

173
241



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

UTILIZACION DE CELULAS DE *Spirulina maxima*
INMOVILIZADAS PARA EL TRATAMIENTO DE
RESIDUALES PORCINOS

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

LILIA RIVAS SEPULVEDA

MEXICO, D. F.

1991

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pags
-I. RESUMEN.....	1
-II. INTRODUCCION.....	4
-III. OBJETIVO.....	7
-IV. ANTECEDENTES.	8
IV.1 Características de la especie.....	9
IV.2 Métodos de Inmovilización.....	12
-V. MATERIALES Y METODOS.....	18
V.1 Microorganismo.....	18
V.2 Medios de Cultivo.....	18
V.3 Soportes.....	20
V.4 Reactivos Químicos.....	20
V.5 Preparación del inóculo.....	20
V.6 Inmovilización de células de <i>Spirulina maxima</i> en los diferentes soportes.	21
V.6.1 Acido Poligalacturónico.....	21
V.6.2 Alginato de Sodio.....	21
V.6.3 Agar.....	21

V.6.4 Kappa-carragenina.....	24
V.7 Mantenimiento de cultivos inmovilizados.....	24
V.8 Remoción de nutrientes.....	26
V.9 Efecto de la concentración celular y de cloruro de calcio sobre la remoción de nutrientes.....	26
V.10 Determinación del tiempo de vida media.....	27
V.11 Determinaciones cuantitativas.....	27
V.12 Factor de corrección.....	28
-VI. RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
VI.1 Inmovilización en Agar y Kappa-carragenina.....	31
VI.2 Efecto de la Concentración celular sobre la inmovilización de <i>S. maxima</i>	31
VI.3 Efecto de la concentración de cloruro de calcio sobre las células de <i>S. maxima</i>	35
VI.4 Efecto de la alcalinidad y concentración del residual porcino en los sistemas inmovilizados.....	39
VI.5 Factor de corrección.....	42
VI.6 Tiempo de vida media y remoción de nutrientes de los sistemas inmovilizados.....	44
-VII. CONCLUSIONES.....	64
-VIII. RECOMENDACIONES.....	66
-IX. BIBLIOGRAFIA.....	62
-X. APENDICES.....	79

I. RESUMEN

Se establecieron las condiciones adecuadas para inmovilizar filamentos de *Spirulina maxima* en ac. poligalacturónico (APG), alginato de sodio, agar y kappa-carragenina, utilizando configuraciones de esferas y discos, para llevar a cabo un tratamiento terciario de residual porcino natural digerido aeróbicamente en concentraciones de 25 y 50 ‰ (v/v).

Se utilizó un inóculo de 2g/l (base húmeda) y una concentración de cloruro de calcio de 0.1 M como solución precipitante, para APG y alginato de sodio; con respecto a la kappa-carragenina se utilizó el mismo inóculo y una solución de cloruro de potasio 0.3 M.

El tratamiento terciario que realizaron estos sistemas inmovilizados (soporte-células) se evaluó mediante la remoción de N-amoniacoal y P-total. Los resultados indicaron que cuando se utilizó agar, se alcanzaron las remociones de 93.7 ‰ para N-amoniacoal y de 99.66‰ para P-total, en residual porcino al 25‰ y para residual al 50‰ fueron de 93‰ N-amoniacoal y de 97‰ para P-total. Sin embargo el agar presentó la desventaja de fraccionarse a medida de su reutilización, reflejándose en su vida media que fue de 66 días para residual al 50 ‰ y de 87 días para residual al 25 ‰. Con la kappa-carragenina se logró una remoción de 93.0‰ para P-total y de 93.4‰ para N-amoniacoal, en residual al 25‰ y con una vida media mayor de 78 días. Para el residual

al 50% y este mismo soporte, la remoción fue de 93.7 % para P-total y 93 % para N-amoniaco, siendo su vida media mayor de 87 días.

En cuanto al APG y alginato de sodio, ambos soportes presentaron la desventaja de disolverse en presencia de iones de fósforo, y sólo toleraron diluciones de residual de 25% en el caso del APG y de 0.125% en el de alginato, con remociones de 85.72 y 90 % para P-total y de 73.4 y 90 % para N-amoniaco, respectivamente; con un tiempo de vida media de 24 días para el APG y de 2.3 días para alginato de sodio.

La kappa-carragenina resultó ser el soporte en el cual el sistema inmovilizado presentó las mayores eficiencias de remoción de nutrientes y tiempo de vida media.

Tabla 1 ANTECEDENTES DE MICROALGAS INMOVILIZADAS

ESPECIE	TECNICA DE INMOVILIZACION	RAZON DE ESTUDIO
Anabaena azollae	bloques de poliuretano	producción de hidrógeno
A. cylindrica	alginato	producción de amonio
A. cylindrica	bloques de poliuretano y esferas de vidrio	producción de hidrógeno
Anacystis nidulans	agar	co-inmovilización
A. nidulans	agarosa	biotransforación
Chlorella emersonii	alginato	glicolato
C. Vulgaris	agarosa y agar	co-inmovilización
Dunaliella parva y D. tertiolecta	alginato	producción de glicerol
Nostoc muscorum	agar	producción de hidrógeno
Oscillatoria limnetica	bloques de poliuretano	producción de hidrógeno
Phormidium	alginato	electricidad
P. laminosum	alginato, agar	producción de hidrógeno
Scenedesmus acutus y S. obliquus	carragenina	remoción de P y N
Scenedesmus obliquus	poliuretano	producción de hidrógeno
Scenedesmus quadricauda	carragenina	remoción de N y P

Adaptado de Robinson, Mak and Trevan (1986) 9.

II. INTRODUCCION

Las aguas residuales que como producto de las actividades humanas, agrícolas y pecuarias se han hecho cada vez más abundantes, originan cambios en el medio ambiente, en particular en la calidad del agua, ya que todos estos desechos llegan a los cursos de los ríos, o bien son dejados a cielo abierto, agravando el problema de la contaminación.

En México, una de las actividades agropecuarias más importantes es la porcicultura. La población nacional aproximada de ganado porcino es de 18 millones de cabezas, produciendo un total de 1840 kg de materia fecal seca por año Iñiguez (1989)1, lo que representa un problema de contaminación, debido a la presencia de un alto contenido de materia orgánica, constituyendo un medio ideal para la proliferación de microorganismos patógenos .

Durante los últimos años se han aplicado algunas alternativas para el tratamiento y aprovechamiento de estos residuos.2. Una de ellas, además de la depuración natural, es el uso de cultivos de microalgas, que pueden utilizarse con un doble propósito; por un lado, la obtención de biomasa para consumo animal y por otro, la de proveer de un tratamiento terciario para efluentes municipales ó agrícolas, ya que las microalgas remueven de manera eficiente nutrientes como nitrógeno (amonio o formas inorgánicas oxidadas de amonio) y fósforo (ortofosfatos y fósforo total), causantes de la

eutroficación cuando se vierten en cuerpos de agua naturales 3,4,5.

Sin embargo, existen algunos problemas al desarrollar estos cultivos, como son : 1) la construcción de lagunas de gran extensión, 2) costo, 3) necesidad de condiciones climáticas adecuadas y 4) recuperación de la biomasa. Con relación a este último problema se han propuesto algunas soluciones como el uso de cultivos hiperconcentrados en periodos de tiempo muy cortos, obtención de productos de alto valor agregado utilizando tecnologías de invernadero, etc.6,7

El problema de la recuperación de la biomasa se agudiza cuando se trata de algas unicelulares como *Chlorella* y *Scenedesmus*, de aquí que en los últimos años, las investigaciones se han orientado a la utilización de géneros de algas de tamaños celulares grandes o filamentosas como *Spirulina maxima*, la cual debido a las características de su biomasa, ha sido utilizada con fines de alimentación después de su cultivo en aguas residuales, o bien se prefiere utilizar algas que posean características de autofloculación como *Phormidium* 8,9,15..

Una alternativa de solución para este problema es la aplicación de la técnica de inmovilización, la cual se define como " el confinamiento físico de un microorganismo en una región definida, con retención de su actividad catalítica, si es posible conservando su viabilidad, pudiendo utilizarse repetida y continuamente "6, 9. Los sistemas inmovilizados presentan las siguientes ventajas: 1) la preparación de la matriz disminuye la eliminación o fuga de las células; 2) proveen de protección a

las células contra impactos externos; 3) mantienen estable y activa la biocatálisis por largos periodos de tiempo; 4) son menos susceptibles a problemas de contaminación, por lo que se puede trabajar en condiciones no estériles y 5) los microorganismos inmovilizados son reutilizables y pueden emplearse en procesos continuos, permitiendo un control cuidadoso de los parámetros de la reacción 6,10,11,12.

En los últimos años se han explorado estos sistemas, principalmente con objeto de aplicarlos en las siguientes líneas de investigación : 1) biocatálisis, realizando biotransformaciones y biosíntesis *de novo* 13,14; 2) producción de energía (Hidrógeno y electricidad) 15,16,17; 3) sistemas de co-inmovilización con la producción de oxígeno o reducción de NADP por componentes heterótrofos 15,17,18 ; 4) prolongación de la longevidad de los cultivos y 5) acumulación de materiales residuales (tratamiento terciario de aguas residuales) 19,20,21,22,70.

Actualmente son pocos los trabajos que se han hecho sobre inmovilización de microalgas, Tabla I, por lo que es necesario implementar el estudio de soportes adecuados con diferentes propósitos.

III. OBJETIVO

Establecer la metodología para la inmovilización de células de *Spirulina maxima*, utilizando diferentes soportes, con el objeto de utilizarlas en el tratamiento terciario de residual porcino natural, así como contribuir al conocimiento de estas nuevas tecnologías.

IV. ANTECEDENTES

La utilización de microalgas en el tratamiento biológico de aguas residuales, fue propuesto hace 35 años por Cadwell (1946) 3, Oswald & Gotaas (1957) 4, quienes demostraron que organismos como cianobacterias y clorofíceas son capaces de asimilar los nutrientes presentes en los residuales, realizando un tratamiento terciario.

Recientemente en países como Canadá, Francia, Hawaii, Estados Unidos y México se ha estudiado el potencial del cultivo de algas y cianobacterias para el tratamiento terciario de aguas residuales. En Canadá y Francia Lavoie & de la Noüe (1989) 73 emplearon un cultivo de *Scenedesmus obliquus* para llevar a cabo un tratamiento terciario en efluentes urbanos; Kosaric, H.T Nguyen, Bergonou 22, utilizaron *Spirulina maxima* en una planta de tratamiento de aguas urbanas de Londres, alcanzando remociones de 87 % para nitrógeno y de 60 % para fósforo en un lapso de cuatro días.

En Israel, Oron, Shelef & Levi (1979) 23, utilizaron a *Spirulina maxima* para el tratamiento terciario de residual vacuno, y obtuvieron una producción de biomasa de 3g/l. En Hawaii Chiu et al (1980) 24 cultivaron *Spirulina platensis* para llevar a cabo la fermentación de residual porcino. En Estados Unidos, Martin & Picard (1985) 25 cultivaron *Scenedesmus* sp. en residual porcino aerobio, obteniendo remociones del 98 % para nitrógeno amoniacal y de 95 % para ortofosfatos, en 10 días. En

Francia, Pouliot *et al* (1989) 26 cultivaron *Phormidium* sp en efluentes domésticos, alcanzando remociones de 95 % para nitrógeno amoniacal y de 62 % para ortofosfatos.

Se ha observado que el desarrollo de microalgas en efluentes tratados, reduce la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) 7,27,28,29 ya que debido a sus capacidades fotosintéticas y estos organismos convierten la energía solar en biomasa rica en proteínas 6,7 misma que puede ser utilizada como suplemento en dietas de animales, en acuicultura para alimentar peces, moluscos y crustáceos, como fuente de energía, combustible, fertilizantes y productos químicos de alto valor agregado 9,15,30,31.

Como ya se mencionó, uno de los problemas de la utilización de cultivos de microalgas en suspensión es la recuperación y uso de la biomasa, lo que hace pensar en la necesidad de contar con un método que además de solucionar lo anterior, permita un mayor control del cultivo y un posible incremento en la remoción de nutrientes durante el tratamiento terciario de residuales.

IV.1 CARACTERISTICAS DE LA ESPECIE

Spirulina maxima es una cianobacteria filamentosa pluricelular, que crece en lugares salobres poco profundos y cálidos como el Lago Chad en Africa 32 y el lago de Texcoco 33 en México. Consiste de filamentos azul-verdes, compuestos por células cilíndricas, con un diámetro de 1 a 3 micras, dispuestas en un tricoma helicoidal, cuyo diámetro de hélice es de 50 a 60 micras y

un giro de 80 micras \approx . Los filamentos son móviles a lo largo de su eje. No presentan heterocistos. La forma helicoidal de los tricomas es característica de este género y sólo se mantiene en medio líquido, en tanto que en medio sólido llega a formar grandes espirales planas.

Su ciclo de vida se inicia con el rompimiento continuo de sus tricomas formando varias piezas, este rompimiento se lleva a cabo por la formación de células especializadas llamadas necridias las cuales adelgazan la pared del tricoma, a este fenómeno se le conoce como lisis. La fragmentación de los tricomas en las necridias produce un deslizamiento y la formación de una serie de 2 a 4 células, llamada hormogonia, la cual formará un nuevo tricoma. Durante este proceso el citoplasma parece menos granulado, de un color azul-verde pálido, al incrementarse el número de células de la hormogonia por fisión celular, el citoplasma parece menos granulado y las células toman un color azul-verde brillante; los tricomas incrementan su longitud y asumen la típica forma helicoidal, repitiéndose el ciclo, como puede verse en la Figura 1 20.

