



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

REMOCIÓN DE NUTRIMENTOS (N:P) A PARTIR DEL USO DE
MICROALGAS EN AGUA RESIDUAL DE LA PLANTA DE
TRATAMIENTO DE SAN JOSÉ DEL RINCÓN, ESTADO DE MÉXICO

Que para obtener el título de

B I Ó L O G O

P R E S E N T A

ALEJANDRA ALMARAZ RIVERA

DIRECTORA DE TESIS

M. EN C. GLORIA GARDUÑO SOLÓRZANO

HERBARIO IZTA



Los Reyes Iztacala, Edo. de México mayo del 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo recibió financiamiento del Programa de Apoyo a Profesores de Carrera 2012, de la FES Iztacala; PAPCA 2012, número 48.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a mis padres Araceli y Pedro, “gracias por el apoyo incondicional y por las palabras de aliento que siempre me brindaron”.

Durante mi formación, conocí a muy buenos amigos, entre ellos a Perla, Humberto, Mishael, Armandito a quienes les agradezco el apoyo en todo momento, su compañía y me siento afortunada por contar con su amistad incondicional.

A Carlos, quien es un hombre excepcional quien me ha acompañado y apoyado durante los dos últimos años de mi carrera profesional y que lo sigue haciendo, además de que se ha convertido en una parte muy importante de mi vida.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, casa de mi formación; en particular al herbario IZTA, al acuario “Juan Luis Cifuentes”, la Unidad de Biotecnología y Prototipos, UBIPRO, la Unidad de Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la Salud y la Educación, UIICSE y al módulo de Diversidad Vegetal I por todas las facilidades para llevar a cabo este trabajo.

También, un gran reconocimiento a la Comisión de Cuenca Valle de Bravo-Amanalco a través del Biol. Rubén López Cano quien nos apoyó en la selección del área de estudio así como contar con todas las facilidades para el trabajo de campo.

Por los conocimientos y apoyo proporcionados para la realización de este trabajo al M. en C. Mario Fernández Araiza, Dr. Héctor Hernández Hernández, Biol. Omar Ángeles López, del Acuario; al Dr. Jorge Campos Contreras, Dra. Martha Martínez García, M. en C. Alejandro Monsalvo Cruz, del Laboratorio de Biología Molecular; a la Dra. Patricia Bonilla, Ma. del Rocío Ibarra Montes, de la UIICSE; Dr. Jorge Gersenowies y al Biol. Moisés Chávez Araujo del Laboratorio de Diversidad Vegetal I.

A la M. en B. Mónica Rodríguez Palacio del Laboratorio de Ficología Aplicada del Departamento de Hidrobiología de la UAM Iztapalapa por el apoyo de bibliografía y la dirección de algunos aspectos metodológicos.

Un tierno agradecimiento por su apoyo, dedicación, paciencia y conocimientos que me fueron brindados, a la Maestra Gloria Garduño Solórzano, quien ha sido una parte clave en mi desarrollo.

Muchas gracias

CONTENIDO

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	9
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Área de estudio	9
TRABAJO EN CAMPO	11
Obtención de muestras	11
Análisis físico químico	13
TRABAJO EN LABORATORIO	13
Determinación de la ficoflora	13
Aislamiento de especies	13
Cultivos	14
Cinética poblacional	14
Obtención de biomasa	15
Biomasa libre e inmovilizada	15
Agua residual tratada	16
Lámpara de U.V	16
Análisis NO_3 , NH_4^+ y PO_4^3	16
Prueba de remoción de nutrientes en el laboratorio	16
Análisis estadístico	16
Resultados y discusión	17
Condiciones físico químicas	17
Determinación taxonómica	18
Crecimiento poblacional	19
Inmovilización	21
Pruebas de remoción de N:P utilizando <i>S. obtusus</i> , <i>C. vulgaris</i> y Consorcio	22
Análisis estadístico	27
Conclusiones	30
Sugerencias	31
Apéndices 1, 2, 3 y 4	32
Literatura	36

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la remoción de (N:P) a través de *Scenedesmus obtusus*, *Chlorella vulgaris* y consorcio*. Para la obtención del material ficológico, se colectaron muestras directas en dos sitios del Río de San José del Rincón, Estado de México; éstas fueron procesadas de dos formas, una parte se preservó con formol al 4% y otra se mantuvo *in vivo*; ambas se utilizaron para la determinación taxonómica. Los cultivos monoclonales se obtuvieron a partir del aislamiento por diluciones seriadas. Para cada especie aislada, se determinó la cinética de crecimiento en cultivos: estático, semicontinuo alimentado, discontinuo al 10 y 40%. La prueba de remoción, se realizó por duplicado en el laboratorio, utilizando reactores cilíndricos con 2 l de agua residual tratada e inoculados con cultivos inmovilizados en *lufa* (CI), libres (CL). Adicionalmente, se caracterizó el ambiente a través de algunas variables fisicoquímicas (pH, oxígeno disuelto, alcalinidad, dureza, nitratos, amonio, ortofosfatos y temperatura del agua). La ficoflora determinada correspondió a 16 taxa, 7 de ellos fueron Chlorophyta: *Ankistrodesmus*, *Chlorococcus*, *Chlorella vulgaris*, *Closterium*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus obtusus*, *Spirogyra*; 4 Euglenophyta: *Euglena*, *Lepocinclis*, *Phacus*, *Trachelomonas*; 4 Cyanoprokaryota: *Anabaena*, *Chroococcus*, *Merismopedia punctata* y *Oscillatoria* y 1 Bacillariophyta: *Navicula*. Las especies con potencial de remoción de nutrientes en agua residual aisladas correspondieron a *S. obtusus* y *C. vulgaris*, de ellas el cultivo discontinuo alimentado al 40% fue donde se logró la mayor biomasa con 7×10^6 , 4.4×10^6 cel/ml respectivamente. La prueba de remoción indicó que *S. obtusus* (I) removió NO_3^- 45%, NH_4^+ 46% y PO_4^{3-} 54%, y *C. vulgaris* (I) NO_3^- 61%, NH_4^+ 95% y PO_4^{3-} 37%. Por tanto, esta última fue la especie con mayor porcentaje de remoción de NO_3^- y NH_4^+ . Asimismo las especies inmovilizadas mostraron mayor eficiencia de remoción en comparación con los cultivos libres. La caracterización ambiental del área de estudio demostró que es un ambiente eutrófico, con baja mineralización.

*consorcio: asociación de varias poblaciones de microorganismos (algas, hongos y bacterias) que interactúan entre ellas e intervienen en conjunto en la remoción de nutrientes en el agua residual: Estas en general, de forma individual son menos activas que en su conjunto (Morales, 2013 com. pers.)

INTRODUCCIÓN

La cantidad de agua que se precipita y almacena en el territorio nacional anualmente es aproximadamente 1.5 billones de m³. De ésta, el 72% por evaporación regresa a la atmósfera; el 26% escurre en diferentes sistemas lóticos y el 2% restante recarga los mantos acuíferos. De tal forma que la disponibilidad natural media anual del país es de 465 mil millones de m³ de agua dulce renovable que es aprovechada en diferentes usos, entre ellos el industrial, riego y doméstico (CONAGUA, 2011, IMTA, 2008).

Las de uso doméstico incluyen actividades de limpieza como el aseo personal, de ropa y los efluentes de los servicios sanitarios, los cuales son vertidos en cárcamos, pero también diluidos por la incorporación de agua pluvial de la región, el producto de estas son las aguas residuales (Rodier,1981). Este tipo de aguas contiene compuestos sulfatados y nutrientes, entre ellos el nitrógeno, en diferentes formas: nitrato (NO₃⁻), nitrito (NO₂), amonio (NH₄⁺) y amoniaco (NH₃), así como el fósforo, en forma inorgánica o disuelta (PO₄⁻, HPO₄⁻, H₂PO₄⁻, Ca(PO₄)³⁻). Así también algunos nutrientes como el amonio y ortofosfatos pueden incorporarse a los sistemas acuáticos a través del arrastre de suelos fertilizados, pero también por descarga de aguas residuales domésticas e industriales sin tratamiento o tratadas insuficientemente (Hernández *et al.*, 2012). Estos nutrientes en aguas residuales varían entre 12 y 64 mg NH₄⁺/l y 1 y 5 mg PO₄³⁻ /l pero en la ciudad de México alcanzan los 25 mg/l (Barrera *et al.*, 2008, Monroy *et al.*, 1997).

El contenido de altas concentraciones de nutrientes en aguas residuales, disminuye la posibilidad de ser reusadas, por ello es necesario realizar un tratamiento, el cual, en términos generales comprende cuatro procesos; pretratamiento (se retira el material inerte y se controla el caudal hacia el sistema de tratamiento), tratamiento primario (donde se separan sólidos sedimentables), secundario (proceso aerobio o anaerobio en el que ocurren la mayoría de las actividades de depuración de materia orgánica) y terciario (proceso opcional a través de pulimiento o cloración) (Guido Aguilar y García López, 2012). El resultado final de cada uno de estos procesos genera un efluente con menor cantidad de nutrientes (Guido Aguilar y García López, 2012, Willey, 2007). Sin embargo en muchos casos aún con el tratamiento secundario el agua residual contiene una alta concentración de nitrógeno y fósforo, lo cual provoca eutrofización de los cuerpos receptores y otros problemas a largo plazo (Alvarado Granados, 2012).

Por ello en el proceso terciario se han empleado algunas microalgas para el pulimiento en el tratamiento de aguas residuales, debido a los procesos acoplados de bacterias, quienes realizan la degradación de la materia orgánica y las microalgas utilizan los compuestos inorgánicos como amonio el cual es incorporado por medio de la mineralización siendo éste utilizado para conformar aminoácidos a través de la transaminación, o bien pueden incorporarlo en forma de nitrato (Alexander, 1980., Atlas y Bartha, 1981, Madigan *et al.*, 2009).

En México se desechan cerca de 191 m³/s de aguas residuales, de las cuales se tratan 37 m³/s, generalmente este volumen de agua no puede ser reutilizado debido a la presencia de compuestos que generan un desequilibrio en los ecosistemas acuáticos y en ocasiones afectan a la salud humana (CONAGUA, 2011).

Por lo que una alternativa biotecnológica para el tratamiento de aguas residuales es la implementación de humedales artificiales debido a su bajo costo de instalación y mantenimiento, éstos están integrados por tres elementos: agua, plantas vasculares y material base de soporte. En México en el 2005 estos sistemas habían sido utilizados en un 6% del total de las plantas de tratamiento instaladas, incrementando el porcentaje de remoción de la materia orgánica a través del proceso de mineralización del nitrógeno, fósforo y azufre, por la participación de diferentes microorganismos (Anda Sánchez, 2007).

En Venezuela se han realizado numerosas investigaciones que abordan aspectos de fitorremediación, mediante el uso de plantas acuáticas, cianobacterias y microalgas con el fin de aminorar los sustratos degradados o contaminados así también utilizan filtros intermitentes de arena, filtros rocosos, sistemas de jacintos, lenteja de agua y humedales. Por ejemplo, Núñez *et al.*, (2006), llevaron a cabo el pulimiento de efluentes de un sistema de lagunas de estabilización, implementando un humedal plantado con *Typha dominguensis*. Chacón *et al.*, 2004 utilizaron *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. para la remoción de nitrógeno (amonio), fosforo (ortofosfatos) y DQO.

Se ha sugerido la implementación de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales ya que estas son fundamentales en los procesos biogeoquímicos en humedales (Goldsborough y Robinson, 1996), debido a su capacidad de remover cantidades significativas de nitrógeno y fósforo para su desarrollo contribuyendo al

mejoramiento de la calidad de los efluentes, además del aprovechamiento de nutrientes que son utilizados en la formación de proteínas en la biomasa algal y al final se obtienen productos de valor agregado (Chacón *et al.* 2004, Charity *et al.*, 2009), por lo que algunos invertebrados carnívoros y omnívoros pueden consumirlas en temporadas de escasez. Éstas pueden ser más importantes que las plantas macroscópicas para herbívoros ya que son fáciles de asimilar, además de que son el alimento para peces en algunos lugares durante el invierno, como en Florida (Goldsborough y Robinson, 1996).

