



**Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología**  
Unidad Académica Mazatlán  
Universidad Nacional Autónoma de México



**Eficiencia de coagulantes y floculantes en la remoción de células vegetativas y toxinas de *Gymnodinium catenatum* Graham 1943 (Dinophyceae)**

**TESIS**

**Que para obtener el grado académico de:**

**MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGÍA MARINA)**

**PRESENTA:**

**TOMASA DEL CARMEN CUÉLLAR MARTÍNEZ**

**Directora de Tesis:**

**Dra. Rosalba Alonso Rodríguez**

**Comité Tutorial:**

**Dra. Lourdes Morquecho**

**Dr. Domenico Voltolina**

**Dr. Liberto de Pablo Galán**

**Dr. Jesús Gracia Fadrique**

**Mazatlán Sinaloa, julio de 2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

## *DEDICATORIA*

A mis padres por su amor, su ejemplo de fortaleza y por sus enseñanzas que me acompañaran siempre.

A mis hermanos por ser cada uno como es, porque me han apoyado de diferentes maneras, por sus consejos y ánimos.

A la familia que he decidido conformar con mi esposo, a mi pequeñita que me acompañó durante una etapa de este trabajo y a quien en estos momentos esperamos con mucho amor, ansiedad y felicidad.

A cada uno de ustedes, a quienes amo tanto les dedico este trabajo con el que finalizó una etapa de mi desarrollo profesional y que ha significado mucho en mi vida.



**Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biotoxinas Marinas y Sala de Acuarios de la Unidad Académica Mazatlán, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.**

**Los siguientes proyectos apoyaron la realización de este trabajo de investigación:**

**Proyectos institucionales de la Unidad Académica Mazatlán del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México:**

- **Producción de biotoxinas por microalgas (2008-2011).**
- **Microalgas formadoras de FANs, en sistemas de cultivo y control algal (2012)**

**Recibió apoyo en equipamiento:**

- **Proyecto Regional RLA/7/014 “Designing and Implementing System for Early Warning and Evaluation of the Toxicity of Harmful Algal Blooms in the Caribbean Region Applying Advanced Nuclear Techniques. Radioecotoxicological. Evaluations and Bioassays (ARCAL CVI) de la International Atomic Energy Agency (IAEA).**
- **Proyecto Biomonitorio de metales pesados en sistemas lagunares de Sinaloa. Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación tecnológica (PAPIIT# IN210609) 2010-2011.**

**Asimismo, «Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por el Gobierno de México, a través de la Secretaría de Relaciones Exteriores», en el período de Julio 2011-Julio 2012, No. de Expediente 811.03.06.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología por aceptarme como alumna y a la Unidad Académica Mazatlán, ICMYL, UNAM, por facilitar el uso de las instalaciones para el desarrollo de mi maestría.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores de México, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría, así como al Ministerio de Relaciones Exteriores de El Salvador por la realización de los trámites para la obtención de la beca.

A mi directora de tesis la Dra. Rosalba Alonso, por confiar en mí aún sin conocerme, por su hospitalidad, por brindarme un espacio en su laboratorio, facilitarme los materiales necesarios para mi tesis, por sus sugerencias y consejos para el desarrollo de esta investigación.

A mi comité tutorial por su tiempo y por aceptar ser parte en la orientación y desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Domenico Voltolina, por su buena disposición y tiempo para brindarme las observaciones y sugerencias necesarias para mejorar la investigación y documento de tesis.

A la Dra. Lourdes Morquecho por compartir su conocimiento y brindar sus comentarios en la realización de este trabajo y además por recibirme en el CIBNOR durante una estancia relacionada con el cultivo de dinoflagelados tóxicos. De igual forma a la M. en C. Amada Reyes quien compartió conmigo su experiencia profesional durante dicha estancia.

Al Dr. Federico Páez por las facilidades otorgadas en el uso de equipos para realizar algunos análisis en el laboratorio de Geoquímica Marina y Contaminación Costera, Unidad Académica Mazatlán, ICMYL, UNAM.

Al Dr. Evaristo Méndez del Instituto Tecnológico de Mazatlán por proporcionar la muestras de quitosano utilizadas en este estudio.

Al Dr. Carlos Green Ruiz, del laboratorio de Geoquímica y Sedimentología por proporcionar la arcilla roja y su caracterización.

A la Ing. Rosa María Reyes de la empresa Nacional Química Industrial S. A. de C. V. quien facilitó el policloruro de aluminio utilizado.

A la Sra. Clara Ramírez, por su disponibilidad en la búsqueda y obtención de material bibliográfico.

Al Mat. Germán Ramírez, por su asistencia en el análisis estadístico de los datos, así como por facilitar el uso del equipo de la sala de cómputo.

Al personal de cómputo Carlos Suárez y Herlinda Rojas por su asistencia y amabilidad para facilitar los servicios en la sala de cómputo.

A la Sra. Magali Cordero por facilitar y mediar los trámites ante el posgrado, por su cordialidad y atención.

A la Dra. Gloria Vilaclara, Mtra. Chantal Ruíz, Sra. Guadalupe Godoy, M. en C. Diana Juárez y Sra. Gabriela Almaraz por su buena disposición y apoyo en la realización de trámites del posgrado.

A la M. en C. Jeanette Delgado por enseñarme a cultivar a *Gymnodinium catenatum*, así como a las M. en C. Gladys Tecuapacho, Ruth Pazos y la Ing. Biot. Ana Noriega por sus sugerencias para el buen desarrollo del cultivo.

A la M. en C. Elizabeth Frausto por sus consejos en el mantenimiento de *G. catenatum* y por su orientación en el desarrollo de los experimentos.

A la Ing. Acuic. Sandra Velásquez, Ana María Flores y al Biol. Mar. Edgar Cruz por su gran apoyo durante el escalamiento de los cultivos y la realización de la fase experimental de este trabajo.

A Ing. Biot. Nallely García por su apoyo durante los análisis de toxinas con la prueba ELISA así como con la valoración potenciométrica del quitosano.

A mis padres Adán Cuéllar y María Luisa Martínez y a mis hermanos por su apoyo, sus consejos y alentarme a seguir adelante siempre. A la familia Morán Cuéllar, por su apoyo y por hacerme parte de su hogar.

A mi esposo Edgar Cruz, por su enorme apoyo, por animarme y acompañarme cuando lo he necesitado, además por sus observaciones en la redacción de este documento.

A la familia Ramírez Alonso por su amabilidad y hospitalidad a mi llegada a Mazatlán.

A los que fueron y son compañeros de mi laboratorio, con quien compartimos buenos y malos ratos y por hacer grata mi estancia en el laboratorio y en Mazatlán; Ámbar Yépez, Xóchitl Varela, Ana Noriega, Jorge Bustamante, Vicia Bernal, Jeannethe Delgado, Ruth Pazos, Ana Flores, Gladys Tecuapacho y Nallely García.

## ÍNDICE

Contenido	Página
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 ANTECEDENTES.....	8
3 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA .....	13
4 HIPÓTESIS.....	14
5 OBJETIVOS.....	15
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Cultivo de <i>Gymnodinium catenatum</i> .....	16
6.2 Compuestos utilizados para la remoción de <i>G. catenatum</i> .....	16
6.3 Preparación de coagulantes y floculantes.....	17
6.4 Experimento de remoción de células con coagulantes y floculantes individuales.....	18
6.5 Remoción de células con la combinación de coagulantes y floculantes ..	19
6.6 Remoción de toxinas paralizantes.....	20
6.7 Análisis de toxinas paralizantes .....	21
6.8 Análisis estadístico.....	22
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	24
7.1 Remoción de células de <i>G. catenatum</i> con los coagulantes y floculantes individuales.....	24
7.2 Temperatura y pH registrados durante el experimento de remoción con coagulantes y floculantes individuales.....	33



7.3	Eficiencia de remoción de células de <i>G. catenatum</i> con la combinación de los coagulantes y floculantes.....	34
7.4	Temperatura y pH durante el experimento de remoción con coagulantes y floculantes combinados .....	36
7.5	Selección de la combinación de coagulante y floculante para el experimento de remoción de toxinas paralizantes.....	36
7.6	Remoción de toxinas.....	36
7.7	Temperatura y pH registrados durante el experimento de remoción de toxinas paralizantes.....	40
8	CONCLUSIONES .....	42
9	RECOMENDACIONES.....	43
10	LITERATURA CITADA .....	44
11	APÉNDICES .....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de las toxinas causantes del EPM.....	5
Figura 2. Porcentajes de remoción de células de <i>G. catenatum</i> (1000 céls. mL <sup>-1</sup> ) con los agentes más eficientes (>50%). A) 1000 céls. mL <sup>-1</sup> , B) 2000 céls. mL <sup>-1</sup> , C) 3000 céls. mL <sup>-1</sup> .....	32
Figura 3. Eficiencia de remoción de células de <i>G. catenatum</i> con dosis de 0.1 a 0.7 g L <sup>-1</sup> de hidróxido de calcio.....	34
Figura 4. Eficiencia de remoción de células de <i>G. catenatum</i> con dosis de 0.1 a 0.7 g L <sup>-1</sup> de óxido de calcio.....	35
Figura 5. Eficiencia de remoción de células de <i>G. catenatum</i> (3000 cél. mL <sup>-1</sup> ), utilizando coagulantes y floculantes combinados.....	35
Figura 6. Concentración de saxitoxina (ng mL <sup>-1</sup> ) en los controles. A) sobrenadante, B) flóculos.....	38
Figura 7. Concentración de saxitoxina (ng mL <sup>-1</sup> ) en los tratamientos. A) sobrenadante, B) flóculos.....	39
Figura 8. Mediciones de pH en los controles (A) y en los tratamientos con hidróxido de calcio + quitosano (B), durante el experimento de remoción de toxinas de <i>G. catenatum</i> .....	41

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mitigación de FAN utilizando arcillas flocculantes .....	10
Tabla 2. Coagulantes y flocculantes utilizados para remover a <i>G. catenatum</i> .....	17
Tabla 3. Porcentajes de remoción de células de <i>G. catenatum</i> (R) con los agentes coagulantes y flocculantes menos eficientes (<50%).....	27
Tabla 4. Temperatura y pH registrados durante los experimentos de remoción de células de <i>G. catenatum</i> .....	33
Tabla 5. Temperatura y pH registrados durante el experimento de remoción de células de <i>G. catenatum</i> con coagulantes y flocculantes combinados.....	36
Tabla 6. Temperatura (°C) registrada durante el experimento de remoción de toxinas de <i>G. catenatum</i> .....	41

## RESUMEN

En este estudio, se realizaron experimentos de laboratorio utilizando nueve coagulantes y floculantes (arcilla roja, montmorillonita, óxido e hidróxido de calcio, sulfato de aluminio, quitosano, sílice activada, clinoptilolita y policloruro de aluminio) en tres dosis, con el fin de evaluar y comparar su eficiencia para remover las células del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* en tres concentraciones celulares (1000, 2000 y 3000 cél. mL<sup>-1</sup>). La eficiencia de remoción se determinó mediante recuento de células. Bajo el criterio de máxima eficiencia de remoción con la dosis mínima, se seleccionaron tres agentes coagulantes y floculantes combinándose en parejas, para evaluar nuevamente su eficiencia de remoción. Finalmente se determinó la modificación en la concentración de las toxinas, tomando muestras del sobrenadante y del flóculo a las 0, 3, 12, 24, 48, 72 y 96 horas utilizando la combinación binaria de los coagulantes y floculantes más efectivos para remover las células del dinoflagelado. Se realizaron mediciones de temperatura y pH al inicio y al final de los experimentos. La concentración de toxinas fue determinada utilizando la prueba ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Los valores de eficiencia de remoción más bajos (<50%) se obtuvieron con la montmorillonita, arcilla roja, clinoptilolita y sílice activada y los mayores (>50%) resultaron al adicionar el sulfato de aluminio, óxido e hidróxido de calcio, quitosano y policloruro de aluminio (PAC). En el caso del sulfato de aluminio y el PAC la eficiencia de remoción decreció al incrementar el número de células (2000 -3000 cél. mL<sup>-1</sup>) y se observó la formación de flóculos de baja densidad. La eficiencia de remoción con las combinaciones (óxido de calcio-quitosano, hidróxido de calcio-quitosano, óxido de calcio-hidróxido de calcio) fue del 95 - 99%. La concentración más alta de toxinas (9.9 ng mL<sup>-1</sup>) fue determinada tres horas después de la adición de la combinación seleccionada (óxido de calcio-quitosano). La concentración de toxinas en el líquido sobrenadante y en los flóculos no disminuyó significativamente por efecto del tiempo (p=0.4 en ambos casos) tanto en los tratamientos como en los controles.

## ABSTRACT

In this study, laboratory experiments were conducted using nine coagulants and flocculants (red clay, montmorillonite, calcium oxide, calcium hydroxide, aluminum sulfate, chitosan, activated silica, clinoptilolite, and polyaluminum chloride) in three doses, to examine and compare their efficiency to remove the cells of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum* (1000, 2000, 3000 cell. mL<sup>-1</sup>). The removal efficiency was determined by cell count. With the criterion of maximum removal efficiency obtained with the lowest dose, three coagulants and flocculants were selected combining in pairs to evaluate its removal efficiency. Finally the toxin modifications were evaluated in the supernatant and flocs at 0, 3, 12, 24, 48, 72 and 96 hours, using the binary combination of more effective coagulants and flocculants to remove the dinoflagellate. Temperature and pH values were measured at the beginning and at the end of the experiments. The toxin concentration was determined using the ELISA test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). The lowest removal efficiencies (<50%) were obtained with montmorillonite, red clay, clinoptilolite and activated silica and the highest values (> 50%) were determined adding aluminum sulfate, calcium oxide, calcium hydroxide, chitosan and polyaluminum chloride (PAC). In the case of aluminum sulfate and PAC, the removal efficiency declined by increasing the number of cells (2000 -3000 cell. mL<sup>-1</sup>), and it was observed the formation of low density flocs. Removal efficiencies with combinations (calcium oxide-chitosan, calcium hydroxide-chitosan, calcium oxide-calcium hydroxide) were 95 – 99%. The highest concentration of toxins (9.9 ng mL<sup>-1</sup>) was determined three hours after the addition of the selected combination (calcium oxide – chitosan). The toxin concentration in the supernatant and the flocs were not significantly decreased by time effect (p=0.4 in both cases) in the treatments and controls.

# 1 INTRODUCCIÓN

El fitoplancton está constituido por microalgas, las cuales son organismos fotosintéticos adaptados a pasar una parte o la totalidad de su vida suspendidos en el mar, lagos, estanques y ríos. Las microalgas son los principales productores primarios en el océano y en aguas interiores y son el alimento de moluscos bivalvos filtradores, peces planctívoros, larvas de peces y crustáceos (Reynolds, 2006).

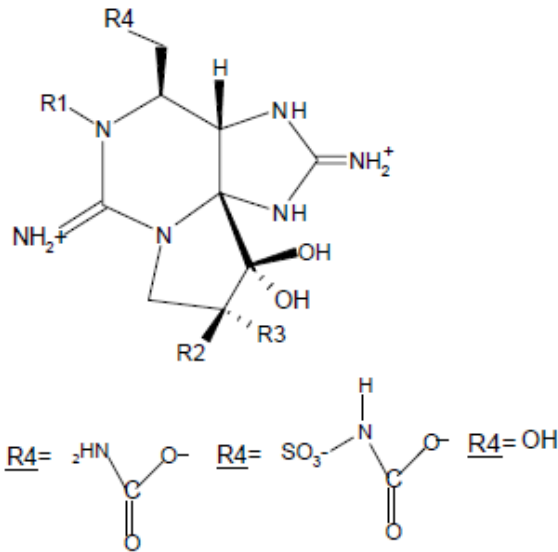
Las microalgas pueden incrementar su abundancia y llegar a ser dominantes en la comunidad planctónica o bentónica, lo que se conoce como florecimiento algal. Cuando, por diversos factores se presentan elevadas concentraciones de microalgas, la coloración del agua puede cambiar a un tono rojizo, comúnmente denominado marea roja, aunque pueden presentarse otras coloraciones como verde, marrón, amarillo, azul o lechoso (Hallegraeff, 2002; Anderson, 2003). La Comisión Oceanográfica Intergubernamental (COI), adoptó el término de floraciones algales nocivas o florecimientos algales nocivos (FAN), para designar la aparición de un grupo heterogéneo de microalgas, que pueden causar efectos adversos sobre la salud humana, fauna marina y actividades productivas como la acuicultura y turismo en la zona costera. El término de FAN es utilizado aunque las concentraciones celulares de las microalgas no sean muy elevadas, siempre y cuando su aparición conlleve un efecto nocivo (Reguera, 2002).