En cuanto a su requerimiento de luz, *S. maxima* es fotoautotrófica y no crece en la obscuridad en medios que contengan carbono orgánico como sustrato, debido a ésto la intensidad y duración de la luz, es un factor limitante ya que a mayor densidad celular se produce una capa donde solo captan la luz las algas de la superficie, deteriorándose las del fondo 19.

En cuanto a su nutrición, una fuente de nitrógeno para *Spirulina maxima*, son los nitratos y sales de amonio en

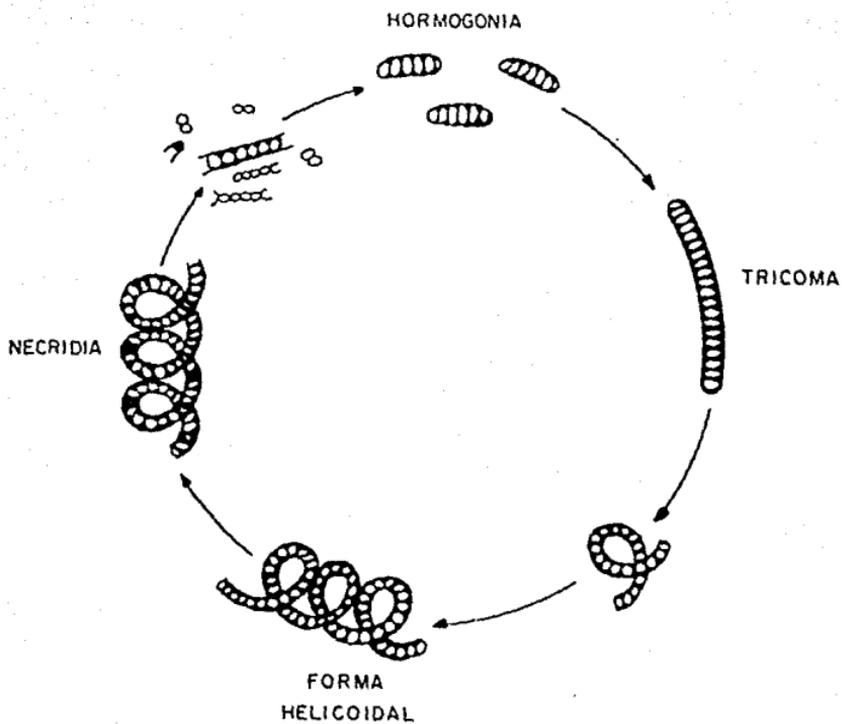


Figura 1. Ciclo de vida de *Spirulina maxima* Richmond (1980)20.

concentraciones menores de 100 mg/l, así también los iones sodio y potasio son indispensables para su crecimiento en una relación de 5:1 ²¹, ²². Otro elemento esencial es el fósforo orgánico que se usa como fuente primaria, siempre y cuando sea hidrolizado por enzimas extracelulares como las fosfatasa, que realizan una reacción energética dependiente de la luz, donde la velocidad de consumo depende de la presencia de iones sodio, potasio y magnesio ^{20,21}.

Uno de los factores limitantes para el crecimiento de *Y. maxima* es la alcalinidad, reflejada en un pH óptimo entre 8.3 y 11.0, aunque es capaz de tolerar cambios progresivos.

IV.2 METODOS DE INMOVILIZACION

Los estudios de inmovilización comenzaron en 1916, con Nelson & Griffin ¹⁹ aplicándose a enzimas. Posteriormente en 1918, se realizó la primera inmovilización con células completas del líquen *Umbilicaria pustulata*, atrapadas en gel de poliacrilamida ³¹.

A partir de la década de los 60's se incrementó el interés por los sistemas inmovilizados aplicados a enzimas, debido a los problemas que involucra la extracción de enzimas, particularmente en el caso de que sean intracelulares, por ésto se planteó la alternativa de inmovilizar microorganismos completos.

El primer ejemplo de inmovilización artificial de microorganismos fue descrito por Mosbach & Mosbach (1966) ¹¹. En forma similar se ha llevado a cabo la inmovilización de microalgas

utilizándose en el tratamiento de purificación de aguas por Robinson & Trevan en 1986 4 .

Sin embargo también existen limitaciones para aplicar la técnica de inmovilización, como son : tamaño celular, los nutrientes deben ser de bajo peso molecular para minimizar las limitaciones de difusión y la presencia de otras actividades que disminuyan la asimilación de nutrientes 34.

Los principales métodos de inmovilización son : entrecruzamiento, enlace covalente, adsorción y atrapamiento por fibras o microencapsulados, los cuales han sido estudiados por varios autores (TablaII).13,11. Entre ellos los más utilizados para inmovilizar microalgas son : el atrapamiento y la adsorción.

El método de adsorción se basa en la habilidad del alga, particularmente de sus estructuras filamentosas de invadir y colonizar, formando una matriz. Entre los soportes más utilizados para estos fines están el poliuretano, la espuma de polivinilo y la fibra de vidrio.6

Los mecanismos de atrapamiento se clasifican en cuatro grupos principales y sus mecanismos de formación se encuentran en la Tabla III.36.

Estos sistemas permiten : la retención de viabilidad, la capacidad de realizar la fotosíntesis, alta densidad celular, productividad continua, mínima eliminación de células del soporte y mayor estabilidad del proceso 34.

Uno de los factores más importantes es el estudio de los

Tabla II METODOS DE INMOVILIZACION

METODOS DE INMOVILIZACION	SOPORTES Y AGENTES ACOPLANTES	MECANISMOS
ENTRECRUZAMIENTO	Glutaraldehído, Disocianato de tolueno.	Interacciones químicas entre el acarreador y la membrana del organismo.
ENLACE COVALENTE	Glutaraldehído, Carbodimida, Isocianato.	Formación de uniones covalentes.
ADSORCION	Madera, Cerámica Vidrio poroso, celulosa, carbón.	Interacciones electrostáticas entre el acarreador y la superficie celular.
ATRAPAMIENTO	Agar, Alginato, Pectina, Carragenina, Poliuretano, Acrilamida.	Atrapamiento físico en una matriz.

Adaptado de Kolot, B. F. 1981 43.

Tabla III TECNICAS DE INMOVILIZACION POR ATRAPAMIENTO

TECNICA	MECANISMO	POLIMERO
Ionotrópica	Formación del gel mediante entrecruzamiento iónico.	Alginato, carragenina, quitosana, Ac.poligalacturónico
Térmico	Formación del gel por calentamiento y enfriamiento posterior.	Agar, agarosa
Polimerización	Formación del gel por medio de una reacción química.	Gelatina, polifenilenoóxido, alginato+gelatina,
Adsorción	Atrapamiento físico, dentro de una matriz porosa.	Poliuretano, nylon, fibra hueca, resina epóxica

Adaptado de Rehm, H. J. 1987.36

soportes, los cuales deben reunir ciertas propiedades como son :

- 1) ausencia de toxicidad para las células;
- 2) máxima fototransparencia;
- 3) estabilidad en el medio de crecimiento;
- 4) resistencia mecánica y
- 5) retención de la biomasa.

Dependiendo de estos factores se pueden adoptar diferentes configuraciones: cubos, esferas, películas y discos, 30,35.

Entre los soportes más utilizados en la técnica de atrapamiento para microalgas están: el alginato de sodio, que es un polisacárido presente en la pared de algas marinas como *Mycrocystis pyrifera* L., *Laminaria hyperborea*, L. y *Ascophyllum medusum* L., 37, que forma geles con soluciones ácidas, ó en presencia de calcio y otros cationes, formando una malla a través de los iones calcio o hidrógeno donde quedan atrapados los microorganismos 37,40,47.

La quitosana, que es un polímero muy estable y con una gran permeabilidad para la célula. Es un derivado de la quitina y es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza. 29,42

La kappa-carragenina que es un polisacárido extraído de algas y que consiste de unidades de 8- α galactosa-2 sulfato y 3,6 anhidro D-galactosa. Este gel se forma por una diferencia de temperatura y por la presencia de iones K^+ , NH_4^+ , y Ca^{+2} , es muy estable y soporta un amplio rango de pH 11,43.

El ácido poligalacturónico, que es un derivado de la pectina, su gelificación es similar a la del alginato de sodio. En el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN se ha utilizado este soporte con éxito en la inmovilización

de bacterias, para la transformación de esteroides, 44.
inmovilización de levaduras para la obtención de etanol
e inmovilización de células de *Capsicum chinense* para la
obtención de capsaicinoides.37,38,39.

V. MATERIALES Y METODOS

V.1 MICROORGANISMO

Se empleó una cepa de *Spirulina maxima* proporcionada por la Cía Sosa Texcoco, S.A., la cual se conservó en tubos inclinados de agar-Zarrouvk, haciendo resiembras cada 20 días e incubando a 30°C con iluminación constante de 2000 luxes durante 96 horas.

V.2 MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron :

- L-C** Medio de tierra, Bourrelly α con un pH ajustado a 8.0 \pm 0.1. Apéndice A
- Zarrouvk** Medio sintético, con un pH 8.5. Apéndice B α .
- Residual porcino** Efluente obtenido de un tratamiento secundario el cual es estabilizado por aereación continua. Figura 2 α .

Los medios de cultivo L-C y Zarrouvk fueron esterilizados en autoclave a 15 lb/pulg² durante 15 minutos.

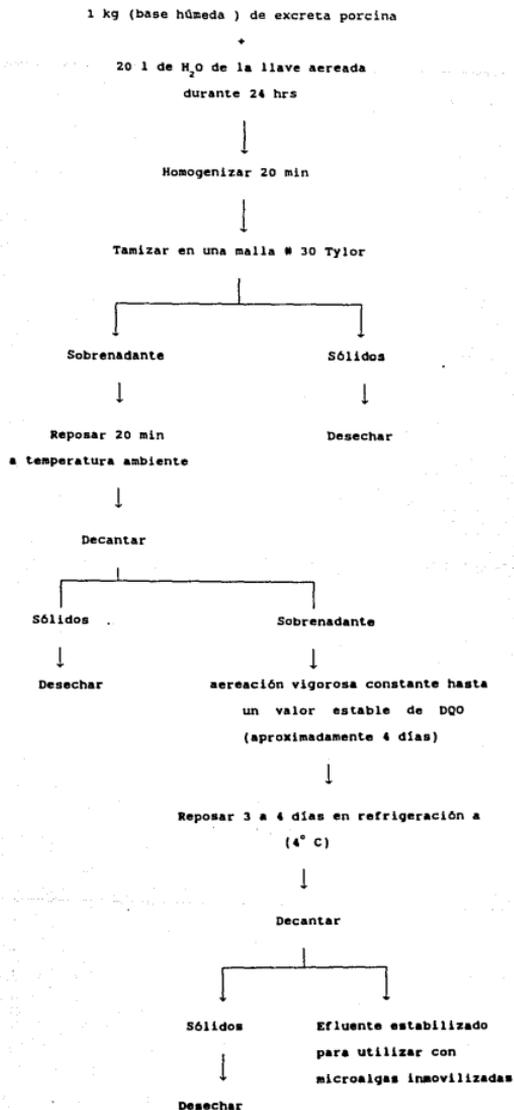


Figura 2. Preparación del residual porcino

Nota: La excreta porcina se obtuvo de un cerdo control alimentado con una dieta a base de alimento balanceado comercial en el bioterio del CINVESTAV.

V.3 SOPORTES

Alginato de sodio de alta viscosidad, obtenido de *Macrocystis pyrifera*; ácido poligalacturónico grado III, obtenido de naranja; Kappa-carragenina grado III, obtenida de *S. costani*. Estos soportes fueron adquiridos de Sigma Chemical Co.; agar bacteriológico Difco.

V.4 REACTIVOS QUIMICOS

Ac. 1-amino, -2-naftol, -4-sulfónico (Fulka AG. Buchs S.C.); reactivo de Nessler (Sigma de México). Todos los reactivos fueron grado analítico.

V.5 PREPARACION DEL INOCULO

Se empleó un cultivo de *Spirulina maxima* en fase logarítmica de 72 horas, desarrollado en medio de cultivo L-C. El cultivo se colectó por filtración al vacío, utilizando una membrana Millipore, con un diámetro de poro de 0.45 micras y se lavó dos veces con una solución de KCl al 5 % ($\frac{P}{V}$), el paquete celular que se obtuvo se utilizó para la inmovilización por atrapamiento.

V.6 INNOVILIZACION DE CELULAS DE *Spirulina maxima* EN LOS DIFERENTES SOPORTES.

V.6.1 ACIDO POLIGALACTURONICO

Las células de *S. maxima* se atraparon en ac. poligalacturónico al 4% (p/v), formando esferas que contenían a las células cuya polimerización se llevó a cabo al ponerse en contacto con una solución de CaCl_2 , en forma similar a la técnica descrita por Montes (1989) 40. El soporte se preparó dejando hidratar el ácido poligalacturónico en agua destilada, con agitación constante, y ajustando el pH con una solución de hidróxido de amonio concentrado, hasta lograr su estabilización a un pH de 8.0. Se tomaron 2g/l base húmeda del paquete celular de *Spirulina maxima* y se llevó a cabo su homogenización con el gel mediante agitación magnética constante.