En México, Ramírez-Carrillo *et al.*, (2009) evaluaron la eficiencia de un humedal artificial de flujo vertical (HAFV) intermitente en el Lago de Xochimilco. Orozco *et al.*, (2006) valoraron el HAFV de Tapachula, Chiapas, utilizando especies vegetativas. Romero-Aguilar *et al.*, (2009) estimaron la remoción de aguas residuales de Morelos, con el uso de *Phragmites australis* y *Typha dominguensis* en humedales artificiales. Valenzuela Salcedo *et al.*, (2007) realizaron el tratamiento biológico de aguas residuales porcícolas en Hermosillo, Sonora. Hernández *et al.*, (2012) compararon la remoción de amonio y ortofosfatos de cultivos libres e inmovilizados de *C. vulgaris* y *Spirulina subsalsa*. González *et al.*, (1997) compararon la eficiencia de remoción de amoníaco y fósforo con *C. vulgaris* y *S. dimorphus*. Ruiz *et al.*, (2010) inmovilizaron *C. vulgaris* y *S. obliquus* para la remoción de N:P. También en otras regiones del mundo han sido investigadas por Rao *et al.*, (2010) quienes emplearon *C. vulgaris* en el efluente de una planta de tratamiento de aguas residuales. Zhang *et al.*, (2012) utilizaron *Chlorella* sp. para la remoción de amonio, nitrógeno y ortofosfatos en aguas residuales municipales. Loy *et al.*, (2009) emplearon *C. vulgaris* inmovilizada para la remoción de dos colorantes (rojo 2GA y azul marino).

En el presente trabajo se llevó a cabo el uso de microalgas con fines de fitorremediación en aguas residuales tratadas, ya que éstas han sido poco estudiadas en México, a pesar de ser organismos con ciclos de vida cortos y altamente eficientes en la remoción de nutrimentos. Esto con el fin de generar alternativas biológicas, para reducir el impacto ecológico de cuerpos acuáticos receptores.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de algunas microalgas y un consorcio (libres e inmovilizados en *lufa*), para remover nutrimentos N:P del agua residual tratada de la planta de tratamiento de San José del Rincón, Estado de México.

Objetivos particulares

- Caracterizar el pH, temperatura, alcalinidad, dureza total, oxígeno disuelto, nitratos, amonio y ortofosfatos del agua residual tratada del río San José del Rincón, Estado de México.
- Determinación taxonómica de la ficoflora de los sitios seleccionados.
- Aislar microalgas con potencial de remoción, del área de estudio.
- Cultivar las especies seleccionadas.
- Inmovilizar las especies cultivadas.
- Determinar el crecimiento poblacional en cultivos: estático, semicontinuo alimentado, discontinuo 10% y 40%.
- Determinar la eficiencia de remoción de nitrato, amonio y ortofosfatos en agua residual tratada empleando cultivos libres e inmovilizados de las especies seleccionadas, en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: San José del Rincón, Estado de México tiene un clima templado sub-húmedo con lluvias en verano C (w2)(w); la temperatura anual varía entre 12 a 18°C, con registros entre 2 a 28°C. Lluvias abundantes en julio, agosto y septiembre; en febrero y marzo con vientos y tolvánicas; en diciembre, enero y febrero hay heladas; durante abril y mayo son los meses de mayor calor (INAFED, 2010).

Planta de tratamiento: En el 2007 se construyó una planta de tratamiento (P.T.) biológico de aguas residuales, que se localiza en las coordenadas geográficas 19°40'04.60" Norte y 100°09'25.60" Oeste, a 2,775 m snm (Figura 1). Ésta inició operaciones en diciembre del mismo año; fue diseñada para un gasto de 2.6 l/s. Consta de una caja de recepción donde se incluye un vertedor de excedentes; un cárcamo de bombeo con dos bombas

sumergibles, antecedido por tres rejillas de apertura de 1 cm de luz a 0.5 cm; un reactor anaerobio de flujo ascendente; un tubo conector hacia dos humedales en serie de flujo subsuperficial; en el primero con *Phragmites* spp. Las dimensiones de los humedales son de 84 m de largo, 18 m de ancho y una profundidad promedio de 70 cm. Cuenta con un área de 1,512 m² y volumen de 1,058 m³. El efluente descarga al río de San José del Rincón (López Cano, 2010).



Figura 1. Diagrama de planta de tratamiento en San José del Rincón, Estado de México.

Las diferentes etapas que se llevaron a cabo durante este trabajo se esquematizan en la figura 2.

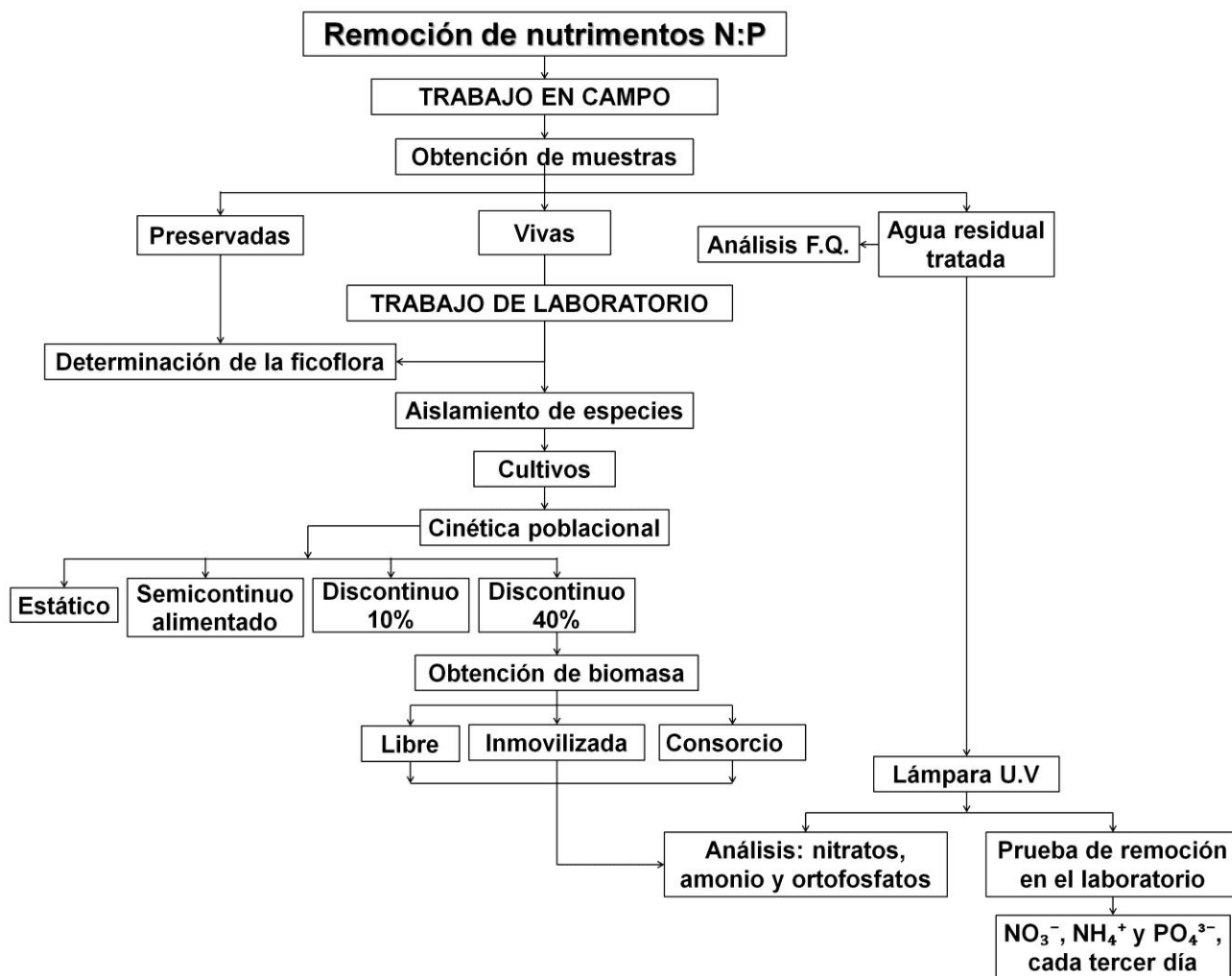


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología utilizada en la remoción de nutrientes.

TRABAJO EN CAMPO

Se efectuaron dos colectas directas del fitobentos en el río de San José del Rincón, Estado de México, los días 25 de junio y 28 de agosto del 2012. Los sitios de muestreo fueron dos; el sitio 1, correspondiente a 100 m antes de la entrada de la P.T. y el sitio 2, 100 m después de la salida de los humedales de la P.T. (Figuras 3 y 4).

Obtención de muestras

En cada uno de los sitios seleccionados, se colectó una muestra ficológica de los crecimientos algales detectados en el área de estudio. Este material se dividió en tres porciones iguales: la primera se preservó con formol al 4% y borato de sodio, para analizar la ficoflora, la segunda, se mantuvo viva para apoyar la determinación taxonómica y la

última, fue material biológico ocupado para el aislamiento (Band-Schmidt, 2007; Moreno, 2003).

También fueron tomados 20 l de agua residual de cada sitio en bidones; estos volúmenes permitieron realizar la prueba de remoción más tarde.



Figura 3. a) Vista de la planta de tratamiento (PT) de San José del Rincón, Estado de México, b) sitio 1 ubicado en el río San José del Rincón 100 m antes de la entrada a la PT, c) sitio 2 localizado en el cauce del río, 100 m después de la PT.

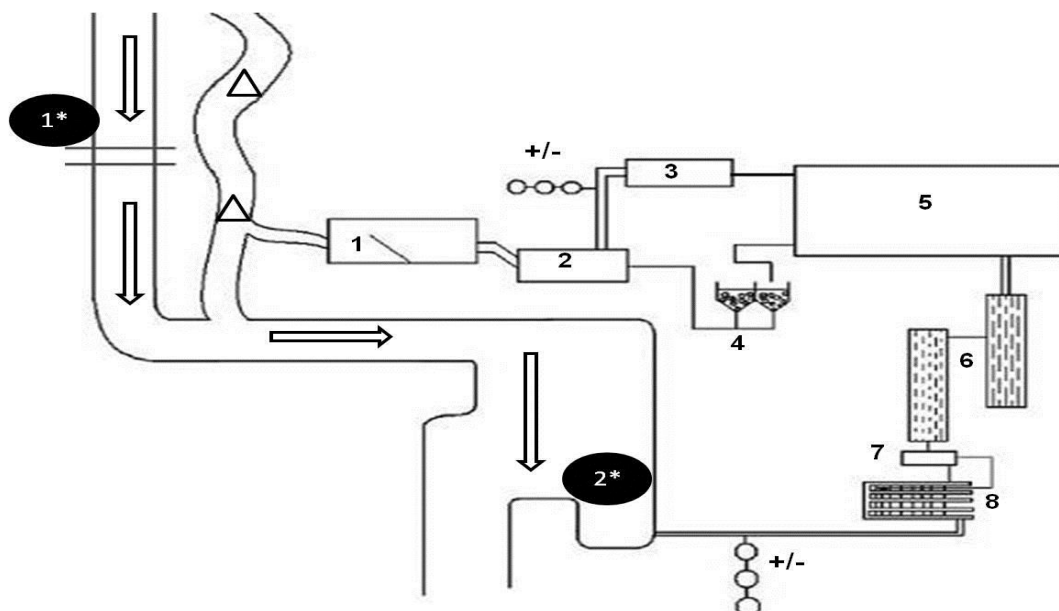


Figura 4. Croquis de la planta de tratamiento y sitios de colecta; donde, 1.- Cribado grueso, 2.- Desarenador, 3.- Microcribado, 4.- Purgador de lodos, 5.- Reactor anaerobio, 6.- Humedales, 7.- Dosificador de hipoclorito de sodio, 8.- Desinfección. 1*, Control de flujo (+/-), flecha, río San José del Rincón; triángulo, alcantarillado municipal. Sitio de colecta 1, 100 m antes de la entrada de P.T., 2*, sitio de colecta 2, 100 m después de la P.T.