Los efectos nocivos que pueden provocar las microalgas durante un florecimiento algal son: a) muerte de peces por asfixia debido al daño u obstrucción de las branquias; b) generación de condiciones hipóxicas o anóxicas por la respiración celular y/o respiración bacteriana, ya que al morir las microalgas los procesos de descomposición agotan el oxígeno del agua, provocando la muerte de peces y de invertebrados marinos; c) producción de potentes toxinas que pueden ser transportadas a través de las redes tróficas, causando intoxicaciones e incluso la muerte a los seres humanos (principalmente por el consumo de mariscos),

además de mortandad de peces, aves marinas y mamíferos pelágicos (Hallegraeff, 2002; FAO, 2005).

Las estimaciones sugieren que se conocen aproximadamente 5000 especies de microalgas marinas (Tett y Barton, 1995) de las cuales, alrededor de 110 son causantes de FAN, 78 pertenecen al grupo de los dinoflagelados y 65 producen potentes toxinas (Moestrup et al., 2012). De acuerdo a los síntomas observados en las intoxicaciones humanas, los dinoflagelados pueden ser productores de toxinas de tipo paralizante, diarreicas, neurotóxicas, azaspirácidos y ciguatoxinas (Daranas et al., 2011).

El envenenamiento paralizante de los mariscos (EPM) es provocado por toxinas producidas por dinoflagelados marinos como *Alexandrium* spp., *Gymnodinium catenatum* y *Pyrodinium bahamense*; es probablemente el más conocido y de significancia para la salud pública. Las toxinas paralizantes hidrofílicas son colectivamente conocidas como saxitoxinas y constituyen una familia de neurotoxinas solubles en agua, lábiles bajo condiciones de pH alcalinos. Son de las toxinas más potentes conocidas y hasta ahora se han descrito más de 57 análogos (Wiese et al., 2010). Su actividad tóxica se debe a la inhibición del transporte de iones  $\text{Na}^+$  a través de las membranas excitables, interrumpiendo la transmisión de señales neuromusculares y causando severos daños, parálisis y en casos graves, la muerte. Las saxitoxinas se clasifican en tres grupos de acuerdo a su potencia tóxica (Figura 1), las toxinas decarbamoiladas o decarbamatos poseen una potencia intermedia entre las toxinas carbamoiladas (altamente tóxicas) y las sulfocarbamoiladas (Zaccaroni y Scaravelli, 2008).



R1	R2	R3	Toxinas carbamatos	Toxinas N-sulfocarbamatos	Toxinas decarbamatos
H	H	H	STX	B1	dcSTX
H	H	OSO <sub>3</sub>	GTX2	C1	dcGTX2
H	OSO <sub>3</sub>	H	GTX3	C2	dcGTX3
OH	H	H	NEO	B2 (GTX6)	dcNEO
OH	H	OSO <sub>3</sub>	GTX1	C3	dcGTX1
OH	OSO <sub>3</sub>	H	GTX4	C4	dcGTX4

**Figura 1. Estructura química de las toxinas causantes del EPM. Fuentes: Aversano et al., 2005; Zaccaroni y Scaravelli, 2008.**

Debido a los impactos de los florecimientos algales nocivos sobre la salud pública, los ecosistemas y la economía, actualmente se desarrollan diversas investigaciones para su manejo, incluyendo estrategias de atención indirecta que se focalizan en la prevención (reducción de la entrada de nutrientes al ecosistema) y mitigación de los impactos (sistemas de alerta temprana y monitoreo de toxinas), así como estrategias directas que tratan de eliminar los organismos causantes de la columna de agua o por lo menos reducir al mínimo su proliferación. Algunos ejemplos de control directo incluyen el uso de productos alguicidas, la adición de arcillas y floculantes químicos, filtros o pantallas para remover las células y la adición de agentes biológicos como virus, bacterias o parásitos patógenos que pueden ser letales para las especies formadoras de FAN (Anderson et al., 2004).



Las microalgas tanto de agua dulce como marina, poseen una carga superficial negativa, que se atribuye a la presencia de moléculas orgánicas (aminoácidos, proteínas, lípidos y carbohidratos) en la superficie de la célula (Yu et al., 1994). En el control de los FAN, la carga superficial negativa de las microalgas favorece el uso de coagulantes y floculantes que generan cargas positivas neutralizando la carga electrostática de las células algales.

Uno de los métodos más prometedores para el control de los florecimientos algales, es el uso de arcillas, cuya capacidad para la remoción de las microalgas se basa en los procesos de floculación y sedimentación. La superficie de las partículas de arcilla presenta una carga negativa y cuando estas partículas se dispersan en agua de mar, ocurre una neutralización de cargas disminuyendo las fuerzas repulsivas y predominando las fuerzas de atracción, por lo cual la repetida colisión y agregación conlleva a la formación de flóculos. Los flóculos interactúan con las células algales capturándolas y sedimentando con estas (Sengco et al., 2001).

Los mecanismos de coagulación-floculación son utilizados en el tratamiento de aguas residuales y agua potable, donde es necesario remover las partículas coloidales del agua. Dichas partículas se encuentran estabilizadas por cargas eléctricas negativas sobre su superficie, lo que hace que se repelan entre sí, impidiendo su choque y agregación con partículas adyacentes, evitando de esta manera la sedimentación. La coagulación es un proceso en el que las partículas son desestabilizadas mediante la neutralización de las fuerzas que las mantienen separadas, que se logra mediante la adición de un coagulante que reduce la repulsión electrostática entre las partículas, de modo que puedan aglomerarse, al adicionar un floculante o si el coagulante también actúa como floculante, éste reúne las partículas floculadas en una red, formando puentes de una superficie a otra, enlazando las partículas individuales en aglomerados (Kemmer y McCallion, 1989; Tchobanoglous y Burton, 1996).

Los coagulantes se clasifican en inorgánicos y orgánicos. Los inorgánicos incluyen la cal, las sales de aluminio y de hierro, estas pueden ser polimerizadas (cloruro de polialuminio, sulfato y cloruro poliférrico) o simples (sulfato de alúmina, aluminato sódico, cloruro de aluminio, cloruro férrico, sulfato ferroso y férrico). Los coagulantes orgánicos a su vez se clasifican de acuerdo a su origen, en naturales o sintéticos. Los de origen natural pueden ser extraídos de microorganismos, plantas, algas o animales, como es el caso de los derivados del almidón, celulosa, alginatos, goma guar y quitosano. Los de origen sintético son conocidos como polielectrolitos y pueden ser aniónicos (ácido poliacrílico, polimetacrilato, ácido poliglutámico), catiónicos (polietilamina, polivinilamina, polietileniminas) o neutros (poliacrilamidas) (Aguilar et al., 2002).

Algunos coagulantes pueden actuar al mismo tiempo como floculantes, tal es el caso del sulfato de aluminio ( $\text{Al}_2(\text{SO}_4) \cdot 14\text{H}_2\text{O}$ ) que es comúnmente utilizado en el tratamiento de aguas residuales (Kemmer y McCallion, 1989) y el quitosano que puede actuar como un coagulante primario en aguas con alta turbidez y alcalinidad y como un floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas (Laréz, 2006). Este es un biopolímero obtenido de la desacetilación de la quitina (pérdida del grupo acetilo y sustitución del grupo amida del carbono 2, por un grupo amino) que es componente estructural de artrópodos, anélidos, moluscos y celenterados (Pastor, 2004); su mecanismo de acción incluye la neutralización de cargas de las partículas, adsorción y formación de puentes que conducen a la formación de agregados fácilmente precipitables. El quitosano es una alternativa en el tratamiento de agua potable, debido a su baja toxicidad además de ser biodegradable (Renault et al., 2009), posee un uso prometedor en la remoción de metales pesados en aguas contaminadas (Bassi et al., 2000) y también ha sido utilizado para remover microalgas marinas, salobres (Morales 1985; Divakaran y Pillai, 2002) y de agua dulce (Romero y Ferran, 2001; Wang et al., 2012).

## 2 ANTECEDENTES

Para el control de los FAN se han realizado ensayos experimentales con métodos biológicos, físicos y químicos. Las técnicas biológicas se basan en el pastoreo observado en las poblaciones naturales, así como en el uso de bacterias y virus (Secher, 2009). En esta línea de investigación, Hare et al. (2005) encontraron una bacteria con la habilidad de controlar el crecimiento y abundancia de dinoflagelados. Por otro lado, Jeong et al. (2008) utilizaron un protozoo para reducir la población de *Cochlodinium polykrikoides*, sugiriendo su uso en áreas pequeñas que sean afectadas por florecimientos de este dinoflagelado.

Los métodos físicos que han sido estudiados, consisten en la generación de burbujas que se adhieren a las microalgas haciéndolas flotar para su posterior colecta, este es el mecanismo de flotación por aire disuelto (FAD), aunque para utilizar este método se requiere primero la adición de un coagulante. Otros métodos físicos consisten en el uso de ondas ultrasónicas y la electrólisis de las células (Secher, 2009).

En el caso del control químico, el sulfato de cobre ha sido utilizado por su efecto alguicida. En 1957 este producto fue esparcido en un área de 41.5 km<sup>2</sup> en las costas de Florida para controlar un florecimiento de *Gymnodinium breve*. Sin embargo, este método resultó muy costoso, tuvo un efecto de corta duración y fue letal para algunos organismos marinos (Rounsefell y Evans, 1958). Asimismo, el hidróxido de magnesio, que actúa como un alguicida, inhibe el movimiento y promueve la ruptura y agregación de células, ha sido usado para controlar las poblaciones de *Cochlodinium polykrikoides* (Maeda et al., 2009).

También se han realizado pruebas a escala experimental, con un biosurfactante aislado de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, que con una dosis de 5 µg mL<sup>-1</sup> provocó la disminución de la eficiencia de la fotosíntesis y de la viabilidad de las células, mientras que 50 µg mL<sup>-1</sup> resultaron ser letales para las microalgas

(Gustafson et al., 2009). Lee et al. (2008) utilizaron un biosurfactante soforolípido aislado de *Candida bombicola* y combinado con arcilla amarilla, obteniendo el 95% de remoción de *Cochlodinium* sp.

En Australia, Estados Unidos, Suecia, Japón y Corea del Sur se han utilizado arcillas flocculantes para el control de FAN. En países de Asia, las arcillas son usadas en cultivos de peces, para controlar los florecimientos de *Cochlodinium* spp. (Sengco y Anderson, 2004). Asimismo, se han llevado a cabo ensayos experimentales que indican que la eficiencia de remoción de células depende del tipo de arcilla y de la dosis utilizada, así como de la concentración de las células algales y de la especie de microalga (Sengco et al., 2001). Los resultados de algunos ensayos se presentan en la Tabla 1.

También se ha utilizado la combinación de sedimentos con coagulantes flocculantes, para remover microalgas marinas y de agua dulce (Pan et al., 2011a). Por ejemplo, *Amphidinium carterae* y *Chlorella* sp. fueron removidos eficientemente (80%), con la combinación de arena de silicio, suelo y arena de playa local modificadas con quitosano y policloruro de aluminio (Pan et al., 2011b), mientras que la combinación de sedimentos con cal apagada ( $\text{Ca(OH)}_2$ ), cal viva ( $\text{CaO}$ ), lodos de aluminio y bentonita con zeolita, removieron más del 70% de *C. polykrikoides* (Song et al., 2010). El quitosano ha sido utilizado especialmente para remover microalgas de agua dulce (Romero y Ferran, 2001; Ahmad, 2011), aunque también se ha probado su efectividad con especies de aguas salobres (Divakaran y Pillai, 2002) y marinas (Morales et al., 1985).

**Tabla 1. Mitigación de FAN utilizando arcillas flocculantes**

Tipo de arcilla	Especies algales	Remoción celular %	Referencias
- 25 tipos de arcillas y arcilla loess. Las más eficaces fueron la montmorillonita, bentonita y arcilla fosfática	<i>Karenia brevis</i> <i>Aureococcus anophagefferens</i>	>90% y <40%	Sengco et al. (2001)
- Arcilla fosfática	<i>K. brevis</i>	58%	Pierce et al. (2004)
- Arcilla amarilla	<i>C. polykrikoides</i> <i>A. tamarensis</i> <i>Scrippsiella trochoidea</i>	78, 84, y 83%	Sun et al. (2004)
- Arcilla fosfática+ 5 ppm de PAC	<i>Prymnesium parvum</i>	100%	Hagström y Gráneli (2005)
- Arcilla roja, caolín montmorillonita	<i>C. polykrikoides</i> <i>G. catenatum</i>	>80% y <50%	Frausto (2009)
- Arcilla de bola (ball clay)	<i>P. bahamense</i> <i>Akashiwo sanguinea</i> <i>Amphidinium carterae</i> <i>Pyrophacus horologium</i> <i>Chattonella marina</i> <i>Alexandrium sp.</i>	99% para <i>P. bahamense</i> y < 70% para las demás especies	Padilla et al. (2010)

Por otro lado, se han realizado experimentos en el laboratorio para estudiar la capacidad de las arcillas de remover toxinas disueltas gracias a su propiedad de adsorción. Esto se ha comprobado con montmorillonita sódica y cálcica, caolín, caolinita, sedimentos marinos y de agua dulce, con los cuales se obtuvo una remoción mayor al 50% de saxitoxina (Burns et al., 2009).

En otro estudio Hagström y Gráneli (2005), utilizaron 4 g L<sup>-1</sup> de arcilla fosfática y PAC (5 ppm) para remover las células y toxinas de *P. parvum* en cultivos con diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo, obtuvieron el 100% de remoción de células 72 horas después de la adición de la arcilla y el PAC. La toxicidad se

incrementó con la sedimentación total de las células hacia el final del experimento, lo cual fue atribuido al estrés fisiológico. No se detectaron toxinas en los sedimentos aún cuando más del 50% de células habían sedimentado, los autores sugirieron que las toxinas fueron adsorbidas por los sedimentos y degradadas por las bacterias.

Sengco et al. (2005) determinaron la efectividad de bentonita, ilita y caolín para la remoción de *P. parvum*: obtuvieron baja eficiencia de remoción (17.5%, 7.5% y 0% respectivamente), y además observaron que en cultivos con deficiencia de nitrógeno la concentración de toxinas en los flóculos se incrementó a las 2.5 horas, tiempo en el cual ocurrió la sedimentación de las células.

Lewis et al. (2003), evaluaron la toxicidad de los sedimentos para dos especies de anfípodos, una especie de pez y camarón en estado larval, al adicionar arcilla fosfática combinada con PAC para remover a *Karenia brevis*, determinando que la mezcla utilizada no modifica la toxicidad de las células del dinoflagelado, y que la adición de arcilla y PAC no redujo la concentración de las toxinas.

Alrededor del mundo, los FAN se han asociado con impactos en la salud humana y daños en los ecosistemas, así como con pérdidas económicas en la acuicultura, pesquerías y turismo. En la costa del Pacífico existe un registro bibliográfico de alrededor de 175 florecimientos algales (Gárate et al., 2008), de acuerdo al cual hasta el año 2000 se contabilizaban aproximadamente 500 casos de envenenamiento en humanos, con 20 muertes asociadas a florecimientos tóxicos, así como numerosos casos de mortandad de peces, aves marinas, mamíferos marinos y tortugas (Ochoa, 2003).

En el litoral Pacífico de México, todos los casos de intoxicación y decesos en humanos, se asocian al consumo de ostras, mejillones o almejas contaminadas con toxinas paralizantes, producidas por *P. bahamense* en el sureste de México o por *G. catenatum* especialmente en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, sitio

considerado centro de expansión de EPM, a partir del cual las microalgas son llevadas hacia el sur por la corriente de California (Ochoa et al., 2002).