Las esferas se prepararon con ayuda de una pipeta acoplada a una bomba peristáltica, Cole Parmer Mod. 701400, con una manguera de tygon de un 1 mm de diámetro interno, dejando gotear la mezcla de gel-células sobre una solución de cloruro de calcio 0.1M pH 8.0, con agitación constante y a temperatura ambiente, tal y como se observa en la Figura 3. Las esferas se

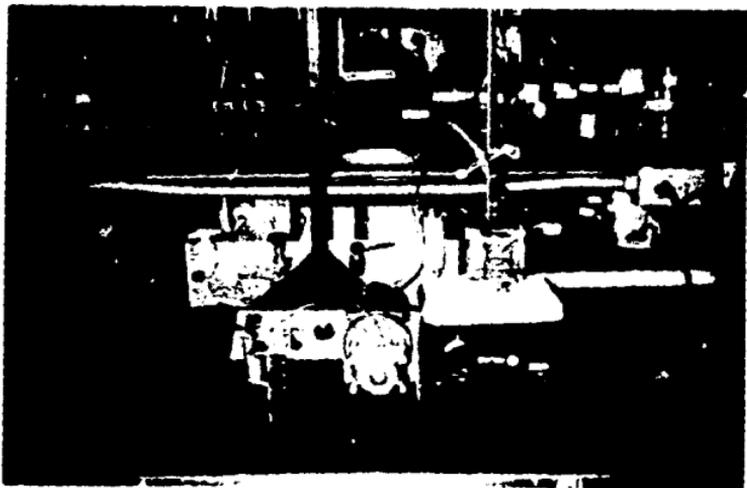


Figura 3. Dispositivo empleado para la inmovilización de *Spirulina* maxima.

formaron inmediatamente al ponerse en contacto con la solución de cloruro de calcio, en donde se conservaron 2 h, a temperatura ambiente con objeto de darles mayor resistencia mecánica. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en medio L-C manteniéndose en refrigeración para su reactivación.

V.6.2 ALGINATO DE SODIO

Las células de *S. maxima* se atraparon en alginato de sodio al 2% (p/v), formando esferas, en forma similar a la técnica descrita por Ohlson (1979) 39, empleándose 2 gramos de células por litro (base húmeda) de *S. maxima* y dejándose gotear sobre una solución de CaCl_2 . Las esferas se dejaron reposar en esta solución por dos horas y posteriormente se pasaron a medio L-C para su reactivación.

V.6.3 AGAR

Se utilizó agar al 4% (p/v) disuelto en agua destilada y esterilizado a 15 lb/pul² durante 15 minutos. Una vez a 45°C, se mezcló con el paquete celular de *Spirulina maxima* (2 g/l peso húmedo), se homogenizó con agitación y se vació en cajas de Petri dejándose solidificar. Posteriormente se formaron discos de 3-5mm de diámetro con un espesor de 5mm, con ayuda de un

cilindro de acero inoxidable . Los discos de agar se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en medio L-C, manteniéndose en refrigeración para su posterior utilización..En la Figura 4 se observa inmovilización de *Y. maxima* en discos de agar.

V.6.4 KAPPA-CARRAGENINA

Se inmovilizaron células de *Y. maxima* en kappa-carragenina, de manera similar a la descrita por De la Noüe (1985) « y que consistió en preparar el gel al 1.5% (p/v) disolviéndose la kappa-carragenina en agua destilada caliente, adicionándole 0.25% (p/v) de goma karaya (grado alimenticio).El gel se mezcló con las células de *Y. maxima* (2g/l base húmeda) a 35° C y se pasó a través de una pipeta con la ayuda de una bomba peristáltica, Cole Parmer Mod.701400 utilizando una manguera de tygon de un 1mm de diámetro interno y se dejó gotear sobre una solución precipitante de KCl 0.3 M a temperatura ambiente. Las esferas que se formaron al ponerse en contacto con la solución precipitante, se dejaron reposar por 24 h para incrementar su estabilidad. Se lavaron con agua destilada y se resuspendieron en medio L-C para su posterior utilización.

V.7 MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS INMOVILIZADOS

Tanto los sistemas de células libres como inmovilizadas, se



Figura 4 Fotomicrografía de microscopio óptico (10X) de *Spirulina maxima* inmovilizada en discos de agar.

incubaron bajo las siguientes condiciones: iluminación continua de 2000 luxes; temperatura de $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, y aereación constante de aproximadamente 2.5 vvm. Los cultivos en suspensión se mantuvieron en matraces Fernbach de 2800 ml, conteniendo 1000 ml de medio L-C, Zarrouvk ó residual porcino, según el caso. Los cultivos de células inmovilizadas se mantuvieron en reactores de vidrio pyrex tipo columna de 250 ml con 100 ml de residual porcino con aereación y luz constantes.

V.8 REMOCION DE NUTRIENTES

Las microalgas inmovilizadas en los diferentes soportes, se colocaron en los reactores tipo columna de 250 ml conteniendo 100 ml de diferentes concentraciones de residual porcino estabilizado aeróbicamente al 25 y 50 % (v/v) en las condiciones ya descritas. Se tomaron muestras del efluente de la columna cada 24 horas, al cabo de las cuales se cuantificaron los nutrientes fósforo total y nitrógeno amoniacal.

V.9 EFECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR Y DE CLORURO DE CALCIO SOBRE LA REMOCION DE NUTRIENTES.

Para determinar el efecto de la concentración celular inmovilizada, sobre la remoción de nutrientes, se hicieron esferas conteniendo 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 g / l en base húmeda, de células de *S. maxima*, cuantificándose P-total y

N-amoniacal.

Para medir el efecto de la concentración de cloruro de calcio, como solución precipitante para alginato de sodio y ac. poligalacturónico, sobre la remoción de nutrientes por células de *S. maxima*, se utilizaron diferentes concentraciones de cloruro de calcio (0.1, 0.2 y 0.3 M) y se cuantificó el nitrógeno amoniacal y fósforo total.

V.10 DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA

Una de las características de los sistemas inmovilizados, es la posibilidad de su reutilización, la cual está en función de su tiempo de vida media. Se entiende por tiempo de vida media : el tiempo en el cual se llega a un 50 % de remoción de nutrientes. De acuerdo a lo anterior se determinó la vida media de los sistemas inmovilizados bajo estudio. 47.

V.11 DETERMINACIONES CUANTITATIVAS

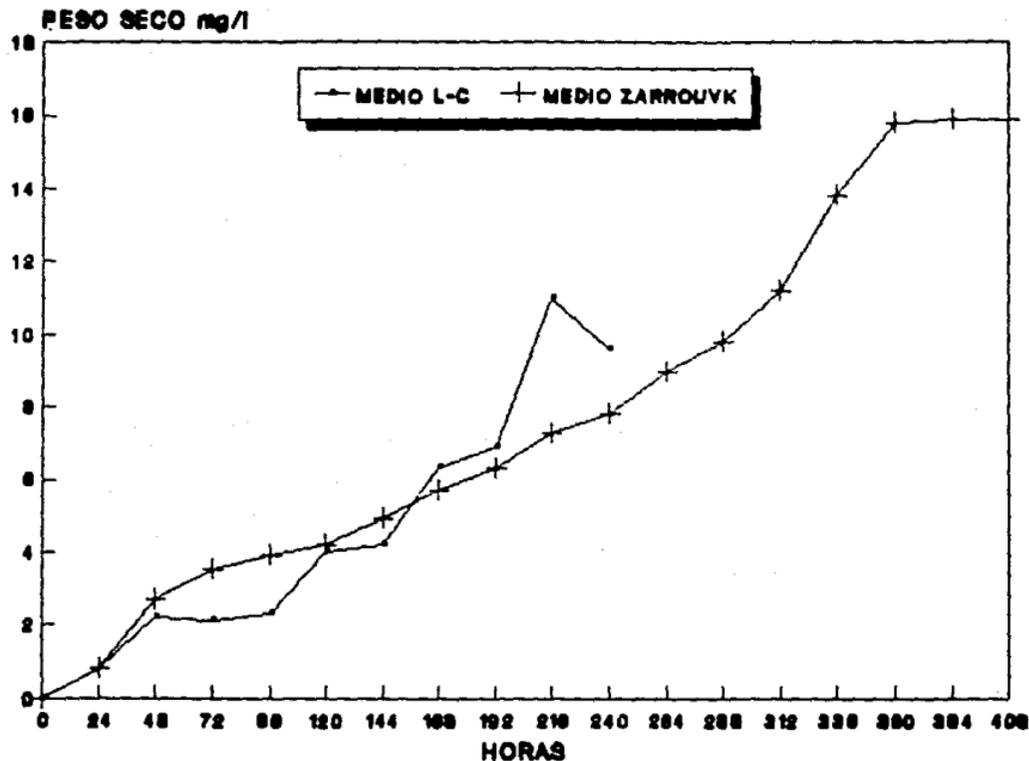
Las determinaciones de fósforo total se hicieron por el método de Fiske-Subbarow 48 y el nitrógeno amoniacal por el método de Nessler 49. También se determinó la Demanda Química de Oxígeno (DQO) y Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) por el método descrito en APHA, 1985 51, y la determinación de clorofila, como análisis indirecto de crecimiento por el método de acetona-agua, descrito en APHA, 1985. 50.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

Con el objeto de determinar el tiempo en que el cultivo se encontraba en fase logarímic, se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento en medio Zarrouvk y en L-C Grafica 1, utilizando cultivos en suspensión. Los resultados nos indicaron que a las 72 h y 96 h respectivamente el cultivo ya se encontraba en la referida fase, por lo que la cosecha de células para inmovilizar se hizo a estos tiempos. Se inmovilizaron células de *S. máxima* en diferentes soportes empleando un inóculo de 72 hrs y se determinó la remoción de fósforo total y nitrógeno amoniacal de residual porcino al 25 y 50 % (v./v), utilizando reactores tipo columna operando en forma semicontinua y tomando muestras cada 24 horas.

El método de inmovilización por atrapamiento resultó sencillo y permitió obtener una distribución homogénea de las células, en cada soporte utilizado.

Tanto la configuración de esferas como la de discos, mostraron suficiente rigidez y buenas propiedades mecánicas, que permitieron su incubación en sistemas agitados con flujo continuo de aire.



GRAFICA 1.- CINETICA DE CRECIMIENTO DE *Spirulina maxima*
EN MEDIO L-C Y ZARROUVK (CULTIVO EN SUSPENSION).

VI.1 INMOVILIZACION EN AGAR Y KAPPA-CARRAGENINA

Cuando las células fueron inmovilizadas en agar y en kappa-carragenina, la gelificación estuvo determinada por la disminución de la temperatura de 43 a 37°C .Cabe mencionar que la kappa-carragenina además de gelificarse por la diferencia de temperatura, también necesita de una solución precipitante de cloruro de potasio, la cual contribuye a lograr la polimerización, otorgándole mayor resistencia al gel 3s., por lo que es necesario tener cuidado con los microorganismos sensibles a esta temperatura como es el caso de *S. maxima* 32,51.

VI.2 EFECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR SOBRE LA INMOVILIZACION DE *S. maxima*

Uno de los factores importantes en la inmovilización de microalgas que contribuye a crear un microambiente, es la concentración de células dentro de la esfera ,ya que puede afectar tanto la velocidad de difusión del sustrato como la de los gases (CO_2 y O_2) . Por otro lado puede repercutir de manera negativa en la asimilación de nutrientes y causar además el rompimiento de la esfera ó disco, al existir una concentración excesiva de microorganismos y de gases, Hulst et al (1987) 17,52. Con objeto de evitar este problema se ensayaron diferentes concentraciones celulares y se evaluó la remoción de nutrientes (fósforo total y nitrógeno amoniacal) como parámetro

indicativo para determinar el tamaño de inóculo más adecuado.

La concentración celular a la cual se obtuvieron los mejores resultados fue de 2g/l de células, peso húmedo, misma que se determinó en ensayos de APG y se hizo extensiva para todos los experimentos posteriores. También se determinó si esta misma concentración celular era la mas adecuada para llevar a cabo la remoción de nutrientes como se aprecia en la Tabla IV con células inmovilizadas en ac. poligalactúronico (APG). Fue posible observar que a concentraciones mayores de 3 gramos de células por litro, se presentaron problemas para la formación de la esfera, es decir no hubo buena polimerización del gel. u.

El porcentaje de remoción de nutrientes aumentó en forma proporcional al tamaño del inóculo hasta 2g/l. Con concentraciones celulares de 3 g/l, disminuyeron estos porcentajes. Esto se puede atribuir a que el exceso de células pudo provocar la formación de una capa celular, en donde sólo captaron la luz las algas de la superficie, deteriorándose las del centro (Redalje, D.G. et al 1989)u. También se ha observado que la concentración de algas en un sistema inmovilizado afecta la actividad fisiológica celular, por la limitación de la luz en el interior. Este fenómeno fue observado también en cultivos hiperconcentrados en suspensión por de la Noüe et al (1983)s.

Los trabajos relacionados con la utilización de microalgas inmovilizadas para el tratamiento terciario de residuales, son escasos (Tabla V) v. ya que los conocimientos que se tienen sobre los aspectos bioquímicos y fisiológicos de las células en confinamiento son limitados. Sin embargo, se menciona que el

Tabla IV EFECTO DE LA CONCENTRACION CELULAR SOBRE LA REMOCION DE NUTRIENTES (P-TOTAL Y N-AMONICAL) EN CELULAS INMOVILIZADAS EN AC.POLIGALACTURONICO .