Análisis físico químico

Se determinaron algunas características fisicoquímicas del agua residual como: pH el cual se midió con un potenciómetro marca Conductronic; la temperatura del agua y ambiental se obtuvo con un termómetro de mercurio marca Brannan, oxígeno disuelto se determinó con el método de Winkler modificado, alcalinidad y dureza total por titulometría (Robles Valderrama *et al.*, 2008).

TRABAJO DE LABORATORIO

Determinación de la ficoflora

Las muestras fueron observadas al microscopio de luz para la determinación taxonómica (Band-Schmidt, 2007). Esta se realizó con apoyo de las obras de Desikachary (1959), Wehr y Sheath (2003), Ciugulea y Triemer (2010), Godinho *et al.*, (2010) y John *et al.*, (2002).

Aislamiento de especies

Bajo condiciones asépticas, a través de diferentes técnicas de aislamiento se obtuvieron las cepas utilizadas.

La primera opción fue realizada por dilución seriada 1:10. Este procedimiento se realizó con un ml de la muestra original, agregándola a un tubo de ensayo con 9 ml de medio, se homogenizó y posteriormente de este último tubo se tomó un ml y se agregó a un segundo tubo. A partir de ésta dilución se tomo una muestra y se colocó en un porta objetos excavado para ser observado al microscopio de luz, para aislar las especies de interés con una pipeta Pasteur de punta adelgazada (Band-Schmidt., 2007, Garduño *et al.*, 2011).

La segunda técnica, consistió en el uso de una placa de agar, sembrando con rayado en estría. En este caso, las cajas Petri contenían agar nutritivo y se agregó un ml de la muestra original; la cual se distribuyó con un asa de siembra. Este material se incubó durante 15 días y posteriormente se observaron al microscopio óptico. El procedimiento se realizó 4 veces hasta que las especies elegidas quedaron totalmente aisladas (Band-Schmidt, 2007).

Con el fin de obtener cultivos unialgales, cada especie aislada en ambas técnicas fueron trasladadas a tubos eppendorf por separado, con un ml de agua destilada y Ferti-Plus

(apéndice 1) y se cultivaron durante cinco días con un fotoperiodo 12:12, a 20°C, con irradiación de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Posteriormente, fueron escalados hasta un volumen final de 1.5 l utilizando agua potable marca Kirkland, con 4.5 ml de Ferti-Plus (Band-Schmidt, 2007).

Cultivos

Cada especie aislada se cultivó en botellas transparentes con una capacidad de 1.5 l con un volumen de 1 l de agua potable para consumo humano marca Kirkland, a las cuales se les agregó 3 ml de Feti-Plus. Estos se mantuvieron durante 15 días en aireación y fotoperiodo constante con intensidad luminosa de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la diferencia de volumen evaporado se aforó con agua destilada estéril diariamente. Esto con la finalidad de obtener el inóculo, para la elaboración de la curva de crecimiento (Hernández-Reyes, 2010, Rosales-Loaiza *et al*, 2008).

Cinética poblacional

Se determinó la cinética de crecimiento con la finalidad de conocer su constante de cada cepa y con ello deducir los días de la fase exponencial en diferentes sistemas de cultivo: estático, semicontinuo alimentado, discontinuo al 10% y 40% (Hernández-Reyes, 2010, Rosales-Loaiza *et al*, 2008).

El Estático (apéndice 2 A): también denominado *batch*, no se añade ni se elimina medio de cultivo después de la inoculación. El Semicontinuo alimentado (apéndice 2 B): se añade una cantidad determinada de nutrientes en forma semicontinua (Nieves, 2000, Lemus, 2006). El Discontinuo 10% (apéndice 2 C): son cultivos con tasa de renovación del 10% cada tiempo determinado, el cultivo extraído es renovado con medio de cultivo. Y finalmente, el Discontinuo 40% (apéndice 2 D): representan cultivos con tasa de renovación del 40% cada tiempo determinado, donde el cultivo extraído es renovado con medio de cultivo (Bermúdez *et al.*, 2002).

Cada uno de estos cultivos se realizaron por triplicado en botellas transparentes de 400 ml, con agua potable embotellada para consumo humano marca Kirkland, a las cuales se les agregó 1.2 ml de medio de cultivo Ferti-Plus. Estos se mantuvieron durante 10 días en aireación y fotoperiodo constante, intensidad luminosa de $90 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, manteniendo las características propias de cada tipo de cultivo (Hernández Reyes, 2010,

Lemus *et al.*, 2006). La densidad celular se determinó empleando una cámara de Neübauer (apéndice 3), durante 10 días hasta alcanzar las diferentes fases en las curvas de crecimiento poblacional y determinar los días de cosecha y obtención de biomasa con células en fase exponencial (Band-Schmidt, 2007, Arredondo *et al.*, 2007).

Obtención de biomasa

La biomasa cosechada de la cinética poblacional fue empleada para la producción de cultivos destinados para la obtención de cultivos libres e inmovilizados.

Biomasa libre

Cada especie aislada y el consorcio se cultivaron por triplicado en botellas transparentes con una capacidad de 1.5 l con un volumen de 1 l de agua potable para consumo humano marca Kirkland, a las cuales se les agregó 3 ml de Feti-Plus. Estos se mantuvieron durante 15 días en aireación y fotoperiodo constante, intensidad luminosa de $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y la diferencia de volumen evaporado se aforó con agua destilada estéril diariamente (Hernández-Reyes, 2010, Rosales-Loaiza *et al.*, 2008).

Biomasa inmovilizada

Cada cultivo y el consorcio se inmovilizaron en *lufa* (apéndice 4); utilizando botellas transparentes de 1.5 l con 1 l de agua para beber marca Kirkland, más 3 ml de Ferti-Plus. Estos contenedores fueron inoculados con 10 ml de la cepa seleccionada en fase exponencial con 6×10^6 cel/ml en 11 gr de *lufa* previamente cortada y esterilizada (apéndice 4); los cuales se mantuvieron en aireación constante, con ciclos de luz continua, por un periodo de 6-10 días (Figura 5). La biomasa inmovilizada fue estimada por peso seco a partir de 5 cm^3 del sustrato, usando un sistema de filtración Millipore con filtros de $5.0 \mu\text{m}$, mediante el método descrito en el apéndice 4 (Hernández-Reyes, 2010, Rosales-Loaiza *et al.*, 2008).

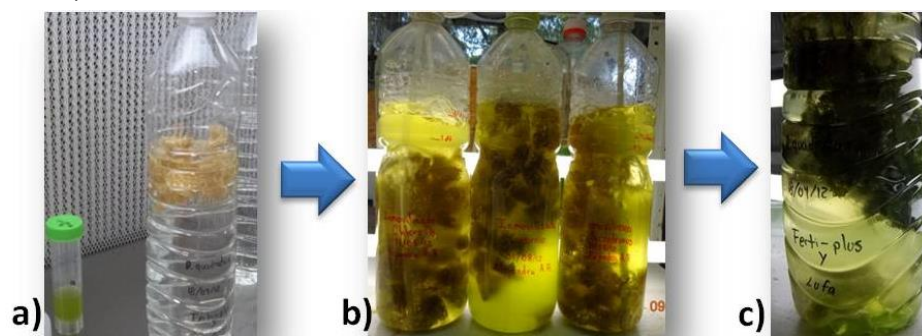


Figura 5. Proceso de Inmovilización, a) siembra del cultivo, b) cultivos con aireación, c) cultivo inmovilizado, después de 8 días de incubación.

Agua residual tratada

Lámpara de U.V

La muestra de agua residual original obtenida de los sitios de colecta, se trató con lámpara de luz ultravioleta marca BOYU, durante 4 h, con el fin de disminuir el número de microorganismos, y con ello evitar la competencia de éstos con las poblaciones de microalgas (Figura 6) (Hernández *et al.*, 2012).

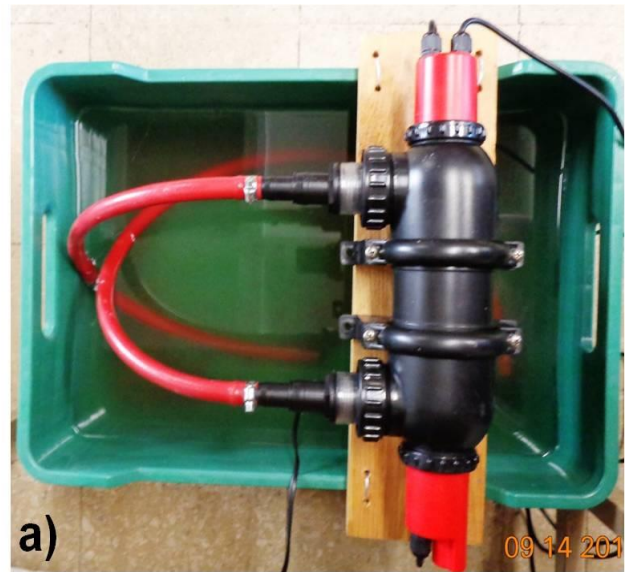


Figura 6. Tratamiento del agua residual empleando lámpara de luz ultravioleta.

Análisis de NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-}

La concentración de nitratos, amonio y ortofosfatos se determinó al inicio y posteriormente cada tercer día durante la prueba de remoción, mediante los métodos de reducción de cadmio, Nessler y molibdovanadato respectivamente empleando un espectrofotómetro marca Hach modelo 2800 (APHA *et al.*, 1989). El análisis de estos parámetros se realizó en las instalaciones del Acuario “Juan Luis Cifuentes” de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Prueba de remoción de nutrimentos en el laboratorio

En reactores cilíndricos de vidrio transparente con capacidad de 6 l, se vertieron 2 l de agua residual tratada e inoculados con los cultivos: libre, inmovilizado y consorcio. Estos se mantuvieron a temperatura ambiente con ciclo de luz de 12:12 y $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad luminosa; ensayo que se realizó por duplicado.

La cuantificación de nitratos, amonio y ortofosfatos se realizó posteriormente cada tercer día; durante un periodo de 18 días, por las técnicas antes señaladas (Romero-Aguilar *et al.*, 2009).

Análisis estadístico

Los resultados se procesaron con el análisis de varianza de un factor (ANOVA simple) y la prueba de Fisher, ambos con un nivel de significancia de 0.05 (Durán *et al.*, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Condiciones Físico-químicas

Las condiciones físico químicas del agua en los sitios de muestreo fueron diferentes; en el Sitio 1, las características organolépticas fueron, color del agua transparente e inodora y las variables fisicoquímicas promedio en ambas colectas fueron: pH 7.5, valor cercano a la neutralidad, el oxígeno disuelto 5.6 mg l⁻¹, que según Gama *et al.*, (2010) corresponde a un cuerpo de agua bien oxigenado, poco mineralizado con base en la dureza de 50 mg CaCO₃/l y alcalinidad 36.5 mg CaCO₃/l (Rodier, 1981). Los nitratos se registraron de 0.2 mg/l, el amonio fue de 0.12 mg/l y los ortofosfatos de 0.6 mg/l. Estas características hacen referencia a un cuerpo de agua bien oxigenado, poco mineralizado y con baja cantidad de nutrientes debido a que este sitio no lleva descargas de aguas residuales.

En contraste, el sitio 2 es un área que recibe el agua residual tratada así como los excedentes del agua residual municipal que no pasa por la planta de tratamiento por lo que las condiciones organolépticas fueron: olor desagradable, color pardo además de notorios cambios en las variables fisicoquímicas como: pH 7.4, oxígeno disuelto de 3.3 mg/l⁻¹, ambiente mineralizado y los nutrientes cuantificados corresponden a ambientes acuáticos eutróficos. Con base en el criterio de Wetzel (2001) los valores de nitratos, amonio y ortofosfatos, para este sitio corresponden a altas concentraciones de nutrientes de 0.9 mg/l, 3 mg/l y de 17 mg/l respectivamente. Vázquez *et al.*, (2007), indicaron valores semejantes a ambientes eutróficos en cuerpos de agua lenticos. En la tabla 1, se observan los registros obtenidos para cada una de las variables analizadas.

Tabla 1: Registros de variables Fisicoquímicas de los sitios estudiados.

Variable	06/02/12		15/04/12		Valores promedio	
	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 1	Sitio 2
pH	7.7	7.4	7.3	7.4	7.5	7.4
O ₂ mg l ⁻¹	6	4.4	5.2	2.3	5.6	3.3
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /l)	28	168	45	76	36.5	122
Dureza total (mg CaCO ₃ /l)	38	56	63	111	50.5	83.5
Nitrato (mg/l)	0.11	0.4	0.3	1.4	0.2	0.9
Amonio (mg/l)	0.1	3.5	0.15	2.5	0.12	3
Ortofosfatos (mg/l)	0.4	21	0.8	13	0.6	17
Temperatura °C	19	15	20	20	19.5	17.5

Determinación taxonómica: En la figura 7 se muestran los porcentajes de la ficoflora observada en sitio 1 y 2. En total se determinaron 16 taxa, 7 (44%) correspondiente a Chlorophyta: *Ankistrodesmus*, *Chlorococcus*, *Chlorella vulgaris*, *Closterium*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus obtusus*, *Spirogyra*; 4 (25%) a Euglenophyta: *Euglena*, *Lepocinclis*, *Phacus*, *Trachelomonas*; 4 (25%) Cyanoprokaryota: *Anabaena*, *Chroococcus*, *Merismopedia punctata* y *Oscillatoria*, y 1 (6%) Bacillariophyta: *Navicula*.

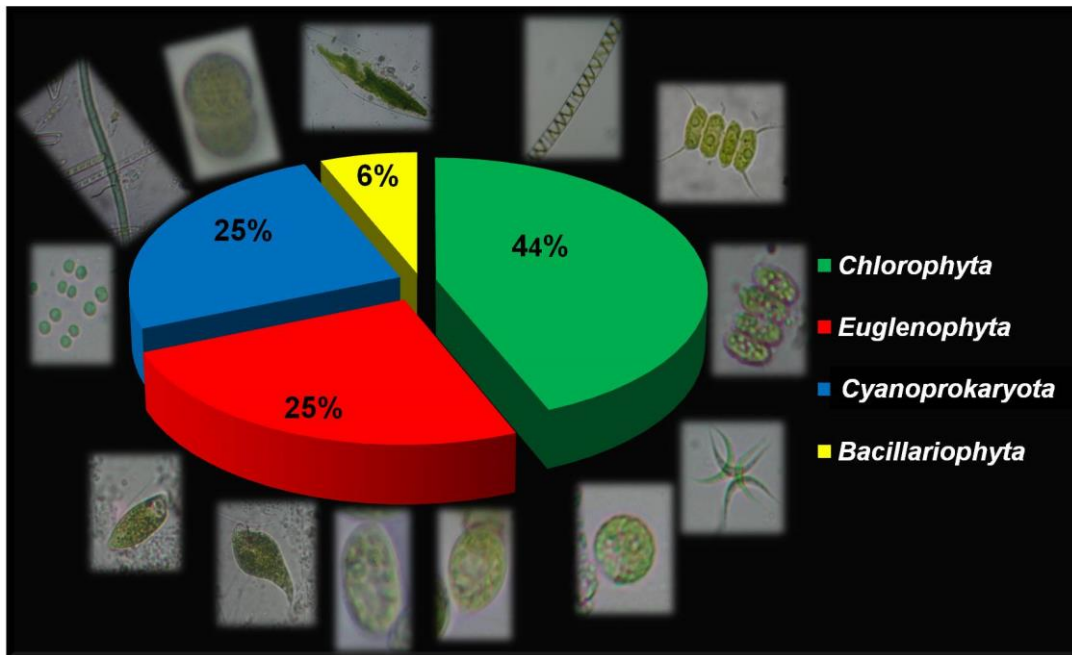


Figura 7. Porcentajes de grupos taxonómicos determinados en el área de estudio.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Comas, (1996), Tell y Conforti, (1986) quienes refieren que las Chlorophyta (Chlorococcales), Euglenophyta y Cyanoprokaryota son grupos algales que se desarrollan con mayor diversidad en aguas con alta concentración de nutrientes y materia orgánica. Ellos pueden habitar cuerpos de agua estancados, con buena disponibilidad de luz, e incluso en temperaturas y concentraciones altas de nitrógeno y fósforo. Esto representa una problemática ambiental, ya que provocan florecimientos algales nocivos y algunas especies de Cyanoprokaryota son generadoras de toxinas potencialmente dañinas incluso al hombre (Leal *et al.*, 2001).

En el sitio 2, se registraron los 15 taxa debido a que es un hábitat eutrófico, con baja cantidad de oxígeno y con una alta cantidad de nutrimentos Chlorophyta: *Ankistrodesmus*, *Chlorococcus*, *Chlorella vulgaris*, *Closterium*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus obtusus*.

Euglenophyta: *Euglena*, *Lepocinclis*, *Phacus*, *Trachelomonas*; Cyanoprokariota: *Anabaena*, *Chroococcus*, *Merismopedia punctata* y *Oscillatoria*, y Bacillariophyta: *Navicula*.

Ciugulea y Treimer (2010) comprobaron que el género *Euglena* se desarrolla en ambientes con altas concentraciones de materia orgánica, donde participan en la oxigenación y remoción de nutrientes, permitiendo a su vez el crecimiento de bacterias aerobias que contribuyen a la depuración de las aguas residuales en tratamiento.

Novelo (2011) señala que las Cyanoprokaryota, son indicadores de calidad de agua contaminada ya que se desarrollan en cuerpos eutróficos con una gran cantidad de materia orgánica.

Entre las especies determinadas, se registraron *C. vulgaris* y *S. obtusus*, que de acuerdo con trabajos previos han sido utilizadas en otros países y en México para la remoción de nutrientes en diferentes tipos de agua residual (González *et al.*, 1997, Charity., 2009, Chacón., 2004 y Hernández *et al.*, 2012) motivo por el cual la autora aisló *C. vulgaris* y *S. obtusus* para el desarrollo de este trabajo.

Crecimiento poblacional

La cinética de crecimiento poblacional de *S. obtusus* en los diferentes tipos de cultivo se presenta en la figura 8. En el cultivo estático, la fase exponencial se registró en el quinto día con 9.8×10^6 cel/ml; en contraste con la fase de declinación en el octavo día 1.4×10^6 cel/ml. En este caso, el tiempo de duplicación fue de 1 h.

Para el cultivo semicontinuo alimentado, se presentó la fase exponencial en el cuarto y quinto día entre 5.5×10^6 cel/ml y 6.8×10^6 cel/ml respectivamente, posteriormente la concentración celular disminuyó por lo que se observó la fase de declinación o muerte celular al octavo día con 2.5×10^6 cel/ml.

El cultivo discontinuo al 10%, alcanzó la fase exponencial del tercero con 6.3×10^6 cel/ml y cuarto día con 11×10^6 cel/ml. El tiempo de duplicación fue de 1 h.

Para el cultivo discontinuo al 40%, se registró la fase exponencial entre el segundo y quinto día, llegando a la concentración celular de 7×10^6 cel/ml, posteriormente se observó la fase de desaceleración al sexto día hasta 4.8×10^6 cel/ml continuando con la fase decaimiento que se observó en el séptimo día con 4×10^6 cel/ml seguida de una fase estacionaria de un día. Para al séptimo y hasta el octavo día se observó la fase de decaimiento debido a la

disminución celular por la última cosecha registrada por 3.8×10^6 cel/ml, el tiempo de duplicación fue de 1.3 h. Rosales *et al.*, (2008) señalan que esta cinética de crecimiento es característica de muchas microalgas.

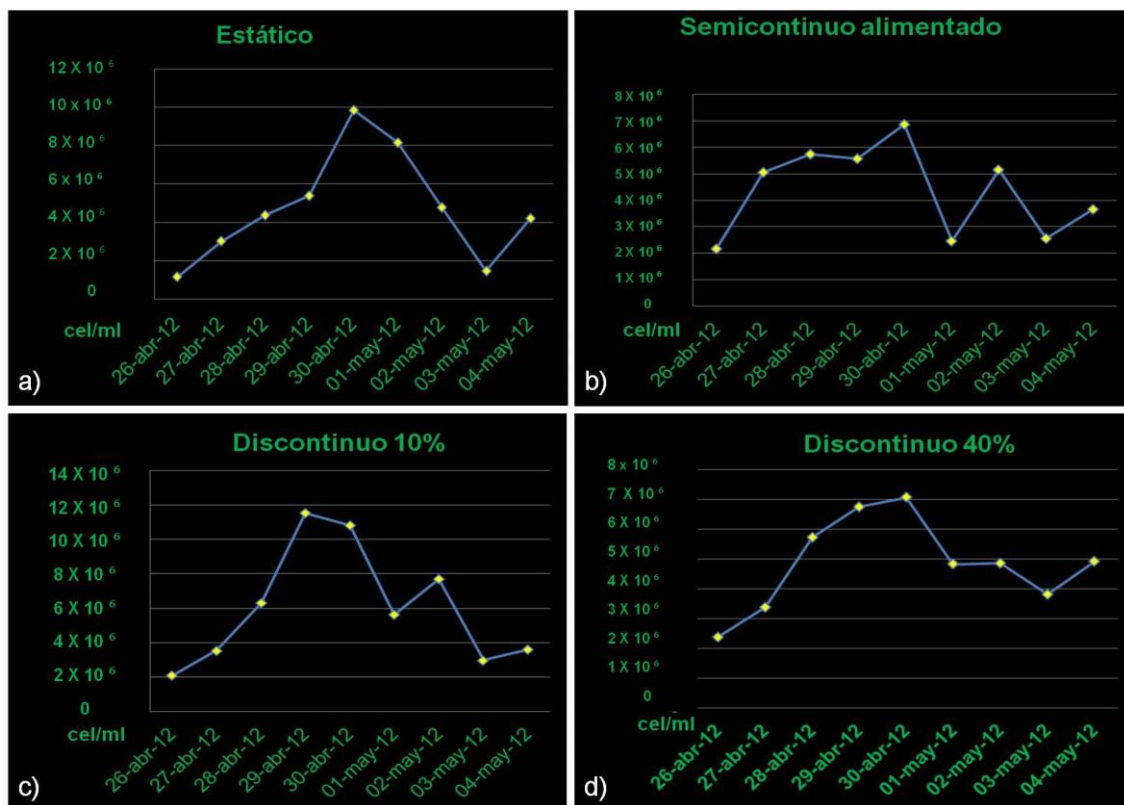


Figura 8. Cinética de crecimiento de los cultivos de *S. obtusus* a) estático, b) semicontinuo alimentado, c) discontinuo 10%, d) discontinuo 40%.

La figura 9 muestra el crecimiento población de *C. vulgaris* en los diferentes tipos de cultivo. El cultivo estático tuvo un incremento poblacional en el tercer día de 2.6×10^6 cel/ml superado por el noveno día con 3.1×10^6 cel/ml; durante este lapso de tiempo (seis días) se registraron las fases: log en el sexto día con 1.7×10^6 cel/ml, desaceleración hasta el octavo día con 2.2×10^6 cel/ml.

El cultivo semicontinuo alimentado presentó la fase log, del tercero al cuarto día con 0.99×10^6 cel/ml y 1.9×10^6 cel/ml respectivamente, seguida de la fase estacionaria en el sexto día con 2×10^6 cel/ml, posteriormente se observó la fase exponencial al séptimo día con 3.8×10^6 cel/ml y finalmente se registró la muerte celular hasta el décimo día con 2.2×10^6 cel/ml.

El cultivo Discontinuo al 10% comenzó con una fase de adaptación del primero al cuarto día, después continua la fase exponencial desde el tercer día hasta el décimo con una biomasa máxima de 3.1×10^6 cel/ml.

Para el cultivo discontinuo al 40%, la biomasa máxima osciló entre 4.4 y 5.2×10^6 cel/ml; esto se puede explicar por las cosechas realizadas cada tercer día. Nótese que la biomasa se alcanzó a recuperar en dos días, fenómeno señalado para otras microalgas por Rosales-Loaiza *et al.*, (2008).

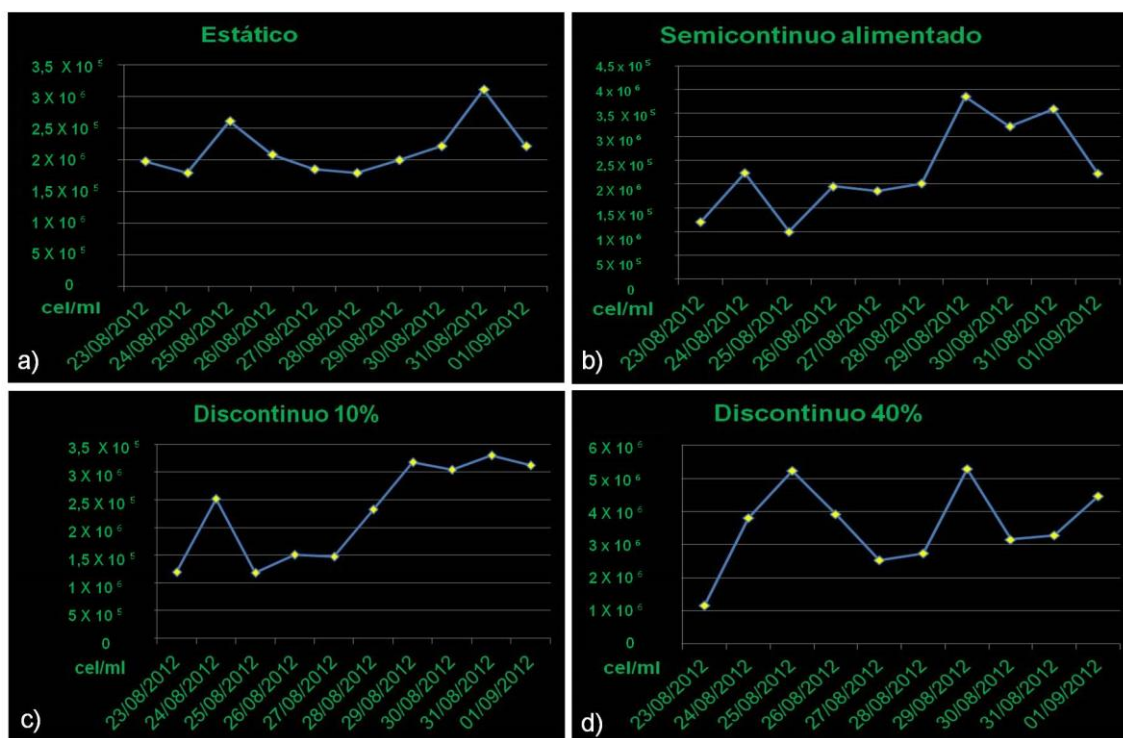


Figura 9. Cinética de crecimiento de los cultivos de *C. vulgaris* a) estático, b) semicontinuo alimentado, c) discontinuo 10% y d) discontinuo 40%.

En comparación con Lemus *et al.*, (2006) quienes determinaron que el sistema de mayor producción en biomasa fue el discontinuo. Así también López y Voltolina (1993) realizaron cultivos semicontinuos al 25, 30, 40, 50, 60 y 70% de *Pavlova luthen* donde la máxima biomasa se mostró al 30 y 40%.

Inmovilización

La inmovilización de *C. vulgaris* y *S. obtusus* se llevó a cabo durante 5 y 8 días respectivamente y se registraron diferencias en la cantidad de biomasa inmovilizada, como se observa en la tabla 2. La biomasa inmovilizada (I), para *S. obtusus* fue de 40% y *C. vulgaris* de 60%. Este resultado puede atribuirse a la morfología y tamaño de los organismos, ya que *S. obtusus* produce un cenobio de $50 \mu\text{m}$, mientras que el tamaño promedio para las células de *C. vulgaris* es de $12 \mu\text{m}$ de diámetro, lo que les permite incorporarse entre los intersticios de la *lufa*.

Hernández *et al.*, (2012), utilizaron *lufa* y polietileno como soporte de inmovilización; ellos indican que el primer sustrato fue un buen soporte para la inmovilización de las microalgas. Hecho que se observo en la inmovilización de este trabajo.

Tabla 2. Porcentaje de inmovilización en *lufa* de las especies estudiadas.

Especie	Biomasa inmovilidad (%)
<i>S. obtusus</i> (I)	40
<i>C. vulgaris</i> (I)	60

Pruebas de remoción de N:P utilizando S. obtusus, C. vulgaris y consorcio

Los resultados de las pruebas de remoción de NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} , (n=2). En las figuras 10, 11 y 12 se observan los registros de cada cultivo: control, libre e inmovilizado para *S. obtusus*.

En la figura 10, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para nitratos. En ambas se observan que en los cultivos libres registraron aumento de los nitratos. A diferencia del cultivo inmovilizado, que en ambas pruebas mostraron la remoción de nitratos, de una concentración inicial de 0.55 mg/l, a 0.3 mg/l a partir del tercer día; lo que permite señalar el 45% de remoción de este nutriente. El análisis estadístico de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamiento: control, libre e inmovilizado ($p=0.000008 < 0.05$).

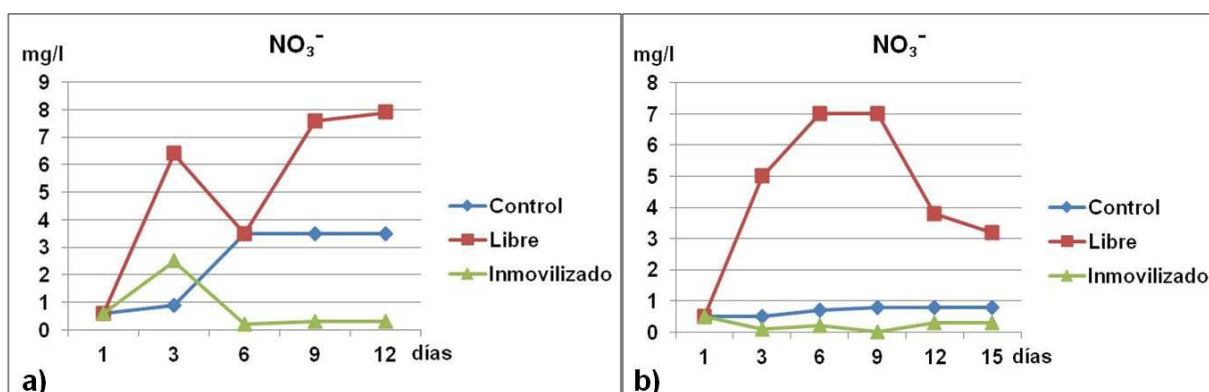


Figura 10. Remoción de NO_3^- por *S. obtusus*, a) primera prueba y b) segunda prueba.

A diferencia del porcentaje obtenido por Charity *et al.*, (2009) donde registraron, para este mismo género en cultivos libres una remoción del 77% de nitrato.

En la figura 11, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para amonio. En los cultivos libres, ambas pruebas presentaron aumento de NH_4^+ , durante todo el proceso. En los cultivos inmovilizados, la remoción se nota claramente solo en el primer ensayo, donde a partir de la concentración inicial de 0.76 mg/l, disminuyó hasta 0.41 mg/l al tercer día; lo que representa el 46% de remoción. El análisis estadísticos de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p=0.000020 < 0.05$). El porcentaje de remoción obtenido en esta prueba fue más eficiente que el registrado por Hernández (2010) que fue del 25%. Por su parte, es menor al señalado por Charity *et al.* (2009) y Ruíz-Marín *et al.*, (2012) quienes lograron el 94% y 97 % de remoción respectivamente empleando cultivos libres de *Scenedesmus obliquus*.

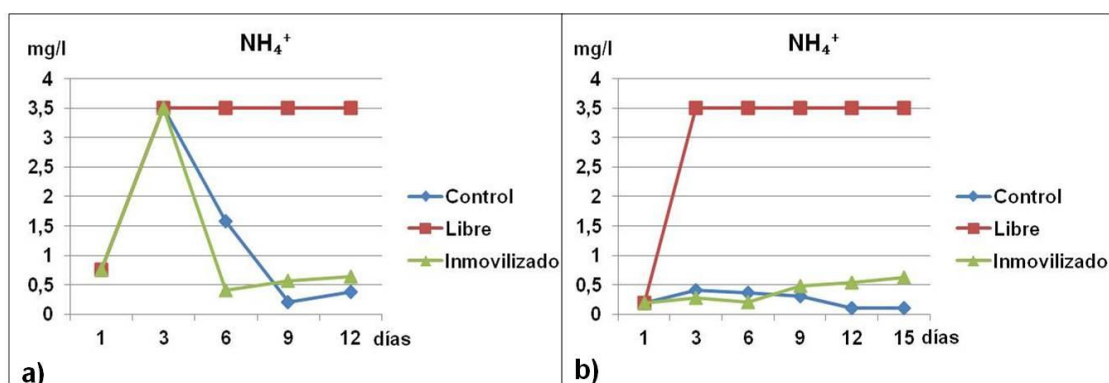


Figura 11. Remoción de NH_4^+ por *S. obtusus*, a) primera prueba y b) segunda prueba.

En la figura 12, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para ortofosfatos. En los cultivos libres se presentó aumento de PO_4^{3-} en ambas pruebas. Para el cultivo inmovilizado, en la primera prueba la concentración inicial de 30.4 mg/l disminuyó a 14 mg/l, lo que indica el 54% de remoción. En comparación con Hernández (2010) y Ruíz-Marín *et al.* (2012) quienes registraron en agua cruda y tratada porcentajes de remoción entre el 10 y 20%. Con el análisis estadísticos de ANOVA simple, se confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p=0.000009 < 0.05$).

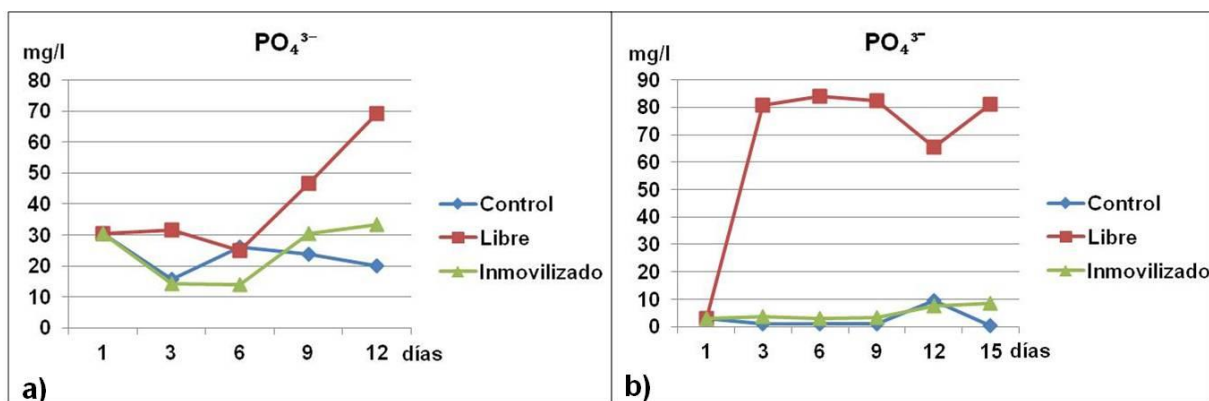


Figura 12. Remoción de PO_4^{3-} por *S. obtusus*, a) primera prueba y b) segunda prueba.

La prueba de remoción de NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} con *C. vulgaris*, se representan en las figuras 13, 14 y 15 respectivamente con las gráficas de cada cultivo: control, libre e inmovilizado.

En la figura 13, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para nitratos. El cultivo libre presentó una remoción del 75% con una concentración inicial de 0.8 mg/l la cual disminuyó a 0.2 mg/l durante la primera prueba. Con respecto al cultivo inmovilizado, el cual registró la disminución en ambos ensayos con una remoción similar del 61% con un valor inicial 0.65 mg/l llegó a 0.25 mg/l. Rao *et al.*, (2010) registró 29% de disminución de nitratos, valores menores a los registrados en éste trabajo. El análisis estadístico de ANOVA simple, permitió comprobar que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p= 0.000393 < 0.05$).

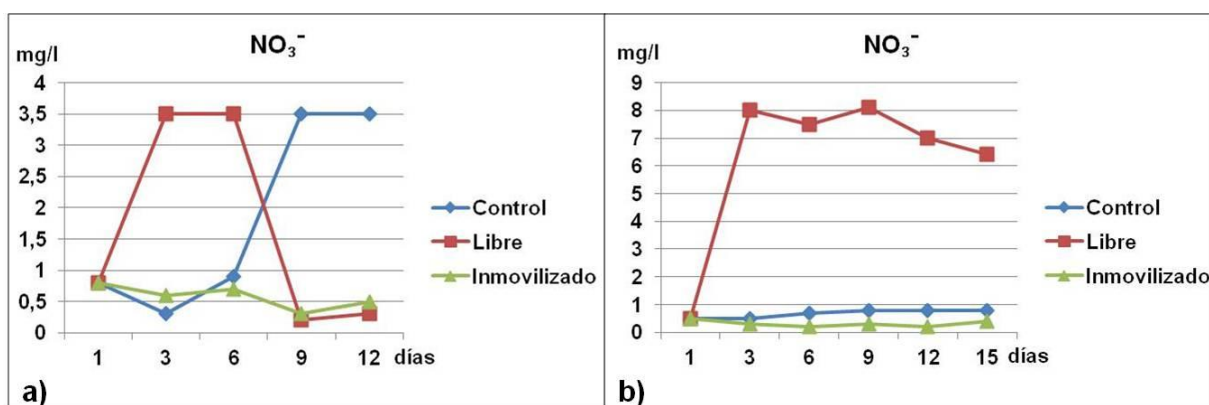


Figura 13. Remoción de NO_3^- por *C. vulgaris*, a) primera prueba y b) segunda prueba.

En la figura 14, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para amonio. El cultivo libre disminuyó el amonio de 3.5 mg/l (concentración inicial) a 0.19 mg/l (concentración final) que corresponde al 94%. Por su parte, el cultivo inmovilizado registró disminución de 3.5 mg/l (valor inicial) a 0.18 mg/l (valor final) lo que representa el 95% solo en la primera fase experimental y superan a

los porcentajes de remoción presentados por Zhang *et al.*, (2012) de 60 y 82%. El análisis estadísticos de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p= 0.013295 < 0.05$).

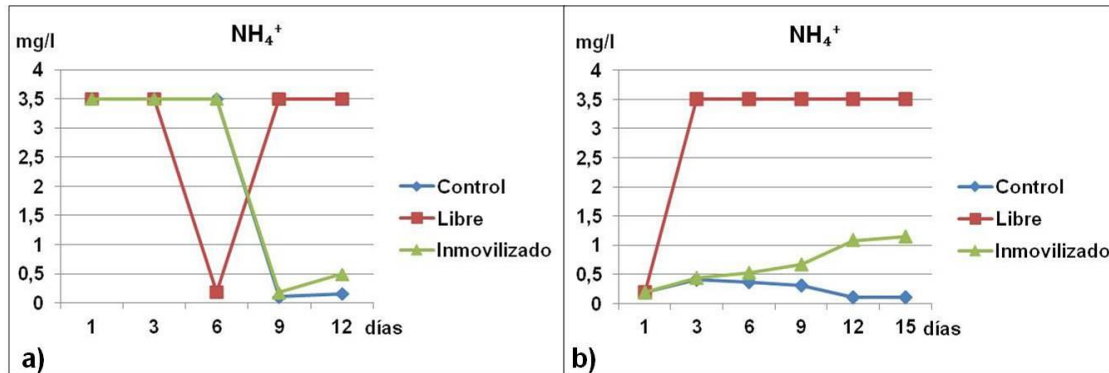


Figura 14. Remoción de NH_4^+ por *C. vulgaris*, a) primera prueba y b) segunda

En la figura 15, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para ortofosfatos. El cultivo libre muestra aumento de PO_4^{3-} en ambas pruebas. El cultivo inmovilizado presentó remoción en la primera fase experimental de 19.9 mg/l a 12.6 mg/l lo que representa el 37%; mismo que difiere a lo reportado por Zhang *et al.*, (2012) al remover de 84-100% de ortofosfatos. El análisis estadístico de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p= 0.000010 < 0.05$).

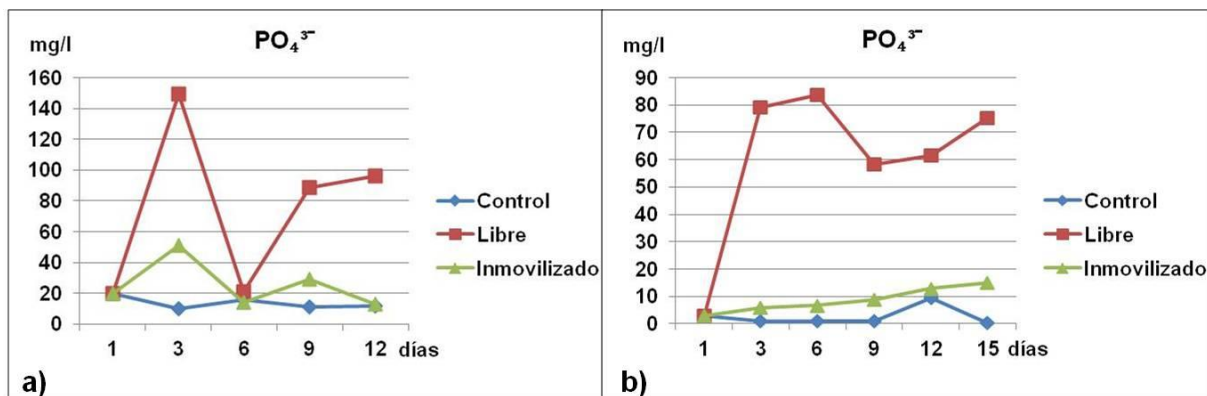


Figura 15. Remoción de PO_4^{3-} por *C. vulgaris*, a) primera prueba y b) segunda prueba.

Los resultados de la prueba de remoción de NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} por el Consorcio se representan en las figuras 16,17 y 18 respectivamente, con las gráficas de cada cultivo: control, libre e inmovilizado.

En la figura 16, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para nitratos. El cultivo libre aumento el NO_3^- en ambas pruebas. El cultivo inmovilizado, en ambos

ensayos tuvo disminución similar de nitratos, con un promedio inicial de 2 mg/l y el valor final de 0.3 mg/l, lo que representa el 85% de remoción. El análisis estadísticos de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p=0.010732<0.05$).

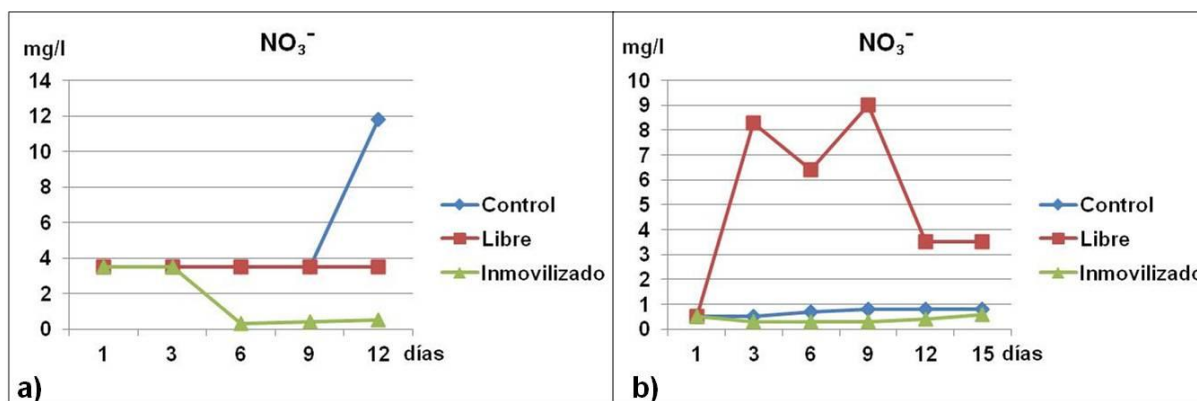


Figura 16. Remoción de NO_3^- por el Consorcio, a) primera prueba y b) segunda prueba.

En la figura 17, se muestran la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción para amonio. El cultivo libre registro el aumento de NH_4^+ en ambas pruebas. El cultivo inmovilizado, en ambas pruebas disminuyó el amonio en un 48% con un valor inicial de 0.6 mg/l y el valor final de 0.31 mg/l. Siendo este porcentaje menor al obtenido por Hernández (2010) que fue de 70% de remoción. El análisis estadístico de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p=0.0000001<0.05$).

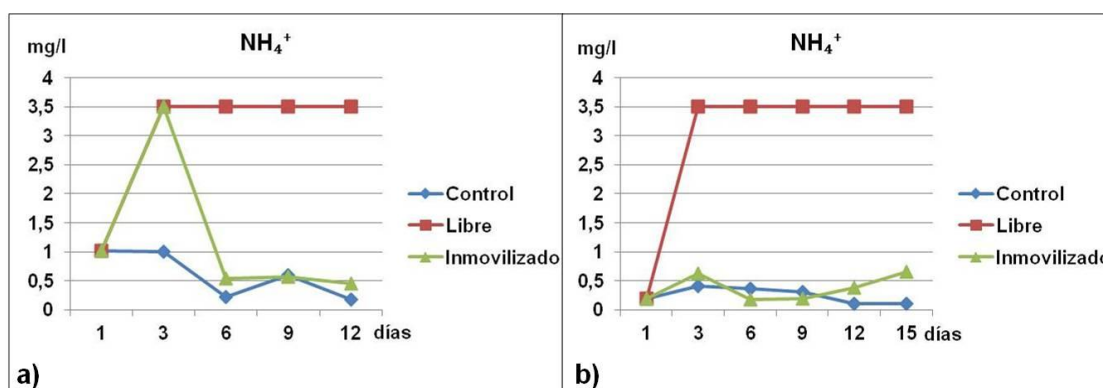


Figura 17. Remoción de NH_4^+ por el Consorcio, a) primera prueba y b) segunda prueba.

En la figura 18, se muestran los gráficos de la primera (a) y segunda (b) prueba de remoción de ortofosfatos. El cultivo libre y el inmovilizado, en ambos ensayos se registraron aumento de ortofosfatos. En comparación con Hernández (2010) quien señala un valor del 90% en remoción de ortofosfatos en *Chlorella vulgaris*. El análisis estadístico

de ANOVA simple, confirma que hay diferencias entre los tratamientos: control, libre e inmovilizado ($p= 0.000001 < 0.05$).

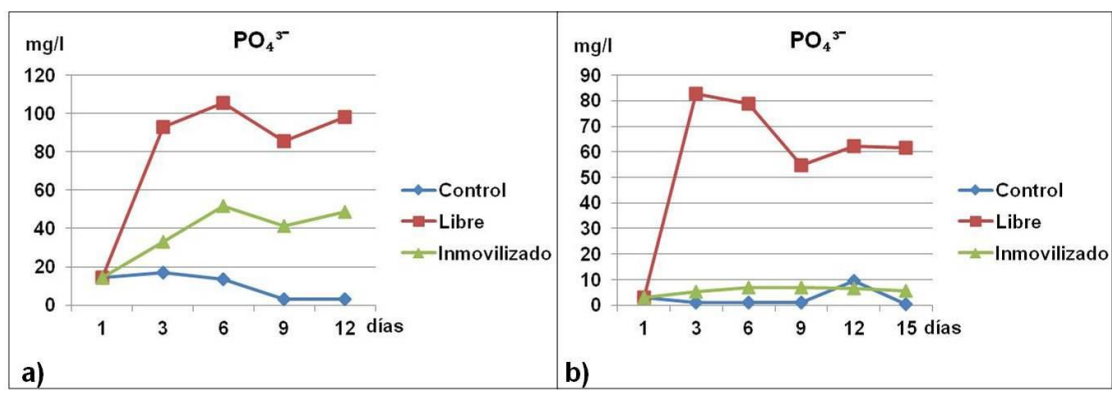


Figura 18. Remoción de PO_4^{3-} por el Consorcio, a) primera prueba y b) segunda prueba.

Análisis estadístico

Los resultados de la prueba de remoción de N:P fueron examinados por el Análisis de Varianza (ANOVA) simple, con el nivel de significancia $p < 0.05$; donde se determinaron las diferencias en la remoción de NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} para cada una de las especie utilizadas. Posteriormente, se compararon cada par de medias post-hoc (Tukey-Kramer), y se realizó la prueba de LSD. Éstas pruebas fueron realizadas utilizando el software estadístico (Statistical v8.1, StatSoft, Tulsa).

Los resultados estadísticos de la prueba de remoción para cada uno de los tratamientos se indican en las tablas 3, 4 y 5; donde, MS= Cuadrados medios (Varianza); p =probabilidad observada. En general los cultivos inmovilizados mostraron mayor remoción de nitratos, amonio y ortofosfatos que los cultivos libres.

Tabla 3. Análisis estadístico de remoción para *S. obtusus*, con los diferentes tratamientos cultivo libre e inmovilizado.

Variable	MS	p<0.05	Tratamiento	LSD
NO ₃ ⁻	3.1041	0.000008	Control	1.4636
			Libre	4.7727
			Inmovilizado	0.48182
NH ₄ ⁺	1.1362	0.000020	Control	0.72000
			Libre	2.9500
			Inmovilizado	0.74545
PO ₄ ³⁻	362.82	0.000009	Control	12.018
			Libre	54.493
			Inmovilizado	13.745

Tabla 4. Análisis estadístico de remoción para *C. vulgaris*, con los diferentes tratamientos cultivo libre e inmovilizado.

Variable	MS	p<0.05	Tratamiento	LSD
NO ₃ ⁻	4.1467	0.000393	Control	1.1909
			Libre	4.1636
			Inmovilizado	0.43636
NH ₄ ⁺	2.0291	0.013295	Control	1.1155
			Libre	2.8982
			Inmovilizado	1.3845
PO ₄ ³⁻	649.23	0.000010	Control	7.6818
			Libre	66.900
			Inmovilizado	16.236

Tabla 5. Análisis estadístico de remoción para Consorcio, con los diferentes tratamientos cultivo libre e inmovilizado.

Variabl e	MS	p<0.05	Tratamiento	LSD
NO ₃ ⁻	6.2315	0.010732	Control	2.7182
			Libre	4.4273
			Inmovilizado	0.96364
NH ₄ ⁺	0.80272	0.0000001	Control	0.40909
			Libre	2.9727
			Inmovilizado	0.75273
PO ₄ ³⁻	499.60	0.000001	Control	6.1182
			Libre	67.245
			Inmovilizado	20.345

CONCLUSIONES

La remoción de nutrientes (N:P) en agua residual tratada de la planta de tratamiento de San José del Rincón, Estado de México, usando *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obtusus* inmovilizados en *lufa* mostraron mayores eficiencias de remoción, en comparación con los cultivos libres.

Las condiciones físico químicas del agua determinadas, corresponden a un ambiente eutrófico, con concentraciones de nitratos de 0.4 a 1.4 mg/l, ortofosfatos de 13-21 mg/l, y baja mineralización.

Se determinaron 16 taxa, 7 correspondiente a Chlorophyta: *Ankistrodesmus*, *Chlorococcus*, *Chlorella vulgaris*, *Closterium*, *Desmodesmus*, *Scenedesmus obtusus*, *Spirogyra*; 4 a Euglenophyta: *Euglena*, *Lepocinclis*, *Phacus*, *Trachelomonas*; 4 Cyanoprokaryota: *Anabaena*, *Chroococcus*, *Merismopedia punctata* y *Oscillatoria*, y 1 Bacillariophyta: *Navicula*.

A partir de las muestras biológicas colectadas en el campo, se pudieron reconocer y aislar algunas especies con potencial de remoción como *C. vulgaris*, y *S. obtusus*.

Se obtuvieron los cultivos unialgales de *C. vulgaris* y *S. obtusus*, mismas que se depositaron en la colección del herbario IZTA.

Las cepas se inmovilizaron adecuadamente en *lufa*, por lo ésta es un sustrato adecuado para este proceso.

En la cinética de crecimiento poblacional, el cultivo discontinuo al 40% fue el mejor para ambas especies, al obtener una mayor cantidad de biomasa en menor tiempo.

La prueba de remoción de (N:P) en reactores cilíndricos en condiciones de laboratorio para ambas especies inmovilizadas presentan mayor eficiencia, con respecto a los cultivos libres. De ellas, *C. vulgaris* removi6 mayor cantidad de NO_3^- y NH_4^+ .

SUGERENCIAS

El trabajar con especies autóctonas, reduce la posibilidad de que éstas se vean afectadas al ser utilizadas en los sistemas de pulimiento.

Esta biotecnología probada en el laboratorio es sencilla y de bajo costo, se propone establecer una serie de humedales piloto para evaluar su eficiencia en campo y con ello diseñar el manejo integral en las cuencas de abastecimiento de agua potable en áreas cercanas a grandes ciudades.

APÉNDICE 1

MEDIO DE CULTIVO

Ferti-plus con nutrientes orgánicos 11-8-5.

Procedimiento: agregar 3 ml por cada litro de agua.

Ingredientes activos, porcentaje en peso	
Nitrógeno (N).....7.28 %	Fósforo (P ₂ O ₅).....8.21%
Potasio (K ₂ O).....14.07%	Magnesio (Mg).....0.086%
Hierro (Fe).....0.006%	Cobre (Cu).....0.001%
Zinc (Zn).....0.002%	Manganeso (Mn).....0.075%
Azufre (S).....1.31 %	Boro (B).....0.002%
Molibdeno (Mo).....TRAZAS	Calcio (Ca).....0.19%

Marca registrada Delta, hecho en México.

APÉNDICE 2

TIPOS DE CULTIVO

A) estático

En 400 ml de agua potable marca Kirkland se agregaron 1.2 ml de Ferti-Plus y 6 ml de la cepa del cultivo correspondiente (*C. vulgaris*. o *S. obtusus*). Durante 10 días, este cultivo se mantuvo en crecimiento, diariamente se aforó al volumen inicial con agua destilada estéril, después se extrajo 1 ml de la muestra la cual se utilizó para la cuantificación celular a través de una cámara de Neübauer.

B) semicontinuo alimentado

En 400 ml de agua potable marca Kirkland se agregaron 1.2 ml de Ferti-Plus y 6 ml de la cepa del cultivo correspondiente (*C. vulgaris*. o *S. obtusus*). Durante 10 días estos cultivos se mantuvieron en crecimiento, diariamente se aforó al volumen inicial con agua destilada estéril, después se extrajo 1 ml de la muestra para el conteo celular en cámara de Neübauer, posteriormente cada tercer día se agregaron 6 ml de medio de cultivo, al sexto y noveno día se adicionaron 12 ml de medio de cultivo.

C) discontinuo al 10%

En 400 ml de agua potable marca Kirkland se agregaron 1.2 ml de Ferti-Plus y 6 ml de la cepa del cultivo correspondiente (*C. vulgaris*. o *S. obtusus*). Durante 10 días estos cultivos se mantuvieron en crecimiento, diariamente se aforó al volumen inicial con agua destilada estéril, después se extrajo 1 ml de la muestra para el conteo celular en cámara de Neübauer, posteriormente al tercer día se extrajo el 10% (40 ml) y se aforó con medio de cultivo hasta el volumen inicial, este ultimo procedimiento se realizo hasta la etapa final del proceso.

D) discontinuo al 40%

En 400 ml de agua potable marca Kirkland se agregaron 1.2 ml de Ferti-Plus y 6 ml de la cepa del cultivo correspondiente (*C. vulgaris*. o *S. obtusus*). Durante 10 días estos cultivos se mantuvieron en crecimiento, diariamente se aforó al volumen inicial con agua destilada estéril, después se extrajo 1 ml de la muestra para el conteo celular en cámara de Neübauer, posteriormente al tercer día se extrajo el 40% (159 ml) y se aforó con medio de cultivo hasta el volumen inicial, este ultimo procedimiento se realizo hasta la etapa final del proceso.

APÉNDICE 3

CUANTIFICACIÓN CELULAR

En el recuento celular en los cultivos de microalgas se utilizó el hematocímetro de 0.1 mm de profundidad con reglilla de Nüebauer, tomando en cuenta los cuatro extremos, los puntos: A, B, C, D (figura 18). Se calculó con la siguiente fórmula (Arredondo y Voltolina, 2007).

$$C = N \times 10^4 \times \text{dil}$$

Dónde:

C= cél/ml

N= promedio de células presentes en 1 mm² (0.1 µl)

dil= factor de dilución (cuando se consideró necesario diluir la muestra)

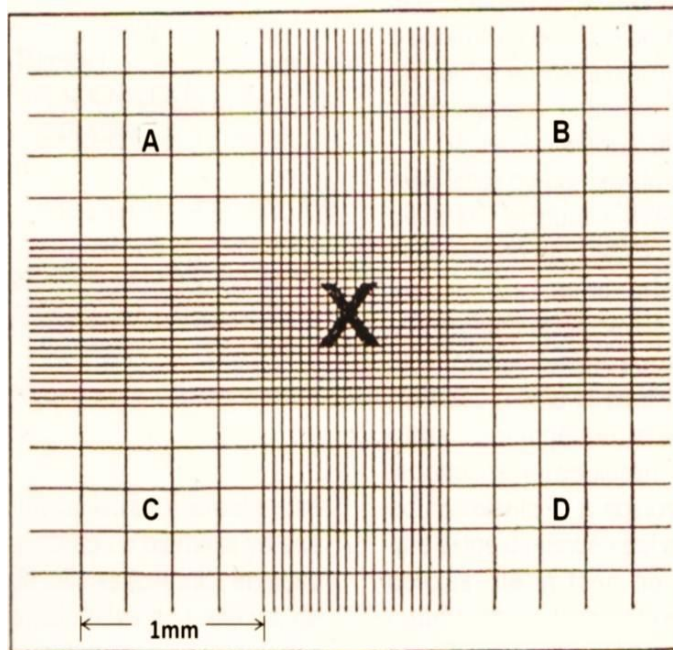


Figura 19. Reglilla de Nüebauer de 9 mm²

APÉNDICE 4

Lufa

La lufa, es un género con siete especies de plantas con flores pertenecientes a la familia Cucurbitaceae (Guzmán., 1997).

Ésta fue cortada en cuadros de 1 cm³ y esterilizada por 15 min en autoclave y se adicionaron 11 gr de estos trozos en botellas de plásticos de 1.5 l, con agua para beber inoculados con los cultivos de cada una de las cepas y fueron colocados en aireación y con ciclos de luz continua.

A partir de 5 cm³ fue cuantificada la biomasa inmovilizada; cada cm³ se colocó en un tubo de ensayo de vidrio con 10 ml de agua destilada estéril y se sonicó por intervalos de 5 min para desprender la biomasa del soporte, esta actividad se repitió hasta que el agua quedo libre de microalgas. El agua destilada con las células fue depositada en un matraz de 250 ml.

Posteriormente se filtró a través de membranas con poro de 5,0 µm con ayuda de una bomba de vacío, equipo Millipore y matraz Kitasato. Una vez concluido este procedimiento las membranas se colocaron en una estufa a 60°C por 24 horas, posteriormente fueron colocadas en un desecador con silica gel y se pesaron en una balanza analítica.

El peso seco se obtuvo en g/ml calculándose como la diferencia entre el peso inicial del filtro y el peso del filtro con la muestra, dividida entre el volumen de la muestra (Arredondo y Voltolina, 2007, modificado).

LITERATURA

- Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. Ed AGT S.A. México 491 pp.
- Alvarado Granados, A.R. 2012. Experiencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en el Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México. 230 pp.
- Anda Sánchez, J. 2007. Tecnología innovadora que permite tratar aguas grises y generar un jardín o producir flores de ornato. Centro de investigación y asistencia en tecnología y diseño de Jalisco, A.C. Unidad de Tecnologías Ambientales. México. 5 pp.
- Atlas, M.R. y Bartha, R. 1981. Microbial ecology: fundamental and applications. Ed. The Benjamin /Cummings publishing company INC. E.U. 533 pp.
- APHA. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 17st Ed. APHA, AWWA, WPCF, Washington DC, USA.
- Arredondo Vega, B. O. y Voltolina, D. 2007. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento, pp. 17-25. En: B. O. Arredondo Vega y D. Voltolina (ed). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz.
- Arredondo Vega, B. O. y Voltolina, D. 2007. Determinación de peso seco y contenido orgánico e inorgánico, pp. 27-39. En: B. O. Arredondo Vega y D. Voltolina (ed). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz.
- Band-Schmidt, C. J. 2007. Aislamiento, purificación y Mantenimiento de cepas de microalgas, pp. 1-16. En: B. O. Arredondo Vega y D. Voltolina (ed). Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. La Paz.
- Barrera, B.C., Vázquez, G., Barceló, Q.I. y Bussy, L. 2008. Microalgal dynamics in *batch* reactors for municipal wastewater treatment containing dairy sewage water. *Water Air Soil Pollution* 190: 259-270.
- Bermúdez, J. L., Lodeiros, C. y Morales, E. 2002. Producción de biomasa de la microalga marina *Chroomonas* sp., en función del pH, intensidad luminosa y salinidad. *Boletín de investigacione Marinas y Costeras* 31:167-185
- Ciugulea, I., y Triemer, R. E. 2010. A color atlas of photosynthetic euglenoids. Ed. Michigan State University Press. China. 204 pp.
- Comas, G. A. 1996. Las Chlorococcales dulceacuícolas de Cuba. Biblioteca Phycologica. Band. 99 J. Cramer. Berlin, Stuttgart. 192pp.
- Chacón, C., Charity, A., Cárdenas, C., Araujo, I., Morales, E. 2004. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 38(2): 94-108.
- Charity, E., Andrade, R., Alexandra, L., Vera, B., Carmen, H., Cárdenas, L y Morales, E. D. A. 2009. Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wasterwater from fishery. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia* 32(2):126-134.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) 2011. Estadísticas del agua en México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México. www.conagua.gob.mx
- Desikachary, T. V. 1959. Cyanophyta. Ed. Board. India. pp. 150-155.
- Durán, D. A., Vargas, V. A. y Cisneros, C. A. E. 2007. Bioestadística. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 260 pp.

- Gama-Flores, J. L., Pavón Meza, E. L., Fernández Araiza, M. A., Ramírez Pérez, T. y Ángeles López, O. 2010. Análisis de calidad del agua: relación entre factores bióticos y abióticos. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 119 pp.
- Garduño-Solórzano, G., Rodríguez-Palacio, M. C., Martínez-García, M., Quintanar-Zúñiga, R. E., Lozano-Ramírez, C., Campos-Contreras, J. E y Monsalvo-Reyes, A.C. 2011. Cultivos de microalgas del lago de Catemaco, Veracruz. *Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental Algal* 2(2):67:80.
- Godinho, L.R., González A.A.C. y de Mattos Bicudo, C.E. 2010. Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. *Algas*, 30: Chlorophyceae (familia Scenedesmaceae). *Hoehnea* 37(3): 513-553.
- Goldsborough, L. G. y Robinson, G.G.C. 1996. Pattern in wetlands, 77-117. En: R. J. Stevenson., M. L. Bothwell y R. L. Lowe (ed). *Algal ecology freshwater benthic ecosystems*. Ed. Academic Press, USA.
- González, L. E., Cañizares, R. O., Baena, S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource technology* 60:259-262.
- Guido Aguilar, J.J. y García López, J.C. 2012. Condiciones de diseño para la construcción de una planta de tratamiento, pp.69-92. En: A. R. Alvarado Granados (ed). *Experiencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en el Estado de México*. Ed. Universidad Autónoma del Estado de México. Estado de México.
- Guzmán-Díaz, G. A., 1997. Aspectos técnicos sobre el cultivo del paste (*Luffa cylindrica*). Ministerio de Agricultura y Ganadería serie cultivos no tradicionales. San José, Costa Rica. 42 pp.
- Hernández Reyes, B. M. 2010. Remoción de ortofosfatos y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas. Tesis para obtener el grado de especialidad en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 57 pp.
- Hernández Reyes, B.M., Rodríguez Palacio, M.C., Lozano Ramírez, C. y Castilla Hernández, P. 2012. Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. *Revista Latinoamericana Biotecnología Ambiental Algal* 3(1):80-94.
- Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) 2008, Necesidad de desalar agua. SEMARNAT. Gaceta del IMTA. Num.20.
- Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED) 2010, Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México. Secretaría de Gobernación (SEGOB). http://www.e-local.gob.mx/wb/ELOCAL/ELOC_Enciclopedia#.
- Jhon, D.M., Whitton, B.A. y Brook, A.J. 2002. The freshwater algal flora of the British Isles an identification guide to freshwater and terrestrial algae. Cambridge University Press, Reino Unido, 702 pp.
- Leal, M., Ortiz, N., Mora, R., Ruiz, G., Perona, E. y Morales, E. 2001. Caracterización de la cianobacteria *Pseudanabaena galeata* a diferentes condiciones del cultivo. *Boletín del centro de investigaciones biológicas*. 35(3):223-241.
- Lemus, N., Urbano, T., Arredondo Vega, B., Guevara, M., Vásquez, A., Carreón Palau, L. y Vallejo, N. 2006. Crecimiento y perfil bioquímico de *Chaetoceros muelleri* cultivadas en sistemas discontinuos y semicontinuos. *Ciencias Marinas* 32(3):597-603.
- López Cano, R. 2010. Descripción básica del sistema de tratamiento de aguas residuales de la cabecera municipal de San José del Rincón. Comisión de cuenca Villa Victoria San José del Rincón. 10 pp.
- López Elías, J. A., Voltolina, D. 1993. Cultivos semicontinuo de cuatro especies de microlagas con medio no convencional. *Ciencias Marinas* 19(2):169-180.

- Loy Chu, W., Chu See, Y. y Moi Phang, S. 2009. Use of immobilised *Chlorella vulgaris* for the removal of colour from textile dyes. *Journal Appl Phycology*. 21:641-648.
- Madigan, M. T., Martinko, J.M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. 2009. Brock Biología de los microorganismos. Ed. Pearson Educación, N.S.A. Madrid, España. 1259 pp.
- Monroy, O., Cervantes, F., Viniestra, G., Castilla, P. y Meraz, M. 1997. Biotecnologías para el tratamiento de las aguas residuales de la Ciudad de México. XII Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. 4-7 de Noviembre. Zacatecas, México.
- Moreno, J. L. 2003. Fitoplancton, pp. 13-45. En: G. de la Lanza Espino y S. Hernández Pulido (ed). Manual para la colecta, el manejo y las observaciones de campo para bioindicadores de calidad del agua. Ed. AGT S.A. México.
- Novelo, E. 2011. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 90. Cyanoprokaryota. Universidad Nacional Autónoma de México Instituto de Biología. 96 pp
- Nieves Soto M., 2000. Efecto de productos de naturaleza zeolítica sobre el crecimiento y la calidad dietética de microalgas para la acuicultura. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias pecuarias . Universidad de Colima. México. 189 pp.
- Núñez, M., Cárdenas, C., Hablich, K., Velásquez, W., Isea, D., Trujillo, A. y Morales, E. 2006. Uso de humedal construido como pulimiento para efluentes de un sistema de lagunas de estabilización. *Bol. Centro de Investigaciones Biológicas*. 40(3): 327-346.
- Orozco, C. E., Cruz, A. M., Rodríguez, M. A. y Pohalan, A.J. 2006. Humedal superficial de flujo vertical como sistema de depuración terciaria en el proceso de beneficiado de café. *Higiene y Sanidad Ambiental* 6:190-196.
- Rao, P. H., Kumar, R. R., Raghavan, B. G., Subramanian, V. V. y Sivasubramanian, V. 2010. Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. *Department of Plant Biology and Plant Biotechnology, R.K.M. Vivekananda College, Chennai 600 004, Tamil Nadu, India.*
- Ramírez-Carrillo, H.F., Luna-Pabello, V.M., Arredondo-Figueroa, J.L. 2009. Evaluación de humedal artificial de flujo vertical intermitente, para obtener agua de buena calidad para la acuicultura. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 8(1): 93-99.
- Robles Valderrama, E., González Arreaga, M. E., Sáinz Morales, M. de G., Martínez Pérez, M. E. y Ayala Patiño, R. 2008. Análisis de agua métodos fisicoquímicos y bacteriológicos. Editorial Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México.182 pp.
- Rodier, J. 1981. Análisis de las aguas: aguas naturales, aguas residuales y aguas de mar. Ed. Omega, S.A., Barcelona. 1059 pp.
- Romero-Aguilar, M., Colín-Cruz, A., Sánchez-Sainas, E. y Ortiz-Hernández, M. L. 2009. Tratamiento de aguas residuales por un sistema piloto de humedales artificiales: Evaluación de la remoción de la carga orgánica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 25 (3): 157-167.
- Rosales-Loaiza, N., Guevara, M., Lodeiros, C. y Morales, E. 2008. Crecimiento y producción de metabolitos de la cianobacteria marina *Synechococcus* sp. (Chroococcales) en función de la irradiancia. *Revista Biológica Tropicall* 56 (2):421-429.
- Ruiz Marin, A., Mendoza Espinosa, L. G. y Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in *batch* and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*101:58-64.
- Tell, G. and V. Conforti, 1986. Euglenophyta pigmentadas de la Argentina. *Bibliotheca Phycologica* Band 75. J. Cramer. Berlin.
- Valenzuela-Salcedo, G. F., Huerta-Aldaz, N., Nubes-Ortiz, G., Peña-Limón, C. E. y López-Elías, J. A. 2007. Utilización de la microalga *Scenedesmus obliquus* en el tratamiento secundario de aguas residuales de una granja porcícola, utilizando *Escherichia coli*

- como microorganismo indicador. Memorias en Extenso VI Congreso Internacional y XII Nacional de Ciencias Ambientales. Ciudad de Chihuahua, Chih., México. pp. 115-119.
- Vázquez, G., Caballero, M., Lozano, S. y Rodríguez, A. 2007. Lagos cráter de la región de los Tuxtlas: limnología, flora algal y estudio paleolimnológico de la deforestación reciente. En: Las aguas interiores de México. Conceptos y casos. De la lanza G. (ed) AGT. México. 695 pp.
- Wehr, J. D., y Sheath, R. G. 2003. Freshwater algae of North America. Ed. Academic Press. The United States of America. 918 pp.
- Wetzel, R. G. 2001. Limnology: lake and river ecosystems. 3^a ed. 1006 pp.
- Willey, N. 2007. Phytoremediation. Methods and reviews. Editorial Humana Press. Towa, 468pp.
- