.10 \pm 0.04	0.42 \pm 0.08	2.12 \pm 0.68 ^a
SYX1	3.92 \pm 0.58	8.78 \pm 0.47	1.17 \pm 0.22 ^a
CLMG1	0.05 \pm 0.02	0.12 \pm 0.01	1.26 \pm 0.59 ^a
SYX1	3.80 \pm 0.44	8.93 \pm 0.40	1.24 \pm 0.17 ^a
CLV1	0.15 \pm 0.03	0.34 \pm 0.06	1.22 \pm 0.53 ^a
SCO1	0.04 \pm 0.04	0.37 \pm 0.07	3.40 \pm 1.43 ^a
CLV1	0.35 \pm 0.08	0.99 \pm 0.31	1.48 \pm 0.70 ^a
SCO1	0.04 \pm 0.02	0.42 \pm 0.09	3.54 \pm 0.70 ^a
CLMG1	0.17 \pm 0.04	0.12 \pm 0.02	-0.46 \pm 0.22 ^c
CLMG1	0.10 \pm 0.05	0.64 \pm 0.09	2.84 \pm 0.62 ^a
CLV1	0.40 \pm 0.24	1.33 \pm 0.27	1.92 \pm 1.10 ^a

Los cultivos mixtos que tuvieron una fase de acondicionamiento (dos días) fueron SYX1-SCO1, SYX1-CLMG1 y SYX1-CLV1 (Figuras 14 a 16). El cultivo de las cepas SYX1-SCO1 tuvo variaciones en su crecimiento y sin las fases típicas de crecimiento (Figura 14). Las cepas SCO1-CLV1, SCO1-CLMG1, CLMG1-CLV1 comenzaron una fase exponencial al inicio del cultivo y en el segundo o tercer día del cultivo entraron en la fase estacionaria (Figuras 17 a 19).

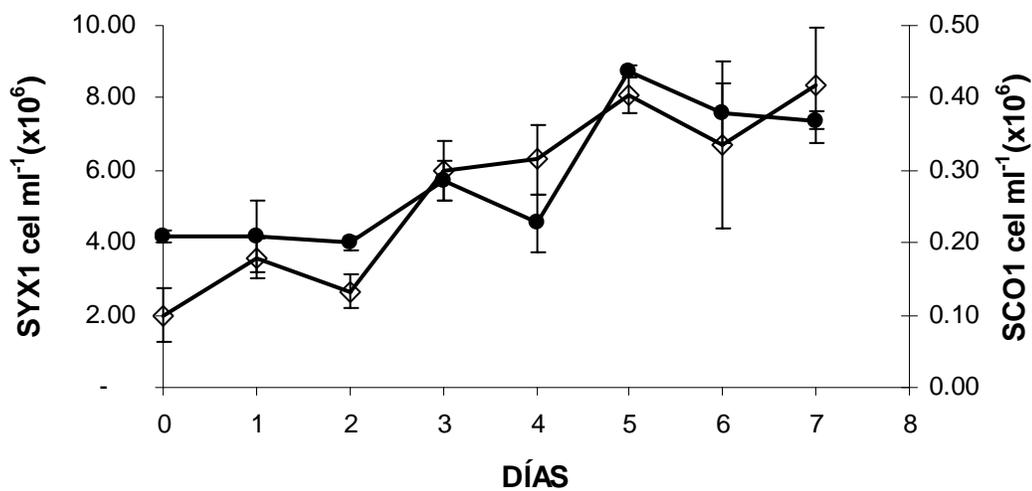


Figura 14. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) (◇) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

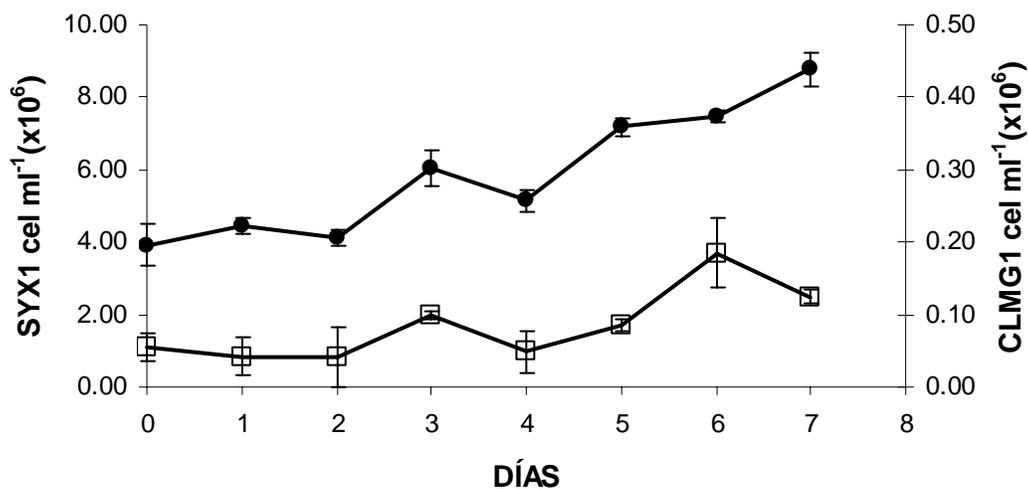


Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1) (□) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

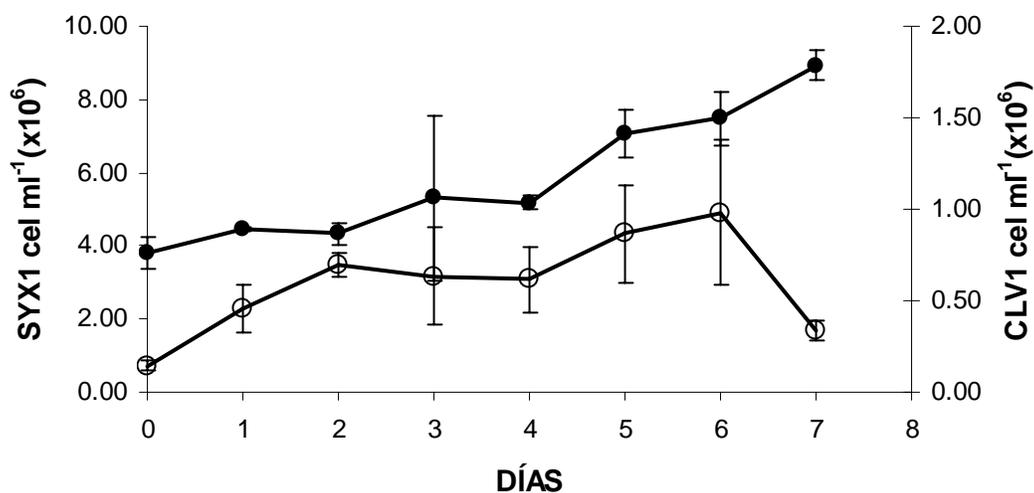


Figura 16. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) (○) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

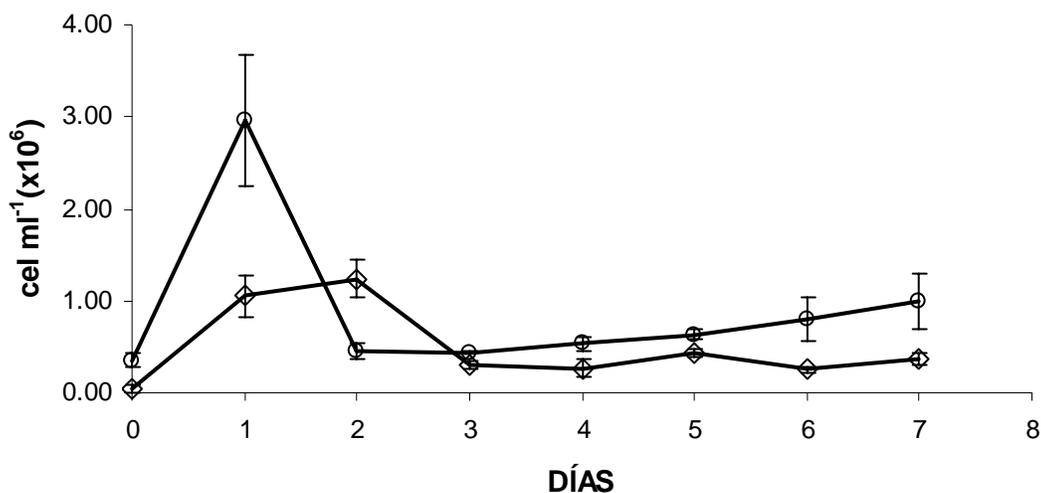


Figura 17. Curvas de crecimiento de las cepas de *Scenedesmus obliquus* (SCO1) (◊) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) (◻) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

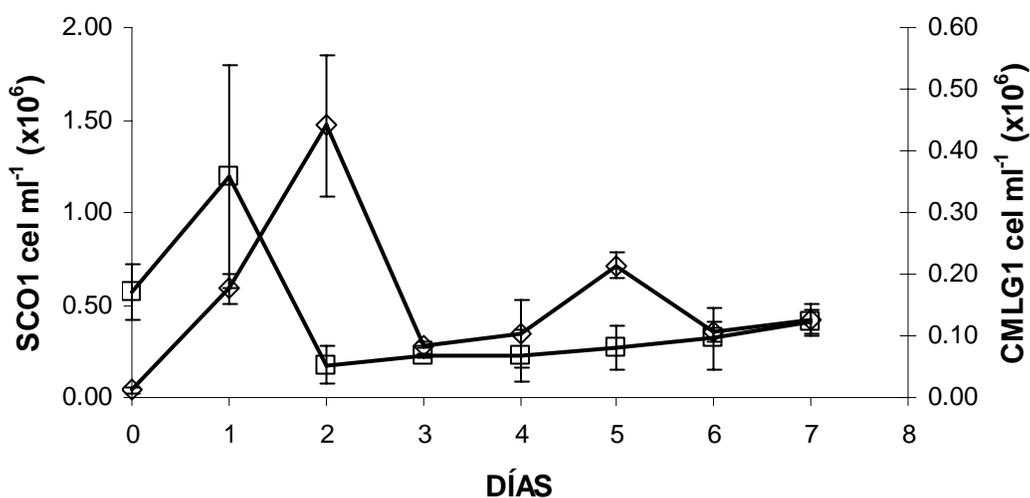


Figura 18. Curvas de crecimiento de las cepas de *Scenedesmus obliquus* (SCO1) (◊) y *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1) (◻) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

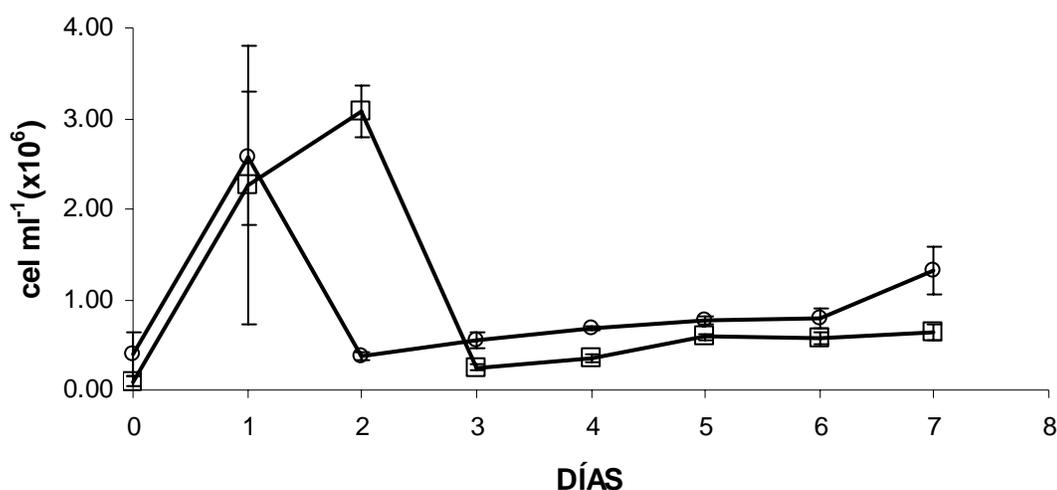


Figura 19. Curvas de crecimiento de las cepas de *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1) (\square) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) (\circ) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

IV. 4 Remoción de nutrientes de cultivos mixtos libres y de cultivos coinmovilizados

IV. 4.1. Viabilidad de las cepas coinmovilizadas

En este ensayo no se formaron esferas sino elipsoides y tuvieron una consistencia blanda, su tamaño promedio fue de 3 mm de ancho por 4 mm de largo, al interior del elipsoide la distribución de ambos tipos de célula fue uniforme en toda la matriz (Figura 20).

Durante las primeras horas después de la inmovilización los elipsoides perdieron color aun cuando se les adicionó medio “f/2” para disminuir el efecto del estrés causado por el cambio de pH. A las doce horas se cambió el 100% del medio “f/2” para evitar un pH alcalino y se inició el experimento de remoción de nutrientes a las 24 h después de la coinmovilización.

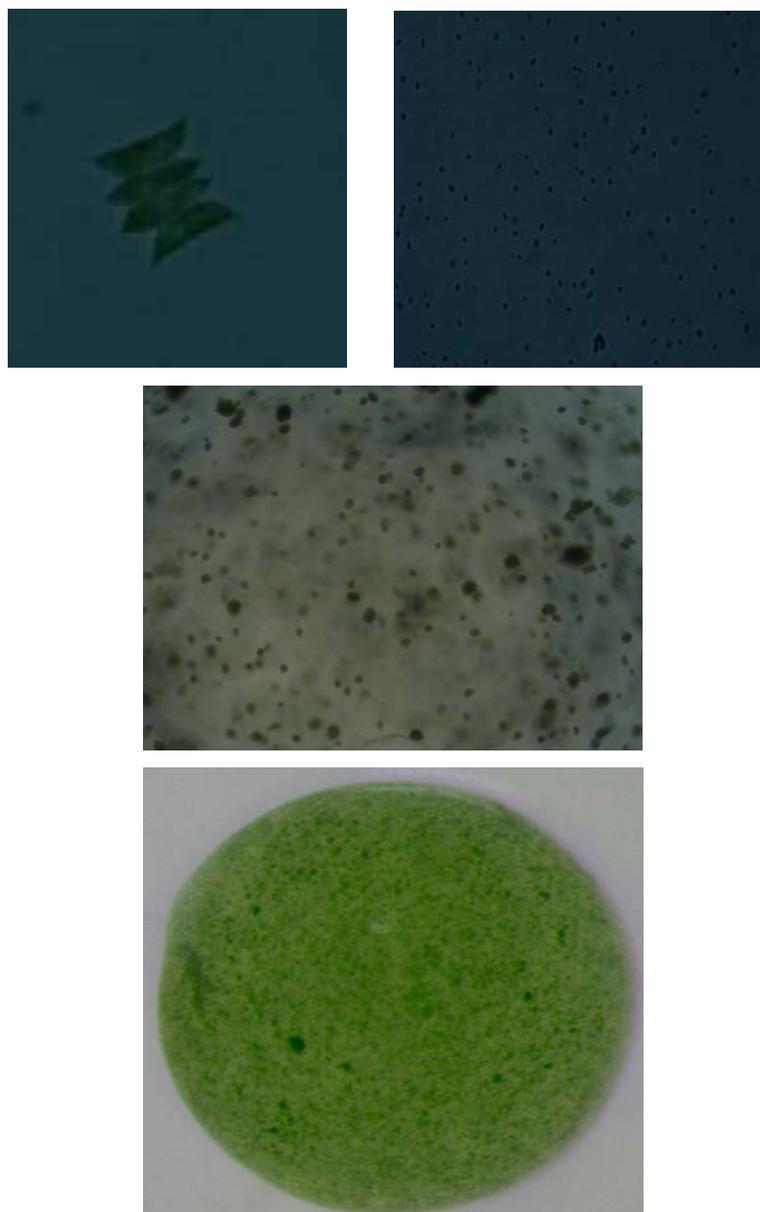


Figura 20. Imágenes (a) cenobio de células libres de *Scenedesmus obliquus*, (b) células libres de *Synechococcus elongatus* vistas bajo microscopio compuesto (100x), (c) cenobio de *Scenedesmus obliquus*, y células de *Synechococcus elongatus* dentro de la matriz de quitosano, vistas bajo microscopio compuesto (100x), (d) esfera de quitosano con células coinmovilizadas de *Scenedesmus obliquus* y *Synechococcus elongatus* vista bajo microscopio estereoscópico (1.25x). Las imágenes fueron tomadas con una cámara “Evolution MP Color” y con el programa “Imagen Pro Discovery” Versión 4.5.