Peso celular (g/l) base húmeda	Porciento de Remoción	
	P-total	N-amoniacal
0.5	3.85	1.67
1.0	6.92	3.34
2.0	9.24	4.17
3.0	0.77	0.84

Condiciones del experimento:

- Inóculos en fase logarítmica de crecimiento
- Tiempo de incubación 24 horas.
- Luz y aire continua.
- Temperatura ambiente.
- Medio L-C.

Tabla V : SOPORTES UTILIZADOS PARA INMOVILIZAR MICROALGAS EN TRATAMIENTOS DE AGUAS RESIDUALES.

ESPECIE	TECNICA DE INMOVILIZACION	RAZON DE ESTUDIO
<i>Scenedesmus acutus</i>	Carragenina	Remoción de N/P. 46
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Carragenina	Remoción de N/P. 46
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Carragenina	Remoción de N/P. 54
<i>Phormidium sp.</i>	Quitosana	Remoción de N/P. 53
<i>Chlorella sp.</i>	Alginato de sodio	Remoción de N/P. 38

Adaptado de Robinson, P. K, Mak, A. L. and Trevan, M.D (1986) 9

incremento en las concentraciones celulares ocasiona problemas de limitación de oxígeno y CO_2 , que se puede manifestar en la asimilación de nutrientes (Tanaka, H. Matsura & I.A.Valikmy, 1984 55; Gosman, B. & H.R.Jorgen 1986 56, Anderson, G.J., 1986 57 y Robinson, P., et al, 1986 9).

VI.3 EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE CALCIO SOBRE LAS CELULAS DE *Spirulina maxima*

El calcio es un nutriente inorgánico requerido por las microalgas para mantener su estructura y llevar a cabo el transporte iónico, por lo que su ausencia o exceso puede afectar la fisiología de la célula y por lo tanto la asimilación de nutrientes. También es necesario para la formación de la pared celular y la movilidad 59,60,64. Tabla VI. Debido a que algunos de los soportes utilizados en este trabajo, requieren del calcio para formar su estructura gelificante como el alginato de sodio y el ac. poligalacturónico, fue necesario observar el efecto del cloruro de calcio sobre las células y sobre la polimerización de los geles 61 .

En estudios preliminares con microalgas inmovilizadas en alginato de sodio y ac. poligalacturónico se reportó que para este gel se requiere una concentración de cloruro de calcio de 0.1 M 17,40,58. Basados en esta información, se ensayaron concentraciones crecientes de cloruro de calcio para inmovilizar *Spirulina maxima* en ambos polímeros y se determinó su efecto sobre la remoción de fósforo total y nitrógeno

Tabla VI PAPEL DE LOS NUTRIENTES INORGANICOS EN EL METABOLISMO DE ALGAS.

Elemento	Función probable	Componentes
Nitrógeno	Componente de mayor importancia metabólica	Aminoácidos, purinas, pirimidinas, amino azúcares, porfirinas y aminos.
Fósforo	Estructural, transferencia de energía.	ATP, GTP, ácidos nucleicos, fosfolípidos, coenzimas, coenzima A, fosfoenol piruvato.
Potasio	Regulación osmótica, control de pH, estabilidad y conformación proteica.	Formación de compuestos iónicos.
Calcio	Estructural, activación enzimática y transporte iónico.	Carbonato de calcio
Magnesio	Pigmentos fotosintéticos, activación enzimática. transporte iónico y estabilidad ribosomal.	Clorofila
Sodio	Activación enzimática, balance hídrico y enzimas.	Nitrato reductasa
Cloro	Fotosistema II	Terpeno.

-Datos presentados en el primer Curso Internacional de Tópicos Selectos en el cultivo de las Microalgas, CINVESTAV-IPN México D.F. 1990.

amoniaco. En la Tabla VII, se presentan los resultados obtenidos con ambos polímeros, en donde se aprecia que al utilizar una concentración superior a 0.3 M de cloruro de calcio para la gelificación, se observó una remoción menor de los nutrientes antes mencionados, mientras que a concentraciones de calcio menores, la remoción fue mayor. La tendencia a una baja remoción de nutrientes con respecto a concentraciones crecientes de cloruro de calcio (0.3 M) mostrada tanto para alginato como para APG, se atribuye a que se presentó una plasmolisis celular según se pudo observar al microscopio, impidiéndose la asimilación de nutrientes. Bidwell (1979) ⁵⁹ & Baker (1983) ⁶⁰ reportaron que el calcio es un catión que se requiere para el crecimiento de las microalgas, especialmente para la formación de la pared celular y para la movilidad. Krypt & Quatrano (1987) ⁶¹. Holmgren, Hustetter & Scholes, (1971)⁶² reportaron que el exceso de calcio puede ocasionar la formación de complejos insolubles que limitan la captación de calcio por las células, manifestando una deficiencia de éste y presentándose en consecuencia la plasmolisis celular.

Una vez establecidas las condiciones de la solución precipitante y el tamaño del inóculo, la inmovilización se llevó a cabo con una concentración de cloruro de calcio de 0.1 M para alginato de sodio y ácido poligalacturónico.

Tabla VII EFECTO DE LA CONCENTRACION DE CLORURO DE CALCIO SOBRE *Spirulina maxima* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE SODIO Y AC. POLIGALACTURONICO.

CaCl₂ (Molaridad)	Pérdida de Pigmentación	Plasmolisis celular*	Resistencia mecánica
0.1	menor	menor	buena
0.2	regular	regular	buena
0.3	mayor	mayor	buena

Condiciones del experimento:

-Inóculo de 2 g/l en base húmeda, para ambos soportes.

-Tiempo de incubación de 24 hrs.

* Observación al microscopio.

VI.4 EFECTO DE LA ALCALINIDAD Y CONCENTRACION DEL RESIDUAL PORCINO EN LOS SISTEMAS INMOVILIZADOS.

El tratamiento terciario con microalgas, se aplicó al efluente secundario de la digestión aerobia del residual porcino, con el objeto de disminuir el contenido de nutrientes inorgánicos y permitir la reutilización del agua tratada, en diferentes actividades como son limpieza, riego ó su vertimiento en cuerpos de agua evitando eutroficación y por lo tanto contaminación.

En la Tabla VIII, se muestran los resultados de la caracterización del residual porcino y se observó que tiene una relación N:P de 1.5:1, con un pH de 7.5. Zarrouvk (1966) reportó que la alcalinidad es un factor limitante para el crecimiento de *S. maxima* la que se refleja en el pH de 8.3 a 11.0, y recomendó para el medio sintético la adición de 16.8 g/l de bicarbonato de sodio. De acuerdo a ésto se adicionaron 16.8 g/l de bicarbonato de sodio al residual porcino para alcanzar un pH entre 8.0 y 9.0.

El alginato de sodio y el APG son fáciles de manejar y presentan buenas propiedades mecánicas, sin embargo tienen la desventaja de disolverse frente a los iones fosfato y citrato Kolot, (1981) ss.63. Por lo anterior y en base a los resultados de la caracterización del residual porcino, se empleó a éste diluido al 25 % y 50 % (25 ó 50 partes de residual por 75 ó 50 partes de agua de la llave). Dainty, et al (1986) **, reportaron que la adición de cloruro de calcio o cualquier fuente

**Tabla VIII CARACTERIZACION DEL RESIDUAL PORCINO ESTABILIZADO POR
AEREACION A DIFERENTES CONCENTRACIONES.**

PARAMETROS	CONCENTRACION DEL RESIDUAL PORCINO AEROBIO		
	100%	50%	25%
P-TOTAL	80mg/l	40mg/l	23mg/l
N-AMONICAL	120mg/l	60mg/l	28mg/l
pH	9	9	9
DQO	400mg/l	215mg/l	110mg/l
DBO	520mg/l	260mg/l	130mg/l

de calcio, aumenta la tolerancia del alginato de sodio a la presencia de iones fósforo en el medio. Sin embargo, *S. maritima* es sensible a concentraciones elevadas de calcio, por lo que se procedió a ensayar diluciones mayores del residual y se determinó que al 0.125 % (0.125 partes de residual por 99.8 de agua) no se afecta la polimerización del gel, ni se presenta daño celular. Los experimentos posteriores se llevaron a cabo con esta concentración. Por otra parte, se observó de manera cualitativa, que al adicionar cloruro de calcio al residual porcino el cual se encuentra a pH de 9 , con el objeto de reforzar la polimerización del alginato de sodio y del APG , ocurrió una precipitación de fosfatos, provocándose turbidez y un aumento de los fosfatos en el medio, lo que ocasionó una severa despolimerización de los geles. Las esferas de APG toleraron una concentración de residual de 25% presentando mayor resistencia, debido posiblemente a la conformación del polímero, ya que éste forma uniones de tipo éster y puentes de hidrógeno con el calcio, lo que no ocurre con el alginato de sodio. (Glisckman, 1970)7.

En cuanto a la concentración del residual no se utilizó al 100% (100%), ya que al microscopio se pudo observar que las partículas que tiene en suspensión, cubrían el exterior de las estructuras inmobilizadas en los diferentes soportes, sin penetrarlas, pero obstruyendo la asimilación de nutrientes y el paso de la luz. Nilson, (1984) es señaló que los soportes empleados en la inmobilización, presentan un tamaño de poro determinado, por

lo que recomienda trabajar con medios que tengan partículas de menor tamaño que el de estos poros . En nuestro caso, el tamaño de las partículas suspendidas en el residual porcino fue mayor al de los poros de los soportes utilizados, por lo que se presentó la obstrucción de los mismos.

VI.5 FACTOR DE CORRECCION

Los factores de corrección se presentan en la Tabla IX. Su aplicación resultó de utilidad ya que en el caso de alginato de sodio y APG, el fósforo funcionó como quelante del calcio formando un complejo con éste y dando por lo tanto resultados erróneos sobre su asimilación.

De la Noüe & Chevalier (1985)⁶⁷ reportaron que la kappa-carragenina requiere un tiempo determinado para saturarse de iones fósforo. Tomándose esta recomendación en cuenta, se permitió que el sistema inmovilizado de k-carragenina se saturara para que la remoción de nutrientes fuera veraz.

Cuando se utilizó agar como soporte, no se presentó este fenómeno, ya que su estructura polimérica se realiza por diferencia de temperatura, sin la intervención de ningún ión, por lo que los resultados obtenidos con este gel no requirieron ser corregidos.³⁶

En cuanto al N-amoniacal, se determinó que no hubo absorción de este nutriente por parte de los soportes utilizados, por lo tanto no hubo necesidad de aplicar ningún factor

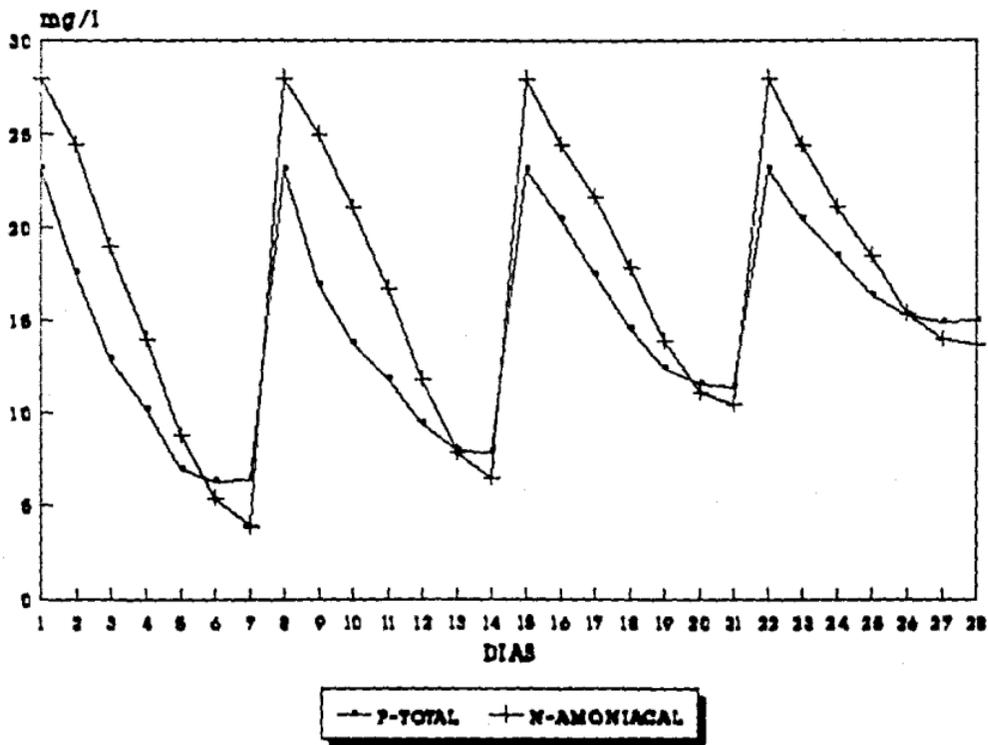
de corrección.

VI.6 TIEMPO DE VIDA MEDIA Y REMOCION DE NUTRIENTES DE LOS SISTEMAS INMOVILIZADOS

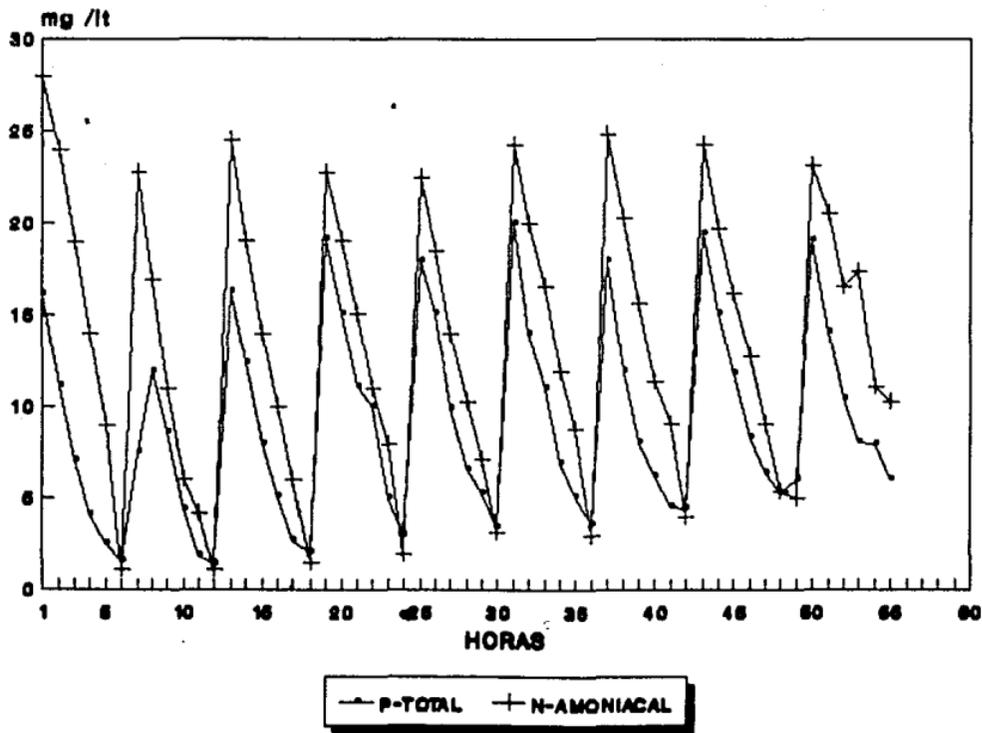
Una vez establecidas las condiciones de inmovilización de células de *Spirulina maxima* en APG, alginato de sodio, agar y kappa-carragenina, se determinó la remoción de fósforo total y nitrógeno amoniacal con respecto al tiempo. En la Gráfica 2 se muestran los resultados de la remoción de nutrientes (P-total y N- amoniacal) en efluente porcino al 25% por *Spirulina maxima* inmovilizada en ac. poligalacturónico, en donde se puede apreciar que la máxima remoción se alcanzó a los 6 días y fue de 73.42% para P-total y de 85.72% para N-amoniacal. Este porcentaje disminuyó a medida que se reutilizaba el sistema inmovilizado.

En el caso del alginato de sodio (Gráfica 3), se alcanzó la máxima remoción en el residual al 0.125% a las 7 horas y fue de 90% para P-total y 90% para N-amoniacal. De nuevo se observó una disminución gradual de estos porcentajes, a lo largo de las reutilizaciones del sistema inmovilizado.

De la Noüe & Proulx (1988) se informaron sobre la disminución del porcentaje de remoción de nutrientes al aumentar el número de reutilizaciones del sistema inmovilizado de *Phormidium* sp. en quitosana. Chevalier & de la Noüe (1985) también reportaron este fenómeno cuando



GRAFICA 2.- REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONIAL POR CELULAS INMOVILIZADAS EN AC. POLIGALACTURONICO UTILIZANDO RESIDUAL PORCINO AL 25 %.



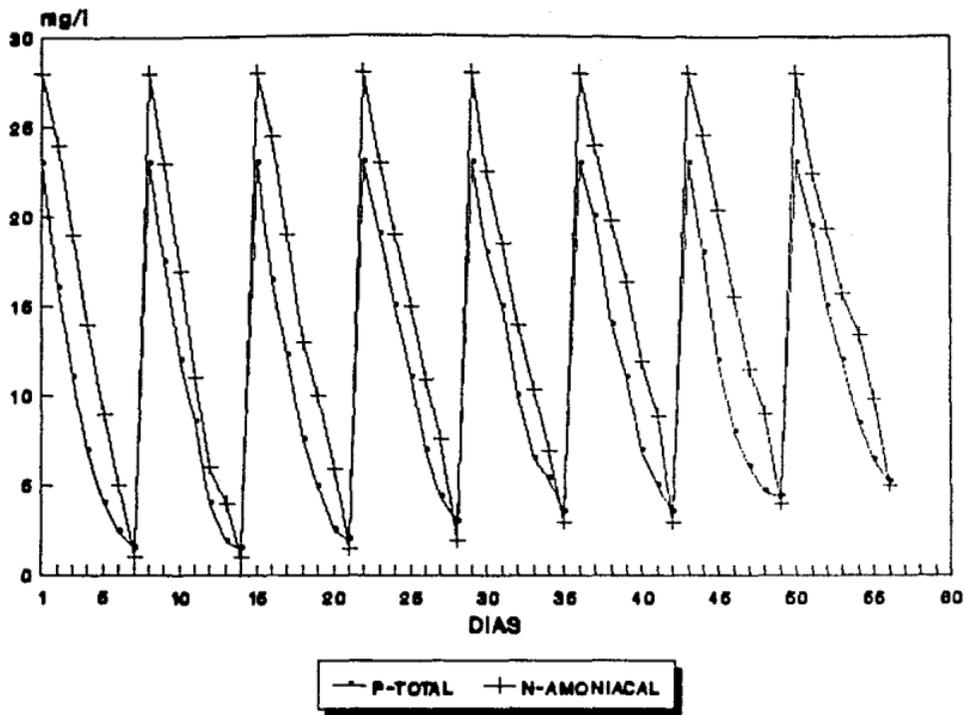
GRAFICA 3.- REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONIAL DE CELULAS INMOVILIZADAS EN ALGINATO DE SODIO UTILIZANDO RESIDUAL PORCINO AL 0.125 %

utilizaron un sistema de *Scenedesmus quadricauda* inmovilizado en kappa-carragenina.

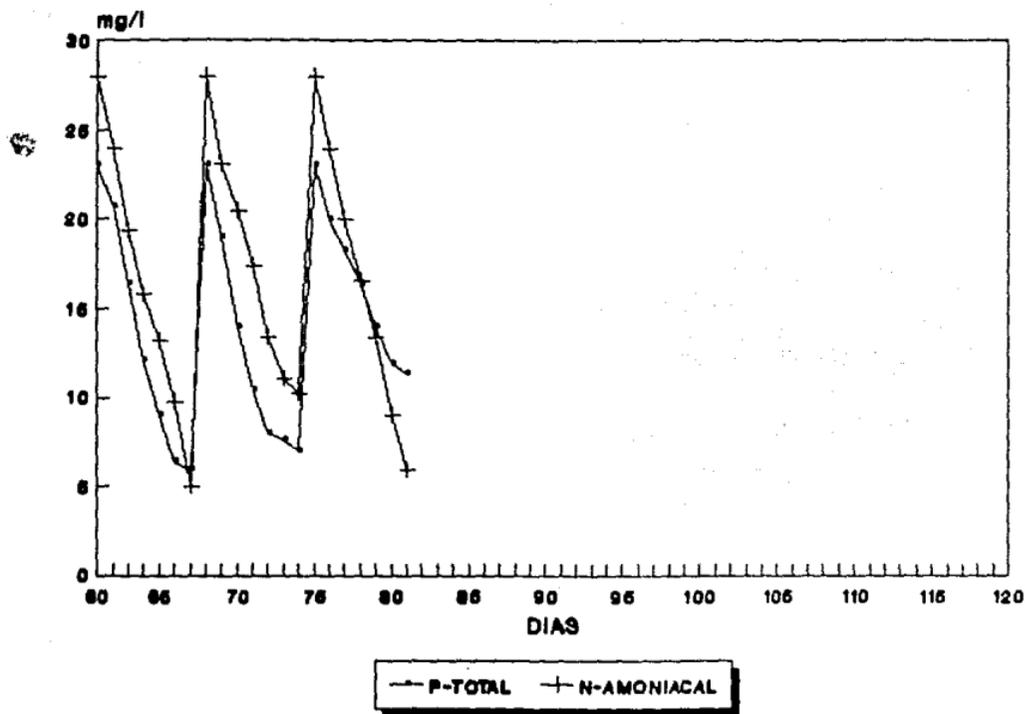
El tiempo de vida media del sistema inmovilizado en ac. poligalacturónico, fue de 24 días y para el alginato de sodio de 2.3 días. En ambos casos fue posible constatar un aumento en el número de células que presentaron plasmolisis, a medida que se incrementaba su reutilización, repercutiendo ésto en la baja asimilación de nutrientes y en el tiempo de vida media del sistema .

Por otro lado se observó al microscopio y por determinaciones de clorofila en el sobrenadante, una liberación de células de los soportes anteriores. Al microscopio las células de *S. maxima* se observaron fragmentadas y con ausencia de color, por lo que al cuantificar clorofila en el sobrenadante no se absorbancia. Esto puede atribuirse a que conforme pasó el tiempo, polímero y células formaron una unidad y al despolimerizarse el gel por la presencia de iones fósforo en el medio, se provocaron daños irreversibles a las células, fragmentando su pared celular y vertiendo al medio sus organelos, impidiéndose así la síntesis de clorofila entre otros. 62.

El agar se utilizó como soporte para los ensayos de dos concentraciones de residual porcino (25 y 50 %). En las Gráfica 4 se observa que en este sistema se alcanzó la máxima remoción de nutrientes a los seis días y fue de 93.75% para P-total y 95.66% para N-amoniacal, en residual porcino al 25 % . Estos porcentajes disminuyeron con el tiempo tal y como se mencionó para los soportes anteriores. Una desventaja que presentó



GRAFICA 4.- REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONIAL DE CELULAS INMOVILIZADAS EN AGAR UTILIZANDO RESIDUAL PORCINO AL 25 %

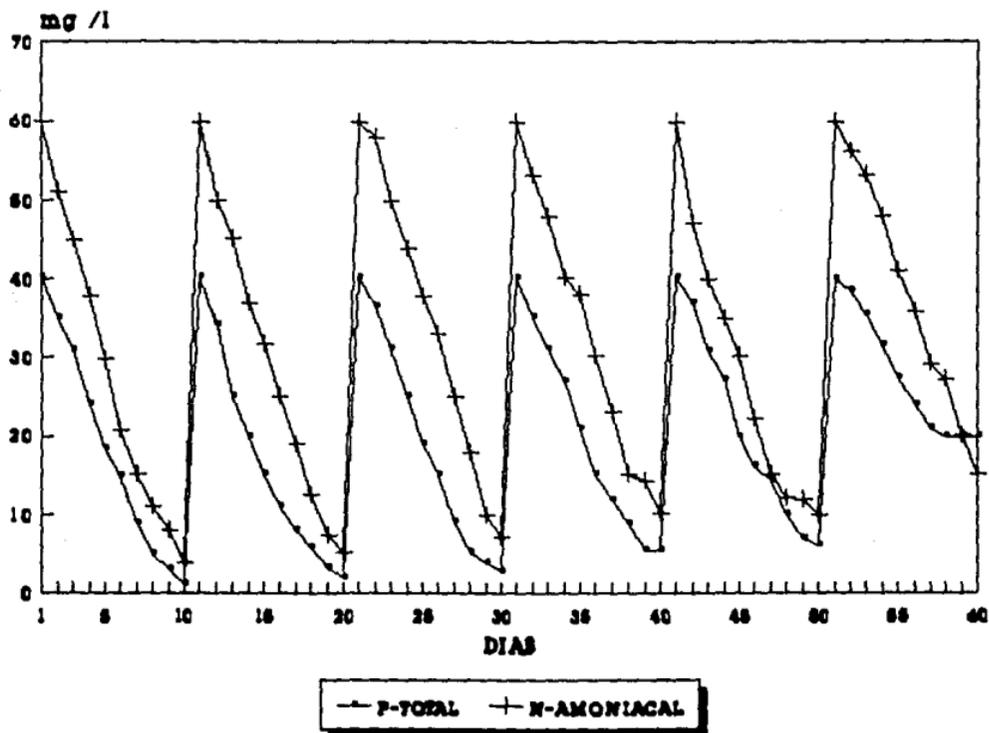


CONTINUACION DE GRAFICA 4

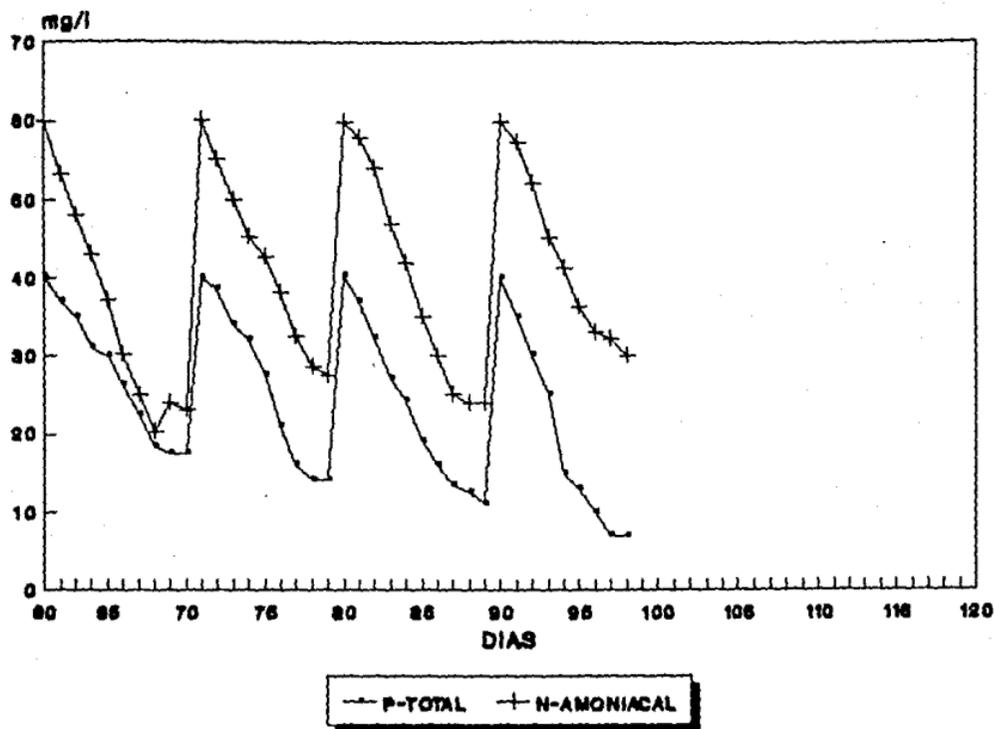
el agar como soporte fue su fragmentación, debido quizás a la configuración de disco que se utilizó s_4 , la cual presenta mayores puntos de fracturación. La fragmentación del gel, provocó la liberación celular, lo que se reflejó en el tiempo de vida media que fue de 66 días para residual al 25 % con 10 reutilizaciones continuas y de 87 días en residual al 50 % con el mismo número de reutilizaciones continuas.

En la Gráfica 5 se presentan datos del soporte agar en residual porcino 50% ($\frac{v}{v}$). En estos ensayos el sistema alcanzó su máxima remoción a los 9 días. Esto se debió a que en esta dilución del residual, existía el doble de la concentración de nutrientes que en el residual al 25 % ($\frac{v}{v}$). El porcentaje de remoción alcanzado en la primera reutilización de este sistema en residual porcino al 50% ($\frac{v}{v}$) fue de 97.0% para P-total y de 93% para N-amoniaco, observándose una disminución gradual a lo largo del tiempo y número de reutilizaciones.

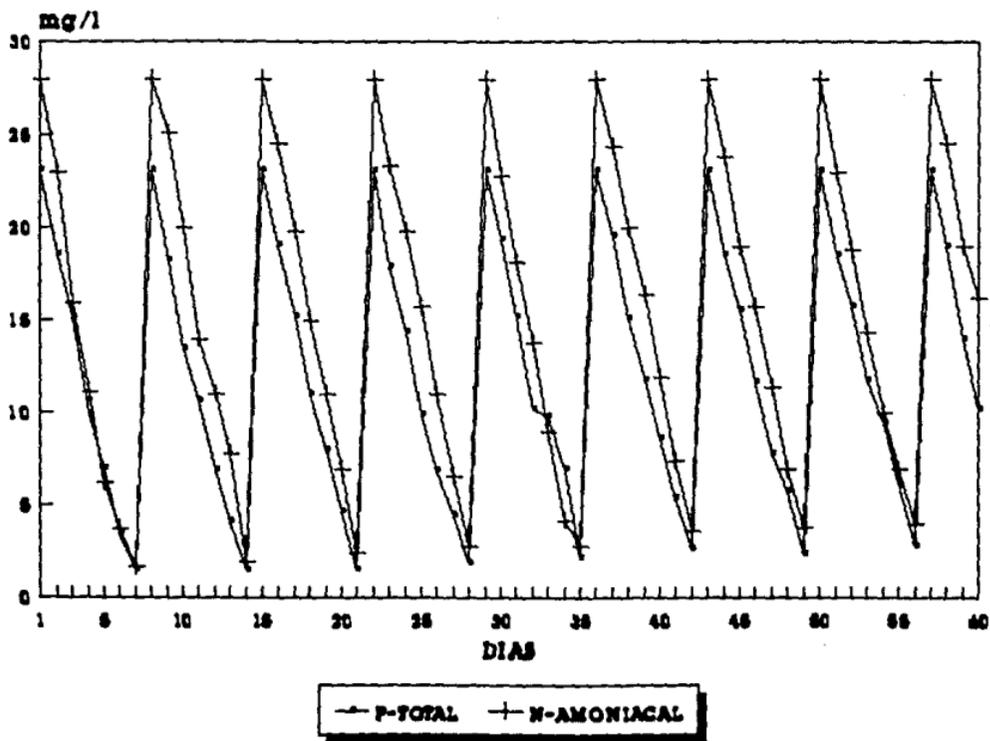
El sistema inmovilizado en kappa-carragenina se ensayó con las concentraciones de residual porcino de 25 y 50 % ($\frac{v}{v}$), obteniéndose el comportamiento que se ilustra en las Gráficas 6 y 7. Con residual porcino al 25%, se alcanzó una remoción de 93.48% para P-total y de 93% para N-amoniaco a los seis días; con una vida media superior a 78 días, y una ligera disminución en el porcentaje de remoción, a medida que se aumentó el número de reutilizaciones. Con residual al 50% se obtuvo una remoción de 93.7% para P-total y de 93% para N-amoniaco en nueve días, con una vida media superior a 87 días.



GRAFICA 5.- REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONIAL DE CELULAS
 INMOVILIZADAS EN AGAR UTILIZANDO RESIDUAL PORCINO AL 50 %

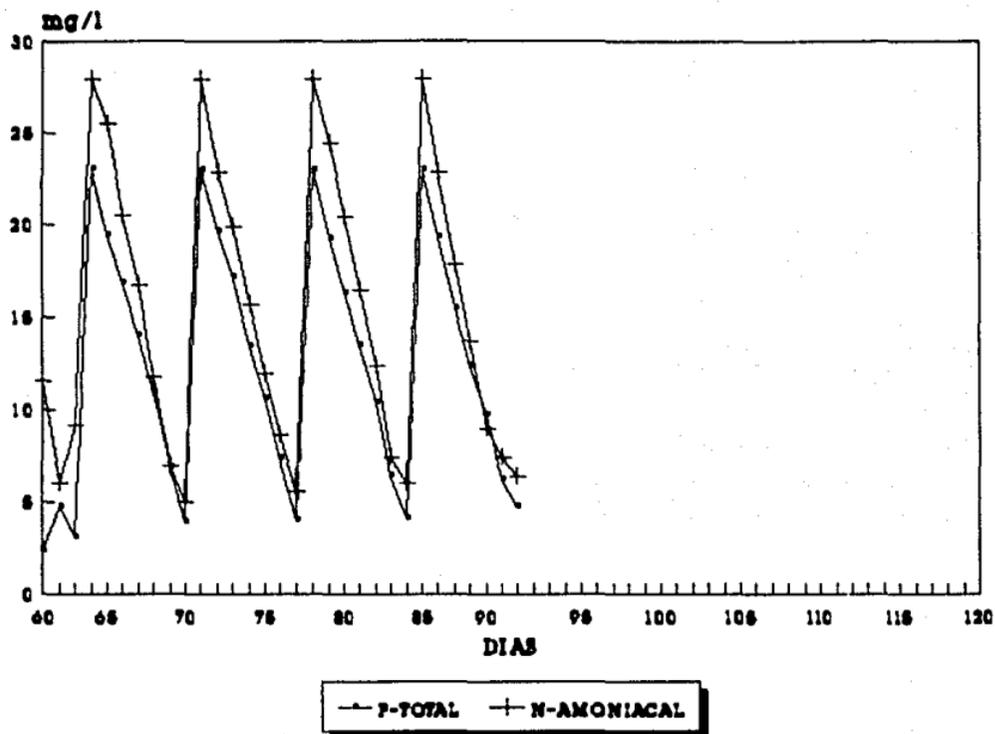


CONTINUACION DE GRAFICA 5

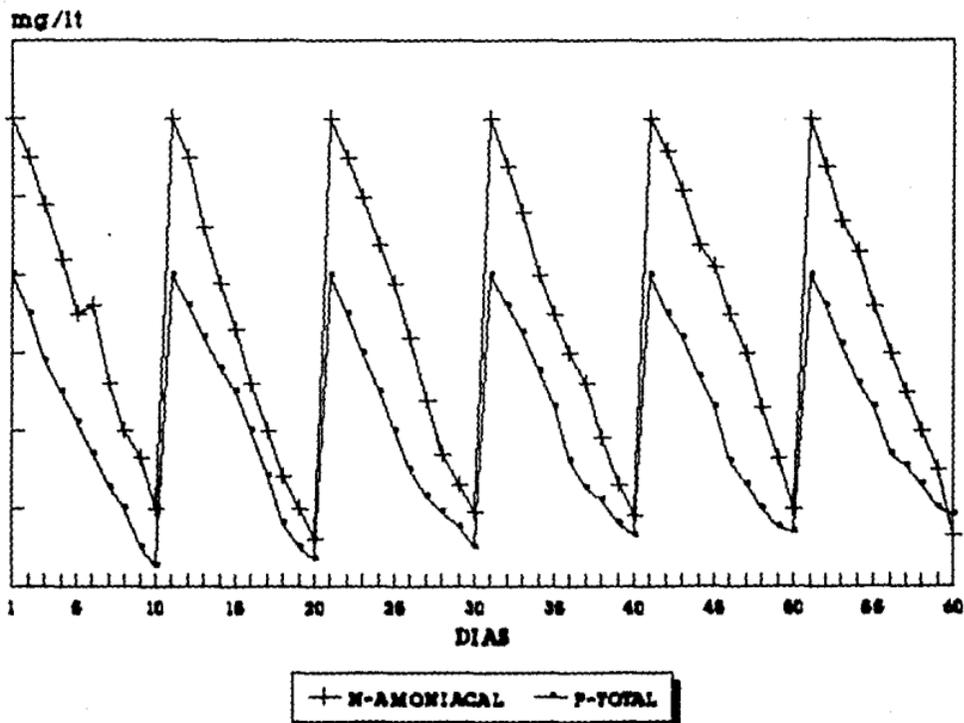


GRAFICA 6.- REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONIAL DE CELULAS INMOVILIZADAS EN KAPPA-CARRAGENINA UTILIZANDO RESIDUAL PORCINO AL

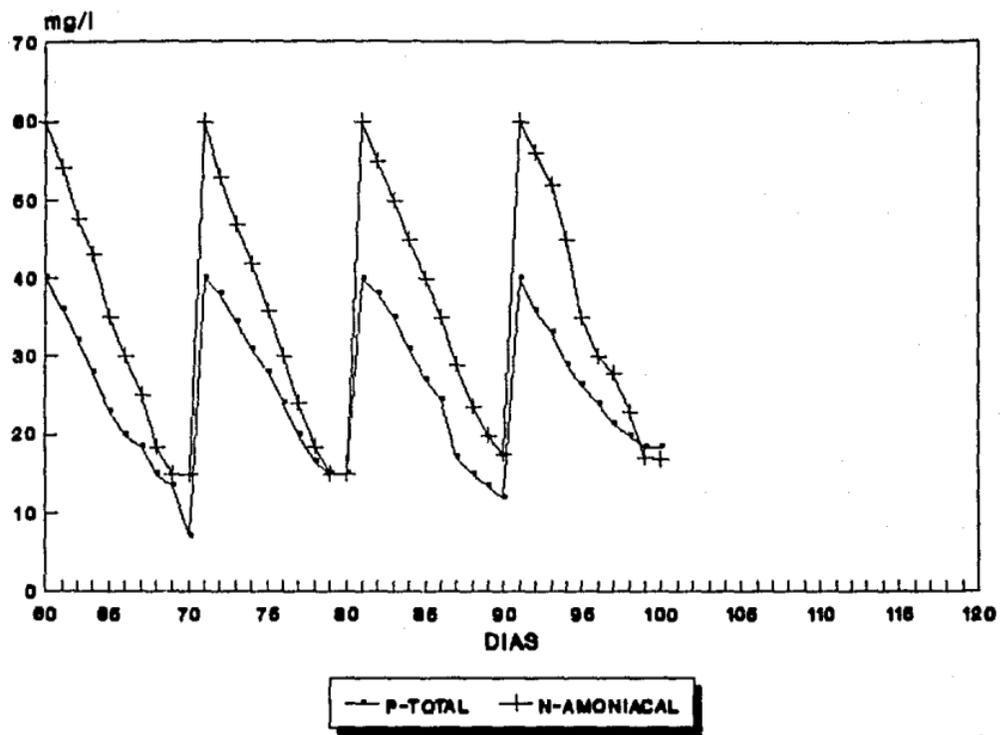
25 %



CONTINUACION DE GRAFICA 6



GRAFICA 7.- REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONIAL DE CELULAS INMOVILIZADAS EN KAPPA-CARRAGENINA UTILIZANDO RESIDUAL PORCINO AL 50 %



CONTINUACION DE GRAFICA 7

Comparando los resultados obtenidos con los cuatro soportes, se logró observar que la remoción de nitrógeno amoniacal fue más rápida, es decir en un menor tiempo que la de fósforo total, esto posiblemente se debió a que la biomasa celular de *S. maxima* está compuesta por un elevado contenido de nitrógeno por lo que para mantener esta condición todos los compuestos nitrogenados en el medio de cultivo fueron asimilados por las células para producir material rico en energía, lo que explicaría su rápida utilización. Otro factor que puede estar influyendo es la pérdida de nitrógeno hacia la atmósfera por desabsorción, debido a las condiciones de alcalinidad del residual 21.

Con respecto a los componentes de fósforo, su remoción fue lenta en todos los soportes estudiados. El residual contiene aproximadamente 2 partes de nitrógeno por una parte de fósforo. Sin embargo la remoción de nitrógeno fue mayor y más rápida 22. Chevalier y de la Noüe (1985) 46 reportaron una asimilación de nitrógeno amoniacal más rápida con respecto a la de fósforo total para *Scenedesmus obliquus* inmovilizado en kappa-carragenina.

En la tabla X se presentan en resumen los datos de remoción de nutrientes y tiempos de vida media para la primera utilización de los sistemas inmovilizados en diferentes soportes, así como su tiempo de vida media en el residual al 25 y 50 % (v/v), donde es evidente que el soporte que tuvo un tiempo de vida media mayor fue la kappa-carragenina seguida por el agar. Gráficas 8 y 9.

La diferencia en el porcentaje de remoción de

Tabla X REMOCION DE P-TOTAL Y N-AMONICAL EN LA PRIMERA UTILIZACION DE *Spirulina maxima* INMOVILIZADA EN DIFERENTES SOPORTES CON RESIDUAL PORCINO AL 25 Y 50 %

SOPORTES	PORCENTAJE DE REMOCION		TIEMPO DE VIDA MEDIA (DIAS)
	P-TOTAL	N-AMONICAL	
RESIDUAL PORCINO AL 25 %			
APG	85.72	73.42	24
AGAR	99.66	93.75	66
KAPPA-CARRAGENINA	93.00	93.48	más de 78
RESIDUAL PORCINO AL 50 %			
AGAR	97.00	93.00	87
KAPPA-CARRAGENINA	93.7	93.00	más de 87
RESIDUAL AL 0.125%			
ALGINATO DE SODIO	90.0	90.00	2.3

nutrientes, entre las células inmovilizadas en uno y otro soporte, sugiere que la inmovilización con kappa-carragenina y con agar es más estable que la de ac. poligalacturónico y alginato, ya que este último no toleró altas concentraciones de residual, requiriéndose una dilución mayor de éste.

En cuanto al ac. poligalacturónico, existe poca información sobre sus características y aplicaciones 40. Sin embargo, aunque este soporte es muy similar al alginato en su patrón de polimerización, se verificó que presenta mayor resistencia a los iones fósforo que el alginato, y que retiene su estabilidad 41, lo que hace posible su utilización a concentraciones mayores de residual porcino que las toleradas por el alginato.

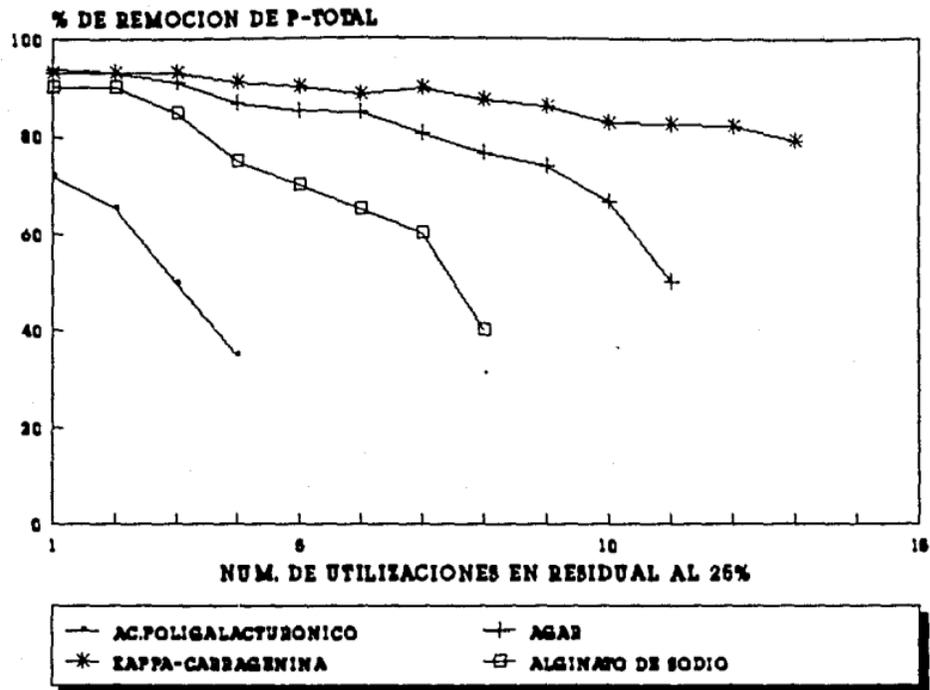
Con el fin de verificar los cortos tiempos de vida media, obtenidos en APG y alginato y comprobar si había crecimiento celular dentro de los soportes, se realizaron algunos ensayos cuantificando clorofila. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XI, en donde se observa que en las dos primeras reutilizaciones del sistema de APG, sí hubo crecimiento celular, mismo que cesó en la cuarta reutilización. Es probable que este soporte a medida que pasa el tiempo afecte la viabilidad celular, al competir con las células por los iones calcio, dando como consecuencia el debilitamiento de la estructura celular y muerte de las células. En el alginato de sodio no se presentó crecimiento celular, por lo que es posible que la remoción de nutrientes cuantificados haya sido fuera sólo para mantener la

Tabla XI CUANTIFICACION DE CLOROFILA EN LOS DIFERENTES SISTEMAS
INMOVILIZADOS

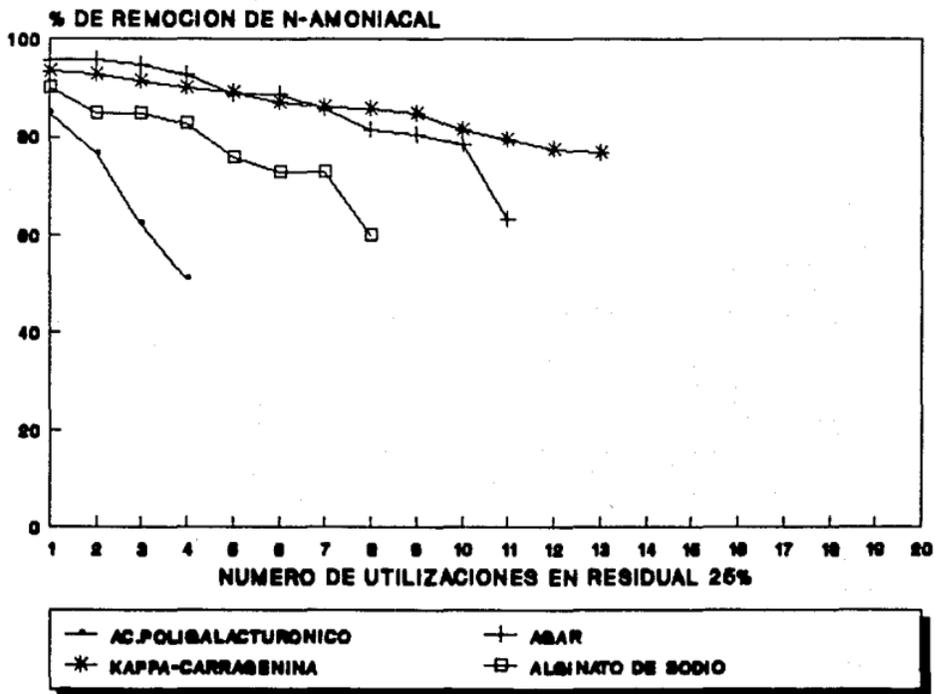
UTILIZACIONES	APG	ALGINATO	AGAR	KAPPA-CARRAGENINA
		(Clorofila mg/l)		
0	0.02	0.02	0.02	0.02
1	0.025	0.02	0.03	0.031
2	0.03	0.02	0.033	0.035
3	0.032	-	0.035	0.037
4	0.032	-	0.037	0.039
5	0.032	-	0.039	0.040
6	0.03	-	0.039	0.040
7	0.03	-	0.04	0.045
8	0.028	-	0.045	0.049
9	-	-	0.045	0.05
10	-	-	0.04	0.054
11	-	-	0.039	0.057
12	-	-	0.04	0.06
13	-	-	-	0.065

viabilidad del sistema.

En cuanto al agar y la kappa-carragenina, ambos soportes presentaron crecimiento de *S. maxima* a lo largo de sus reutilizaciones. La kappa-carragenina fue el soporte que tuvo un tiempo de vida media mayor y una remoción de nutrientes más elevada, así como un crecimiento mayor. Estos datos están de acuerdo con los experimentos de Tyagi & Vembu (1990) ⁵⁴, en donde se reporta que la kappa-carragenina constituye un buen soporte para el crecimiento de algas inmovilizadas, cuando se emplean para el tratamiento de aguas residuales. Cabe señalar que el agar también resultó un buen polímero para este tipo de biotecnología. No obstante que en el presente trabajo las células inmovilizadas en agar removieron un elevado porcentaje de nutrientes, y su tiempo de vida media fue grande, la configuración utilizando discos presentó fragmentaciones.



GRAFICA 8.- DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA EN LOS DIFERENTES SOPORTES CON RELACION A LA REMOCION DE P-TOTAL



GRAFICA 9.- DETERMINACION DEL TIEMPO DE VIDA MEDIA EN LOS
 DIFERENTES SOPORTES CON RELACION A LA REMOCION DE N-AMONIAL

VII. CONCLUSIONES

-Por primera vez se inmovilizaron células de *Spirulina maxima* por atrapamiento en los siguientes soportes :ácido poligalacturónico al 4 ‰ (p/v), alginato de sodio al 2‰ (p/v), agar al 4 ‰ (p/v) y kappa-carragenina al 1.25 ‰ (p/v) adicionado de 0.25 ‰ (p/v) de goma karaya, manteniendo sus características fisiológicas naturales.

-Las condiciones adecuadas para esta inmovilización, fueron utilizando una concentración celular de 2g/l de células (base húmeda)y una concentración de CaCl_2 de 0.1M, tanto para el ac. poligalacturónico como para el alginato de sodio.

-El tiempo de vida media de estos sistemas, fue de 24 días para el ácido poligalacturónico, de 2.3 días para el alginato de sodio ; 66 días para el agar y superior a 87 días. para la kappa-carragenina.

-En residual al 25 % ($\frac{v}{v}$) el sistema inmovilizado en agar presentó las mayores remociones de P-total (99.66 %) y N-amoniacoal (93.75 %) con un tiempo de vida media de 66 días.

-En residual al 50% ($\frac{v}{v}$) el sistema inmovilizado en agar presentó las mayores remociones de P-total (97 %) con un tiempo de vida media de 87 días .Con respecto al N-amoniacoal a misma dilución de residual, los sistemas inmovilizados en kappa-carragenina y agar presentaron el mismo porcentaje de remoción de 93% con un tiempo de vida para el primero superior de 87 días y de 87 días para el segundo.

-La kappa-carragenina resultó ser el mejor soporte en las condiciones experimentales ensayadas.

-La originalidad del trabajo radica en que con el sistema inmovilizado se aplicó el tratamiento terciario de residual porcino natural, obteniéndose remociones de nutrientes por superior del 90 %.

VIII. RECOMENDACIONES

En base a los resultados obtenidos, es conveniente señalar algunos puntos que requieren de un mayor estudio para el mejor conocimiento del sistema inmovilizado.

-Ensayar diferentes configuraciones y tamaños con el agar, con la finalidad de disminuir la desventaja de su fraccionamiento.

- Para incrementar la remoción de nutrientes, es necesario el estudio completo de los parámetros que afectan a los sistemas fotosintéticos inmovilizados, como son : temperatura, iluminación, pH y aereación.

- Los sistemas de microalgas inmovilizadas, a pesar de su han sido poco estudiados en nuestro país, por lo que es necesario profundizar en su estudio, con la finalidad de ampliar sus aplicaciones biotecnológicas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Iñiguez C., G. Manejo y Aprovechamiento Integral del Estiercol de Cerdo. Congreso Nacional AMVEC-83, Pto Vallarta, Jal. 29 de junio al 2 de Julio de 1983.
- 2.- López, M.V., (1985). Tratamiento Biológico de aguas residuales En: "Prospectiva de la Biotecnología en México".Fundación Barros Sierra, Conacyt, México, 259 pp.
- 3.- Cadwell, D.H. (1946) Sewage oxidation ponds-performance, operation and design. Sewage Works J. 18: 453-458.
- 4.- Oswald, W.J., & Gotaas, H.G. (1957).Photosynthesis in sewage treatment. Trans Am Soc Civ Eng. 122: 73-105 .
- 5.- Chevalier, p., & de la Noüe, J. (1985) . Efficiency of immobilized algae for ammonium and orthophosphate removal from wastewaters. Biotechnol. Lett. 7(6): 395-400.
- 6.- Cañizares, V. R. O.y Campillo, C. C., (1991) . Cuadernos sobre Biotecnología. CINVESTAV-IPN. México.
- 7.- Becker, E. W. (1981). Algae mass cultivation, production and utilization. Proc. Biochem. 16 (5) : 10-14 .

- 8.- Talbot, P. & de la Noüe (1988). Evaluation of *Phormidium bohneri* for solar biotechnology. In : Algal Biotechnology, Stadler, T., Mollion, G., Verdus, M, C., Karamanos, Y., Morvan, H., & Christiaen D., Eds., Elsevier, Amsterdam, pp 400-411.
- 9.- Robinson, A.K., Mak A.L., & Trevan, M.D., (1986). Immobilized algae : A review. Proc Biochem. 21: 122-126 .
- 10.- Durand, G. & J. M. Navarro. (1978). Immobilized microbial cells. Proc. Biochem. Sep : 14-23 .
- 11.- Blanch, H. W. (1984). Immobilized Microbial Cells. In Ann. Rep. on Ferm. Proc. Tao, G. T. Ed. 7: 81-87.
- 12.- Nilsson, K. & Mosbach, K., (1984). A. General Method for Entrapment of cells in Beaded Polymers In : Biotech 83. International Conference on the comercial applications and Implications of Biotechnology London : Online publ. pp 217-231.
- 13.- Trevan, M. D. & Mak, A. L. (1988). Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts. Tibtech. 6 : 68-72.

- 14.- Wickstrom, P., Swajcer, E., Brodelius K, Nilsson, K., & Mosbach, K., (1982). Formation of alpha-keto acids from amino acids using immobilized bacteria and algae. *Biotechnol. Lett.* 4 : 153-158.
- 15.- Ochiai, H., Shibata, H., Sawa, Y. & Katon, T., (1980) "Living electrode" as longlived photoconverter for biophotolysis of water, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1980), 77: 2442-2444 .
- 16.- Ochiai, H., Shibata, H., Sawa, Y., Shunga, M. & Ohta, S. (1983) *Appl. Biochem. Biotechnol*, 8: 289-303 .
- 17.- Aldercreutz, P., & Mattiason, B., (1982). Oxygen supply to immobilized cells.I Oxygen production by immobilized *Chlorella*. *Enzyme Microb. Technol.* 4: 332-336 .
- 18.- Day, J., & Codd., G.,(1985). Photosynthesis and glycollate excretion by Immobilized *Chlorella emersonii*. *Enzyme Microb. Technol* 12: 235-241.
- 19.- Hashimoto, S., & Furukama, K., (1989). Nutrient Removal from Secondary Efluent by Filamentous Algae. *J. Fern. Bioeng.* 67:(1) 62-69 .

- 20.- Richmond, A. & Becker, W. (1986) Technological aspects of mass cultivation a general outline. In: Handbook of Microalgal Mass Cultivation Culture, Richmond, A. (Ed) pp 245-463. Boca Raton. CRC Press.
- 21.- Redlaje, D.G., Duerr, E.O., de la Noüe, J., Mayzand, P., Nonomura, A.M., & Cassin, R., (1989) Algae as ideal waste removers: biochemical pathways, In: Biotreatment of Agricultural Wastewater, Huntley, M., Ed., CRC Press. Boca Raton, F.L, Chap 7.91-110 pp.
- 22.- Kosaric, H.T. Nguyen, & M. A. , Bergougnou, (1974). Growth of *Spirulina maxima* Algae in Effluents from Secondary Waste-Water Treatment Plants. Biotechnol. Bioeng. 16 : 881-896 .
- 23.- Oron, G., Shelef, G., & Levi, A. (1979) Growth of *Spirulina maxima* on Cow-Manure Wastes. Biotechnol. Bioeng. 21: 2169-2173 .
- 24.- Chiu, R. J., H. I. liu, C. Chen, Y. C. Chi, H. Shao, P. Soong & Paul L.C. Has. (1980). The cultivation of *Spirulina platensis* on fermented swine manure. Proceeds Intl. Symp. on Biogas, microalgae and Livestock wastes. Taipei, Taiwan, R.O.C.

- 25.- Martin, C., de la Noüe, J. & Picard, G. (1985 b).Intensive cultivation of freshwater microalgae on aerated pig manure. *Biomass*, 7: 245-259 .
- 26.- Pouliot, Y., G. Buelna, C. Racine & J. de la Noüe. (1989). Culture of cyanobacteria for wastewater treatment and biomass production. *Biol. Wastes*, 29: 81-91 .
- 27.- Doyle, Y. & J. De la Noüe.(1987). Aerobic Treatment of Swine Manure: Physico-Chemical aspects. *Biol. Wastes*. 22: 187-208 pp.
- 28.- Pichard, G.A.J. de la Noüe V. P., Piette, & C. Kirovac. (1979). Utilisation de l' algue *Cocystis* sp. pour le traitement tertiare des aux usées -I. Culture en VTAC de cellules preatablement conditionées en cyclostol. *Water Res.* 13: 1203-1212 .
- 29.- Knorr D., (1984). Use of Chitinous polymers in food. *Food Technol.* 1: 85-87 .
- 30.- Kayano, H., Karube, I., Matsunaga, T., Susuki, S. & Nakayama, O. (1981). A Photochemical Fuel Cell System Using *Anabaena* N-7363. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12: 1-5 pp.

- 31.- Lindsey, K. & M. M. Yeoman, (1983). Novel Experimental System for Studying The Production of Secondary Plant Metabolites by Plant Tissue Cultures. In: PLant Biotechnology (Mantel, S. H. and H. Smith, Eds.) Cambridge. : Univ. Press,39-66 .
- 32.- Zarrouk, C.(1966). Contribution a L' Etude done Cyanophycea. Influence de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la Croissance et la Photosynthese de *Spirulina maxima*.Thesis, University of Paris, France,
- 33.- Santillán, C., (1974). Sosa texcoco XIV Convención Nacional del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos, A.C Edo de México, México.
- 34.- Klein, J & F. Wagner, (1983). Methods for the Immobilization of Microbial Cells. In : Appl Biochem Bioeng Ingard, L. B. and E. Katchalskíkatzir Eds. 4: Academic Press. 11-46 pp.
- 35.- Scott, C., (1987). Immobilized cells : a review of recent literature. Enzyme Microb. Technol 9: 69-72.
- 36.- Rehm, H. J., & Reed, G. (1987). Biotechnol, 7a Enzyme Technol. VCH 405-464 pp.

- 37.- Glicksman, M., (1969). Gum Technology in the food Industry. Food Science and Technology. A. series of monographs. Academic Press. N.Y. & London 159-190 pp.
- 38.- Robinson, P., Goulding, K., Mak, A., & Trevan, M., (1986). Factor affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella*. Enzyme Microb. Technol. 8:72-82.
- 39.- Ohlson S., P. O. Larsson & K. Mosbach. (1979). Steroid transformation by living cells immobilized in calcium alginate. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 7: 103-110 .
- 40.- Montes, H., (1989). Deshidrogenación del compuesto "S" de Reichstein por células de *Arthrobacter simplex* inmovilizadas. Tesis Maestría. CINVESTAV. México.
- 41.- Arellano, M. S., García O. B. (1990) Inmovilización de células de *Capsicum chinense* para la producción de capsaicinoides. Tesis de Licenciatura UNAM.
- 42.- Varlop, K. D., & J. Klein, (1981). Formation of spherical chitosan biocatalyst Ionotropic gelation. Biotechnol. Lett., 3(1): 9-14 .

- 43.- Kolot ,F.B. (1981). Microbial carriers strategy selection.
Proces. Biochem. 16 (6):30-46 .
- 44.- Bourrelly, P.(1948). L'Algotheque du Laboratoire de
Cryptogama de museum Paris Mus. Nat. d hist. nat. 14 pp.
Hydrobiol. Supp. 39. Algal Stud. 43 : 86-126 (1970).
- 45.- Iñiguez C., G.(1989) Comunicación Personal.
- 46.- Chevalier., P., & de la Noüe, J. (1985). Efficiency of
immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and
orthophosphate removal from wastewaters. Biotechnol. Lett. 7:
400.
- 47.- Odum, E., P., (1971). Fundamentals of Ecology. Ed. Sanders.
Philadelphia U.S.A. 766 pp.
- 48.- Fiske, C. and Y Subbarow (1980). En: Manual de Procedimientos
en Bioquímica Clínica Ed. IPN. Escuela Nacional de Ciencias
Biológicas. Depto de Bioquímica clínica.México, D, F.
- 49.- APHA (1975). Standard Methods for the Examination of water and
Wastewater,14 th. edition.American Public Health Association
Washington,D.C.

- 50.- APHA (1985). Standard Methods for the Examination of water and wastewater. American Public Health Association Washington, D.C.
- 51.- Lukavsky, J., Komareck, J., Lukavska, A., Ludvick, J., & Pokon, J., (1986). Metabolic activity and cell structure of immobilized algal cells (*Chlorella*, *Scenedesmus*), Arch. Hydrobiol. Suppl. 73 (2): 261-267 .
- 52.- Hulst, A. C., J. Tramper, P. Brodelius, L. & J. O. Eijikenboom, (1987). Immobilized plant cells: respiration and oxygen transfer. Ed Hulst. A.C. 65-75 pp.
- 53.- De la Noüe, J., & Proulx, D. J., (1988). Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan - immobilized *Phormidium*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 29:292-297 .
- 54.- Tyagi, R., Vembu, K., (1990). Wastewater treatment by immobilized cells. Ed. ORO pp 144-152.
- 55.- Tanaka, H., M. Matsumura, M., & Veliky, J.A., (1984). Diffusion Characteristics of substances in Ca-Alginate Gel Beads. Biotechnol. Bioeng 26: 53-58.

- 56.- Gosman, B. & H. R. Jorgen (1986). Oxygen Uptake of Microorganism entrapped in Ca- alginate. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23 : 163-167 .
- 57.- Anderson, G.J., (1986). Immobilized Cell Physiology. In: Process Engineering Aspects of Immobilized Cell System (Webb, C., M.G. Black & B. Atkinson Eds.). The Institution of Chemical Engineers, England. 153-176 pp.
- 58.- Martinsen, A., Skajak-Braek, G., & Smidsrod, O., (1989). Alginate as Immobilization material. Biotech. Bioeng. 33:79-89 .
- 59.- Bidwell, S. G. R., (1979). Plant Physiology. 2nd Ed. Mac Millan Publishing Co. Inc. New York. 259 pp.
- 60.- Becker, E. W. (1981). Algae mass cultivation, production and utilization. Proces Biochem. 16 (5): 10-14 .
- 61.- Kropf, D.L., & R.S. Quatrano (1987). Localization of membrane-associated calcium during development of furoid algae using chlorotetracycline. Planta 171: 158-170.

- 62.- Holmgren, P. R., Hustetter J. R. & Scholes, V. E. (1971). Ultrastructural observation of crosswalls in the blue-green algae *Spirulina major*. *J. Phycol*, 7:309-11.
- 63.- Kolot, F. B. (1981). Microbial carriers strategy selection. *Proc. Biochem.* 16(6): 30-46.
- 64.- Dainty A.L., Goulding, K.H., Robinson, P.K., Simpkins, I., & Trevan, M.D., (1986). *Biotechnol. Bioeng.*, 28: 210-216 .
- 65.- Narshima, D.L.R., Venkataraman, G. S., Duggal, S. K. & Eggum O. (1980). Nutritional quality of the blue-green alga *Spirulina platensis* Geitler, *J. Sci., Food and Agric.*, 33:456-60.
- 66.- Nilsson, K., Mosbach, K., (1984). A general method for entrapment of cells in beaded polymers. *Biotechnol.* 217-131
- 67.- Chevalier, P., & De la Noüe J., (1985). Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb. Technol.*, 7:345-356.
- 68.- De la Noüe, J. & Proulx (1988). Biological tertiary treatment of urban wastewaters by chitosan-immobilized *Phormidium*. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 29: 292-297 pp.

- 69.- Richmond, A., Vonshak, A., & Arands S.,(1980). Environmental limitations in outdoor production of algal biomass. In: Algae Biomass, Shelef, G. and Soeder, CV. J. Eds., Elsevier y North-Holland, Amsterdam 22-272 pp.
- 70.- Tsai Pi Hsin (1980). Mass culture and utilization of *Spirulina platensis* grown on fermented hog manure. Proceeds Intl. Symp. on Biogas. Microalgae and Livestock wastes Taipei. Taiwan, R.O.C.
- 71.- De la Noüe, J., & N. de Pauw. (1988). The Potential of Microalgal Biotechnology: A review of production and uses of microalgae. Biotechnol. Adv. 6: 725-770 .
- 72.- Gilson, C., Thomas, A., & Hawkes, F. (1990). Gelling Mechanism of Alginate beads with and without Immobilized Yeast. Proc. Biochem 104-108 pp.

APENDICE A COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO L-C

Reactivos	g	mililitros para preparar un litro de medio
KNO_3	4	5
K_2HPO_4	4	1
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	3	1
$CaNO_3$	3	1
FeCl	0.15	1
Caldo de tierra*		10

-Esterilizar a 15 lb/pul² durante 15 min.

-Ajustar pH a 9.0

-Adicionar 16.8 g/l de $NaHCO_3$

-* Tomar una cantidad de tierra de jardín que ocupe un volumen de 500ml($\frac{P}{V}$) sin compactar y se afora a un litro con agua de la llave. Se hierve la mezcla durante una hora y se procede a separar por decantación .El sobrenadante se afora a un litro con agua de la llave y se hierve nuevamente por una hora. Se deja reposar.Después de 24 horas se vuelve a hervir una hora más y se conserva en refrigeración a 4^o C.

Adaptado de Bourrelly, P.1984 44

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE B. Composición del medio Zarrouvk

Reactivos	g/l
Na HCO ₃	16.8
K ₂ HPO ₄	0.5
NaNO ₃	2.5
K ₂ SO ₄	1.0
NaCl	1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2
CaCl ₂	0.04
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.01
EDTA	0.08
Solución A ₄	1 ml.
Solución A ₄	
H ₃ BO ₃	2.86
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.81
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.22
CaSO ₄ ·5H ₂ O	0.0798

Zarrouvk, 1966 32