En la bahía de Mazatlán, desde 1979 se identificó a *G. catenatum* como causante de cuatro FAN. En ese año se registró la muerte de tres individuos por intoxicación con toxinas paralizantes (Mee et al., 1986) y en 1988 10 personas sufrieron de este tipo de intoxicación (Cortés y Núñez, 1992). Además *G. catenatum* se encontró entre las especies causantes de marea roja en los años 1997 y 2000 (Cortés y Alonso, 1997; Cortés y Gómez, 2001).

Acevedo et al. (2006), realizaron un estudio sobre la presencia de toxinas paralizantes durante un año (febrero 2003 a enero 2004), siendo *G. catenatum* la especie productora de este tipo de toxinas. En el 2006 (abril-mayo), ocurrieron tres eventos de marea roja, las principales especies involucradas fueron *Chattonella marina* y *C. cf. ovata*, a las cuales se atribuyó la mortandad de peces en algunas playas de Sinaloa, mientras que *G. catenatum* estuvo presente durante este período en bajas concentraciones celulares (Cortés et al., 2006).

Asimismo en el estado de Sinaloa, la camaronicultura se ha visto afectada por los florecimientos de *G. catenatum* que han causado la muerte de nauplios y adultos del camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Gárate et al., 2002; Alonso y Páez, 2003; Alonso et al., 2004). En ensayos de laboratorio, juveniles y adultos de *L. vannamei* inyectados con diferentes dosis de toxinas producidas por *G. catenatum*, presentaron daños en tejidos del cerebro y corazón, parálisis en los pereiópodos, desequilibrio y espasmos abdominales (Pérez et al., 2008). Además, se han encontrado diferencias significativas en la tasa de supervivencia, porcentaje de alimentación y aumento de peso en camarones expuestos al dinoflagelado (Pérez et al., 2009). Pazos (2011) señaló que el principal medio de exposición del camarón a las toxinas paralizantes es la fase disuelta, en la cual se encuentran las toxinas hidrofílicas producidas por el dinoflagelado.

### 3 JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA

Se ha evidenciado que los florecimientos algales nocivos se han incrementado en intensidad, duración y distribución geográfica, durante las últimas décadas, lo que ha conducido al desarrollo de estrategias de mitigación y control algal. Para dilucidar el mecanismo de acción de las posibles estrategias de control directo se desarrollan ensayos en el laboratorio, los resultados varían de acuerdo a la especie de microalga, así como del agente coagulante y floculante. *Gymnodinium catenatum* es un dinoflagelado tóxico causante de florecimientos algales nocivos en el Pacífico Mexicano y afecta las actividades acuícolas en Sinaloa. La presente investigación contribuye con información sobre la efectividad de agentes coagulantes y floculantes en la remoción de las células vegetativas y en la modificación de la concentración de toxinas disueltas producidas por *G. catenatum*.



## 4 HIPÓTESIS

Las microalgas poseen una carga eléctrica superficial negativa debido a la presencia de moléculas orgánicas en su superficie. Algunos agentes coagulantes y floculantes actúan sobre las partículas cargadas negativamente neutralizando las fuerzas que las mantienen separadas, favoreciendo su agregación y sedimentación. Por tanto, al aplicar coagulantes y floculantes en un cultivo del dinoflagelado *Gymnodinium catenatum*, se espera que estos promuevan su agregación y sedimentación.

Se espera que la sedimentación de las microalgas promovida por agentes coagulantes y floculantes provoque un estrés fisiológico en las células algales, y que su respuesta consista en la liberación de toxinas al medio, por lo cual es de esperar que al adicionar los coagulantes y floculantes a un cultivo de *G. catenatum* se incremente la concentración de toxinas disueltas en el agua y en los flóculos formados.

## 5 OBJETIVOS

### General

Evaluar la capacidad de remoción de células vegetativas de *Gymnodinium catenatum* y de sus toxinas disueltas con agentes coagulantes y floculantes.

### Específicos

Estimar y comparar la eficiencia de remoción de diferentes concentraciones de *Gymnodinium catenatum* mediante la aplicación de tres dosis de nueve coagulantes y floculantes.

Evaluar la eficiencia de remoción usando combinaciones binarias de tres coagulantes y floculantes seleccionados por su eficiencia.

Determinar si la combinación del coagulante y floculante más eficiente para remover las células del dinoflagelado, modifica la concentración de toxinas disueltas en el líquido sobrenadante y si existe alguna diferencia con respecto a los flóculos formados.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cultivo de *Gymnodinium catenatum***

La cepa del dinoflagelado (GCMQ-2) usada en este trabajo es nativa de la Bahía de Mazatlán, se estableció a partir de la germinación de quistes durante un FAN en el año 2000 y forma parte del acervo de la Colección de Dinoflagelados Marinos (CODIMAR) del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. Para su cultivo se utilizó el medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962; Guillard, 1975) enriquecido con selenio, preparado como se describe en el Apéndice A, usando agua de mar con una salinidad de 35. Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de 23 a 25 °C y fotoperiodo de luz y oscuridad 12:12 h.

El escalamiento del cultivo se realizó cada catorce días, iniciando con un inóculo en recipientes de plástico para cultivo de tejidos de 50 mL. Cuando se obtuvo un inóculo denso (identificado por el color y turbidez del medio de cultivo), se transfirió a un matraz de 125 mL, al cual se agregó medio fresco dejando dos tercios del volumen del matraz con aire. Al obtener nuevamente un inóculo denso, se transfirió a un matraz de mayor volumen en una proporción de 50% medio de cultivo y 50% de inóculo hasta completar un volumen de 4 L. Para realizar los diferentes experimentos se utilizó el cultivo en fase exponencial (día 14), determinada a través de la curva de crecimiento del dinoflagelado.

### **6.2 Compuestos utilizados para la remoción de *G. catenatum***

Para explorar la eficiencia de remoción de las células de *G. catenatum* se utilizaron las dosis referidas en la literatura como eficaces para remover a diferentes especies de microalgas. Los agentes coagulantes y floculantes utilizados fueron seleccionados por sus antecedentes en la remoción de microalgas, por su uso en el tratamiento de aguas y por su disponibilidad (Tabla 2).

En el Apéndice B se presentan las características disponibles de algunos de los coagulantes y floculantes que se utilizaron.

**Tabla 2. Coagulantes y floculantes utilizados para remover a *G. catenatum*.**

No.	Coagulantes y floculantes	Dosis g L <sup>-1</sup>	Referencia
1	Montmorillonita	1.5, 2.0, 2.5	Frausto (2009)
2	Arcilla roja	1.5, 2.0, 2.5	Frausto (2009)
3	Hidróxido de calcio Ca(OH) <sub>2</sub>	0.8, 1.7, 2.4	Song et al. (2010)
4	Sulfato de aluminio Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0.5, 1.0, 1.5	Sengco et al. (2001)
5	Óxido de calcio	0.8, 1.6, 2.4	Song et al. (2010)
6	Quitosano	2.5 x10 <sup>-2</sup> , 5 x10 <sup>-2</sup> , 7.5 x10 <sup>-2</sup>	Romero y Ferrán (2001)
7	Sílice activada	2. 5x10 <sup>-3</sup> , 5x10 <sup>-3</sup> , 7. 5x10 <sup>-3</sup>	*
8	Clinoptilolita (zeolita)	0.5, 1.0, 1.5	Sengco et al. (2001)
9	Policloruro de aluminio **	2. 5x10 <sup>-2</sup> , 5x10 <sup>-2</sup> , 7. 5x10 <sup>-2</sup>	Sengco et al. (2001)

\* No existen antecedentes documentados de su uso para la remoción de microalgas.

### 6.3 Preparación de coagulantes y floculantes

Algunos coagulantes y floculantes requirieron un proceso de disolución previo a su adición. En los casos donde no se especifica un tratamiento previo, los agentes fueron aplicados directamente, en forma sólida.

El quitosano fue obtenido por la acción de un medio alcalino concentrado sobre la quitina a temperaturas superiores a 60 °C (Pastor, 2004) y fue proporcionado por el Instituto Tecnológico de Mazatlán. La solución stock de 10 g L<sup>-1</sup> de quitosano fue preparada por disolución en ácido acético 1% (v/v, pH = 3.8), que se mezcló a 150 rpm durante 24 h (Lertsutthiwong et al., 2009). Como parte de su caracterización se obtuvo el porcentaje de grupos amino del quitosano siendo de 44.7 % (Apéndice C), el cual se determinó por titulación potenciométrica, disolviendo 0.5 g de quitosano en ácido clorhídrico 0.3 M, titulando la solución con hidróxido de sodio 0.1 M valorada previamente con biftalato de potasio como

patrón primario. Se obtuvo una curva de titulación con dos puntos de inflexión, cuyos valores se establecieron según el criterio de la primera derivada, dichos puntos de inflexión corresponden a la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos amino del quitosano. Además se determinó el peso molecular que fue de  $1.5 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$  obtenido a través del método de viscosimetría utilizando un viscosímetro capilar de Ostwald. Las concentraciones de quitosano utilizadas fueron de  $1.0 \times 10^{-3}$ ,  $8.0 \times 10^{-4}$ ,  $6.6 \times 10^{-4}$ ,  $5.7 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$  siendo disueltas en una mezcla de ácido acético 0.1 M y cloruro de sodio 0.2 M. Se determinó el tiempo de caída de la disolución polimérica y se calculó el peso molecular promedio viscoso (Parada et al., 2004).

La calidad del hidróxido y óxido de calcio, así como el sulfato de aluminio fue grado reactivo. El óxido de silicio grado reactivo fue activado de acuerdo a Ramírez (2006), con ácido sulfúrico para obtener la sílice activada. El policloruro de aluminio fue proporcionado por la empresa Nacional Química Industrial, con un contenido de 12.2 - 12.5% de aluminio y densidad de  $1.3 \text{ g/cm}^3$ , se diluyó en agua destilada para ser utilizado en los experimentos en las dosis requeridas.

#### **6.4 Experimento de remoción de células con coagulantes y floculantes individuales**

Los experimentos para la remoción de células se realizaron en triplicado, con tres concentraciones celulares ( $1000$ ,  $2000$ ,  $3000 \text{ céls. mL}^{-1}$  aproximadamente) usando como controles, igualmente en triplicado, suspensiones de células en agua de mar sin coagulantes y floculantes. El procedimiento para el experimento se detalla a continuación y se basa en la metodología descrita por Sengco et al. (2001):

- En recipientes plásticos (Tereftalato de polietileno, PET) de 110 mL se adicionaron 100 mL de agua de mar con cada concentración del dinoflagelado.
- Se agregó el agente coagulante y floculante de acuerdo a las dosis especificadas en la tabla 2.

- Se agitó tres veces por inversión.
- Transcurridas 3 horas (tiempo que se consideró necesario para que ocurriera la coagulación-floculación de las células), el líquido sobrenadante fue cuidadosamente decantado y transferido a recipientes plásticos, fijándolo con solución de lugol al 5% (Boltovskoy, 1995). Posteriormente se determinó por triplicado la concentración celular usando un microscopio invertido Nikon (Eclipse TS 100) y una cámara de conteo de células tipo Sedgewick-Rafter (Sun et al., 2004).
- Para el cálculo de la eficiencia de remoción de células se utilizó la siguiente fórmula (Sengco et al., 2001):

$$R (\%)= 100 (1- (CT/CC))$$

**Donde CT y CC son los números medios de células presentes en tratamiento y control respectivamente.**

Con el fin de verificar las condiciones en que se desarrolló el experimento se realizaron mediciones de temperatura y pH con una sonda multiparámetro (YSI 63). Las mediciones se realizaron en los controles y tratamientos al inicio y al final del experimento. En el caso de los tratamientos se consideró la medida inicial antes de adicionar a los agentes coagulantes y floculantes.

### **6.5 Remoción de células con la combinación de coagulantes y floculantes**

Entre los nueve agentes coagulantes y floculantes usados en la primera serie de pruebas se seleccionaron los tres que dieron los resultados mejores, después de evaluar mediante una prueba exploratoria la dosis necesaria para obtener la mejor remoción.

En estos experimentos adicionales se aplicó la metodología del apartado anterior, aunque en este caso se usaron tubos de ensayo de 70 mL, con 50 mL de agua de mar y  $\sim 3000$  céls.  $\text{mL}^{-1}$  del dinoflagelado, adicionando las concentraciones previstas de cada producto, en duplicado en cada caso.

Los coagulantes y floculantes seleccionados se combinaron en grupos de dos y se realizaron pruebas de eficiencia de remoción con el procedimiento descrito en la sección anterior, utilizando  $3000 \text{ cél mL}^{-1}$  y cinco repeticiones. Finalmente, con los resultados de estas pruebas se eligió la combinación que presentó la mayor eficiencia de remoción.

## **6.6 Remoción de toxinas paralizantes**

La prueba para determinar la remoción de toxinas, con la combinación que dio el mejor resultado de remoción de células, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito a continuación:

- Se usaron recipientes de tereftalato de polietileno de 110 mL con 100 mL de agua de mar adicionados con la concentración correspondiente de dinoflagelados ( $3000 \text{ cél mL}^{-1}$ ), en cinco repeticiones.
- Después de obtener una muestra para determinar la concentración inicial de toxinas, se adicionó la combinación de coagulante y floculante designada a través de las pruebas anteriores. Se utilizaron como controles igualmente con cinco repeticiones, suspensiones de células en agua de mar sin la adición de coagulantes y floculantes.
- La duración del experimento fue de 96 horas, y las muestras para los análisis de toxinas presentes en el líquido sobrenadante y el flóculo producido se colectaron después de 0, 3, 12, 24, 48, 72 y 96 horas desde el inicio de esta serie de experimentos. La separación de las fases de sobrenadante y flóculo tanto en tratamientos como controles se determinó de forma visual correspondiendo aproximadamente a 60 ml para el sobrenadante y 40 ml para los flóculos.

## 6.7 Análisis de toxinas paralizantes

Las toxinas presentes en el líquido sobrenadante y en los flóculos sedimentados fueron analizadas después de separar cada fase por decantación, que se preservó en congelación (-15 °C). La concentración de toxinas presentes en cada fase se determinó con la prueba ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), utilizando muestras compuestas, las cuales se formaron agrupando cinco muestras de manera proporcional, obteniendo un volumen final de 300 µL. Para este análisis se trabajó con una dilución de 1:500 y la metodología en la prueba ELISA fue la indicada por el fabricante (Abraxis LLC, Estados Unidos, Lote No. 11J8140, caducidad agosto/2012) que brevemente consiste en la secuencia siguiente:

En los pocillos de la placa ELISA se adicionaron en triplicado 50 µL de seis soluciones estándar de saxitoxina para agua de mar (0, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40 ng mL<sup>-1</sup>) o de la muestra correspondiente (sobrenadante o flóculo), en este caso, con dos repeticiones. Posteriormente se agregó la misma cantidad de enzima conjugada y de solución anticuerpo, los pocillos fueron cubiertos con parafilm y el contenido se mezcló con movimientos circulares rápidos, incubándose por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron cuatro lavados de los pocillos utilizando 300 µL de solución buffer de lavado, se añadieron a cada uno 100 µL de solución substrato y se incubó nuevamente por 30 minutos en la oscuridad, antes de agregar la solución stop (100 µL).

Finalmente en un lector de placa ELISA (Bio-Teck Instruments EL307C) se midió la absorbancia a 450 nm. La cuantificación de las toxinas se basó en las curvas de calibración de la relación entre la absorbancia relativa y la concentración de toxinas usando los seis estándares incluidos en la prueba ELISA. El límite de detección para saxitoxina fue de 0.015 ng mL<sup>-1</sup>. La reactividad cruzada determinada por el fabricante fue para STX (100%), decarbamoil STX (29%), GTX



2, 3 (23%), GTX 5 (23%), Sulfo GTX 1, 2 (2.0%), decarbamoil GTX 2, 3 (1.4%), NeoSTX (1.3%), decarbamoil NeoSTX (0.6%), GTX 1, 4 (<0.2%).