IV. 4.2. Tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$)

Los pares de especies utilizados para los cultivos mixtos (cocultivos) tanto libres como inmovilizados fueron los descritos a continuación:

Synechococcus elongatus (SYX1) - *Scenedesmus obliquus* (SCO1)
Synechococcus elongatus (SYX1) - *Chlorella vulgaris* (CLV1)

Las mayores tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$) la obtuvieron el cocultivo de las cepas SYX1-SCO1 en forma libre y en los cultivos coinmovilizados de SYX1-CLV, donde la cepa SYX1 tuvo la mayor tasa de crecimiento (Tabla V).

La cepa SYX1 del cultivo mixto SYX1-CLV1 tuvo una tasa de crecimiento negativa. En los cultivos monoespecíficos fue la cepa SCO1 la que produjo la mayor tasa de crecimiento acumulada, seguido por las cepas CLV1 y SYX1 en los dos tipos de inóculos (Tabla V). Entre los diferentes tratamientos de los cultivos monoespecíficos, cocultivos libres y coinmovilizados existieron diferencias significativas ($F = 24.451$) ($P < 0.05$) (Prueba ANOVA $\alpha = 0.05$) (Tabla V). Hubo diferencias significativas entre el cocultivo libre y el coinmovilizado para las cepas SYX1-SCO1 y para la combinación SYX1-CLV1 no hubo diferencias significativas. Entre los tratamientos coinmovilizados de las cepas SYX1-SCO1 y SYX-CLV1 no existieron diferencias significativas (Tabla V).

IV. 4.3 Evaluación de la biomasa

Las mayores densidades celulares tanto en los cultivos libres mixtos como en los coinmovilizados la obtuvieron las cepas SYX1-SCO1. La cepa CLV1 tuvo una densidad mayor que la cepa SYX1 para ambos tipos de cultivo mixtos libre y coinmovilizado (Tabla V).

En los cultivos monoespecíficos la cepa que obtuvo la mayor concentración celular fue SCO1 y la menor concentración la tuvo la cepa SYX1 con un inóculo menor.

En cuanto a la concentración celular con respecto al tiempo y al tratamiento existieron diferencias significativas entre los tratamientos ($F = 3.506$) ($P < 0.05$). El cultivo

coimmobilizado SYX1-SCO1 fue el que resultó con diferencias significativas con el resto de los tratamientos (Prueba ANCOVA $\alpha=0.05$) (Tabla V).

Tabla V. Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de células ($\times 10^6$ cel ml^{-1}), la tasa de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$, divisiones en 7 días) de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) cultivadas en medio “2F” de forma libre, mixta-libre y coimmobilizada. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas (por la $\Sigma\mu$), $a>b>c$ obtenidas por una prueba *a posteriori* Tukey. Los números distintos indican diferencias significativas entre tratamientos (según la concentración celular) $1>2>3$ obtenidas por una prueba *a posteriori* Tukey. * : dato único.

CLAVE DE CEPAS	LIBRES			COINMOVILIZADAS		
	Inicial	Final	($\Sigma\mu$)	Inicial	Final	($\Sigma\mu$)
SYX1	0.02	0.313 \pm 0.09 ²	4.25 \pm 0.75 ^{ab}	1.56 \pm 0.02	6.19 \pm 0.10 ¹	1.32 \pm 1.39 ^c
+ SCO1	0.01	0.823 \pm 0.09 ²	6.92 \pm 0.31 ^a	0.52 \pm 0.045	0.85 \pm 0.47 ^{1,2}	0.56 \pm 0.85 ^c
SYX1	0.14	0.128 \pm 0.01 ²	-0.14 \pm 0.09 ^c	2.36*	0.33 ^{2*}	2.83 ^{c*}
+ CLV1	0.01	0.127 \pm 0.01 ²	3.83 \pm 0.23 ^{bc}	1.16*	1.31 ^{1,2*}	0.17 ^{c*}
SCO1	0.01	0.790 \pm 0.14 ²	6.69 \pm 0.24 ^{ab}			
CLV1	0.01	0.145 \pm 0.03 ²	4.12 \pm 0.27 ^{abc}			
SYX1(1.10ml)	0.02	0.114 \pm 0.01 ²	3.50 \pm 1.86 ^{bc}			
SYX1(7.36ml)	0.14	0.515 \pm 0.26 ²	1.75 \pm 0.70 ^{bc}			

En los cultivos mixtos libres de las cepas SYX1-SCO1 y SYX1-CLV1 ambos cultivos tuvieron una fase de acondicionamiento hasta las 72 horas, una fase exponencial de 24 horas y a partir de las 120 horas la curva de crecimiento tuvo una tendencia de crecimiento inversa de una cepa con respecto a la otra cepa, ya que cuando la concentración de células aumentó para SCO1 y para CLV1 disminuyó para SYX1 (Figura 21 y 23).

El crecimiento en los cultivos coimmobilizados para las cepas SYX1-SCO1 tuvo una tendencia similar a los cultivos libres ya que sucedió una fase de acondicionamiento hasta las 48 horas, una fase exponencial de 48 horas para la cepa SCO1 mientras que para la cepa SYX 1, la fase exponencial fue de 72 horas (Figura 22). La curva de crecimiento para el

cultivo coinmovilizado de SYX1-CLV1 tuvo una fase de acondicionamiento de 12 horas, pero en la cepa SYX1 no ocurrió una curva de crecimiento típica mientras que la cepa CLV1 si presentó una fase exponencial y una de declinamiento; la última fase ocurrió a las 96 horas en ambas cepas (Figura 24).

Con respecto a las curvas de crecimiento de los cultivos monoespecíficos, las cepas que tuvieron una curva típica de crecimiento fueron SCO1 y CLV1, con una fase de acondicionamiento de 36 horas, una fase exponencial hasta las 120 horas; la cepa SCO1 y CLV1 llegó a la fase exponencial las 144 horas (Figuras 25 y 26). La cepa SYX1 no tuvo una curva de crecimiento típica para ambos tipos de inóculo (1.10 ml y 7.36 ml) (Figuras 27 y 28).

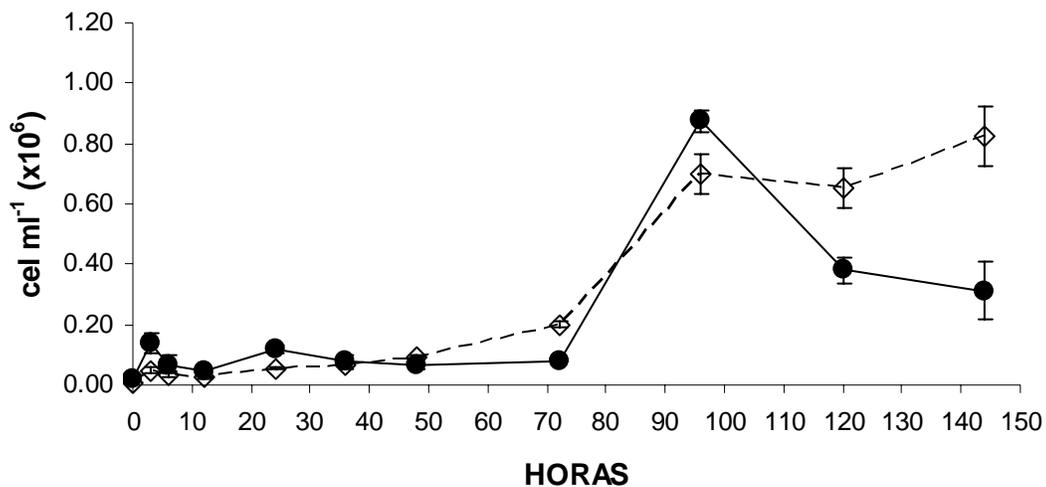


Figura 21. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) (◇) mantenidas en cocultivos en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

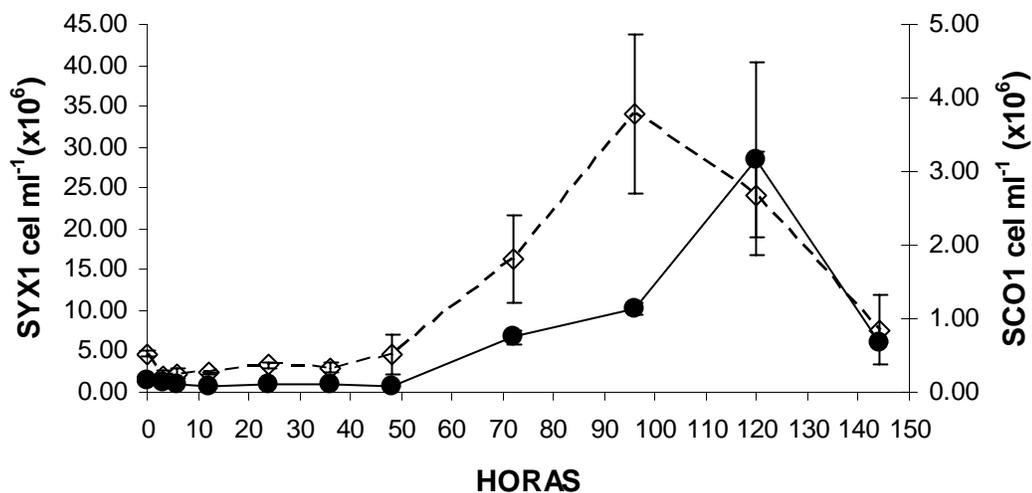


Figura 22. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) (◇) mantenidas en cultivos coinoculados en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

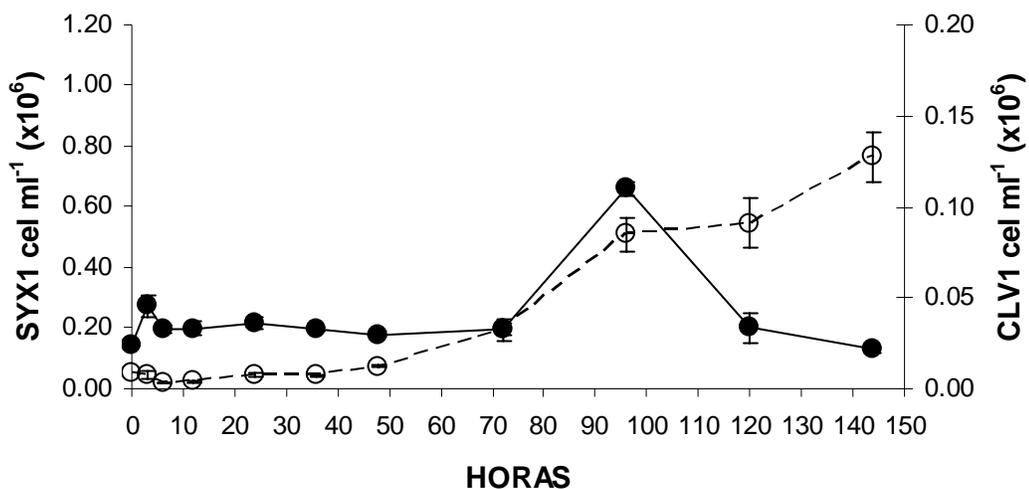


Figura 23. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) (○) mantenidas en cocultivo en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

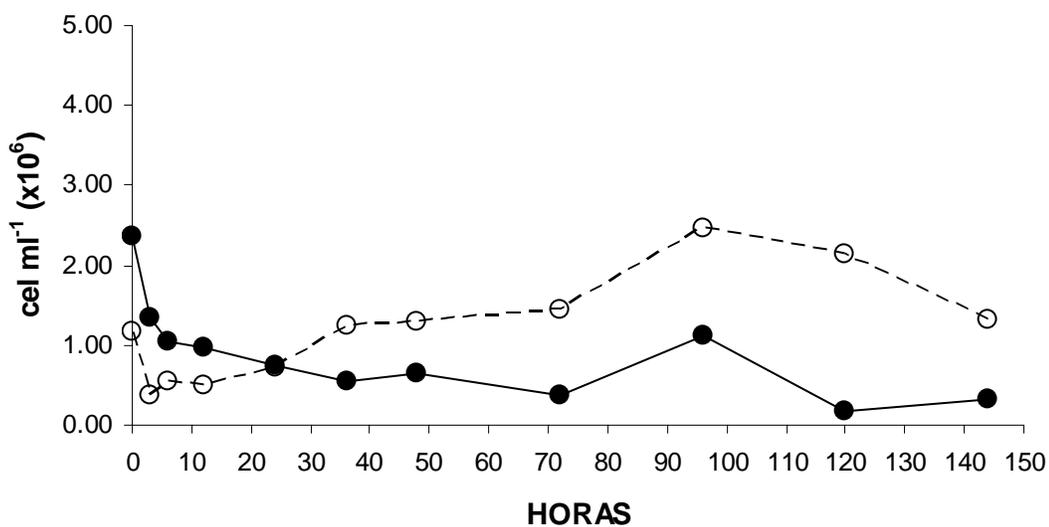


Figura 24. Curvas de crecimiento de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) (●) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) (○) mantenidas en cultivos coinmovilizados en un sistema estático en medio “2f”.

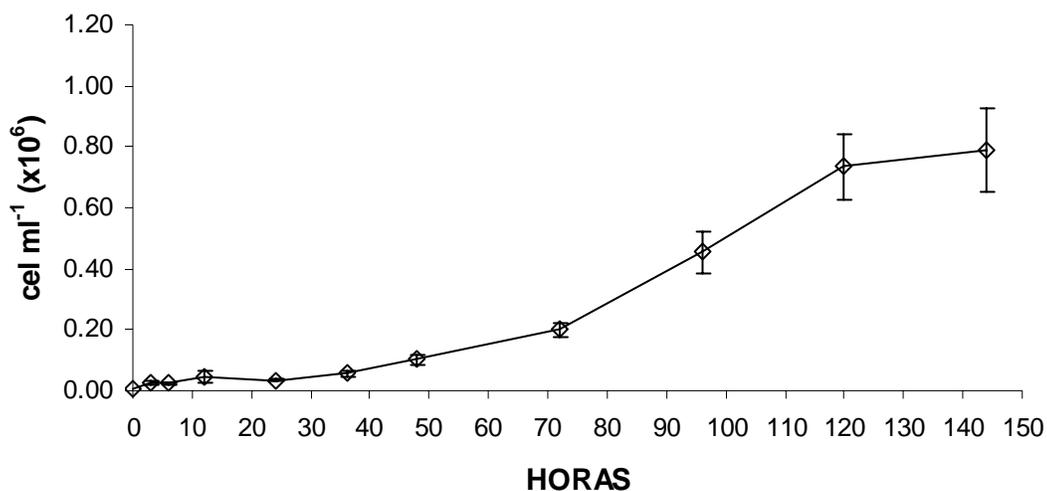


Figura 25. Curva de crecimiento de *Scenedesmus obliquus* (SCO1) mantenida en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

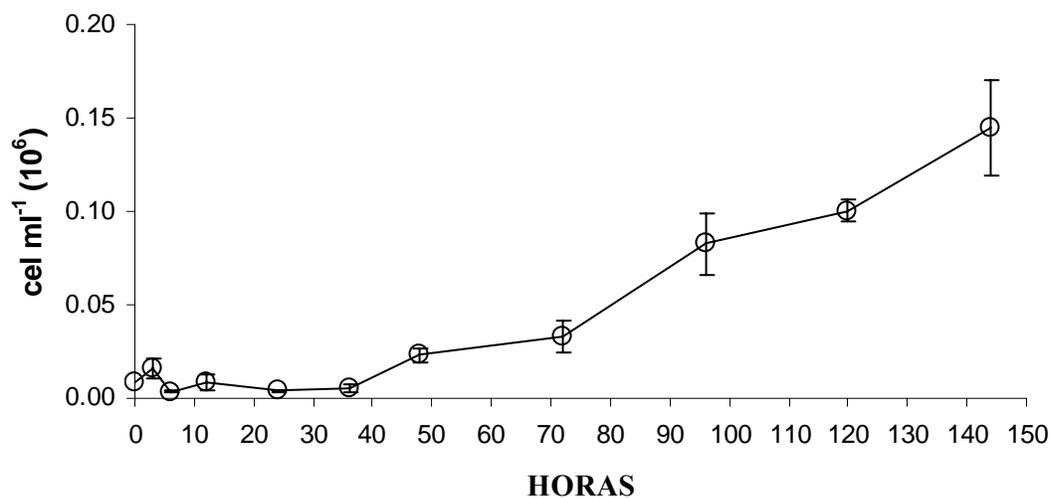


Figura 26. Curvas de crecimiento de *Chlorella vulgaris* (CLV1) mantenidas en un sistema estático en medio “2f”. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

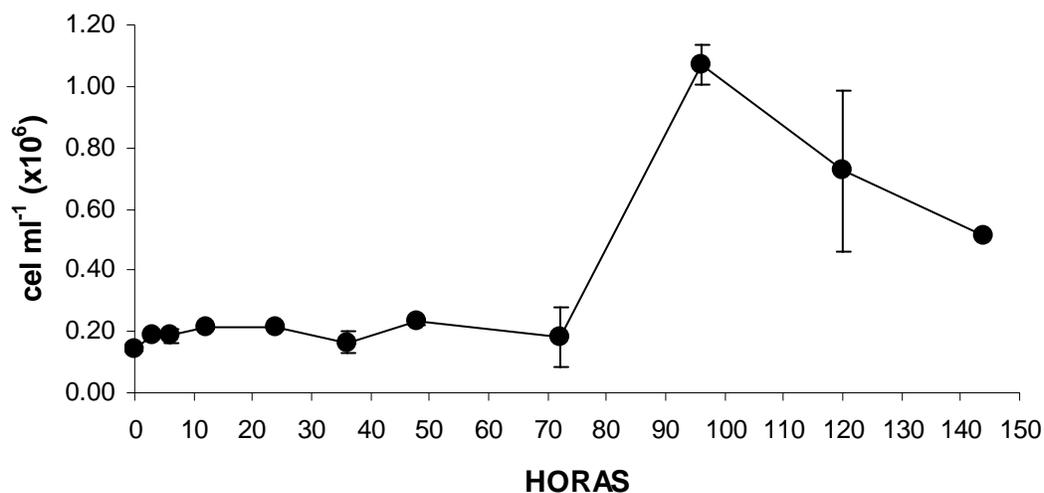


Figura 27. Curvas de crecimiento de *Synechococcus elongatus* (SYX1) mantenidas en un sistema estático en medio “2f” con un inóculo inicial de 1.10. ml. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

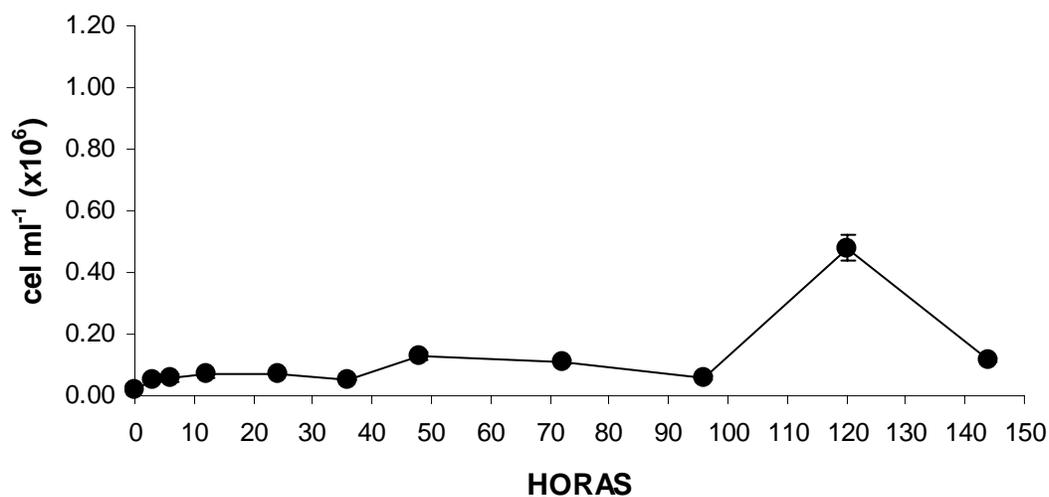


Figura 28. Curvas de crecimiento de *Synechococcus elongatus* (SYX1) mantenidas en un sistema estático en medio “2f” con un inóculo inicial de 7.36 ml. Las barras verticales representan ± 1 error estándar (n=3).

IV. 4.4. Evaluación de la biomasa por biovolumen

Paralelamente al cálculo de la concentración celular (células ml⁻¹) de los cultivos mixtos y los coinmovilizados se realizaron cálculos de biovolumen (μm³ ml⁻¹) para cada cepa. Además, se obtuvo un factor de correlación entre las células ml⁻¹ y el biovolumen para establecer la relación entre ambas variables (Tabla VI).

El mayor biovolumen tanto en los cultivos libres mixtos como en los coinmovilizados lo obtuvieron las cepas SYX1-SCO1. En los cultivos monoespecíficos fue la cepa SCO1 la que obtuvo el mayor biovolumen seguido por las cepas CLV1 y por SYX1 (Tabla VI).

Tabla VI. Valores promedio ± 1 error estándar del biovolumen (μm³ ml⁻¹ x10⁶) de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), y *Chlorella vulgaris* (CLV1) y valor del factor de correlación entre cel ml⁻¹ y el biovolumen cultivadas en medio “2f” de forma mixta y coinmovilizadas. * : dato único.

CEPAS	LIBRES		Factor de correlación	COINMOVILIZADAS		Factor de correlación
	Inicial	Final		Inicial	Final	
SYX1	0.11	3.01±1.20	r=0.95	7.89±0.11	31.27±0.55	r=1.00
SCO1	1.96	55.01±11.29	r=1.00	135.65±12.15	219.93±120.42	r=1.00
SYX1	0.71	0.60±0.12	r=0.97	11.92*	1.67*	r=1.00
CLV1	1.49	17.67±0.66	r=0.99	210.62*	237.46*	r=1.00
SCO1	1.96	52.08±2.12	r=1.00			
CLV1	1.49	21.50±2.85	r=1.00			
SYN1 (1.10ml)	0.11	2.10±2.90	r=0.66			
SYN1 (7.36ml)	0.71	2.07±1.52	r=0.98			

IV. 4.5. Peso seco, peso orgánico y peso de ceniza

Se evaluó el peso seco orgánico y de ceniza de las cepas SYX1, SCO1 y CLV1 de las cuales la que tuvo el mayor peso seco fue la cepa SCO1, y en orden decreciente las cepas CLV1 y SYX1. En peso orgánico se obtuvo la misma tendencia de una mayor cantidad en la cepa SCO1, con respecto al peso de ceniza la cepa que tuvo la mayor cantidad fue SYX1, y la cepa SCO1 fue la que menor cantidad de cenizas tuvo (Tabla VII).

Tabla VII. Valores promedio \pm 1 error estándar del peso seco, el peso orgánico y el peso de ceniza ($\mu\text{g ml}^{-1}$) de las cepas de *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1), y *Chlorella vulgaris* (CLV1) cultivadas en medio “2f” en un cultivo estático. * : dato único.

ESPECIES	CEPAS	PESO SECO	PESO ($\mu\text{g} \times 10^6$ células)	PESO ORGÁNICO	PESO ($\mu\text{g} \times 10^6$ células)	PESO CENIZA	PESO ($\mu\text{g} \times 10^6$ células)
<i>Synechococcus elongatus</i>	SYX1	43.35 \pm 3.67	2.38	38.38 \pm 2.07	0.27	4.97 \pm 1.72	2.10
<i>Scenedesmus obliquus</i>	SCO1	45.24*	18.60	44.615*	0.68	0.63*	17.91
<i>Chlorella vulgaris</i>	CLV1	32.54 \pm 0.64	45.24	31.35 \pm 0.80	0.63	1.19 \pm 0.55	44.62

IV. 4.6. Remoción de nutrientes

Se evaluaron los valores de pH para los cuatro tratamientos mantenidos en medio “2f”. Los valores mas altos se registraron en los cultivos libres tanto para los cultivos mixtos como los monoespecíficos (Figuras 29 a 32). En los cultivos coinmovilizados los valores mas altos se obtuvieron en el tratamiento SYX1-CLV1 (Figura 31). Con respecto a los tratamientos control (solo Medio de cultivo y Medio de cultivo + Quitosano) los valores para ambos tratamientos fueron muy similares (Figura 29).

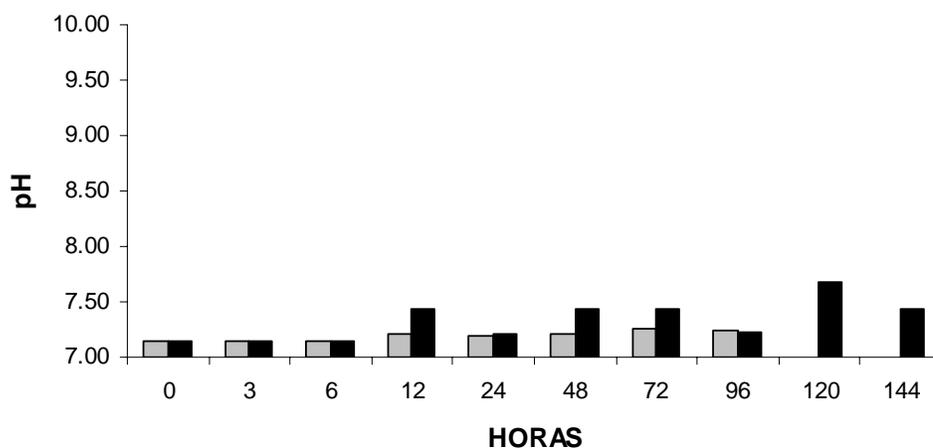


Figura 29. Valores promedio de pH de los tratamientos Medio (■) y Medio+Quitosano (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.

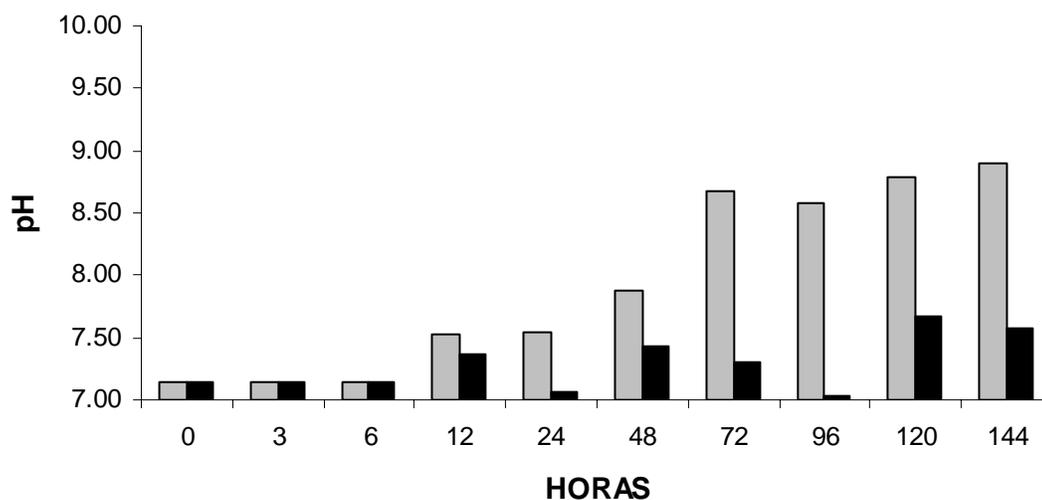


Figura 30. Valores promedio de pH de los cocultivos SYX1-SCO1 en forma libre (■) y coinmovilizados (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.

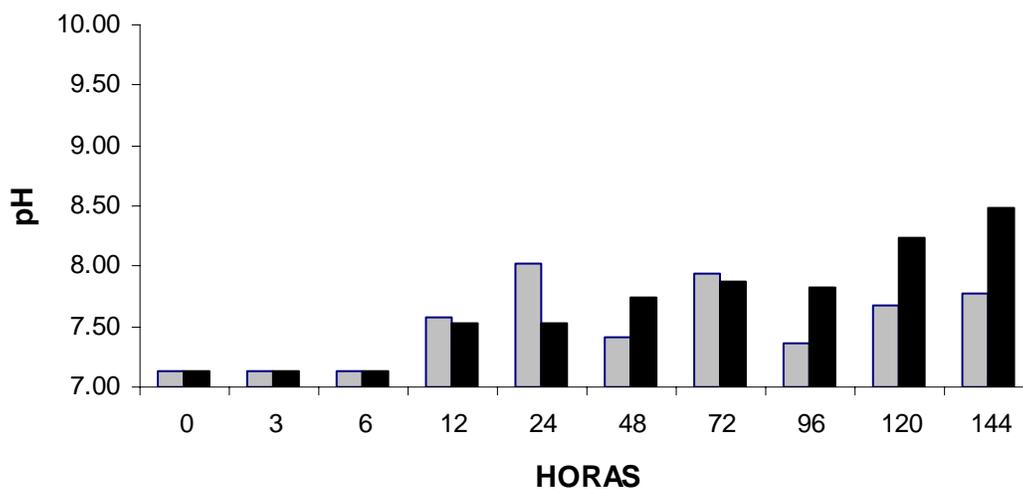
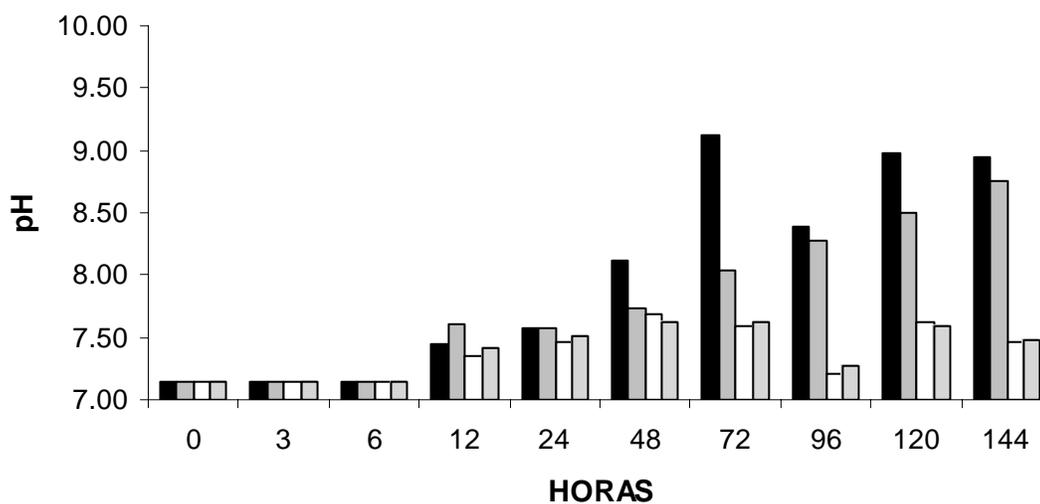


Figura 31. Valores promedio de pH de los cocultivos SYX1-CLV1 en forma libre (■) y coinmovilizados (■) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.



Figuras 32. Valores promedio de pH de los cultivos de las cepas *Scenedesmus obliquus* (■), *Chlorella vulgaris* (■), *Synechococcus elongatus* (1.10 ml) (□) y *Synechococcus elongatus* (7.36 ml) (≡) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo.

Se evaluó la cantidad de nitritos, nitratos y ortofosfatos y el porcentaje de remoción para los cuatro tratamientos:

- a) Medio de cultivo sin células.
- b) Medio de cultivo sin células y con cápsulas de quitosano.
- c) El medio de cultivo y los cocultivos de células libres.
- d) El medio de cultivo y cápsulas con células coinmovilizadas.

Los valores de nitritos y nitratos fueron sumados para obtener la cantidad total de nitrógeno inorgánico en el medio. Los tratamientos a y b fueron eliminados ya que se contaminaron los medios de cultivo con una especie de microalga.

El porcentaje de remoción de nitrógeno en todos los tratamientos tanto cultivos libres como coinmovilizados tuvieron un porcentaje menor al <50%

Los cocultivos libres de SYN-SCO1 y SYN-CLV1 tuvieron su mayor porcentaje de remoción de nitrógeno a las 36 horas siendo el cocultivo SYN-SCO1 el que obtuvo el mayor porcentaje entre todos los tratamientos (37%) (Figuras 33 y 35). Entre los cocultivos coinmovilizados el de las cepas SYN-CLV1 fue el que obtuvo a las 12 horas el mayor porcentaje de remoción de nitrógeno (24%) (Figuras 33 y 35).

En cuanto a los cultivos monoespecíficos la cepa SCO1 resultó el porcentaje mas alto (23%) a las 12 horas (Figura 37), la cepa CLV1 tuvo su mayor porcentaje (28%) a las 36 horas (Figura 39), y la cepa SYX1 en ambos tipos de inóculos obtuvo el porcentaje mas alto de remoción de nitrógeno (Figuras 41 y 43).

Al final del experimento (144 horas) se registraron porcentajes de remoción en los cultivos monoespecíficos de las cepas SCO1 (21%) y en SYX1 (4%), en el resto de los tratamientos no hubo remoción de nitrógeno (Tabla VIII). Existieron diferencias significativas entre los tratamientos de los cocultivos libres y los coinmovilizados con respecto a la remoción de nitrógeno ($F = 6.722$) ($P < 0.05$) (Prueba ANOVA $\alpha = 0.05$). El tratamiento del cultivo coinmovilizado de las cepas SYX1-SCO1 fue significativamente diferente y mayor al resto de los tratamientos (Tabla VIII).

El porcentaje de remoción de los ortofosfatos siguió la misma tendencia que el nitrógeno todos los tratamientos obtuvieron un porcentaje menor al <50%.

El cultivo que tuvo el mayor porcentaje de remoción de ortofosfatos entre todos los tratamientos fue el cultivo coinmovilizado de SYX1-CLV1 (36%) a las 36 horas en cuanto al cultivo coinmovilizado de SYX1-SCO1 obtuvo el mayor porcentaje de remoción a las 48 horas (20%) (Figuras 34 y 36).

Los cocultivos libres tuvieron el más alto porcentaje de remoción a las 48 horas para SYX1-SCO1 y con respecto a SYX1-CLV1 lo obtuvieron a las 72 horas (18%) (Figuras 34 y 36).

En los cultivos monoespecíficos la cepa que tuvo el mayor porcentaje de remoción de ortofosfatos fue SYX1 con el inóculo mayor (7.36 ml) (26%) a las 48 horas (Figura 44) y con el inóculo menor (1.10 ml) lo obtuvo a las 144 horas (23%) (Figura 42). La cepa CLV1 tuvo el mayor porcentaje a las 36 horas (22%) (Figura 40) mientras que la cepa SCO1 fue la que presentó el menor porcentaje de remoción (20%) a las 48 horas de forma análoga a lo medido en los cocultivos (Figura 38).

En todos los tratamientos a las 144 horas hubo remoción de nitrógeno y ortofosfatos tanto en cultivos libres como coinmovilizados. Tanto en los cocultivos libres como en los coinmovilizados las cepas de SYX1-SCO1 obtuvieron el mismo porcentaje de remoción al final del experimento (Tabla VIII). Además no existieron diferencias significativas con respecto a los ortofosfatos entre los diferentes tratamientos ($P > 0.05$) (Prueba ANOVA $\alpha = 0.05$).

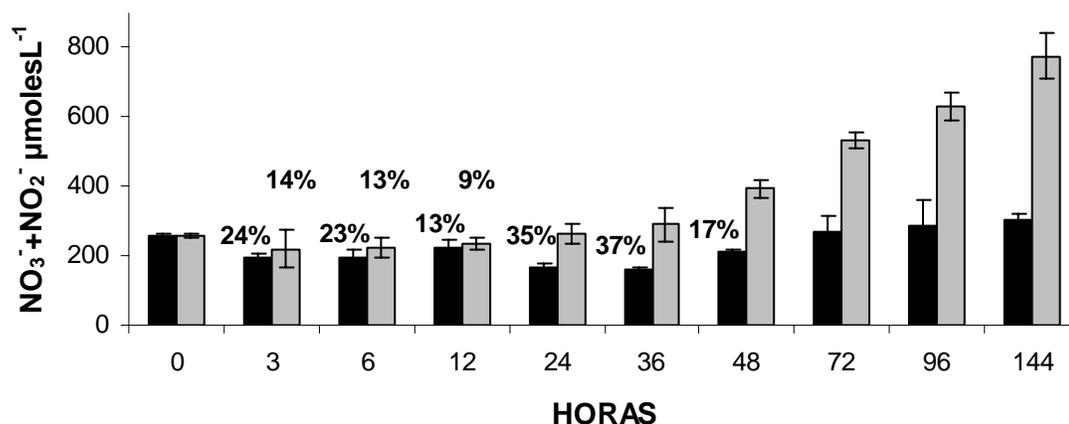


Figura 33. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y su porcentaje de remoción de los cocultivos de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) de forma libre (■) y coinmovilizada (▒) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

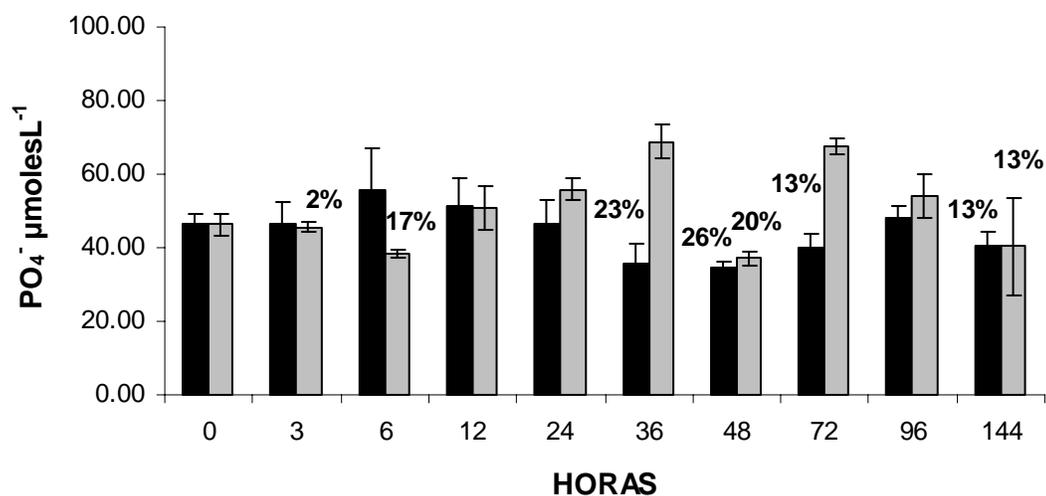


Figura 34. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de los cocultivos de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) de forma libre (■) y coinmovilizada (▒) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

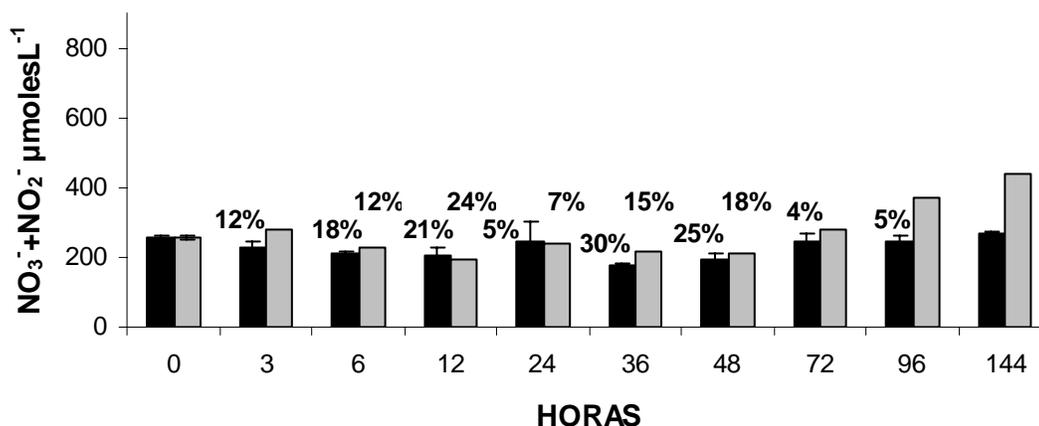


Figura 35. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y su porcentaje de remoción de los cocultivos de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Chlorella vulgaris* (CLV1) de forma libre (■) y coinmovilizada (▒) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

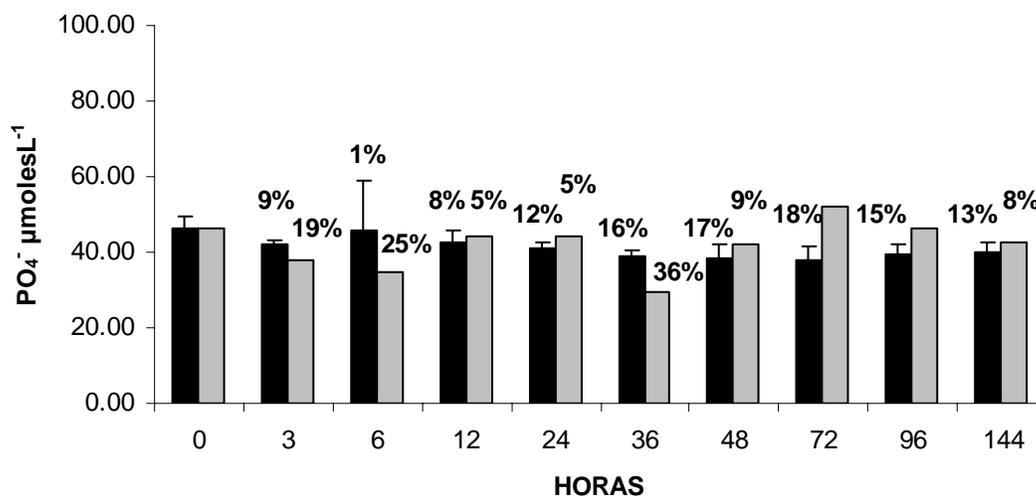


Figura 36. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de los cocultivos de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Chlorella vulgaris* (CLV1) de forma libre (■) y coinmovilizada (▒) mantenidos en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

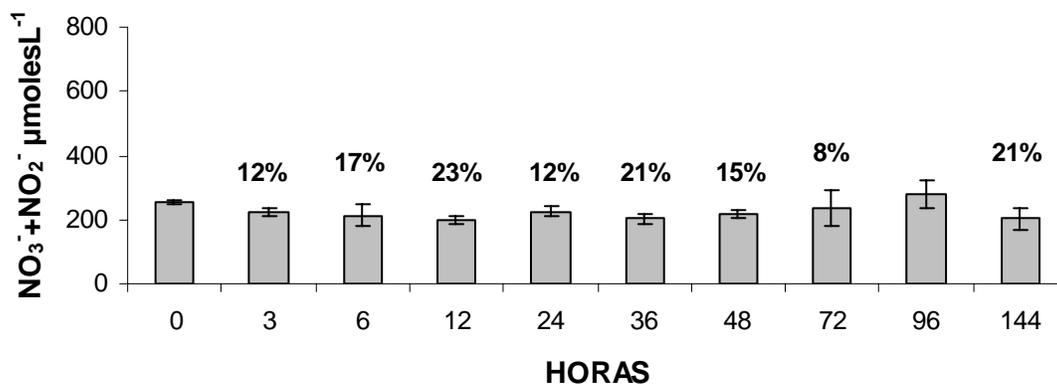


Figura 37. Valores promedio ± 1 error estándar de las concentraciones de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y su porcentaje de remoción de la cepa *Scenedesmus obliquus* (SCO1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

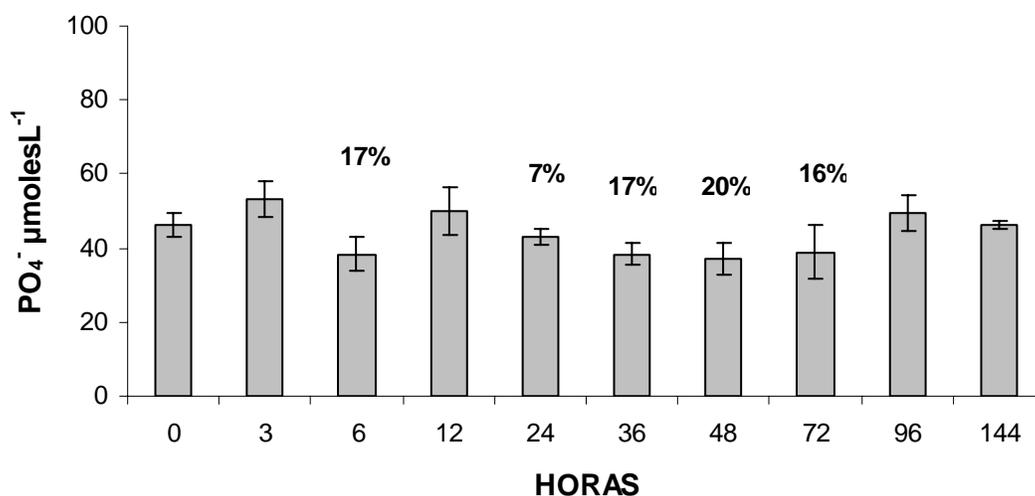


Figura 38. Valores promedio ± 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa *Scenedesmus obliquus* (SCO1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

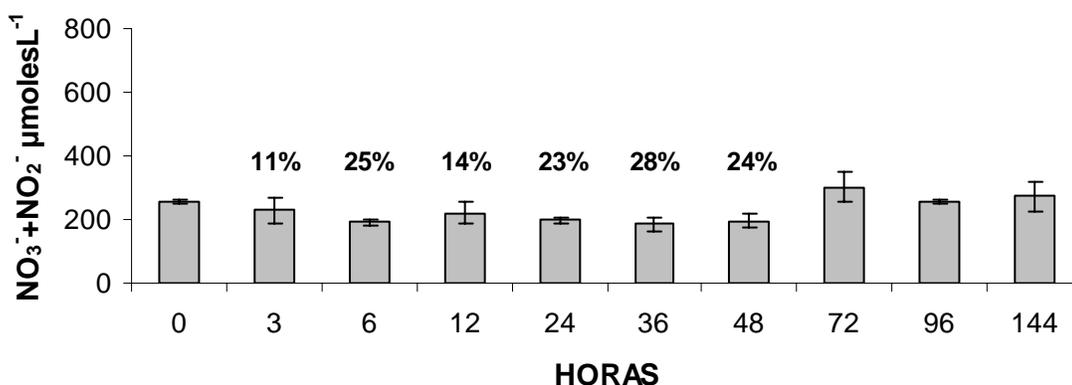


Figura 39. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y su porcentaje de remoción de la cepa *Chlorella vulgaris* (CLV1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

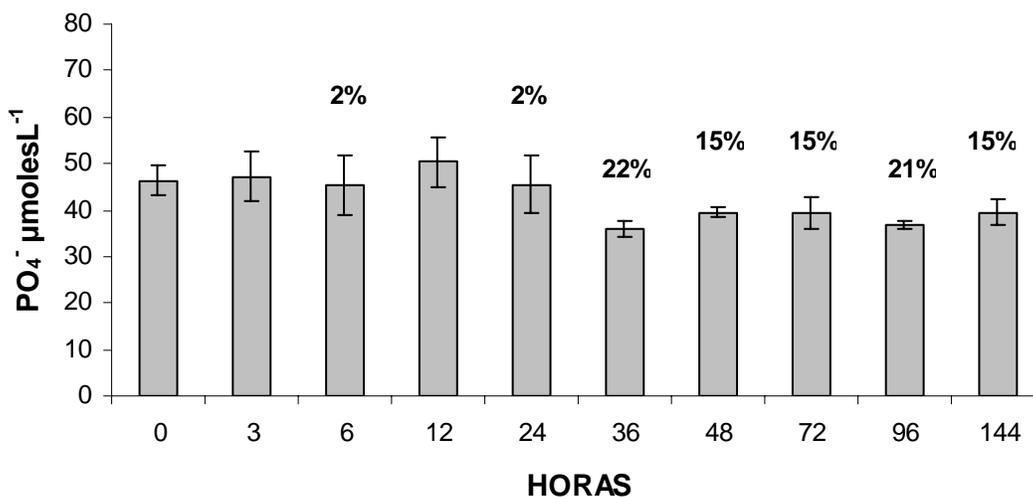


Figura 40. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa *Chlorella vulgaris* (CLV1) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

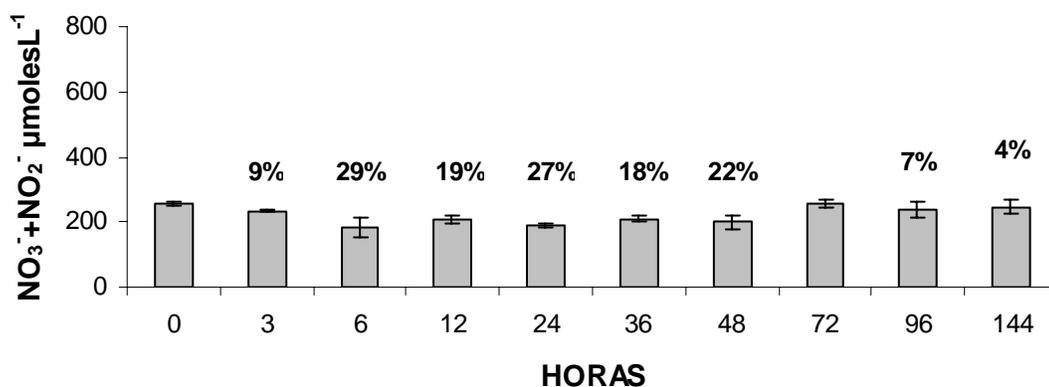


Figura 41. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y su porcentaje de remoción de la cepa *Synechococcus elongatus* (SYX1) (1.10 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

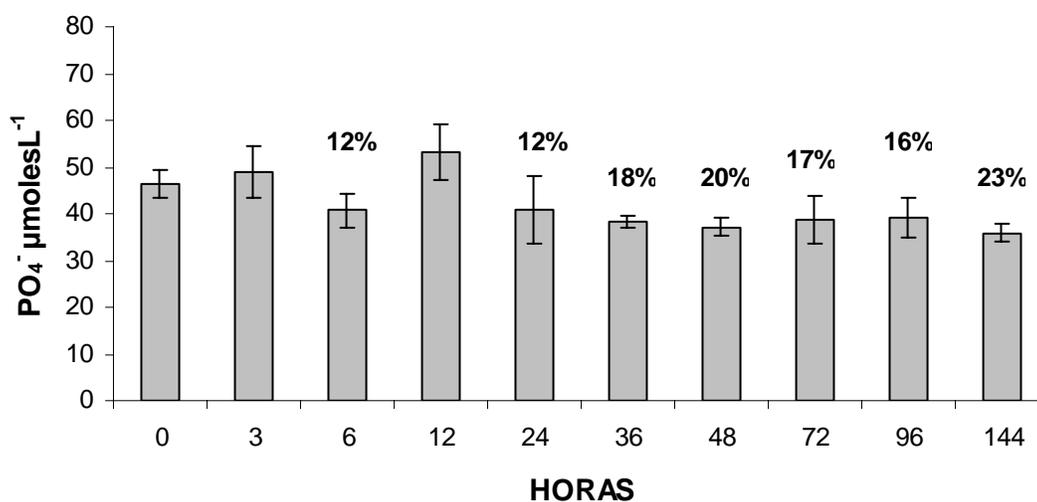


Figura 42. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa *Synechococcus elongatus* (SYX1) (1.10 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

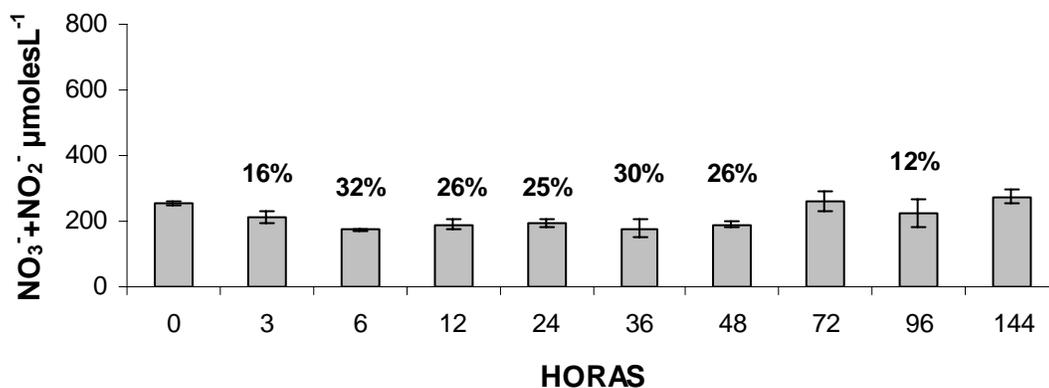


Figura 43. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de $\text{NO}_2 + \text{NO}_3$ y su porcentaje de remoción de la cepa *Synechococcus elongatus* (SYX1) (7.36 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

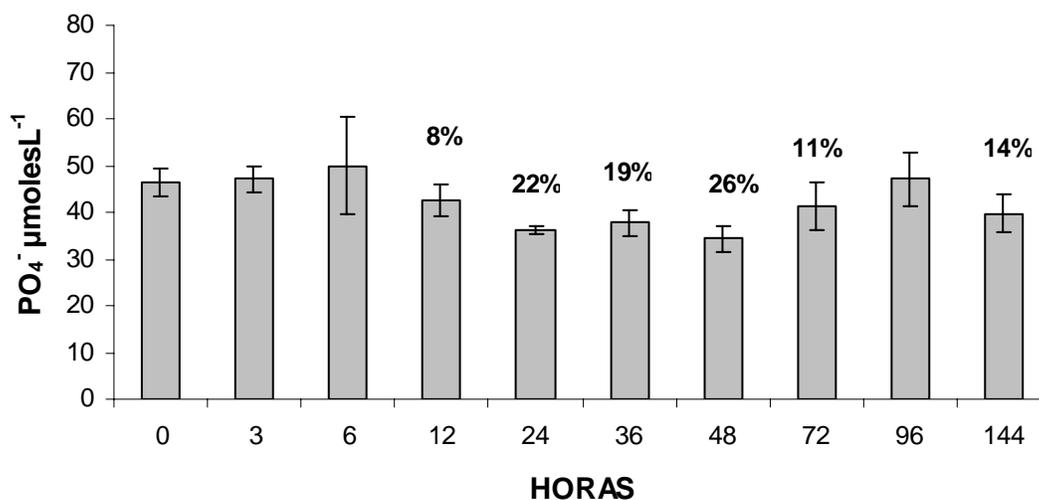


Figura 44. Valores promedio \pm 1 error estándar de las concentraciones de PO_4 y su porcentaje de remoción de la cepa *Synechococcus elongatus* (SYX1) (7.36 ml) mantenida en un sistema estático en medio “2f” durante un periodo de 144 horas de cultivo. Las barras sin valores de porcentaje corresponden a producción.

Tabla VIII. Valores promedio \pm 1 error estándar de: la concentración inicial y final de nutrientes (NO_2+NO_3 y PO_4 en $\mu\text{moles l}^{-1}$) y el porcentaje (%) de remoción de las cepas *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) cultivadas en medio “2F” de forma libre, mixta-libre y coinmovilizada. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas, $a>b>c$ obtenidas por una prueba *a posteriori* Tukey. * : dato único.

LIBRES	NO_2+NO_3		PO_4	
	Inicial	% Remoción Final	Inicial	% Remoción Final
	256.46 \pm 5.82		46.34 \pm 3.10	
	Final		Final	
SYX1-SCO1	301.90 \pm 19.45 ^b		40.50 \pm 3.95	13
SYX1-CLV1	270.53 \pm 2.46 ^b		40.24 \pm 2.36	13
SCO1	202.92 \pm 35.76 ^b	21	46.15 \pm 1.09	0.4
CLV1	273.14 \pm 47.77 ^b		39.45 \pm 2.81	15
SYX1(1.10ml)	246.29 \pm 21.91 ^b	4	35.89 \pm 2.00	23
SYX1(7.36ml)	274.78 \pm 20.44 ^b		39.65 \pm 4.02	14
COINMOVILIZADAS				
SYX1-SCO1	776.05 \pm 64.62 ^a		40.35 \pm 13.15	13
SYX1-CLV1	440.12 ^{ab*}		42.65*	8

Se calculó la proporción de remoción de nitrógeno con respecto al biovolumen. En los tratamientos de los cocultivos libres fueron las cepas de SYX1-SCO1 las que obtuvieron la proporción más baja con respecto al valor inicial de remoción y en los cultivos mono-específicos fue la cepa SYX1. En los cultivos coinmovilizados la proporción en ambos tratamientos SYX1-SCO1 y SYX1-CLV1 tendió a aumentar (Tabla IX).

La cepa SYX1 (1.10 ml) fue significativamente diferente y mayor con respecto a los otros tratamientos ($F = 17.153$) ($P < 0.05$) (Prueba ANOVA $\alpha = 0.05$), en cuanto a las proporciones de nitrógeno con respecto al biovolumen (Tabla IX).

En los ortofosfatos la proporción más baja con respecto al biovolumen en los cultivos mixtos libres la tuvieron las cepas SYX1-SCO y en los cultivos libres mono-específicos fue la cepa SYX1 quien obtuvo la proporción más baja y en los cultivos coinmovilizados fueron las cepas SYX1-SCO1 las que mostraron la proporción más baja (Tabla IX).

Existieron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto a la proporción de ortofosfatos y el biovolumen ($F = 18.796$) ($P < 0.05$) (Prueba ANOVA $\alpha = 0.05$). La cepa SYX1 fue significativamente diferente y mayor con respecto a los otros tratamientos (Tabla IX).

Tabla IX. Valores promedio de: la proporción inicial y final de nutriente/biovolumen ($\mu\text{moles l}^{-1}/\mu\text{m}^3 \text{ ml}^{-1}$) ($\times 10^{-6}$) de las cepas *Synechococcus elongatus* (SYX1), *Scenedesmus obliquus* (SCO1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) cultivadas en medio "2f" en un sistema estático de forma libre, mixta-libre y coinmovilizada. Las letras distintas indican diferencias significativas entre las cepas, $a > b > c$ obtenidas por una prueba *a posteriori* Tukey.

LIBRES	NO ₂ +NO ₃ / Biovolumen		PO ₄ / Biovolumen	
	Inicial	Final	Inicial	Final
SYX1-SCO1	124.28	5.20 ^b	22.46	0.70 ^b
SYX1-CLV1	118.72	14.80 ^b	21.45	2.20 ^b
SCO1	131.06	3.90 ^b	23.68	0.89 ^b
CLV1	177.37	12.70 ^b	32.05	1.84 ^b
SYX 1(1.10ml)	2402.41	116.84 ^a	434.08	17.03 ^a
SYX 1(7.36ml)	359.05	132.97 ^b	64.87	19.19 ^b
COINMOVILIZADAS				
SYX1-SCO1	1.79 ^b	3.09	0.32	0.16 ^b
SYX1-CLV1	1.15 ^b	1.84	0.21	0.18 ^b

Capítulo V

V. DISCUSIÓN

V. 1. Tasa de crecimiento de cultivos monoespecíficos

Existen una variedad de factores que intervienen en el crecimiento de cianobacterias y microalgas pero son cuatro los más relevantes en los ambientes acuáticos y corresponden al nitrógeno, el fósforo, el carbono y la luz, ya que estos tienen un efecto sobre la respuesta fisiológica de las microalgas (Owens y Esaias, 1976). Además de estos factores, la temperatura y el pH también son importantes ya que deben estar en valores adecuados según los requerimientos de cada especie (Mora, 2002; Rosales *et al.*, 2006).

Las cianobacterias y las microalgas se han propuesto como alternativas para diversas aplicaciones biotecnológicas así como para el tratamiento de diversos tipos de efluentes. La utilización de los cultivos microalgales resultan ser una alternativa de tratamiento terciario de aguas residuales (Asano *et al.*, 2000; Salazar, 2006; Aguilar-May, 2006), pero los elevados costes y la dificultad de cosechar las microalgas para este tipo de tratamientos hace necesario buscar alternativas para la cosecha de la biomasa microalgal como es el uso de microalgas inmovilizadas (de la Noüe *et al.*, 1990).

Por lo anterior en el presente trabajo se evaluó la tasa de crecimiento y el porcentaje de remoción de nitrógeno (NO_2+NO_3) y de fósforo (PO_4) de ocho cepas de cianobacterias y microalgas en dos concentraciones de nutrientes (medio “f” y “2f”), para elegir al menos dos especies de microalgas y/o cianobacterias que proporcionen las mejores tasas de crecimiento y la mayor remoción de nutrientes, y que además algunas de estas puedan coexistir para su posterior coinmovilización.

La cepa *Chlamydomonas mexicana* (CMM1) obtuvo la mayor tasa de crecimiento en ambos medios de cultivo al igual que las cepas *Scenedesmus* sp. (SCX1) y *Scenedesmus* sp.

(SCX2) obtuvieron altas tasas de crecimiento en medio “f”. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Fierro-Reséndiz (2004) quien evaluó la tasa de crecimiento de estas tres cepas cultivadas en dos temperaturas a 20 °C y 32 °C obteniendo las mayores tasas de crecimiento a una temperatura de 32 °C.

Ruíz-Marín (2008) evaluó el crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en estado libre e inmovilizado y obtuvo para *Scenedesmus obliquus* una tasa de crecimiento similar a la evaluada en este estudio (0.28 divisiones por día). Este autor obtuvo mayores tasas de crecimiento para *Chlorella vulgaris* (0.37 divisiones por día) que las obtenidas en este trabajo (0.27 divisiones por día). Lau *et al.* (1997) también evaluaron mayores tasas de crecimiento para *Chlorella vulgaris* cultivada en forma libre e inmovilizada en alginato y carragenano, respecto a los valores obtenidos en este trabajo.

Las cepas *Scenedesmus obliquus* (SCO1), *Scenedesmus* sp. (SCX1), *Scenedesmus* sp. (SCX2), *Chlamydomonas gloeopara* (CLMG1), *Chlamydomonas mexicana* (CLMM1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1) tuvieron las mayores tasas de crecimiento acumulada en medio “2f” así como la mayor densidad celular. Esto podría deberse a que el crecimiento de las microalgas depende de factores, como la temperatura, la intensidad de la luz, el pH, la salinidad y la disponibilidad de los nutrientes. Si existiera un nutriente limitante en el cultivo afectaría el metabolismo y las tasas de división celular y se reflejaría en el crecimiento (Owens y Esaias, 1976; Grossman y Takahashi, 2001). Por lo general las temperaturas óptimas para cultivar microalgas oscilan entre 18-25 °C pero esto varía según la especie que se vaya a cultivar y su tolerancia a los cambios de temperatura ya que puede afectar las reacciones intracelulares, el metabolismo y los requerimientos nutricionales así como la composición de la biomasa (Fogg y Thake, 1987; Álvarez-Arellano, 2003).

Existe una relación entre la temperatura y la actividad biológica ya que la tasa de crecimiento aumenta conforme se incrementa la temperatura dentro de un rango óptimo determinado para cada especie. Fuera de este rango de óptimo de temperatura el crecimiento tiende a disminuir. Además, las temperaturas óptimas para cada especie varían con la intensidad de la luz y la concentración de los nutrientes (Fogg y Thake, 1987; Álvarez-Arellano, 2003).

Las diferencias en el crecimiento evaluadas con las cepas estudiadas con respecto a lo indicado por Fierro-Reséndiz (2004) podrían deberse al efecto de la temperatura. Se considera que los nutrientes o el pH no influyeron de forma importante, ya que no hubo diferencias significativas entre los tipos de medios utilizados y la tasa de crecimiento. En tanto que el pH evaluado en los cultivos de las ocho cepas estudiadas tuvo una tendencia similar en ambos medios de cultivo ("F" y "2F"). En este estudio la temperatura se mantuvo a 20 ± 1 °C. Se menciona que para *Scenedesmus obliquus* (SCO1) a partir de 10 °C la tasa de crecimiento y la producción de biomasa se incrementan exponencialmente con la temperatura por lo que su temperatura óptima de crecimiento es de 31 a 32 °C (Soeder y Hegewald, 1988).

La luz es un factor fundamental en el cultivo de las microalgas, así como su relación con otros factores ambientales (Álvarez-Arellano, 2003). El crecimiento en *Chlorella vulgaris* (CLV1) fué afectado por la combinación de la irradiancia y la temperatura, ya que en otros estudios se ha comprobado que a 25 °C y con diferentes intensidades de luz no se producen cambios significativos en el crecimiento. Sin embargo, esta especie expuesta a una menor temperatura y a una alta irradiancia el crecimiento disminuye, debido a que en *Chlorella* el crecimiento se favorece con bajas irradiancias (3 kilolux) (Oh-Hama y Miyachi, 1988). Copalcúa-Inzúnza (2003) evaluó el efecto de la irradiancia ($300 \mu\text{E seg}^{-1} \text{cm}^{-2}$ y $180 \mu\text{E seg}^{-1} \text{cm}^{-2}$) sobre el crecimiento de dos cepas de *Chlorella* (CLX1 y CXL2) y obtuvo un mayor crecimiento a una menor irradiancia. En este trabajo el crecimiento de *Chlorella vulgaris* pudo estar influenciado por la baja temperatura (20 °C) al igual que para las cepas de *Scenedesmus*, mas que por el efecto de la irradiancia, ya que la irradiancia en este ensayo fue baja ($110 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con respecto a otros estudios (Copalcúa-Inzúnza, 2003; Fierro-Reséndiz, 2004; Aguilar-May, 2006).

Con la cepa *Synechococcus elongatus* (SYX1) se obtuvo la mayor tasa de crecimiento acumulada en el medio "2F" así como la mayor densidad celular. Estos resultados coinciden con los trabajos de Rosales (2006) para *Synechococcus* sp. en donde se registró un aumento en la densidad celular con respecto al incremento de nitrato de sodio en el medio de cultivo. Aguilar-May (2006), cultivo a *Synechococcus elongatus* en agua de mar obteniendo un mejor crecimiento a 30 °C y una alta tasa de crecimiento acumulada (6.60 en 10 días)

comparada con las de este estudio (3.01 para medio “f” y 3.17 para medio “2f”) al cultivar la misma cepa en agua dulce.

Esta diferencia en las tasas de crecimiento acumulada de *Synechococcus elongatus* pudo deberse a un estrés salino, ya que esta especie fue aislada a partir de muestras de agua de una granja de producción de camarón (Aguilar-May, 2006), aún cuando es una especie tolerante, su crecimiento pudo verse afectado por la diferencia en la concentración de sales inorgánicas disueltas y por la influencia de factores como la temperatura y la concentración de nutrientes (Álvarez-Arellano, 2003).

Estas diferencias en las tasas de crecimiento también pudieron estar influenciadas por la distinta cantidad de inóculo, ya que en el estudio de Aguilar-May el inóculo fue de 0.035×10^8 cel ml⁻¹ mientras que para este estudio fue de 1.122×10^6 cel ml⁻¹. El tamaño del inóculo y la viabilidad de las células, es importante para el desarrollo del cultivo ya que la mayoría de las células por el cambio de las condiciones de cultivo pueden modificar su metabolismo (Fogg y Thake, 1987). Si el cultivo es muy denso se producen pérdidas debido a la respiración o a una ineficiente utilización de la energía lumínica (Álvarez-Arellano, 2003).

Las cianobacterias son un grupo de organismos fotosintéticos con características fisiológicas y morfológicas específicas que le han permitido desarrollar estrategias de adaptación a diferentes condiciones ambientales de temperatura, humedad, salinidad, irradiancia y pH. La cianobacteria *Synechococcus elongatus* es capaz de crecer tanto en agua dulce como en medio marino (Mora *et al.*, 2002; Rosales *et al.*, 2005).

El género *Spirulina* tiene gran importancia por su alto contenido de proteínas, β-caroteno, vitaminas, ficocianina y γ ácido linoleico (Sánchez-Luna *et al.*, 2004), por estas características y por su rápido crecimiento y fácil adaptación en ambientes con altas concentraciones de nutrientes (nitrógeno y fósforo), la cianobacteria *Spirulina maxima* (SPM1) fue elegida para este estudio. Además, *S. maxima* se ha utilizado como purificadora de aguas residuales (Pouliot *et al.*, 1986; Cañizares *et al.*, 1993; Pedraza, 1989). En este estudio *S. maxima* tuvo una mejor tasa de crecimiento acumulada en medio “f” respecto a la obtenida en el medio específico (*Spirulina*), lo que refleja su adaptabilidad a un medio distinto al que normalmente se usa para cultivarla. Cruz-Fraga (2003) evaluó el

crecimiento de *Spirulina maxima* en cuatro concentraciones diferentes de nutrientes y concluyó que las células pueden crecer y reproducirse en elevadas concentraciones de nutrientes (hasta cuatro veces las descritas en los medios de cultivo específicos).

Márquez *et al.* (1993) evaluaron el crecimiento de *Spirulina platensis* con y sin adición de glucosa en condiciones de luz y oscuridad, concluyeron que esta especie es capaz de crecer heterotróficamente con glucosa en condiciones aeróbicas y de oscuridad, al igual que mixotróficamente en presencia de luz. Las concentraciones celulares de los cultivos mixotróficos constituyeron la suma de las concentraciones celulares autotróficas y heterotróficas.

Debido a las características específicas de las microalgas y las cianobacterias, estos grupos cultivados tienen requerimientos distintos de nutrientes que se manifiesta de manera diferente en la limitación de un nutriente y/o a factores estresantes. Lo anterior interfiere en su metabolismo así como en su morfología, en la reducción de la tasa fotosintética y en las tasas de división celular que influyen directamente en el crecimiento (Owens y Esaias, 1976).

V. 1.1 Remoción de nutrientes de cultivos monoespecíficos

Los requerimientos nutricionales de microalgas y cianobacterias varían entre las distintas especies y además dependen de las condiciones de cultivo (Álvarez-Arellano, 2003), por lo que la captación de nitrógeno depende de la cuota de remoción y de la capacidad de asimilación de las células (Owens y Esaias, 1976).

Las formas químicas de nitrógeno comúnmente usadas para el cultivo de microalgas son amonio, nitrato y urea, aunque las microalgas prefieren al amonio antes que los nitratos. Cuando en un cultivo se utiliza el amonio o nitratos como aporte de nitrógeno, se modifican los valores de pH, si las células consumen nitratos se incrementa el pH en el medio (Myers, 1951; Oh-Hama y Miyachi, 1988, Álvarez-Cobelas *et al.*, 1989). En este experimento el pH se mantuvo sin grandes cambios en el transcurso del tiempo para todas las especies estudiadas y los valores resultaron cercanos a 8, excepto para la cepa SPM1 que registró valores de pH mayores de 9 debido a su fisiología y a que el medio de cultivo es específico e incluye compuestos que promueven un medio alcalino.

Cuando hay un cambio en el metabolismo por deficiencia de nitrógeno se produce un decremento en la tasa de crecimiento de las células (Oh-Hama y Miyachi, 1988).

En este estudio resultó una relación directa entre el consumo de nitrógeno y el crecimiento de *Synechococcus elongatus*, ya que esta cepa fue la que obtuvo los mayores porcentajes de remoción de nitrógeno (75% para medio "f" y 85% para medio "2f") y las mayores tasas de crecimiento acumulada en ambos medios de cultivo "f" y "2f". Esta relación entre el consumo de nitrógeno y el crecimiento de cianobacterias también fue encontrada por Rosales (2006), al evaluar la concentración de nitrato de sodio respecto al crecimiento y la composición bioquímica de *Synechococcus* sp. Esta especie, en ausencia de nitrato de sodio, tuvo una disminución significativa de la población inicial y en presencia de nitrato de sodio se evaluó un incremento en la densidad celular.

Resultados similares obtuvo Aguilar-May (2006), al evaluar la tasa de crecimiento de *Synechococcus elongatus* con distintos aportes de nitrógeno (amonio, nitrato de sodio, urea y fertilizante agrícola) en el medio de cultivo. Las mayores tasas de crecimiento acumulada la obtuvieron los cultivos mantenidos con 100% de urea y con fertilizante agrícola que contenía 7.8% de amonio, 7.8% de nitrato y 16.4 % de urea.

La eficiencia de remoción de nitrógeno de la cepa *Synechococcus elongatus* evaluada en este trabajo fue mayor a la descrita por Aguilar-May (2006), quien en su estudio evaluó porcentajes de remoción de nitratos tanto en células libres como inmovilizadas en valores cercanos al 30% y la remoción de ortofosfatos fue aproximadamente del 50% en medio marino.

Las cepas de *Scenedesmus* (SCO1, SCX1 y SCX2) también tuvieron altos porcentajes de remoción de nitrógeno en medio "f", lo que resultó similar a los porcentajes obtenidos por Fierro-Reséndiz (2004) para cultivos con células libres (30% de remoción de nitrato) y con células inmovilizadas (70% de remoción de nitrato).

Los porcentajes de remoción de ortofosfatos obtenidos en este estudio con *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* fueron similares a los obtenidos por Chacón *et al.* (2004) para *Chlorella* sp. (44% en agua residual esterilizada) y para *Scenedesmus* sp. (48.7% en agua residual no esterilizada), donde también evaluaron la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas.

Los requerimientos de fosfatos varían entre especies (Myers, 1951) de microalgas y cianobacterias. En un cultivo estático tienden a acumular ortofosfatos y su concentración puede ser más alta en el interior de la célula que al exterior (Owens y Esaias, 1976).

La cianobacteria *Spirulina maxima* no removió el nitrógeno del medio aun cuando los nitratos son su principal aporte de nitrógeno (Richmond, 1988). Sin embargo, para esta especie se evaluó 100% de remoción de ortofosfatos en ambos medios de cultivo (“F” y “2f”). Esta tendencia coincide con lo descrito por Cañizares *et al.* (1993) quienes compararon la eficiencia de remoción de *Spirulina maxima* a diferentes concentraciones de nutrientes (amonio y fósforo total) provenientes de desechos porcinos tanto en cultivos de células libres e inmovilizadas en carragenano. Estos autores obtuvieron (en cultivos libres) una mayor concentración de biomasa y una mayor remoción de ortofosfatos (98%) y de amonio (75%) a una concentración de nutrientes del 50%. Para los cultivos de células inmovilizadas obtuvieron una remoción de amonio y de ortofosfatos cercana al 90% en concentraciones nutrientes de 25% y 50%. Por lo anterior, concluyeron que *Spirulina maxima* es capaz de remover el exceso de nutrientes tanto en forma libre en el medio como inmovilizada.

Cruz-Fraga (2003) evaluó la capacidad de remoción de las distintas formas químicas de nitrógeno (nitritos, nitratos y amonio) y de fósforo (ortofosfatos) de la cianobacteria *Arthrospira (Spirulina) maxima* mantenida en forma libre e inmovilizada en quitosano. Encontró que la mayor remoción de ortofosfatos y de amonio (casi 100%) se dió durante las primeras doce horas del ensayo. En este ensayo se obtuvo en 100% de remoción de ortofosfatos al final del experimento.

V. 2. Tasa de crecimiento de cultivos mixtos

Hay diversos estudios sobre las interacciones entre bacterias-microalgas que constituyen una alternativa para ser utilizados como control de las proliferaciones de bacterias y fitoplancton causantes de daños a los ambientes naturales (como el caso de los florecimientos algales) y sistemas cerrados de cultivo. Estas investigaciones se han hecho tanto en laboratorio como *in situ* y han demostrado procesos de estímulo e inhibición del crecimiento de las microalgas y/o bacterias (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

Las interacciones entre bacteria-microalga son importantes y también lo son las interacciones entre las diversas especies de fitoplancton. Por lo anterior, dos o más especies pueden ocupar el mismo nicho ecológico puesto que el hábitat es heterogéneo por las fluctuaciones temporales y espaciales que ocurren en el medio ambiente y de esta manera pueden coexistir en equilibrio ya que cada una está limitada por diferentes recursos.

Esta coexistencia entre distintas especies de microalgas sucede tanto en los cultivos como en el medio natural tal como lo encontró Tilman (1977), que cultivo dos especies de diatomeas *Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana* en sistemas semicontinuos con diferentes proporciones de silicatos y diferentes concentraciones de fosfatos. Encontró que con una proporción alta de Si:P incrementa el crecimiento de *Asterionella* y a una alta proporción de P:Si favorece el crecimiento de *Cyclotella* y cuando las proporciones de nutrientes son intermedias ambas especies coexisten (South y Whittick, 1987).

Los primeros trabajos que se hicieron sobre relaciones alelopáticas en fitoplancton sugirieron que a veces no existen relaciones alelopáticas nutricionales entre especies de fitoplancton mediadas a través de sustancias orgánicas. Posteriormente se estableció que existían sustancias liberadas por microalgas que inhibían el crecimiento del fitoplancton y/o de otros organismos (Maestrini y Bonin, 1981).

Es difícil estudiar la alelopatía entre los organismos acuáticos en condiciones naturales porque hay factores como la competencia por nutrientes y luz, los cambios de pH y la temperatura que enmascaran los efectos alelopáticos, por lo anterior es necesario realizar este tipo de estudios en laboratorio bajo condiciones ambientales controladas (Wang *et al.*, 2007).

En este ensayo se hicieron cultivos mixtos de una especie de cianobacteria y dos especies de clorofíceas, para establecer relaciones alelopáticas exitosas. Las cepas *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) y *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Chlorella vulgaris* (CLV1) fueron las combinaciones de especies que tuvieron una alta tasa de crecimiento acumulada y una mayor concentración celular al compararlas con las otras combinaciones de especies cuya concentración celular fue menor o registraron una tasa de crecimiento acumulada menor. Este menor crecimiento posiblemente sea debido a la

competencia por el mismo nutriente, como fue postulado en otras investigaciones relacionadas con alelopatía (Maestrini y Bonin, 1981).

También se han hecho estudios de alelopatía entre especies de microalgas con macroalgas, y con microalgas y bacterias. Wang *et al.* (2007) trabajó con los efectos alelopáticos de tejido fresco, polvo seco y extracto acuoso de las macroalgas *Ulva pertusa*, *Corallina pilulifera* y *Sargassum thunbergii* respecto al crecimiento de los dinoflagelados *Heterosigma akashiwo* y *Alexandrium tamaren*. Los resultados que obtuvieron fue un efecto inhibitorio en el crecimiento de las dos especies de dinoflagelados y los aleloquímicos de las tres especies de macroalgas en altas concentraciones fueron letales para *Heterosigma akashiwo*.

Mulderij *et al.* (2005) evaluaron el efecto alelopático de la macrofita *Stratiodes aloides* sobre el crecimiento y la formación de colonias de *Scenedesmus obliquus* y observaron que los exudados de las plántulas jóvenes de la macrofita tienen un efecto altamente inhibitorio sobre la tasas de crecimiento de *S. obliquus* y que además se formaron mas colonias de esta especie en presencia de los exudados.

Hay estudios de alelopatía entre una especie de bacteria y una especie de microalga, siendo *Chlorella vulgaris* la especie mas utilizada para este tipo de ensayos como el elaborado por Lebsky *et al.* (2001) que evaluaron la interacción entre la microalga *Chlorella vulgaris* al ser coinmovilizada en esferas de alginato con la bacteria *Phyllobacterium myrsinacearum* o con *Azospirillum brasilense*. La interacción entre especies fue monitoreada con un microscopio electrónico por 10 días y observaron que al inicio del experimento las cavidades de la esfera fueron colonizadas solo por *Ch. vulgaris*, pero en el transcurso de los días tanto las microalgas como las bacterias colonizaron las mismas cavidades. Este estudio sugiere que hubo interacciones comensales entre la especie de microalga y las dos especies de bacterias, ya que observaron que en el transcurso del tiempo la bacteria *P. myrsinacearum* inhibe el crecimiento de la microalga y *A. brasilense* favorece su reproducción.

Este estudio nos permite vislumbrar que la distribución espacial de las células dentro de las esferas esta mediada por el tipo de microorganismos y por sus relaciones alelopáticas.

V. 3 Remoción de nutrientes de cultivos mixtos libres y de cultivos coinmovilizados

El uso de las microalgas para el tratamiento de aguas residuales ha sido investigado en las últimas décadas, ya que estas tienen la capacidad de usar compuestos orgánicos especialmente aquellos que en cantidades excesivas producen eutrofización como el nitrógeno y el fósforo. Sin embargo, las microalgas para el tratamiento terciario requieren de estanques poco profundos, extensos y para la cosecha de las microalgas se necesitan floculantes químicos que son caros y generan una contaminación secundaria. Una alternativa para este problema de la cosecha de microalgas en el área del control de la eutrofización es la utilización de microalgas inmovilizadas (de la Nouë y Proulx, 1988; Jiménez-Pérez *et al.*, 2004; Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2008).

V. 3.1 Viabilidad de las cepas coinmovilizadas

La inmovilización de las células es una técnica que limita el libre movimiento de las células y es necesario escoger el método y las condiciones adecuadas de inmovilización para cada tipo de célula. El método más común es la inmovilización por confinamiento de las células dentro de matrices y por la polimerización de un material gelificante que no cambie las funciones metabólicas y fisiológicas de las microalgas además que no sea un método destructivo para la viabilidad celular (Yang y Wang, 1990).

Este material gelificante utilizado para la inmovilización de las células de fitoplancton no debe ser tóxico, debe ser poroso o fibroso para que permita la difusión de oxígeno con el fin de que ocurran procesos aeróbicos e intercambio iónico para evitar que existan zonas anóxicas en el centro de la matriz o que se formen anillos gruesos de células en la periferia de la esfera y que permita el paso de la luz para la fotosíntesis. En diversos estudios de inmovilización de células de fitoplancton se ha observado que las células crecen en una región adyacente al suministro de nutrientes (Yang y Wang, 1990; Omar, 1993; Romo y Pérez-Martínez, 1997). Para la inmovilización hay ciertas consideraciones que deben tomarse en cuenta de acuerdo al tipo de gel utilizado como son: el tamaño de la partícula del gel, ya que con menor diámetro es mejor la distribución de las células, esta distribución también se ve modificada con el aumento en la densidad celular y con el tamaño de la célula ya que la densidad celular ejerce un efecto sobre la tasa de captación de oxígeno y

sobre la difusión de oxígeno (Omar, 1993). La inmovilización de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es un proceso que se está usando con mayor frecuencia y para llevarlo a cabo se deben considerar factores como la especie de microalga, la matriz que se va a utilizar en la inmovilización, la concentración de células dentro de la esfera, la morfología de la esfera, la aireación y el tiempo de retención entre otros (Tam y Wong, 2000).

Para este trabajo se utilizó quitosano porque es soluble en diferentes medios así como en ácidos inorgánicos, por su alta estabilidad y resistencia a la humedad, por su actividad quelante además se utiliza como agente antimicrobiano (Lárez-Velásquez, 2003; Díaz de Apodaca *et al.*, 2007).

En estos experimentos no se formaron esferas sino elipsoides que tuvieron una consistencia blanda y su tamaño promedio fue de 3 mm de ancho por 4 mm de largo. Al interior de la elipsoide la distribución de ambos tipos de célula fue uniforme en toda la matriz; contrario a lo que se ha descrito para algunas especies de hongos que fueron coinmovilizadas en alginato cuya distribución estuvo influenciada por la disposición de oxígeno dentro de la esfera (Omar, 1993) o por el efecto del cambio de las características del espesor de la pared de la esfera por la solución utilizada para la gelificación y las características salinas del medio (Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2008).

Los elipsoides inmovilizadas durante las primeras horas después de la inmovilización perdieron color aun cuando se les adicionó medio “f/2” para disminuir el efecto del estrés causado por el cambio de pH, a las doce horas se cambió el medio para evitar un pH alcalino y se inició el experimento de remoción a las 24 h después de la coinmovilización.

En un estudio Dhawan *et al.* (2004) evaluaron las propiedades mucoadhesivas de las esferas de quitosano preparadas por diferentes métodos con el fin de estudiar la interacción entre la mucina y las microesferas en soluciones acuosas. Entre los métodos utilizados por estos autores se evaluó la estabilidad de las microesferas expuestas a 0.1 N HCl, mediante la medición de la concentración de la adhesión de las microesferas. Encontraron que la inestabilidad ácida de la microesferas de quitosano producen la disolución de las microesferas y se hacen más transparentes.

En este estudio se encontró que a las 48 horas de haber iniciado el experimento de remoción de nutrientes, los elipsoides comenzaron a desintegrarse y esto pudo deberse al grado de acidez del proceso de inmovilización y a la calidad del quitosano.

En un estudio realizado por Lebsky *et al.* (2001) evaluaron la interacción entre la microalga *Chlorella vulgaris* coinmovilizada en esferas de alginato con la bacteria *Phyllobacterium myrsinacearum* o con *Azospirillum brasilense* promotora del crecimiento de plantas. Observaron que al inicio del experimento las cavidades de la esfera fueron colonizadas solo por *Ch. vulgaris*, pero en el transcurso del tiempo tanto la especie de microalga como las dos especies de bacterias colonizaron las mismas cavidades.

González y Bashan (2000), coinmovilizaron en esferas de alginato a la microalga *Chlorella vulgaris* y a la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* y observaron que ambos tipos de microorganismos colonizaron las mismas cavidades de la esferas aunque la microalga se congregó más en la periferia de la esfera mientras que la bacteria colonizó el centro de la esfera. Este tipo de colonización no sucedió en las esferas utilizadas en este trabajo porque las especies coinmovilizadas se distribuyeron de manera uniforme en toda la esfera.

V. 4. Tasas de crecimiento acumulada ($\Sigma\mu$)

Al no existir estudios de coinmovilización de microalgas los resultados se contrastaran con estudios hechos con cultivos mono-específicos de células inmovilizadas.

Las mayores tasas de crecimiento acumuladas se obtuvieron en cultivos mixtos libres y fueron significativamente mayores a los inmovilizados a diferencia de los resultados obtenidos por Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2008), quienes evaluaron el crecimiento de *Synechococcus elongatus* y la remoción de nitrógeno y fósforo en células libres e inmovilizadas en quitosano en medio marino. No encontraron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de células libres e inmovilizadas y obtuvieron mayor crecimiento en los cultivos de células libres con respecto a los inmovilizados.

Los cultivos mixtos tanto libres como coinmovilizados tienen una fase de acondicionamiento en la curva de crecimiento, esta tendencia coincide con los resultados

obtenidos por Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2008) y Ruíz-Marín (2008) en el crecimiento de cultivo de células libres e inmovilizadas. Lau *et al.* (1997) tuvieron en sus cultivos de microalgas inmovilizadas, una fase de acondicionamiento de dos días para las células inmovilizadas en carragenano y de tres días para las células inmovilizadas en alginato. La fase “lag” o de acondicionamiento de un cultivo estático esta en relación a la proporción de inóculo, al tipo de especie y a la viabilidad de las células, ya que la mayoría de las células por el cambio de las condiciones de cultivo pueden modificar su metabolismo (Fogg y Thake, 1987). También puede ocurrir que el cultivo se encuentre en un periodo de reactivación antes de que comience la división celular, como se observó en este estudio en el cual la duración de la fase de acondicionamiento en las células inmovilizadas podría deberse al estrés causado por la inmovilización de las células y por los drásticos cambios de pH. No obstante que algunas especies de microalgas y cianobacterias son capaces de adaptarse a cambios provocados por un factor estresante como el pH (Owens y Esaias, 1976).

Con respecto a las cepas SYN1-CLV1 hubo una diferencia significativa en la concentración celular entre los cultivos de células libres y coinmovilizadas, lo que coincide con los resultados obtenidos para células de *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato por Ruíz-Marín (2008).

Existen pocos estudios relacionados con la coinmovilización de una especie de microalga y una especie de bacteria como los realizados González y Bashan (2000), quienes coinmovilizaron en esferas de alginato a *Chlorella vulgaris* con la bacteria promotora del crecimiento de plantas *Azospirillum brasilense* para incrementar el crecimiento de la microalga. Los resultados que obtuvieron fueron un incremento en el peso de la microalga, un aumento en el número de células y en el tamaño de las colonias, así como en el número de células por colonia, y un incremento en la producción de pigmentos por parte de la microalga. Además, observaron que ambos microorganismos colonizaron las mismas cavidades de la esfera aunque la microalga se congregó más en la periferia de la esfera mientras que la bacteria colonizó el centro.

V. 5. Remoción de nutrientes

Las microalgas que se utilizan en los tratamientos de aguas residuales poseen cualidades como ser capaces de soportar elevadas concentraciones de nutrientes y además de adaptarse para sobrevivir a estos medios, tener una actividad metabólica elevada y una alta capacidad de resistir variaciones ambientales. Algunos de los géneros de microalgas más utilizados para este tipo de tratamientos son *Cyclotella*, *Euglena*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Oscillatoria* entre otros grupos incluidos las cianobacterias (Salazar, 2006).

La eficiencia del proceso de remoción de nutrientes dependerá también del tipo de efluente a tratar, además es importante buscar nuevas especies para el uso en estos tratamientos y procesos que faciliten la recuperación de la biomasa microalgal y que sean menos costosos económicamente (Chevalier y de la Noüe, 1985; Salazar, 2006).

Por lo anterior en el presente trabajo se propuso el uso de cianobacterias y microalgas coinmovilizadas en una matriz de quitosano utilizadas para la remoción de nitrógeno y fósforo.

Tanto en las células libres como en las coinmovilizadas la mayor remoción de nitrógeno se produjo durante las primeras horas del experimento (36 h), esta respuesta también fue similar para los ortofosfatos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Jeanfils *et al.* (1993), que evaluaron altas concentraciones de nitrato y el efecto en el crecimiento y la captación de nitratos por células libres e inmovilizadas de *Chlorella vulgaris* y obtuvieron una mayor remoción durante los primeros días de cultivo tanto en células libres como inmovilizadas. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los que encontró Lau *et al.* (1997), quienes evaluaron la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo) de efluentes residuales por *Chlorella vulgaris* inmovilizada en alginato y carragenano donde el mayor porcentaje de remoción sucedió en las primeras 72 horas. Ellos obtuvieron un mayor porcentaje de remoción tanto para nitrógeno (95%) como para fosfatos (99%) que los obtenidos en este estudio para el nitrógeno que fue un 37% y para los ortofosfatos de 36%. Kaya y Picard (1996), obtuvieron la remoción total de amonio y fosfatos (100%) durante las primeras tres horas del experimento al utilizar geles de quitosano como matrices de entrapamiento en células viables de *Scenedesmus bicellularis* y estos porcentajes son

mayores a los obtenidos en este trabajo a las 36 h para el cocultivo SYX1-SCO1 libre para nitrógeno (37%) y para ortofosfatos (23%).

Chevalier y de la Noüe (1985) inmovilizaron la microalga *Scenedesmus* en carragenano para ser utilizada en la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo), encontraron que las curvas de crecimiento fueron similares entre cultivos libres e inmovilizados. No hubo diferencias entre las tasas de remoción de amonio para cultivos de células libres e inmovilizadas a las cuatro horas (90%) y a las cinco horas (70%) del experimento. Los resultados de remoción de nutrientes obtenidos por estos autores fueron mayores a los obtenidos para *Scenedesmus* coinmovilizada con *Synechococcus elongatus*.

En otro trabajo realizado por de la Noüe y Proulx (1988) usaron agregados de *Phormidium* inmovilizados en quitosano para remover distintas formas químicas de nitrógeno (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) y fósforo (P-PO_4^3) de efluentes secundarios urbanos. Los autores concluyeron que hubo una eficiente remoción de fósforo (87.3%) y de nitrógeno (98%) además que las microalgas quedaron protegidas por el quitosano y previenen la abrasión. Estos resultados de remoción fueron mayores a los obtenidos por *Synechococcus elongatus* con diferente cantidad de inóculo (1.10 ml y 7.36 ml) pero con porcentajes similares en la remoción de nitrógeno (29% para 1.10 ml y 32% para 7.36 ml) y de ortofosfatos (23% para 1.10 ml y 26% para 7.36%) y permiten vislumbrar la eficiente remoción de estos compuestos por esta especie de cianobacteria.

Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2008) estudiaron el crecimiento y la remoción de nitrógeno y fósforo en células libres e inmovilizadas en quitosano de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* y obtuvieron una mayor remoción de amonio en células libres (54%) que en inmovilizadas (29%). La remoción de los nitratos fue similar tanto en cultivos de células libres (38%) como inmovilizadas (44%). También evaluaron el fósforo que presentó una mayor remoción en las células libres (88%) respecto a las inmovilizadas (77%).

La tendencia de una mayor remoción de nitrógeno con las células de *S. elongatus* libres respecto a las inmovilizadas en quitosano también sucedió en este estudio para los dos tipos de cocultivos de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) (37%) y de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Chlorella vulgaris* (CLV1) (30%) obtenidos a las 36

h. Los cocultivos coinmovilizadas de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) tuvieron un porcentaje de producción (13%), en tanto que para los cocultivos de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Chlorella vulgaris* (CLV1) tuvieron un 15% de remoción de nitrógeno.

Con respecto al fósforo la tendencia de una mayor remoción en las células libres solo se dió en *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) con un 23% de remoción y en células coinmovilizadas se evaluó una producción (49%).

Los resultados de remoción de nitratos y fósforo obtenidos en este ensayo difieren con los obtenidos por Fierro-Reséndiz (2004) que utilizó microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes de efluentes de cultivos acuícola y obtuvo una mayor remoción de nitratos (70%) y de fosfatos (94%) en células inmovilizadas a las 12 h del experimento. Estas diferencias en las tasas de remoción pudieron deberse a las diferentes especies de microalgas utilizadas así como al tipo de matriz utilizada para la inmovilización.

Al comparar los resultados de remoción de nutrientes obtenidos en este estudio para los cultivos mixtos de células libres y coinmovilizadas resultaron inferiores a los evaluados por de-Bashan *et al.* (2004) quienes coinmovilizaron en esferas de alginato a la bacteria *Azospirillum brasilense* junto con *Chlorella vulgaris* o con *C. sorokiniana* para utilizarlas en la remoción de nitrógeno y fósforo en aguas residuales domésticas. La coinmovilización de la especie de bacteria con las microalgas resultó en un incremento significativo en el crecimiento de ambas microalgas, así como en un 100% de remoción de amonio, un 94% de remoción de nitrato, y un 92% de remoción de fósforo en 6 días. En este trabajo obtuvieron menores porcentajes de remoción cuando solo se utilizó la microalga para la remoción de nutrientes (75% de amonio, 84% de nitrato y 89% de fósforo). Estos autores concluyeron que la coinmovilización de microalgas y bacterias puede usarse para el tratamiento de aguas residuales.

Capítulo VI

VI. CONCLUSIONES

La especie *Synechococcus elongatus* (SYX1) obtuvo las mayores tasas de crecimiento acumulada y los mayores porcentajes de remoción de nitrógeno tanto en medio “f” (75%) como en medio “2f” (85%) y una total remoción de fosfatos en ambos medios de cultivo.

La cianobacteria *Spirulina maxima* (SPM1) aunque tuvo una alta tasa de crecimiento acumulada y el mayor porcentaje (100%) de remoción de fosfatos, no pudo coexistir en este ensayo con las otras especies de microalga o cianobacteria debido a sus requerimientos específicos del medio de cultivo (alcalino).

Los cocultivos de células libres de las especies *Synechococcus elongatus* (SYX1) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) coexistieron exitosamente, al igual que *Synechococcus elongatus* (SYX1) y *Chlorella vulgaris* (CLV1). Los cocultivos de las especies de clorofitas tuvieron una relación alelopática inhibitoria del crecimiento.

Las cápsulas obtenidas del proceso de coinmovilización presentaron una distribución uniforme de las células tanto de la cianobacteria como de las clorofitas y no se formó un espesor sin células en la periferia de la cápsula.

Los cocultivos de células libres de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Scenedesmus obliquus* (SCO1) obtuvieron las mayores tasas de crecimiento acumulada y el mayor porcentaje de remoción de nitrógeno (37%).

Los cocultivos de células inmovilizadas de *Synechococcus elongatus* (SYX1)-*Chlorella vulgaris* (CLV1) tuvieron una mayor tasa de crecimiento acumulada y el mayor porcentaje de remoción de fosfatos (36%).

Es posible mantener cocultivos de las cepas *Synechococcus elongatus* y *Scenedesmus obliquus*, así como de las cepas *Synechococcus elongatus* y *Chlorella vulgaris* en forma libre y coinmovilizada en quitosano.

El porcentaje de remoción de nitrógeno y de ortofosfatos fue menor al 50% en los cocultivos de células libres e inmovilizadas y se obtuvieron valores similares a los valores de remoción en cultivos monoespecíficos.

En los cultivos de células libres se encontró una relación directa entre el biovolumen de las cepas *Synechococcus elongatus* (SYX1) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) y la capacidad de remoción de nitrógeno.

Capítulo VII

VII. RECOMENDACIONES

Realizar ensayos de cocultivos con las cepas utilizadas en este estudio y mantenidas a diferentes temperaturas y con diferentes inóculos.

Evaluar otras especies que pudiera coexistir con la cianobacteria *Spirulina maxima* (SPM1) en un medio alcalino.

Realizar ensayos de crecimiento entre *Synechococcus elongatus* (SYX1) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) y una especie de bacteria que pudiera promover el crecimiento de las microalgas y una mayor tasa de remoción de nutrientes.

Evaluar el crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes utilizando células coinmovilizadas con otras matrices poliméricas.

Realizar ensayos de remoción de nutrientes con células coinmovilizadas utilizando distintos aportes de nitrógeno.

Utilizar las células coinmovilizadas de *Synechococcus elongatus* (SYX1) y *Scenedesmus obliquus* (SCO1) en un ensayo de remoción de nutrientes en un efluente acuícola.

Capítulo VIII

VIII. LITERATURA CITADA

- Abram, A.P., W. Argüelles, E. Agullo, F. Goycoolea, A. Heras, R. Mato, A. Mayorga, J. Nakamatsu, C. Peniche, J. San Román y C. Tapia. 2004. Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial. Primera Edición. Perú. 312 pp.
- Aguilar-May, B. 2002. Remoción de nutrientes con tres microalgas marinas en agua sintética simulando un efluente de cultivo de camarón. Posgrado en Ciencias. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 104 pp.
- Aguilar-May, B. 2006. Inmovilización de células de la cianobacteria *Synechococcus* sp. para remover nutrientes de efluentes acuícolas. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California México. 117 pp.
- Aguilar-May, B., M.P. Sánchez-Saavedra, J. Lizardi y D. Voltolina. 2007. Growth of marine *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH. *Journal of Applied Phycology*.19:181-183.
- Aguilar-May, B. y M.P. Sánchez-Saavedra. 2008. Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus* *Journal of Applied Phycology*. DOI: 10.1007/s10811-008-9376-7.
- Álvarez-Arellano, H. 2003. Cultivo de microalgas, manual de uso para acuicultura tropical. Centro de CDP Difusión y Publicaciones de la Escuela Superior Politecnica del Litoral. Primera Edición. Ecuador. 48 pp.
- Álvarez Cobelas, M. y T. Gallardo. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las algas. *Bot. Complutensis*15:9'60.
- Asano, L., H. Ako y C.S. Tamaru. 2000. Water conservation by bioremediation in Aquaculture. *Aquaculture Research*. 34:937-941.

- Borowitzka, M.A. y J. Lesley. 1988. *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press. Primera Edición. Great Britain. 477 pp.
- Cañizares, R.O., A.R. Domínguez, L. Rivas, C. Montes, L. Travieso y F. Benítez. 1993. Free and immobilized cultures of *Spirulina maxima* for swine-wastewater treatment. *Biotechnology Letters*. 15(3):321-326.
- Cañizares, R.O., L. Rivas, C. Montes, A.R. Domínguez, L. Travieso y F. Benitez. 1994. Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan-immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technology*. 47:89-91.
- Chacón, C., C. Andrade, C. Cárdenas, I. Araujo y E. Morales. 2004. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*. 38(2):94-108.
- Chang, Y.C. 2001. Immobilized microalga *Scenedesmus quadricauda* (Chlorophyta, Chlorococcales) for long-term storage and for application for water quality control in fish culture. *Aquaculture*. 195:71-80.
- Chevalier, P. y J. de la Nöue. 1985. Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. *Biotechnology Letters*. 7(6):195-400.
- Chevalier, P. y J. de la Nöue. 1985. Waste nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microbiology Technology*. 7:621-624.
- Chevalier, P. y J. de la Nöue. 1988. Behavior of algae and bacteria co-immobilized in carrageenan, in a fluidized bed. *Enzyme Microbiology Technology*. 10:19- 23.
- Copalcúa-Inzúnza, C. 2003. Determinación de cepas de microalgas factibles de ser usadas como indicadoras de toxicidad de contaminantes ambientales. Reporte Final de Estadía. Tesis de Técnico Superior Universitario en Tecnología Ambiental. Universidad Tecnológica de Tijuana. Tijuana, Baja California, México. 55 pp.
- Cruz-Fraga, C.E. 2003. Uso de la cianobacteria *Arthrospira maxima* para remover macronutrientes de efluentes producidos por cultivos. Tesis de Maestría. Posgrado

en Ciencias. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 83 pp.

- Dhawan, S., A.K. Singla y V.R. Sinha. 2004. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. *APPS PharmaScitech*. 5 (4):1-7.
- de-Bashan, L.E., J.P. Hernández, T. Morey y Y. Bashan. 2004. Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. *Water Research* 38(2):466-474.
- de la Noüe, J. y P. Chevalier. 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microbiology Technology*. 7:621-624.
- de la Noüe, J. y D. Proulx. 1988. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29: 292-297.
- de la Noüe, J., P. Chevalier y D. Proulx. 1990. Effluent treatment with immobilized microalgae and cyanobacteria: a critical assessment. 143-152. En: Tyagi, R.D. y K. Vembu (Eds.). *Waster Treatment by Immobilized Cells*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 534 pp.
- Díaz de Apodaca, D.E., M.C. Villarán, F. Río, C.A. Ramírez y L. Lorenzo. 2007. Utilización de absorbentes basados en quitosano y alginato sódico para la eliminación de iones metálicos Cu^{2+} , Pb^{2+} , Cr^{3+} y Co^{2+} . *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 8(1):20-37.
- FAO (Food and Agricultura Organization). 2002. *El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura*. FAO. Roma, Italia. 174 pp.
- Fierro-Reséndiz, S. 2004. Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes en efluentes de cultivos acuícolas. Tesis de Maestría. Departamento de Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 103 pp.
- Fierro-Reséndiz, S., Sánchez-Saavedra, M.P. y C. Copalcúa 2007. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scendesmus*. *Bioresource Technology*. 99:1274-1279.

- Fogg, G.E. y B.J. Thake. 1987. *Algal Cultures and Phytoplankton Ecology*. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.
- González, L.E. y Y. Bashan. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense* *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4):1527-1531.
- Grossman, A. y H. Takahashi. 2001. Macronutrient utilization by photosynthetic eukaryotes and the fabric of interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 52:162-210.
- Guillard, R.R.I. y J.H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* 8:229-239.
- Hach. 1997. *Water Analysis Handbook*. Hach Company, Loveland. 1309 pp.
- Hammer, M.J. 1975. *Water and Waste-Water Technology*. John Wiley and Sons, INC. Primera Edición. Canadá 502 pp.
- <http://www.bio.utulsa.edu/deepestgreen/Chlamydomonadales.html>
- Jeanfils, J., M.F. Canisius y N. Burlion. 1993. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *Journal of Applied Phycology*. 5:369-374.
- Jiménez-Pérez, M.V., P. Sánchez-Castillo, O. Romera, D. Fernández-Moreno y C. Pérez-Martínez. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology*. 34:392-398.
- Jones, A.B., M.J.O. Donohue, J. Udy y W.C. Dennison. 2001. Assessing Ecological Impacts of Shrimp and Sewage Effluent: Biological Indicators with Standard Water Quality Analyses. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52:91-109.
- Kaya, M.V. y G. Picard. 1996. Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized of screens for tertiary treatment of wastewater. *Bioresource Technology* 56:147-155.

- Komárek, I. y K. Anagnostidis. 2005. Cyanoprokaryota, 2nd Part. Oscillatoriales. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag. Primera Edición. Italia 757 pp.
- Lárez-Velásquez, C. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. Revista Iberoamericana de Polímeros. 4(2):91-109.
- Lau, P.S., N.F.Y. Tam y Y.S. Wong. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. Environmental Technology. 18:945-951.
- Lebsky, V.K., L.E. González-Basham y Y. Bashan. 2001. Ultraestructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Canadian Journal of Microbiology. 47:1-8.
- Lee, K. y L. Choul-Gyun. 2002. Nitrogen removal from wastewaters by microalgae without consuming organic carbon sources. Journal of Microbiology and Biotechnology. 12(6):979-985.
- Maestrini, S. Y. y D. J. Bonin, 1981. Competition among phytoplankton based on inorganic macronutrients. 264–278. En: Platt T. (Ed.). Physiological Basis of Phytoplankton Ecology. Canadian Bulletin Fisheries of Aquatic Science Department of Fisheries and Oceans, Ottawa. 477 pp.
- Márquez, F.J., K. Sasaki, T. Kakizono, N. Nishio y S. Nagai. 1993. Growth characteristics of *Spirulina platensis* in mixotrophic and heterotrophic conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering. 76 (5):408-410.
- Mora, R., N. Ortiz, Y. Clemente, J. Bermúdez, D. Avendaño y E. Morales. 2002. Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila “a” de microalgas cultivadas y aisladas en la región noroccidental de Venezuela. Océánides. 17 (2):73-83.
- Moreno-Garrido, I., O. Campana, L.M. Lubián y J. Blasco. 2005. Calcium alginate immobilized marine microalgae: Experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. Marine Pollution Bulletin. 51:823-829.

- Mulderij, G., W.M. Mooij y E. Van Donk. 2005. Allelopathic growth inhibition and colony formation of green alga *Scenedesmus obliquus* by the aquatic macrophyta *Stratiotes aloides*. *Aquatic Ecology*. 39:11-21.
- Myers, J. 1951. Physiology of the algae. *Annual Reviews Microbiology*. 5:157-180.
- Nieves, M., D. Voltolina y A. Barrera. 1998. A new parameter for comparison of microalgae growth. *Revista Italiana di Acquacoltura*. 33:177-184.
- Oh-Hama, T. y S. Miyachi. 1988. Chlorella. 3-26. En: En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (Eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Olguin, J.E. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*. 22:81-91.
- Omar, S.H. 1993. Oxygen diffusion through gels employed for immobilization. 2. in the presence of microorganisms. Mini-review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 40:173-181.
- Oswald, W.J. 1988. Micro-algae and waste-water treatment. 305-328. En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (Eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Owens, O.H. y W.E. Esaias. 1976. Physiological responses of phytoplankton to major environmental factors. *Annual Review Plant Physiology* 27:461-483.
- Pedraza, G.X. 1989. Cultivo de *Spirulina maxima* para suplementación proteica. *Livestock Research for Rural Development*. 1(1):<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd1/1/gloria.htm>
- Pouliot, Y., P. Talbot y J. de la Noüe. 1986. Biotraitement du purin de porc par production de biomasse de *Spirulina*. *Entropie* 130/131:73-77.
- Riquelme, C.E., R.E. Avendaño-Herrera. 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. *Revista Chilena de Historia Natural* 76:725-736.

- Richmond, A. 1988. Spirulina. 85-121. En: En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (Eds.). Micro-algal Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge. 477 pp.
- Robinson, P.K., A.L. Mak y M.D. Trevan. 1986. Immobilized algae: A review. Process Biochemistry. 21:122-127.
- Rodríguez-Sánchez, D. y C. Rha. 1981. Chitosan globules. Journal Food Technology. 16: 469-479.
- Romo, S. y C. Pérez-Martínez. 1997. The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory. Journal of Phycology. 33:1073-1076.
- Rosales, N. J. Ortega, R. Mora y E. Morales. 2005. Influencia de la salinidad sobre el crecimiento y composición bioquímica de la cianobacteria *Synechococcus* sp. Ciencias Marinas. 31(2):349-355.
- Rosales, N, L. Jonte y E. Morales. 2006. Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp. modulados por nitrato de sodio. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 40(2):120-132.
- Ruíz-Marín, A. 2008. Remoción de nutrientes de aguas residuales urbanas por *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* en cultivos libres e inmovilizados. Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias en Oceanografía Costera. Instituto de Investigaciones Oceanológicas. Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, Baja California Mexico. 128 pp.
- Salazar, G.M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Contactos 59:64-70.
- Sánchez-Luna, L.D., A. Converti, G.C. Tonini, S. Sato y J.C.M. de Carvalho. 2004. Continuous and pulse feedings of urea as a nitrogen source in fed-batch cultivation of *Spirulina platensis*. Aquacultural Engineering. 31:237-245.
- Shirai, K., I. Guerrero, G.M. Hall. 1996. Quitina: Ocurrencia, propiedades y aplicaciones. Ciencia 47(4):317-328.

- Soeder, C.J. y E. Hegewald. 1988. *Scenedesmus*. 59-84. En: M.A. Borowitzka y L.J. Borowitzka (eds). *Micro-Algal Biotechnology*. Cambridge University Press, London. 477 pp.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1979. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. H Blume Ediciones, España. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. 321-343. En: J.R. Stein (ed.). *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. New York. 448 pp.
- Sorokin, C. y R.W. Krauss. 1958. The effect of light intensity on the growth rates of green algae. *Plant Physiology* 33:109-1115.
- South, G.R. y A. Whittick. 1987. *Introduction to Phycology*. Blackwell Scientific Publications. Great Britain. 341 pp.
- StatSoft, Inc. 2002. *Statistica for Windows [Computer program manual]*. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK 74104, phone: (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, email: info@statsoft.com.
- Stein, J.R. 1973. *Handbook of Phycological Methods. Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press. New York. 448 pp.
- Sun, J. y L. Dongyan. 2003. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 25(11):1331-1346.
- Tam, N.F. y Y.S. Wong. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*. 107:145-151.
- Tiffany, L.H. y M.E. Britton. 1971. *The algae of Illinois*. Hafner Publishing Company. New York. 407 pp.
- Tilman, D. 1977. Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach. *Ecology* 58: 338-348.
- Trujillo, V.M.L. 1993. *La Colección de Microalgas del CICESE. Informe Técnico. Comunicaciones Académicas, Serie Acuicultura, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE). Ensenada, Baja California, México. 103 pp.*
- Wang, R., H. Xiao, P. Zhang, L. Qu, H. Cai y X. Tang. 2007. Allelopathic effects of *Ulva pertusa*, *Corralina pilulifera* y *Sargassum thunbergii* on the growth of the dinoflagellates *Heterosigma akashiwo* y *Alexandrium tamarense*. *Journal of Applied Phycology*. 19:109-121.

Yang, P.Y. y M.L. Wang. 1990. Entrapment of microbial cells for wastewater treatment. En: R.D. Tyagi y K. Vembu (Eds.). Wastewater Treatment by Immobilized Cells. CRC Press, Boca Raton, 45-77.

Zar, J. H. 1984. Biostatistical Analysis. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.