## 6.8 Análisis estadístico

A continuación se describe el análisis estadístico que se realizó de acuerdo a cada una de las fases de experimentos:

- 1) Para determinar diferencias significativas en la eficiencia de remoción del dinoflagelado, de acuerdo a los resultados de la primera serie de pruebas con tres dosis de nueve coagulantes y floculantes aplicados en forma individual con tres concentraciones celulares, se realizaron análisis de varianza de una vía sin repeticiones (ANDEVA) o la prueba no paramétrica Kruskal – Wallis, además de realizar las pruebas de comparaciones múltiples de Tukey y Dunn respectivamente (Zar, 1999).
- 2) La eficiencia de remoción de células con tres agentes coagulantes y floculantes combinados por parejas se comparó con la prueba no paramétrica de Kruskal – Wallis, y con la prueba de comparaciones múltiples de Dunn.
- 3) La remoción de toxinas en un período de 96 horas utilizando la mejor combinación de coagulante-floculante se comparó con la determinada en las muestras control, mediante pruebas de análisis de covarianza (ANCOVA) (Zar, 1999) para detectar diferencias en la concentración de toxinas de los tratamientos y controles, con respecto al tiempo. Las comparaciones se realizaron entre las fases (sobrenadante/flóculo).

Además, se llevaron a cabo análisis de varianza (ANDEVA) o la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, para determinar diferencias significativas en el pH que fue la variable que se modificó al aplicar los coagulantes y floculantes, las comparaciones se realizaron al inicio y final de los experimentos, así como entre

los controles y tratamientos. Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  (Ferran, 2001).

Los paquetes computacionales utilizados fueron el programa EXCEL (v.2007, Microsoft Office), Sigma Plot 11 (Systat Software, Alemania 2008) y Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, 2004).

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Remoción de células de *G. catenatum* con los coagulantes y floculantes individuales

Los coagulantes y floculantes que presentaron una baja eficiencia de remoción de células (< 50%) fueron la montmorillonita, arcilla roja, clinoptilolita y sílice activada (Tabla 3), y no se detectaron diferencias significativas en la remoción obtenida con diferentes concentraciones celulares o con diferentes dosis de aplicación. Estos resultados difieren de los registrados por varios autores con diferentes tipos de arcillas y especies de microalgas (Padilla et al., 2010; Pierce et al., 2004; Sengco y Anderson, 2004; Sun et al., 2004; Sengco et al., 2001), aunque coinciden con la eficiencia de remoción de *G. catenatum* encontrada por Frausto (2009) quien utilizó dosis de 0.25 a 0.75 g L<sup>-1</sup> de montmorillonita, arcilla roja y de caolín.

En condiciones ácidas (pH=5) Yu et al. (1994) obtuvieron una elevada remoción de los dinoflagelados *Prorocentrum minimum* y *Noctiluca scintillans* con montmorillonita, mientras que a pH básico (>8.6) la eficiencia de remoción se redujo en el caso de *P. minimum*, posiblemente debido a la disminución de las cargas negativas producidas por los OH<sup>-</sup> en la superficie de la arcilla. En el caso de *N. scintillans* la remoción aumentó a pH de 8.6 a 10, lo cual fue atribuido a que el incremento en el pH pudo tener efectos sobre los iones Mg<sup>+2</sup>, Ca<sup>+2</sup>, Al<sup>+3</sup> de las arcillas. A un valor de pH similar al de este estudio (8.1), estos autores obtuvieron eficiencias de remoción aproximadamente del 55%. Como resultado de este estudio, Yu et al. (1994) concluyeron que la montmorillonita es más eficiente con diatomeas que con dinoflagelados, debido a las características de las células, como la formación de colonias, mayor área específica y secreción de sustancias mucilaginosas. Sin embargo Sengco et al. (2001) removieron eficientemente al dinoflagelado *Karenia brevis* con montmorillonita, bentonita y arcilla fosfática (90% de eficiencia de remoción). Las diferencias en la eficiencia de remoción de microalgas con arcillas minerales registrada por diferentes autores puede ser explicada, por factores relacionados con las características de la arcilla, como su

forma, densidad, área superficial, composición química y dosis (Yu et al., 1994). Además, influyen la concentración celular y las características de las células microalgales como su diámetro, morfología, área superficial específica, presencia de estructuras para movimiento y mantenimiento en la columna de agua (cuernos, setas u otras proyecciones en la superficie celular), la formación de colonias y polímeros secretados por las microalgas (Avnimelech et al., 1982; Yu et al., 1994; Sengco et al., 2001).

Es por esto que Sengco et al. (2005) destacan que cada sistema arcilla – alga, es único y por ello debe ser abordado de forma individual, ya que la respuesta de las células a la aplicación de arcillas puede variar de acuerdo a la especie y a la arcilla. En este sentido, Burkholder (1992) señala que *Gymnodinium* spp. produce grandes cantidades de mucus como mecanismo de defensa a elevadas concentraciones de limo y arcilla. Por otra parte, Avnimelech et al. (1982) y Yu et al. (1994) mencionan que ciertos polímeros secretados por las microalgas pueden contribuir a su agregación con las arcillas. Durante el cultivo de *G. catenatum* se observó la producción de mucus que, de acuerdo a lo mencionado por Burkholder (1992), podría relacionarse con la baja eficiencia de remoción de células obtenida con las arcillas utilizadas.

La menor eficiencia de remoción se obtuvo con la clinoptilolita utilizando 2000 céls. mL<sup>-1</sup> (-4.6±6.6%) y 3000 céls. mL<sup>-1</sup> (-6.9±8.8%). Los valores negativos son debido a la desviación estándar de los conteos, así como por la estabilización de las células, ya que el uso del aluminosilicato mantiene a los organismos más tiempo en suspensión, en lugar de promover su remoción por floculación y sedimentación (Sengco et al., 2001; Sengco et al., 2005).

Otros autores señalaron bajas remociones con las zeolitas, las cuales son usadas en el tratamiento de aguas por sus propiedades de intercambio iónico (Ouki y Kavannagh, 1999). Sengco et al. (2001) obtuvieron el 20% de remoción de *K. brevis* y Shuang et al. (2011) removieron el 30% de células de *Microcystis*

*aeruginosa* utilizando zeolita artificial. De acuerdo a lo observado en esta investigación, la clinoptilolita fue ineficiente para remover las células de *G. catenatum*. Esta baja remoción puede atribuirse a la producción de mucus como mecanismo de defensa (Burkholder, 1992).

No se encontraron referencias sobre el uso de la sílice activada para la remoción de microalgas, aunque Gomella y Guerree (1977) señalan que este agente es efectivo en aguas con pH cercano o inferior a 7, cuando la concentración de materia orgánica es elevada. La sílice activada actúa por adsorción y es utilizada para fortalecer la estructura de los flóculos, por ello es necesario un coagulante inorgánico además de la sílice, ya que esta solamente actúa como un floculante, cuyo papel es la creación de puentes de una superficie a otra, enlazando las partículas individuales en agregados (Kemmer y McCallion, 1989). Sengco et al. (2001) indican que para incrementar la tasa de floculación, es necesario incrementar el contacto entre partículas mediante mezclado o agitación. Es probable que en condiciones experimentales la remoción de *G. catenatum* adicionando sílice activada pueda ser mejorada agregando un agente coagulante y manteniendo una agitación continua.

**Tabla 3. Porcentajes de remoción de células de *G. catenatum* (R) con los agentes coagulantes y floculantes menos eficientes (<50%).**

Coagulante floculante/Céls. mL <sup>-1</sup>	Dosis	Arcilla roja		Montmorillonita		Clinoptilolita		Sílice activada	
		R	DE.	R	DE.	R	DE.	R	DE.
~ 1000 ± 203	1	11.6	9.0	5.1	4.1	7.4	1.5	-6.4	43.1
	2	-8.4	8.1	3.2	9.4	3.9	19.6	16.7	6.3
	3	39.6	6.8	5.4	3.6	17.0	10.7	10.6	14.9
~ 2000 ± 512	1	-2.8	4.1	-6.1	9.1	-1.9	8.3	-1.5	5.3
	2	-3.9	7.8	7.2	13.7	0.1	15.7	12.6	5.2
	3	6.4	2.7	15.0	5.2	-12.1	11.3	19.1	3.8
~ 3000 ± 370	1	23.9	5.5	19.4	5.4	-13.5	1.2	-4.7	17.1
	2	7.4	7.6	10.1	4.2	-10.2	3.3	-6.7	3.2
	3	8.6	9.7	15.1	5.7	3.1	5.1	15.7	15.3

DE: Desviación estándar

Por otro lado, los mayores valores de eficiencia de remoción de células (R >50%) se obtuvieron adicionando sulfato de aluminio, óxido de calcio, hidróxido de calcio, quitosano y policloruro de aluminio (PAC) (Figuras 2). Se observaron diferencias significativas en la remoción obtenida con el PAC, óxido de calcio e hidróxido de calcio ( $p = <0.001$ ).

Se obtuvieron eficiencias elevadas de remoción con las tres concentraciones celulares empleadas (91% -100%), incluso con la dosis más baja de óxido e hidróxido de calcio ( $0.8 \text{ g L}^{-1}$ ). Estos agentes, combinados en dosis bajas ( $\sim 1.4 - 2.1 \times 10^{-4} \text{ g L}^{-1}$ ) con sedimentos locales fueron utilizados por Song et al. (2010) para remover a *Cochlodinium polykrikoides* en dos áreas de Corea del Sur con porcentajes de remoción superiores al 70%.

El hidróxido de calcio, es también utilizado para incrementar el pH, induciendo a un tipo de floculación química, conocido como autofloculación aunque, este término es erróneo, ya que el incremento en el pH no está relacionado con cambios en las propiedades de las células de las microalgas (Vandamme et al., 2012).

El probable mecanismo de floculación ocurrido al aplicar el hidróxido de calcio y el óxido de calcio al cultivo de *G. catenatum*, consistió en la formación de especies químicas que indujeron a la neutralización de las cargas negativas superficiales presentes en las células. En presencia de exceso de iones calcio, se forma el fosfato de calcio que está positivamente cargado (Sukenic y Shelef, 1984), además puede formarse hidróxido de magnesio (brucita), el magnesio pueden ser remplazados por elementos como hierro y aluminio, resultando un cristal cargado positivamente, causando desestabilización y la subsecuente floculación. Sin embargo el tipo de especies químicas formadas en estos procesos va depender de la cantidad de fósforo y magnesio presente en el agua (Vandamme et al., 2012).

En el caso del PAC se encontró que la eficiencia de remoción decrece significativamente al incrementar el número de células ( $p=0.028$ ). Con  $3000 \text{ céls. mL}^{-1}$ , se observó una marcada disminución de la eficiencia de remoción, con valores de  $56.0 \pm 21.0$ ,  $33.3 \pm 35.1$  y  $24.2 \pm 31.2$  para las dosis de  $2.5 \times 10^{-2}$ ,  $5 \times 10^{-2}$ ,  $7.5 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  respectivamente (Figura 2C). La baja remoción obtenida incrementando la concentración de células, puede estar relacionada a que los grupos cargados positivamente del PAC se saturan debido al incremento de partículas en el medio, además la elevada fuerza iónica del agua de mar provoca un enmascaramiento de los grupos que facilitan la coagulación de las partículas (Bilanovic et al., 1988). La baja remoción obtenida coincide con lo indicado por Sengco et al. (2001) quienes demostraron que este agente coagulante en dosis bajas (5 ppm) y combinado con arcillas, favorece la formación de puentes entre la superficie de las partículas, reduciendo la cantidad de arcilla adicionada, sin embargo, obtuvieron bajas remociones cuando lo emplearon de forma individual con *K. brevis* y *A. annophagefferens* ( $\leq 49\%$  y  $10\%$ ).

Asimismo, se observó que tanto el policloruro de aluminio como el sulfato de aluminio, produjeron flóculos de baja densidad, que se mantuvieron en la columna

de agua sin sedimentar; esta también fue la causa de que en los conteos de células se obtuvieran desviaciones estándar más grandes que con los demás coagulantes floculantes.

En este estudio, con el sulfato de aluminio se obtuvo elevado porcentaje de remoción de *G. catenatum* en la concentración de 1000 céls. mL<sup>-1</sup> (99.1 ±0.6% - 100.0%±0.0), sin embargo para obtener eficiencias de remoción similares (89.6 ± 0.7% al 99.5 ± 0.7%) con 2000 y 3000 céls. L<sup>-1</sup> se requirió una dosis mayor de dicho coagulante-floculante (1.5 g L<sup>-1</sup>).

Los procesos que probablemente permitieron la sedimentación de las células fueron la adsorción e inmersión en el precipitado de Al(OH)<sub>3</sub> que es una de las especies químicas formada por la hidrólisis del sulfato de aluminio y que se encarga de atrapar a las partículas coloidales para su posterior sedimentación (Hossain, 1996), esto de acuerdo al pH inicial en los experimentos realizados con *G. catenatum* (8.5). En el caso del PAC, Duan y Gregory (2003) mencionan que este producto contiene formas pre-hidrolizadas de aluminio como el Al<sub>13</sub>O<sub>4</sub>(OH)<sub>24</sub><sup>7+</sup> o Al<sub>13</sub> que intervienen en la coagulación floculación de las partículas coloidales con los mecanismos similares a los que ocurren utilizando el sulfato de aluminio, aunque también señalan que se requiere mayor investigación para comprender la acción del PAC como agente coagulante y floculante.

La salinidad inhibe la actividad de floculación del sulfato de aluminio, debido a la elevada fuerza iónica del agua de mar, lo anterior fue evidenciado por Sukenik et al. (1988) que emplearon especies de agua dulce y marina con sulfato de aluminio y otros agentes coagulantes y floculantes, encontrando que las dosis empleadas para remover las microalgas marinas superan las utilizadas con las especies dulceacuícolas. En efecto, Sengco et al. (2001) utilizando especies marinas (*K. brevis* y *A. annophagefferens*) obtuvieron baja eficiencia de remoción de células (<49% y 10%) con dosis de 0.001 a 1 g L<sup>-1</sup>.



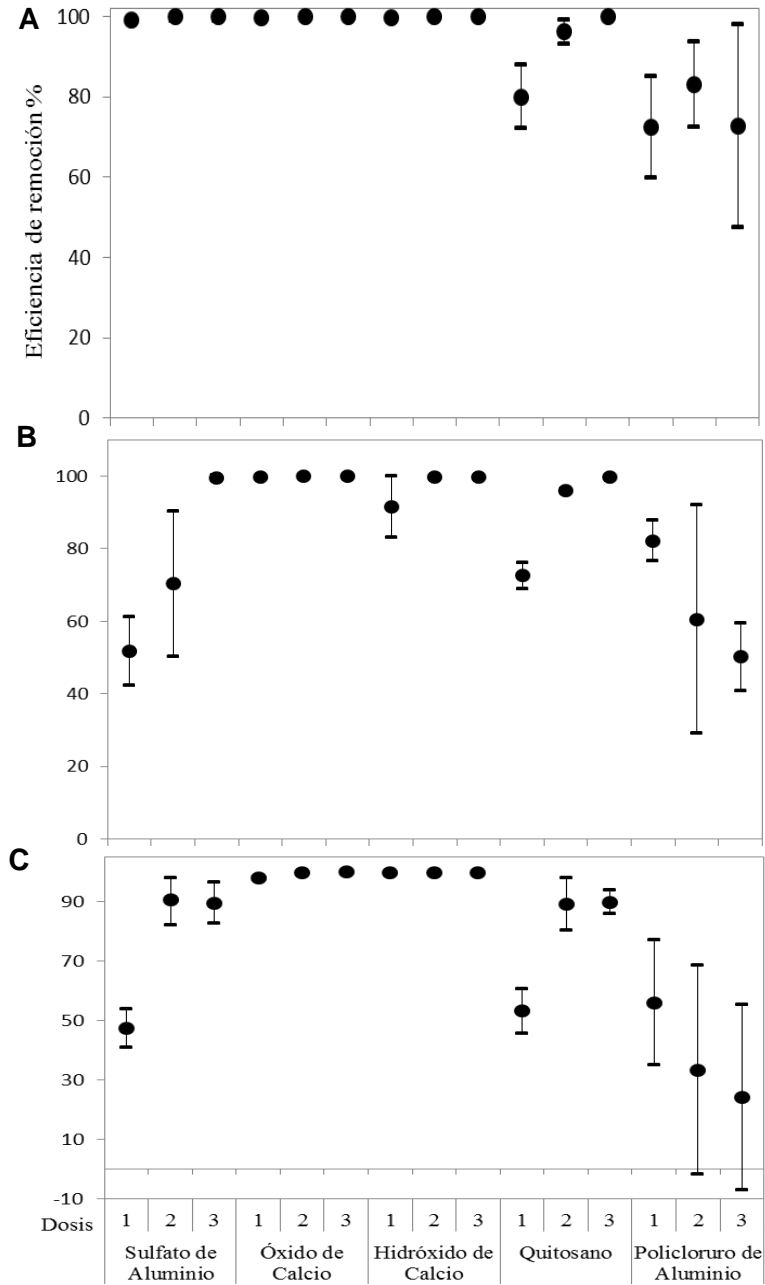
Edzwald (1993) señala que las algas son naturalmente flotantes y por lo tanto forman flóculos de baja densidad, por ello el mecanismo de flotación con aire disuelto (FAD) es más efectivo que la precipitación, y puede ser útil también para remover los flóculos producidos con sulfato de aluminio (Gross et al., 1996). Por ejemplo Henderson et al. (2010) emplearon sulfato de aluminio y utilizaron el mecanismo de FAD con microalgas de agua dulce (*M. aeruginosa*, *Chlorella vulgaris*, *Asterionella formosa* y *Melosira* sp.), obteniendo una remoción elevada de células (94.8% al 99.7%). Durante los experimentos con *G. catenatum* se observó que cuando se aplicó sulfato de aluminio con las densidades de 2000 y 3000 céls. mL<sup>-1</sup> se formaron flóculos que se mantuvieron en la superficie, provocando una baja precipitación de células, especialmente con las dosis de 0.5 y 1.0 g L<sup>-1</sup> (eficiencia de remoción= ~50%), que coincide con lo mencionado por Edzwald (1993).

Las dosis de 25, 50 y 75 mg L<sup>-1</sup> de quitosano dieron eficiencias de remoción del 53% - 100%. Se detectaron diferencias significativas de remoción (p=0.006), ya que al incrementar la dosis de aplicación aumentó la eficiencia de remoción. Se ha identificado que el tratamiento del quitosano con ácidos como el ácido acético, produce que los grupos amino de la estructura del quitosano sean protonados, permitiendo que ocurra la neutralización de cargas que desestabiliza a las partículas con carga superficial negativa, como es el caso de las microalgas. Además el quitosano forma grandes agregados adsorbiendo las partículas en su superficie (formación de puentes), removiéndolas por sedimentación (Renault et al., 2009; Ahmad, 2011).

Este producto ha sido utilizado para la remoción de microalgas de agua dulce como *Chlorella* sp., *Microcystis aeruginosa*, *Oscillatoria* sp. y *Spirulina* sp. (Romero y Ferrán, 2001; Divakaran y Pillai, 2002; Ahmad, 2011; Wang et al., 2012). Lertsutthinwong et al. (2009) destacan que la remoción de microalgas con quitosano es favorecida en condiciones neutras y alcalinas ya que obtuvieron mejor remoción de *Chaetoceros gracilis* (85 %) ajustando el pH entre 7 y 9 con 40

mg L<sup>-1</sup>, mientras que a pH de 5 y con 20 mg L<sup>-1</sup>, la remoción disminuye (45 %). Por ello la eficacia del quitosano está relacionada con el pH y con la dosis de polímero adicionada. En esta investigación se trabajó con pH alcalino de 8.5 que se encuentra en el intervalo de pH en el cual actúa el quitosano.

Algunos autores difieren sobre la eficiencia del quitosano con microalgas marinas. Por un lado, Sukenik et al. (1988), mencionan que la salinidad inhibe la floculación, mientras que Lubián (1989), quien empleó de 40 – 80 mg L<sup>-1</sup> de quitosano y removió eficientemente (75%) a 8 de 11 especies de microalgas marinas ajustando el pH, destaca que aunque la elevada fuerza iónica produce un colapso parcial entre las cadenas de quitosano, disminuyendo la interacción con las células, el reajuste del pH a 8 luego de adicionar el quitosano, es una estrategia simple y eficiente para mejorar la floculación.



**Figura 2. Porcentajes de remoción de células de *G. catenatum* (1000 céls. mL<sup>-1</sup>) con los agentes más eficientes (>50%). A) 1000 céls. mL<sup>-1</sup>, B) 2000 céls. mL<sup>-1</sup>, C) 3000 céls. mL<sup>-1</sup> (Promedio ● Desviación estándar I)**

## 7.2 Temperatura y pH registrados durante el experimento de remoción con coagulantes y floculantes individuales

El intervalo de temperatura durante el experimento fue de  $23.5 \pm 0.5$  °C –  $27.3 \pm 0.8$  °C al inicio y de  $22.6 \pm 0.6$  °C -  $27.0 \pm 1.4$  °C al finalizar las tres horas de duración de los experimentos (Tabla 4).

En el pH final del experimento se encontraron algunas diferencias ( $p < 0.001$ ) entre los controles y tratamientos con quitosano, sulfato de aluminio, óxido e hidróxido de calcio. Con óxido e hidróxido de calcio aumentó el pH, mientras que disminuyó con el sulfato de aluminio y con el quitosano. Estas diferencias se explican por la hidratación del ion aluminio ( $Al^{+3}$ ) que puede reaccionar formando especies por hidrólisis (hidroxicomplejos). La hidrólisis libera iones  $H^+$ , que provoca una disminución en el pH (Hossain, 1996). En el caso del quitosano, la disminución fue causada por el bajo pH (3.8) de la solución stock.

**Tabla 4. Temperatura y pH registrados durante los experimentos de remoción de células de *G. catenatum*.**

Variable ambiental/coagulante y floculante	Temperatura				pH			
	Controles		Tratamientos		Controles		Tratamientos	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Clinoptilolita	$23.7 \pm 0.6$	$24.8 \pm 0.4$	$23.7 \pm 0.6$	$24.8 \pm 0.3$	$8.3 \pm 0.1$	$8.2 \pm 0.1$	$8.3 \pm 0.1$	$8.1 \pm 0.2$
Quitosano	$24.0 \pm 0.4$	$22.6 \pm 0.6$	$24.0 \pm 0.4$	$22.7 \pm 0.6$	$8.4 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.2$	$8.4 \pm 0.1$	$7.0 \pm 0.6$
PAC	$24.7 \pm 0.7$	$25.5 \pm 0.9$	$24.7 \pm 0.7$	$25.4 \pm 0.9$	$8.6 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.2$	$8.2 \pm 0.1$
Sílice Activada	$23.5 \pm 0.5$	$24.8 \pm 0.3$	$23.6 \pm 0.5$	$24.7 \pm 0.4$	$8.7 \pm 0.1$	$8.7 \pm 0.1$	$8.7 \pm 0.1$	$8.7 \pm 0.2$
Arcilla roja	$25.8 \pm 0.5$	$24.1 \pm 0.9$	$25.6 \pm 0.3$	$24.0 \pm 0.8$	$8.2 \pm 0.2$	$8.2 \pm 0.1$	$8.2 \pm 0.2$	$8.0 \pm 0.1$
Montmorillonita	$27.3 \pm 0.8$	$26.9 \pm 1.3$	$27.0 \pm 0.6$	$26.4 \pm 1.3$	$8.1 \pm 0.2$	$8.2 \pm 0.1$	$8.1 \pm 0.2$	$8.1 \pm 0.1$
Hidróxido de Calcio	$26.8 \pm 0.7$	$27.0 \pm 1.4$	$26.9 \pm 0.7$	$26.9 \pm 1.4$	$8.1 \pm 0.2$	$8.4 \pm 0.1$	$8.1 \pm 0.2$	$9.4 \pm 0.1$
Óxido de Calcio	$24.9 \pm 0.5$	$26.3 \pm 1.2$	$24.8 \pm 0.5$	$26.5 \pm 0.9$	$8.6 \pm 0.1$	$8.7 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.2$	$9.8 \pm 0.1$
Sulfato de Aluminio	$23.6 \pm 0.5$	$23.4 \pm 0.4$	$24.8 \pm 0.5$	$26.5 \pm 0.4$	$8.5 \pm 0.1$	$8.2 \pm 0.1$	$8.5 \pm 0.1$	$4.5 \pm 0.4$

### 7.3 Eficiencia de remoción de células de *G. catenatum* con la combinación de los coagulantes y floculantes

El óxido e hidróxido de calcio, presentaron elevada remoción de células (100%) incluso con la dosis adicionada más baja ( $0.7 \text{ g L}^{-1}$ ). Por ello se evaluó la eficiencia de remoción de células con dosis de  $0.1$  a  $0.6 \text{ g L}^{-1}$  (Figuras 3 y 4) y se determinó que la remoción fue superior al 90% con  $0.3 \text{ g L}^{-1}$  que es la concentración usada en la segunda fase de este trabajo.

El quitosano presentó elevada remoción de *G. catenatum* con  $7.5 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  mientras que la dosis de sulfato de aluminio necesaria para obtener la mayor remoción fue  $1.5 \text{ g L}^{-1}$ . Por otra parte, esta dosis, provocó una disminución del pH y además produjo flóculos de baja densidad. Por lo anterior, se eligió para los tratamientos con combinaciones la dosis de  $7.5 \times 10^{-2} \text{ g L}^{-1}$  de quitosano.

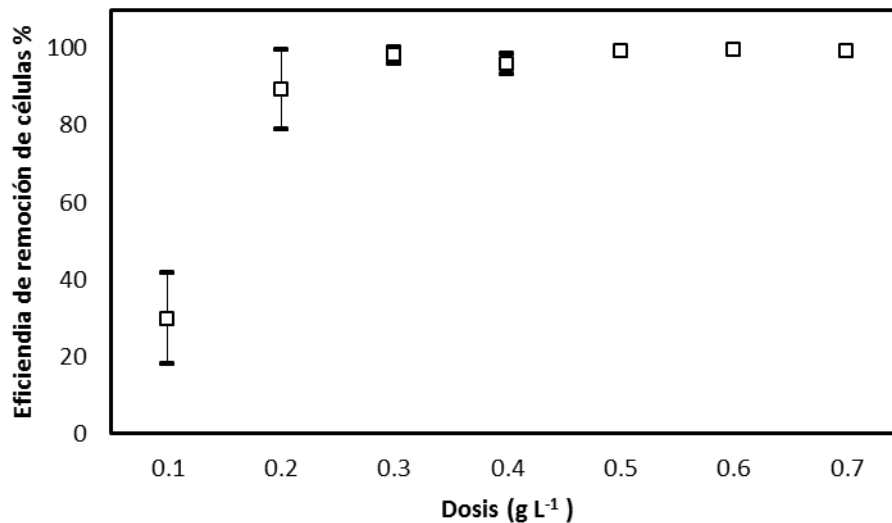
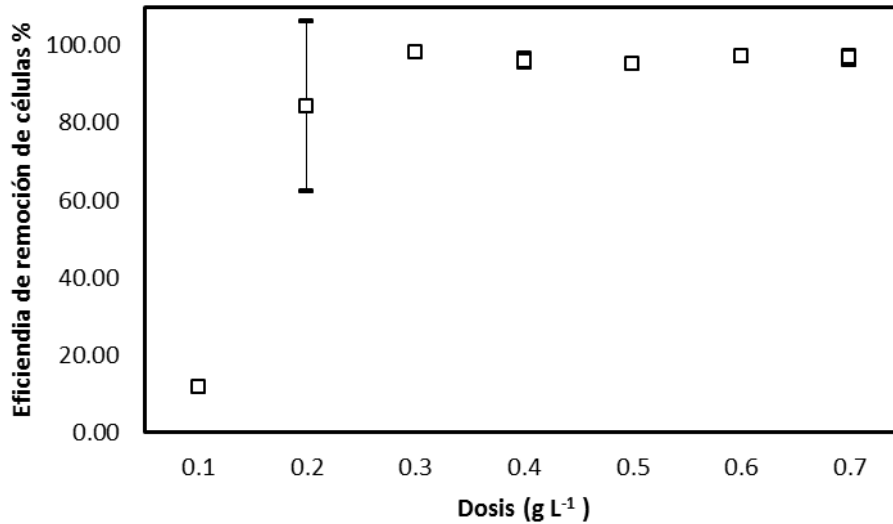
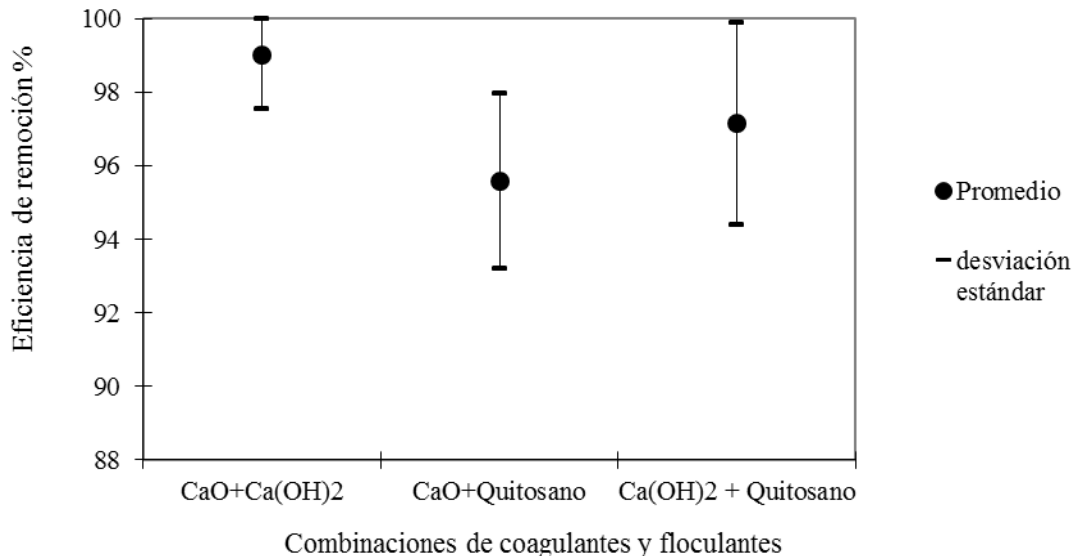


Figura 3. Eficiencia de remoción de células de *G. catenatum* con dosis de  $0.1$  a  $0.7 \text{ g L}^{-1}$  de hidróxido de calcio.



**Figura 4. Eficiencia de remoción de células de *G. catenatum* con dosis de 0.1 a 0.7 g L<sup>-1</sup> de óxido de calcio.**

En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos con las combinaciones binarias de óxido de calcio, hidróxido de calcio y quitosano. Con la combinación de óxido e hidróxido de calcio se obtuvo en promedio  $99.0 \pm 1.4$  % de remoción que fue significativamente mayor ( $p = 0.046$ ) de las obtenidas con las combinaciones óxido de calcio + quitosano e hidróxido de calcio + quitosano.



**Figura 5. Eficiencia de remoción de células de *G. catenatum* (3000 cél. mL<sup>-1</sup>), utilizando coagulantes y floculantes combinados.**

## 7.4 Temperatura y pH durante el experimento de remoción con coagulantes y floculantes combinados

La temperatura en el experimento con coagulantes y floculantes combinados varió de  $23.5 \pm 0.1$  °C -  $23.7 \pm 0.3$  °C al inicio y  $24.2 \pm 0.2$  °C -  $24.8 \pm 0.03$  °C al final (Tabla 5). En relación al pH registrado se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ) con la combinación de  $\text{Ca(OH)}_2$  + CaO y  $\text{Ca(OH)}_2$  + quitosano en relación a la combinación de CaO + quitosano. En las combinaciones donde se adicionó el hidróxido de calcio se observó el valor mayor de pH, de 9.5.

**Tabla 5. Temperatura y pH registrados durante el experimento de remoción de células de *G. catenatum* con coagulantes y floculantes combinados.**

Combinación del coagulante floculante	Temperatura (°C)				pH			
	Controles		Tratamientos		Controles		Tratamientos	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
CaO+Ca(OH) <sub>2</sub>	$23.6 \pm 0.1$	$24.8 \pm 0.03$	$23.7 \pm 0.2$	$24.2 \pm 0.2$	$8.6 \pm 0.1$	$8.7 \pm 0.04$	$8.6 \pm 0.02$	$9.5 \pm 0.1$
CaO+quitosano	$23.5 \pm 0.1$	$24.3 \pm 0.3$	$23.5 \pm 0.05$	$24.4 \pm 0.1$	$8.6 \pm 0.06$	$8.7 \pm 0.03$	$8.6 \pm 0.02$	$9.2 \pm 0.06$
Ca(OH) <sub>2</sub> +quitosano	$23.6 \pm 0.1$	$23.9 \pm 0.4$	$23.7 \pm 0.3$	$24.5 \pm 0.5$	$8.6 \pm 0.1$	$8.7 \pm 0.04$	$8.6 \pm 0.02$	$9.5 \pm 0.1$

## 7.5 Selección de la combinación de coagulante y floculante para el experimento de remoción de toxinas paralizantes.

En los dos tratamientos con hidróxido de calcio, se observó la formación de un flóculo más voluminoso, que dificultó la separación de sobrenadante y flóculo y además se observó un mayor cambio de pH. Por lo cual la combinación óxido de calcio + quitosano fue el tratamiento seleccionado para determinar la remoción de toxinas en el ensayo de 96 horas.

## 7.6 Remoción de toxinas

La concentración de saxitoxinas detectada en el cultivo de *G. catenatum* (3000 céls. mL<sup>-1</sup>) a través de la prueba ELISA fue de  $23.2 \text{ ng mL}^{-1}$ , lo que difiere de los

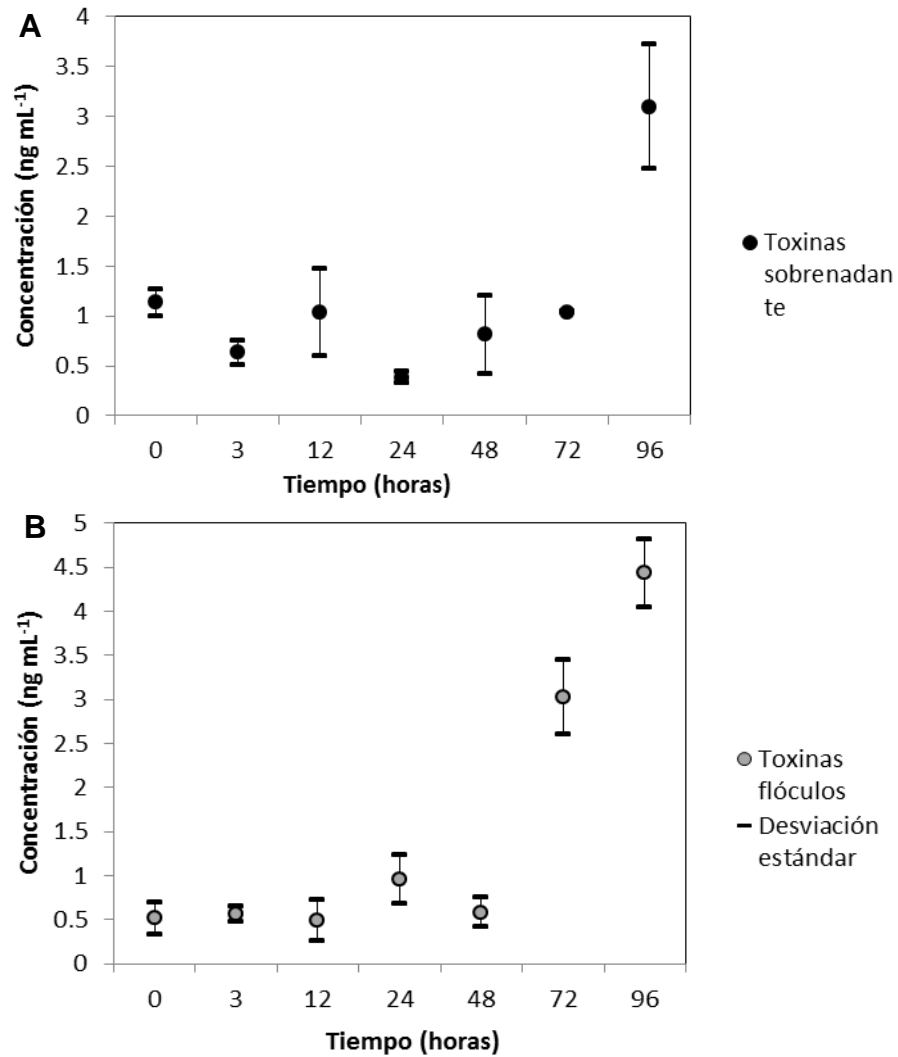
0.408 a 47.7 ng mL<sup>-1</sup> de saxitoxina intracelular y 24 a 132 ng mL<sup>-1</sup> extracelular detectados por Reis et al. (2010) durante un florecimiento algal de *G. catenatum* (24,500 céls. L<sup>-1</sup>) ocurrido en la costa de Portugal. La diferencia en la concentración de toxina puede estar en función de la cepa, de la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo o el tiempo de permanencia del florecimiento algal.

En los controles se observó que la concentración de toxinas tuvo una tendencia a incrementar a través del tiempo en las fases de sobrenadante (cero horas = 1.1 ± 0.1 ng mL<sup>-1</sup>, 96 horas = 3.0 ± 0.6 ng mL<sup>-1</sup>) y flóculo (cero horas = 0.5 ± 0.6 ng mL<sup>-1</sup>, 96 horas = 4.4 ± 0.09 ng mL<sup>-1</sup>). Detectándose diferencias significativas en relación al tiempo ( $F_{(1, 25)} = 41.7$ ,  $p = 0.00$ ,  $R^2_{ajustada} = 0.53$ , Concentración de toxinas = 0.319 + (0.0279 \* tiempo transcurrido (h)).

En los controles a las 96 horas la mayor cantidad de toxinas se presentó en el líquido sobrenadante y flóculos (Figura 6), Pazos (2012) al evaluar la concentración letal media de *G. catenatum* (cultivo, medio de cultivo y células) en postlarvas de *Litopenaeus vannamei*, determinó que la mayor concentración de toxinas se encuentra en la fracción disuelta donde son acumuladas y concentradas, lo cual puede explicar el incremento en toxinas ocurrido en función del tiempo en este estudio.

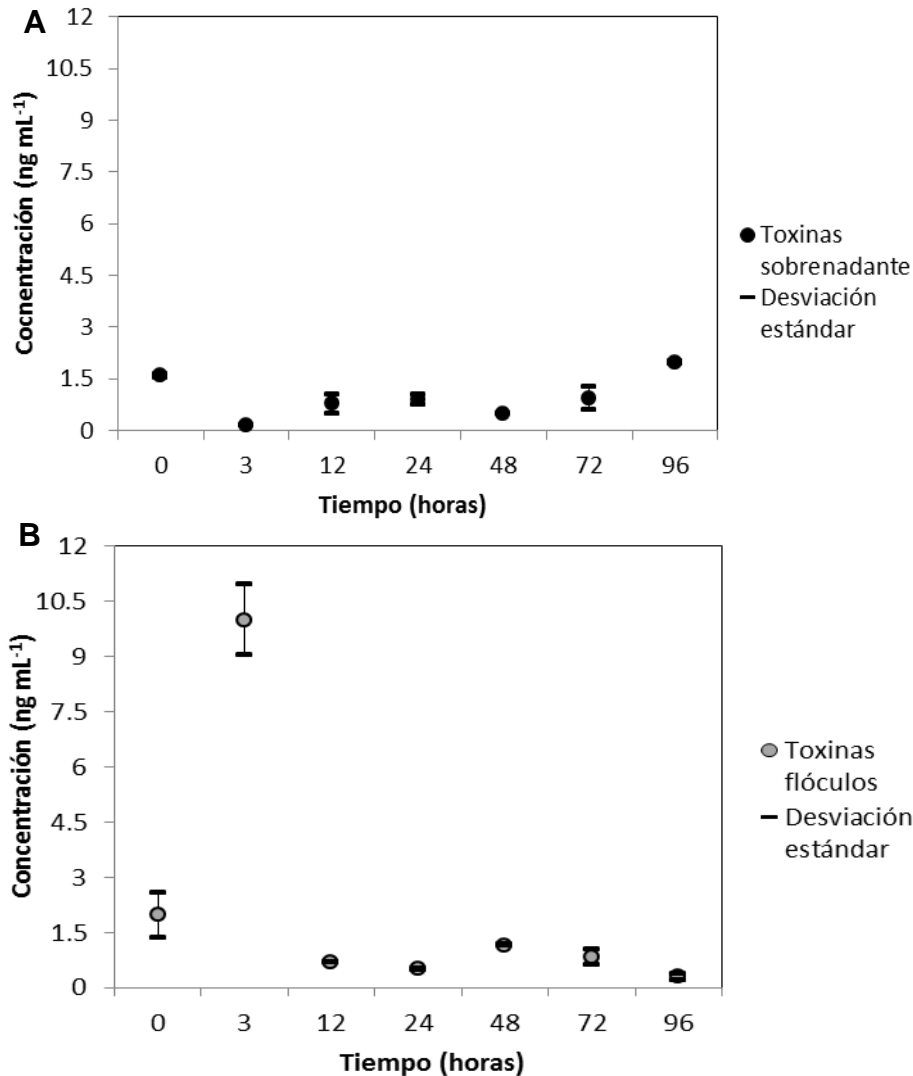
En los tratamientos la mayor concentración de saxitoxinas (9.9 ng mL<sup>-1</sup>) ocurrió en los flóculos a las tres horas de adicionado el óxido de calcio + quitosano (Figura 7). Dicho incremento puede ser atribuido al estrés fisiológico de las células provocado por la sedimentación, que contribuye a una mayor liberación de toxinas, lo cual ha sido evidenciado por otros autores (Hagström y Granéli, 2005; Sengco et al., 2001). En las fases de sobrenadante (cero horas = 1.5 ± 0.05 ng mL<sup>-1</sup>, 96 horas = 1.9 ± 0.03 ng mL<sup>-1</sup>) y flóculo (cero horas = 1.9 ± 0.6 ng mL<sup>-1</sup>, 96 horas = 0.2 ± 0.09 ng mL<sup>-1</sup>) no se encontraron diferencias en la concentración de toxinas en función de las horas transcurridas ( $F_{(1, 25)} = 2.04$ ,  $p = 0.16$ ).





**Figura 6. Concentración de saxitoxina (ng mL<sup>-1</sup>) en los controles. A) sobrenadante, B) flóculos.**

Aunque se observa una tendencia al incremento de las toxinas hacia el final del experimento en los controles y una disminución en los tratamientos tres horas después de la adición de la combinación de óxido de calcio + quitosano, el transcurso del tiempo durante el experimento no tuvo un efecto significativo en la concentración de toxinas en el líquido sobrenadante ( $F_{(1, 25)} = 0.59, p=0.4$ ) y flóculos ( $F_{(1, 25)} = 0.47, p=0.4$ ) tanto en tratamientos como controles.



**Figura 7. Concentración de saxitoxina (ng mL<sup>-1</sup>) en los tratamientos. A) sobrenadante, B) flóculos.**

La mayoría de estudios relacionados con el control algal se enfocan en la estimación de la remoción de células vegetativas. En relación a la remoción de toxinas se han realizado algunos ensayos experimentales con arcillas que actúan de forma individual o combinada con otros coagulantes y floculantes para remover saxitoxinas disueltas (Burns et al., 2009), ictiotoxinas (Hagström y Gráneli, 2005; Sengco et al., 2005) y neurotoxinas (Lewis et al., 2003), aunque no en todos los casos, la adición de dichos agentes ha reducido significativamente la concentración de toxinas (Lewis et al., 2003). Por lo anterior, para el tratamiento

de agua para consumo humano, se han evaluado métodos como la cloración, filtración con carbón activado, ozonación o la combinación de dichos procesos con la adición de coagulantes y floculantes para la remoción de microcistinas y saxitoxinas que son producidas por cianobacterias (Haider, 2003).

Actualmente, se cuenta con escasa información acerca de la remoción de toxinas paralizantes por parte del óxido de calcio o quitosano. Se sabe que tanto el óxido de calcio y como el hidróxido de calcio son utilizados en los estanques de camarón en las granjas ubicadas en Sinaloa cuando se presentan florecimientos algales (com. pers. Comisión Estatal Acuicola de Sinaloa). El uso de estos agentes que incrementan el pH del agua podría promover la degradación de dichas toxinas, ya que Shimizu (2000) menciona que valores de pH por encima de 8 y temperatura ambiente facilitan la degradación de las toxinas paralizantes.

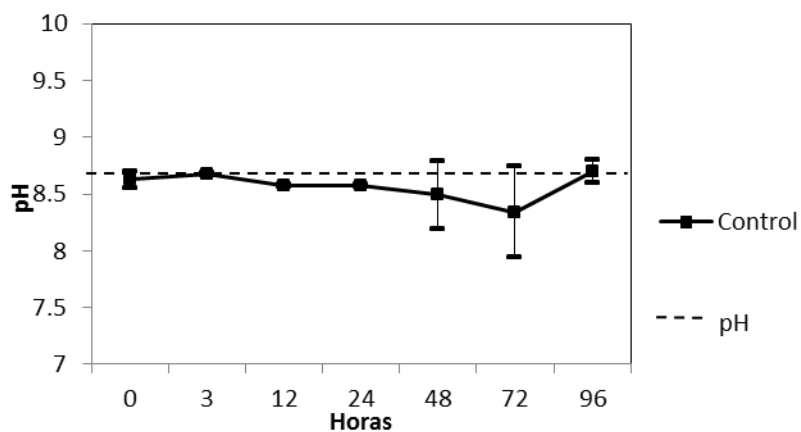
### **7.7 Temperatura y pH registrados durante el experimento de remoción de toxinas paralizantes**

Los valores de temperatura oscilaron de 23.4 °C a 25.8 °C (Tabla 6). Con respecto al pH se encontraron diferencias significativas en los tratamientos y controles en función del tiempo ( $F_{(1,61)}=4$ ,  $p=0.049$ ,  $R^2_{ajustada}=0.067$ ,  $pH= 8.65 - (0.00154 * \text{horas})$  ). El pH promedio inicial del experimento fue de 8.7. Se observaron cambios del pH a lo largo del experimento en los controles y tratamientos (Figura 8). Dichos cambios pueden estar relacionados a factores como las variaciones en la temperatura, tasa de respiración y fotosíntesis de las células algales y a la descomposición de la materia orgánica (De la Lanza, 2001).

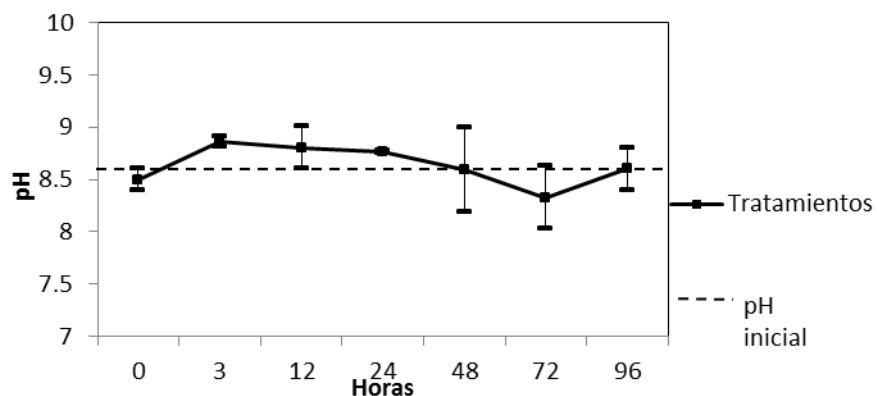
**Tabla 6. Temperatura (°C) registrada durante el experimento de remoción de toxinas de *G. catenatum*.**

Horas	Control		Tratamiento	
	Inicial	Final	Inicial	Final
0	24.5±0.2	24.2±0.05	24.4±0.2	24.2±0.1
3	25.4±0.5	24.6±0.1	25.5±0.5	24.8±0.2
12	24.4±0.1	24.4±0.2	24.4±0.2	24.4±0.3
24	25.6±0.1	24.4±0.1	25.8±0.2	24.5±0.1
48	24.0±0.3	25.3±0.3	24.0±0.2	25.7±0.4
72	24.6±0.04	23.6±0.2	24.7±0.1	23.4±0.3
96	24.9±0.1	27.7±0.5	24.9±0.1	28.0±0.4

**A**



**B**



**Figura 8. Mediciones de pH en los controles (A) y en los tratamientos con hidróxido de calcio + quitosano (B), durante el experimento de remoción de toxinas de *G. catenatum*.**

## 8 CONCLUSIONES

- La eficiencia de remoción de *G. catenatum* presentó diferencias significativas de acuerdo al coagulante y floculante utilizado; el óxido de calcio, hidróxido de calcio y el quitosano fueron los más efectivos; el sulfato de aluminio y el policloruro de aluminio produjeron flóculos de baja densidad resultando una remoción inferior al 50%, con las mayores concentraciones celulares probadas.
- La adición de quitosano y óxido de calcio promueve que las células sedimentadas de *G. catenatum* liberen mayor cantidad de toxinas a las tres horas de aplicar dichos agentes coagulantes y floculantes.
- La concentración de toxinas al aplicar el quitosano y óxido de calcio no es significativamente diferente en el sobrenadante y flóculo durante el desarrollo del experimento (96 h).

## 9 RECOMENDACIONES

Profundizar en el mecanismo de acción de los coagulantes y floculantes utilizados a través de mediciones electroforéticas y estudios detallados sobre los procesos de adsorción, neutralización de cargas, así como otros procesos que permiten la coagulación floculación y sedimentación de las microalgas.

Complementar los resultados de toxicidad obtenidos con ELISA, mediante análisis de cromatografía líquida de alta resolución para obtener el perfil de las toxinas y para disminuir la incertidumbre por la baja detección de algunos derivados debido a las pruebas cruzadas de ELISA, además para determinar la posible diferencia en la composición de toxinas en sobrenadante y flóculo.

Evaluar la eficiencia de remoción de toxinas del quitosano y óxido de calcio de forma individual para dilucidar las reacciones que pudieran estar ocurriendo según el agente coagulante y floculante utilizado.

Probar métodos de desactivación de toxinas producidas por *G. catenatum* como la aplicación de ozono y filtración con carbón activado, que se ha comprobado que remueven las saxitoxinas producidas por las cianobacterias.

## 10 LITERATURA CITADA

- Acevedo, G., Alonso, R., Gárate, I., Bustillos, J. 2006. Estudio anual de toxinas paralíticas (TP) en el ostión roca *Striostrea prismatica* asociado a la presencia de *Gymnodinium catenatum* en bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. En: XIV Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología, A.C., del 31 al 3 de junio del 2006.
- Aguilar, M.I, Sáez, J., Lloréns, M., Soler, A., Ortuño, J.F., 2002. Tratamiento físico químico de aguas residuales: coagulación - floculación. Universidad de Murcia, Servicio de Publicaciones. 151 p.
- Ahmad, A., Mat, N., Derek, C., Lim, J., 2011. Optimization of microalgae coagulation process using chitosan. Chem. Eng. J. 173. 879– 882.
- Alonso, R., Páez, F., 2003. Nutrients, phytoplankton and harmful algal blooms in shrimp ponds: a review with special reference to the situation in the Gulf of California. Aquaculture. 219, 317-336.
- Alonso, R., Gárate, I., Lukas, B., Reinhardt, K., Bustillos, J., 2004. Mortalidad de larvas y camarón en cultivo en Sinaloa, México, asociado a mareas rojas de *Gymnodinium catenatum*. p. 54-55. En: XIII Reunión Nacional de la Sociedad Mexicana de Planctología, A.C. VI Reunión Internacional de Planctología, del 25 al 28 de abril del 2004 en Nuevo Vallarta, Nayarit, México.
- Anderson, D., 2003. Hearing on the harmful algal bloom and hypoxia research amendments act of 2003. Biology Department, Woods Hole Oceanographic Institution. 21 p.
- Anderson, D., Sengco, M., Li, A., Beaulieu, S., 2004. Control of Florida red tides using phosphatic clay. Final Report. Woods Hole Oceanographic Institution, Florida. 83 p.
- Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M. 2005. Hydrophilic interaction liquid chromatography – mass spectrometry for the analysis of paralytic shellfish poisoning (PSP) toxins. J. Cromatogr. A. 1081, 190-201.

- Avnimelech, Y., Troeger, B., Reed, L., 1982. Mutual flocculation of algae and clay: evidence and implication. *Science* 216 (4541), 63–65
- Bassi, R., Prasher, S., Simpson, K. 2000. Removal of selected metal ions from aqueous solutions using chitosan flakes. *Separ. Sci. Technol.* 35, 4. 547-560.
- Bilanovic, D., Shelef, G., Sukenik, A., 1988. Flocculation of microalgae with cationic polymers. Effects of medium salinity. *Biomass.* 17, 65-76.
- Boltovskoy, A., 1995. Taxonomía y morfología de los dinoflagelados: Métodos de trabajo. En: Alveal, K., Ferrario, M. E., Oliveira, E.C, Sar, E. (Eds). *Manual de Métodos Ficológicos.* 863 p.
- Bosch, P., Olguin, M., Bulbulian, S., 2005. Zeolitas naturales, características, propiedades y usos. McGraw Hill - Mexico.
- Buelna, G., Bhattarari, K., Noue, J., Taiganides, E., 1990. Evaluation of various flocculants for the recovery of algal biomass grown on pig-waste. *Biol. Wastes.* 31, 211-222.
- Burkholder, J., 1992. Phytoplankton and episodic suspended sediment loading: phosphate partitioning and mechanisms for survival. *Limnol. Oceanogr.* 35 (5), 974-988.
- Burns, J., Hall, S., Ferry, J., 2009. The adsorption of saxitoxin to clays and sediments in fresh and saline waters. *Water. Res.* 43, 1899-1904.
- Carretero, M., Pozo, M., 2008. *Mineralogía aplicada salud y medio ambiente.* Editorial Thomson. España. 424 p.
- Cortés, R., Alonso, R., 1997. Mareas rojas durante 1997 en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *Ciencias del Mar (Universidad Autónoma de Sinaloa).* 15, 29-35.
- Cortés, R., Gómez, S., 2001. Florecimiento algales nocivos en la bahía de Mazatlán, México (2000). IX Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar. Colombia, 16-20 de Septiembre de 2001.
- Cortés, R., Núñez, A., 1992. Doce años (1979-1990) de registros de mareas rojas en la bahía de Mazatlán, Sinaloa, México. *An. Inst. Cien. Mar. Limnol. UNAM.* 19, 13-21. México.



- Cortés, R., Alonso, R., Sierra, A., 2006. Fish mortality associated with *Chattonella marina* and *C. cf. ovata* (Raphidophyceae) blooms in Sinaloa (Mexico). Harmful Algal News. 31.
- Daranas, A., Norte, M., Fernández, J. 2011. Toxic marine microalgae. Toxicon. 1101-1132.
- De la Lanza, G. 2001. Características físico químicas de los mares de México. México. Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza-Valdez. 149 pp.
- Divakaran, R., Pillai, S., 2002. Flocculation of algae using chitosan. J. Appl. Phycol. 14, 419-422.
- Duan, J., Gregory, J., 2003. Coagulation by hydrolyzing metal salts. Adv. Colloid. Interfac. 475-502
- Edzwald, J., 1993. Algae, bubbles, coagulants and dissolved air flotation. Water Sci. Technol. 27, 67-81.
- FAO. 2005. Biotoxinas marinas. FAO, Roma 295 pp. También disponible en: <http://www.fao.org/docrep/008/y5486s/y5486s00.htm> (último acceso: 12 de Octubre de 2011).
- Ferran, A., 2001. SPSS para Windows. Análisis Estadístico. Editorial McGraw Hill. España. 480 pp.
- Frausto, E., 2009. Evaluación experimental de tres arcillas para el control de florecimientos algales nocivos ocasionados por los dinoflagelados tóxicos *Cochlodinium polykrikoides* (Margalef, 1961) y *Gymnodinium catenatum* (Graham, 1943) y su utilidad en la camaronicultura. Tesis de Maestría en Ciencias en Pesquerías Sustentables. Dirección General de Educación Superior Tecnológica, Instituto Tecnológico de Mazatlán. 69 pp.
- Gárate, I., Band, C., Cervantes, R., Escobedo, D., 2002. Mareas rojas de *Mesodinium rubrum* (Lohmann) Hamburger y Budenbrock ocurridas en el Golfo de California durante el invierno de 1998. *Hidrobiológica* 12(1): 15-20.
- Gárate, I., Pérez, B., Díaz, J., Band, C., 2008. Microalgas y biotoxinas marinas en las costas mexicanas. *Conversus*. 9, 22-26.
- Glynn, H., Gary, H., 1999. Ingeniería ambiental. Segunda edición. Prentice Hall Hispanoamericana. México. 778 pp.

- Gustafsson, S., Hultberg, M., Figueroa, R., Rengefors, K., 2009. On the control of HAB species using low biosurfactant concentrations. *Harmful Algae*. 8, 857-863.
- Gomella, C., Guerree, H., 1977. Tratamiento de aguas para abastecimiento público. Editores Técnicos Asociados. España. 240 pp.
- Gross, F., Cristar, V., Ritcher, C., 1996. Clarificación de agua por flotación con aire disuelto: aplicaciones desarrolladas en Uruguay y Brasil. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. México. 1-10.
- Guillard, R., 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En *Culture of marine invertebrate animals*. Smith, W.L, Chanley, M.H, (Eds.). Plenum Press, New York. 26-60.
- Guillard, R., Ryther, J., 1962. Studies of marine planktonic diatoms I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervaceae* Cleve. *Can. J. Microbiol.* 8, 229-239.
- Hagström, J., Gráneli, E., 2005. Removal of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) cells under different nutrient conditions by clay. *Harmful Algae*. 4, 249-260.
- Haider, S., Naithani, V., Viswanathan, P., Kakkar, P. 2003. Cyanobacterial toxins: a growing environmental concern. *Chemosphere* 52. 1–21.
- Hallegraeff, G., 2002. *Aquaculturists guide to harmful Australian microalgae*. 2<sup>a</sup> edición. Tasmania: University of Tasmania. 136 p.
- Hare, C., Kathryn, E., Craig, J., Kirchman, D., Hutchins, D., 2005. A bacterium that inhibits the growth of *Pfiesteria piscicida* and other dinoflagellates. *Harmful Algae*. 4, 221–234.
- Henderson, R., Parsons, S., Jefferson, B., 2010. The impact of differing cell and algogenic organic matter (AOM) characteristics on the coagulation and flotation of algae. *Water Res.* 44, 3617-3624.
- Hossain, D., 1996. Mechanism of coagulation of coloured water with aluminium sulphate. *J. Civ. Eng.* 24, 213-220.
- Jeong, H. J, Kim, J. S., Yoo, Y.D., Kim, S.T., Song, J.Y., 2008. Control of the harmful alga *Cochlodinium polykrikoides* by the naked ciliate

- Strombidinopsis jeokjo* in mesocosm enclosures. Harmful Algae. 7, 368–377.
- Kemmer, F, McCallion, J., 1989. Manual del agua, su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Vol. I. McGraw Hill. . Estados Unidos. 750 p.
- Laréz, C., 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. Avances en Química. 1, 15-21.
- Lee, Y., Choi, J., Kim, J., Youn, E., Yang, E., 2008. Field experiments on mitigation of harmful algal blooms using a sophorolipid- yellow clay mixture and effects on marine plankton. Harmful Algae. 7, 154–162.
- Lertsutthiwong, P, Suttikarn, S., Powtongsook, S., 2009. Optimization of chitosan flocculation for phytoplankton removal in shrimp culture ponds. Aquacult. Eng. 41,188-193.
- Lewis, M, Dantin, D., Walker, C. Kurtz, J., Greene, G., 2003. Toxicity of clay flocculation of the toxic dinoflagellate, *Karenia brevis*, to estuarine invertebrates and fish. Harmful Algae 2, 235–246.
- Lubián, L., 1989. Concentration cultured marine microalgae with chitosan. Aquacult. Eng. 8. 257-265.
- Maeda, H., Hodokawa, K., Okunishi, S., Hidaka, M., 2009. Supression of red tide by chemicals. Bull. Plankton Soc. Jpn. 56, 69-73.
- Mee, L.D., Espinosa, M., Díaz, G., 1986. Paralytic shellfish poisoning with a *Gymnodinium catenatum* red tide on the Pacific coast of Mexico. Mar. Environ. Res. 19, 77-92.
- Moestrup, Ø., Akselman, R., Cronberg, G., Elbraechter, M., Fraga, S., Halim, Y., Hansen, G., Hoppenrath, M., Larsen, J., Lundholm, N., Nguyen, L. N., Zingone, A. (Eds), 2012. IOC-UNESCO Taxonomic Reference List of Harmful Microalgae. Disponible en: <http://www.marinespecies.org/HAB> (último acceso: 5 de Marzo de 2012).
- Morales, J., de la Noüe, J., Picard, G. 1985. Harvesting marine microalgae species by chitosan flocculation. Aquacult. Eng. 4, 257-270.
- Ochoa, J., Hernández, D., Lluch, S., Arredondo, B., Núñez, E., Heredia, A., Pérez, J., Alonso, R., 2002 Marine biotoxins and harmful algal blooms in México's

- Pacific litoral. In: Harmful Algal Blooms in the PICES Region of the North Pacific; Taylor, F., Trainer, V. (Eds.) PICES Sci. Rep. 23,119-128.
- Ochoa, J., 2003. ENSO phenomenon and toxic red tides in Mexico. *Geofis. Int.* 42(3), 505-515.
- Ouki, S., Kavannagh, M., 1999. Treatment of metals contaminated wastewaters by use of natural zeolites. *Water Sci. Technol.* 39. 115-122.
- Padilla, L., Diego, M., Azanza, R., 2010. Exploring the potential of clay in mitigating *Pyrodinium bahamense* var. *compressum* and other harmful algal species in the Philippines. *J. Appl. Phycol.* 22, 761-768.
- Pan, G., Chen, J., Anderson, D., 2011a. Modified local sands for the mitigation of harmful algal blooms. *Harmful Algae.* 10, 381-387.
- Pan, G., Yang, B., Wang, D., Chen, H., Tian, B., Zhang, M., Yuang, X., Chen, J., 2011b. In-lake algal bloom removal and submerged vegetation restoration using modified local soils. *Ecol. Eng.* 37, 302-308.
- Parada, L., Crespín, G., Miranda, R., Katime, I,m 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Rev. Iberoam. Polim.* 5, 1-16.
- Pastor de Abram, A., 2004. Quitina y quitosano. Pontificia Universidad Católica del Perú. 312 p.
- Pazos, R. 2011. Evaluación de la concentración letal media de *Gymnodinium catenatum* Graham, 1943 (cultivo, medio de cultivo y células) en postlarvas de *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, Unidad Académica Mazatlán, Universidad Nacional Autónoma de México. 56 pp.
- Pérez, J., Ochoa, J.L., Gago, A., 2008. Effects of PSP toxins in white leg shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. *J. Food. Sci.* 73, 671–673.
- Pérez, J., Ochoa, J.L, Gago-Martínez, A., 2009. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population?. *Toxicon.* 53, 185–195.

- Pierce, R., Henry, M., Higham, C., Blum, P., Sengco, M., Anderson, D., 2004. Removal of harmful algal cells (*Karenia brevis*) and toxins from seawater culture by clay flocculation. *Harmful Algae*. 3, 141-148.
- Ramírez, F., 2006. <http://www.elaguapotable.com/Silice%20Activada%201.pdf> (último acceso: 21 de Noviembre de 2011).
- Reguera, B., 2002. Establecimiento de un programa de seguimiento de microalgas tóxicas. En Sar E., Ferrario M., Reguera, B (Eds). *Floraciones Algas del Cono Sur Americano*, Instituto Español de Oceanografía. España 21-54.
- Reis, P., Botelho, M., Lefebvre, K., 2010. Characterization of paralytic shellfish toxins in seawater and sardines (*Sardina pilchardus*) during blooms of *Gymnodinium catenatum*. *Hydrobiologia* 655, 89-97.
- Renault, F., Sancey, B., Badot, P., Crini, G., 2009. Chitosan for coagulation/flocculation processes - An eco-friendly approach. *Eur. Polym. J.* 45, 1337-1348.
- Rey, A., 2006. Adsorción de Zn, Cu, Cd y Pb por montmorillonita y su relación con factores ambientales (pH, temperatura y salinidad). Tesis de Maestría en Ciencias: Universidad Nacional Autónoma de México. Mazatlán, Sinaloa. 90 p.
- Reynolds, C. S., 2006. *Ecology of Phytoplankton*. Cambridge University Press. New York. 535 pp.
- Romero, T., Ferrán C., 2001. Flocculación de *Chorella* sp. con la utilización de quitosana. *Rev. Invest. Mar.* 22, 57-62.
- Rounsefell, G., Evans, J., 1958. Large scale experimental test of copper sulfate as a control for the Florida red tide. *Special Scientific Report Fisheries No. 270*, United States Fish and Wildlife Service, Washington, 57 p.
- Secher, S., 2009. Measures to control harmful algal blooms. *The Plymouth Student Scientist (Universidad de Plymouth)* 2, 212-227.
- Sengco, M., 2001. The aggregation of clay minerals and marine microalgal cells: Physicochemical theory and implications for controlling harmful algal blooms. Ph. D. Thesis. Joint Program in Oceanography. Massachusetts

- Institute of Technology, Dept. of Biology, and Woods Hole Oceanographic Institution. Estados Unidos, 237 p.
- Sengco, M., Anderson, D., 2004. Controlling harmful algal blooms through clay flocculation. *J. Eukaryot. Microbiol.* 51, 169-172.
- Sengco, M., Li, A., Tugend, K., Kulis, D., Anderson, D., 2001. Removal of red- and brown-tide cells using clay flocculation. I. Laboratory culture experiments with *Gymnodinium breve* and *Aureococcus anophagefferens*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 41-53.
- Sengco, M., Hagström, J., Granéli, E., Anderson, D., 2005. Removal of *Prymnesium parvum* (Haptophyceae) and its toxins using clay mineral. *Harmful Algae* 4, 261–274.
- Shimizu, Y. 2000. Chemistry and mechanism. En *Seafood and freshwater toxins pharmacology, physiology and detection*. Botana, L. (Ed). CRC Press. Boca Raton, 151-172 pp.
- Shuang, L., Xing, L., Yanling, Y., Rui, W., 2011. Removal of *Microcystis aeruginosa* and microcystic toxins by four algaecides. *International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring*.
- Song, Y., Sivakumar, S., Woo, J., Ko, S., Hwang, E., Jo, Q., 2010. Removal of *Cochlodinium polykrikoides* by dredged sediment: A field study. *Harmful Algae*. 9, 227-232.
- Sukenik, A., Shelef, G., 1984. Algal autoflocculation—verification and proposed mechanism. *Biotechnol. Bioingen.* 26. 142-147.
- Sukenik, A., Bilanovic, D., Shelef, G., 1988. Flocculation of microalgae in brackish and sea waters. *Biomass* 15. 187-199.
- Sun, Xiao, Joong, C., Eun, K., 2004. A preliminary study on the mechanism of harmful algal bloom mitigation by use of sophorolipid treatment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 304, 35-49.
- Tchobanoglous, G., Burton, F., 1996. *Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización*. Metcalf y Eddy Inc. McGraw-Hill. México. 752 pp.

- Tett, P., Barton, E. D., 1995. Why are there about 5000 species of phytoplankton in the sea?. *J. Plankton Res.* 17, 1693-704.
- Vandamme, D., Foubert, I., Fraeye, I., Meesschaert, B., Muylaert, K., 2012. Flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by high pH: role of magnesium and calcium and practical implications. *Bioresource Technology* 105. 114-119.
- Wang, Y., Zhuo, S., Yang, Y., Li, N., 2012. Application of chitosan in removing algae by dissolved air flotation. *Adv. Mat. Res.* 347-353. 1911-1916.
- Wiese, M., Agostino, P. D', Mihali, T., Moffitt, M., Neilan, B., 2010. Neurotoxic alkaloids: saxitoxin and its analogs. *Mar. Drugs.* 8, 2185-221.
- Yu, Z., Zou, J., Ma, X., 1994. Applications of clays to removal of red tide organisms. II. Coagulation of different species of red tide organisms with montmorillonite and effect of clay pretreatment. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 12, 316–324.
- Zaccaroni, A., Scaravelli, D. 2008. Toxicity of sea algal toxins to humans and animals. En Evangelista, V., Barsanti, L., Frassanito, A., Passarelli, V., Gualtieri, P. (Eds.), *Algal Toxins: Nature, Occurrence, Effect and Detection*, Springer. Pisa, Italia, 91-158 pp.
- Zar, J. 1999. *Biostatistical analysis*. 4a Edición. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey, USA, 663 pp.

## 11 APÉNDICES

### Apéndice A

#### Preparación de medio de cultivo F/2+Se

Para 950 mL de agua de mar filtrada (filtro de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$ ) se debe adicionar:

No.	Compuestos	Cantidad (mL)
1	$\text{NaNO}_3$	1
2	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1
3	$\text{H}_2\text{SeO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1
4	Solución de metales traza.	1
5	Solución de vitaminas.	0.5

Se lleva el medio de cultivo a un volumen de 1 litro de agua de mar filtrada y se esteriliza en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  y  $15 \text{ lb/in}^2$  de presión durante 15 min, excepto la solución de vitaminas y  $\text{H}_2\text{SeO}_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$  que se esteriliza por filtración (filtro de celulosa de 0.2  $\mu\text{m}$ ).

Las soluciones son preparadas como sigue:

#### Solución de nutrientes y selenio

Para 50 mL de agua destilada se adiciona la cantidad correspondiente del compuesto (ya sea  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$  o  $\text{H}_2\text{SeO}_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ ) y se lleva a un volumen final de 100 mL.

Compuestos	Cantidad (mg)	Volumen final (mL)
$\text{NaNO}_3$	7500	100
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	500	100
$\text{H}_2\text{SeO}_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$	0.129	100

Las soluciones son esterilizadas en autoclave a  $120^\circ\text{C}$  y  $15 \text{ lb/in}^2$  durante 15min. y deben ser mantenidas en refrigeración.

#### Solución de metales traza

Para 50 mL de agua destilada se adicionan los compuestos siguientes, que son pesados en una balanza analítica Sartorius CP224S:



<b>Solución</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad</b>
<b>Solución de metales traza.</b>	FeCl <sub>3</sub> -6 H <sub>2</sub> O	0.315 g
	EDTA Sal disódica	0.436 g
	CuSO <sub>4</sub> - 5 H <sub>2</sub> O	0.1 mL
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	0.1 mL
	ZnSO <sub>4</sub> - 7 H <sub>2</sub> O	0.1 mL
	CoCl <sub>2</sub> - 6 H <sub>2</sub> O	0.1 mL
	MnCl <sub>2</sub> - 4 H <sub>2</sub> O	0.1 mL

Se lleva a un volumen final de 100 mL con agua destilada, esta solución es calentada para disolver y se esteriliza en autoclave a 120°C y 15 lb/in<sup>2</sup> durante 15 min, posteriormente debe ser mantenida en refrigeración.

Los compuestos utilizados en la solución de metales traza son preparados con las cantidades siguientes:

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
<b>CuSO<sub>4</sub> - 5H<sub>2</sub>O</b>	0.98	100
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O</b>	0.63	100
<b>ZnSO<sub>4</sub> - 7H<sub>2</sub>O</b>	2.2	100
<b>CoCl<sub>2</sub> - 6H<sub>2</sub>O</b>	1	100
<b>MnCl<sub>2</sub> - 4H<sub>2</sub>O</b>	18	100

Para la solución de vitaminas en 50 mL de agua destilada deben añadirse:

<b>Solución</b>	<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad (mL)</b>
<b>Solución de Vitaminas</b>	Vitamina B12	0.1
	Biotina	1
	Tiamina	0.02

Se lleva a un volumen de 100 mL, se esteriliza por filtración y debe mantenerse en un frasco ámbar en refrigeración.

Los compuestos y cantidades que se utilizan para la preparación de vitaminas son los siguientes:

<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad (g)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>
<b>Vitamina B12</b>	0.1	100
<b>Biotina</b>	0.01	100
<b>Tiamina</b>	0.02	100

## Apéndice B

### Propiedades de las arcillas y clinoptilolita utilizadas.

Aluminosilicato	Origen	Composición Química							Composición mineral	As (m <sup>2</sup> /g)	PxC	CEC cmol/kg	Forma cristalina
		SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O					
Montmorillonita	Empresa Sigma Aldrich	59.8	17.45	4.69	2.22	3.09	0.24	1.41		117.6	11.9	80-120**	-
Arcilla roja	Huayocotla Hidalgo	57.49	27.03	9.17	1.04	1.16	0.94	1.50	Caolinita Feldespato Cuarzo Illita	34.52	-	5-15**	Amorfa
Clinoptilolita (zeolita)	Oaxaca	69.91	10.94	0.20	0.70	0.20	3.80	2.80	Clinoptilolita Sódica	37.56	11.4	256	Placa ***

As: área superficial, PxC: pérdida por calcinación, n.d: no determinado, CEC: capacidad de intercambio catiónico

\* Caracterización obtenida por Rey (2006).

\*\* Meunier (2005).

\*\*\* No prevalece una forma definida

## Propiedades de los agentes coagulantes y floculantes utilizados.

Coagulante floculante	Fórmula química	Solubilidad en agua (g L <sup>-1</sup> )	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Descripción	Densidad (g cm <sup>-3</sup> )	Contenido de aluminio %	Referencia
Sulfato de aluminio	Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> . 18H <sub>2</sub> O	870.0	342.1	Blanco, incoloro, inodoro	1.69	-	1
Óxido de calcio	CaO	1.60	56.08	Blanco levemente amarillo, inodoro	3.37	-	2
Hidróxido de calcio	Ca(OH) <sub>2</sub>	1.70	74.10	Sólido, blanco, inodoro	2.24	-	3
Policloruro de aluminio	(Al <sub>2</sub> (OH) <sub>n</sub> . Cl <sub>6-n</sub> ) <sub>x</sub>	Soluble a cualquier concentración	-	Sólido, amarillo, inodoro	1.30	12.2-12.5	4
Dióxido de silicio	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	200.0	284.20	Sólido, blanco, inodoro	0.90	-	5

1.- Fagalab S.A. de C.V. Sulfato de aluminio ([Http://fagalab.com/Hojas%20de%20Seguridad/sulfato%20de%20aluminio.pdf](http://fagalab.com/Hojas%20de%20Seguridad/sulfato%20de%20aluminio.pdf)), acceso 20/06/2012.

2- Fagalab S.A. de C.V. Oxido de calcio ([Http://fagalab.com/Hojas%20de%20Seguridad/oxido%20de%20calcio.pdf](http://fagalab.com/Hojas%20de%20Seguridad/oxido%20de%20calcio.pdf)), acceso 20/06/2012.

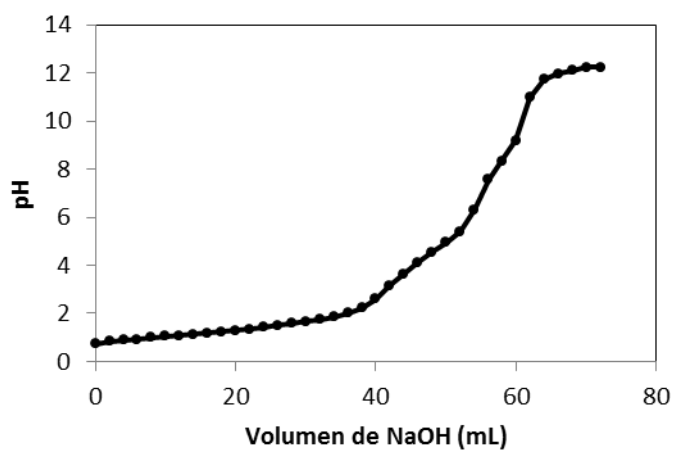
3- Merck. Hidróxido de sodio ([Http://www.esiqie.mx/servicios/ts/hidroxido%20de%20calcio.pdf](http://www.esiqie.mx/servicios/ts/hidroxido%20de%20calcio.pdf)) acceso 20/06/2012.

4- Com. Pers. Nacional Química Industrial S.A de C.V

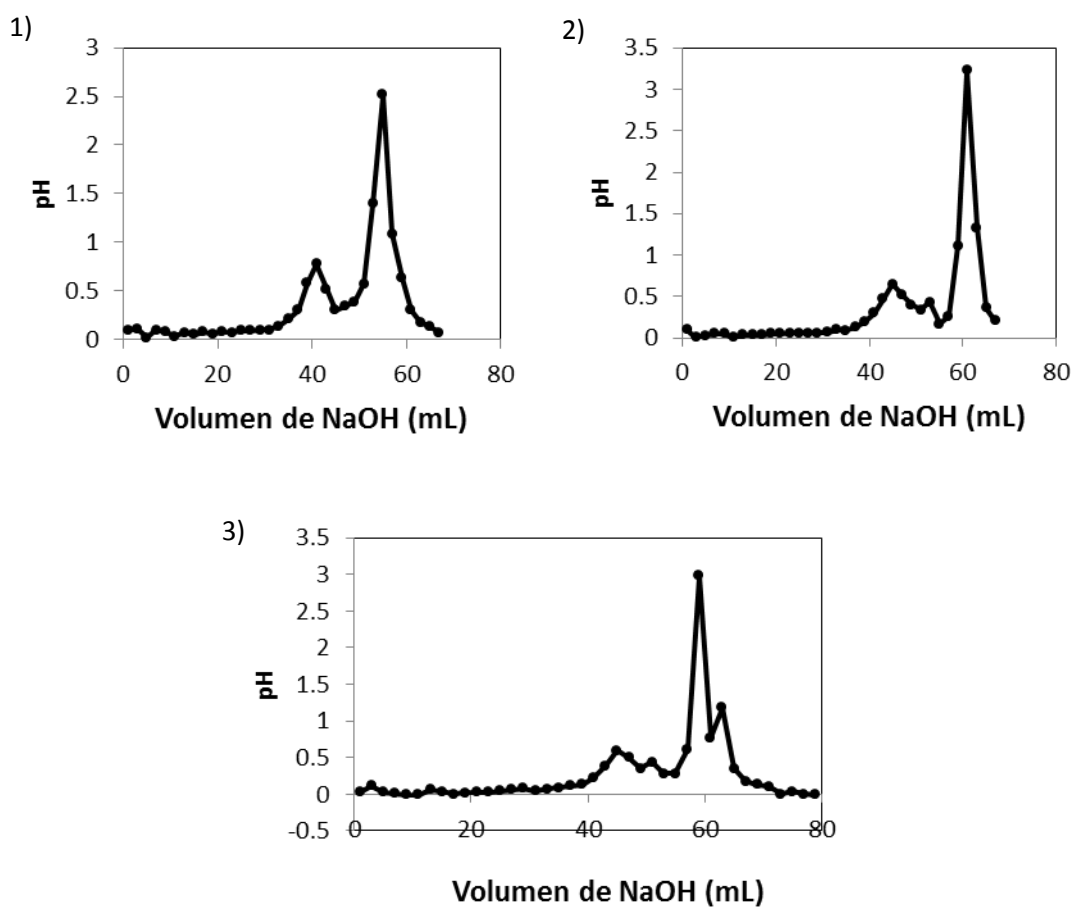
5. Fagalab. Silicato de sodio. ([Http://fagalab.com/Hojas%20de%20Seguridad/metasilicato%20de%20sodio.pdf](http://fagalab.com/Hojas%20de%20Seguridad/metasilicato%20de%20sodio.pdf) ) acceso 20/06/2012

## Apéndice C

### Valoración potenciométrica del quitosano



Curva de titulación del quitosano



Resultados de la primera derivada de titulación del quitosano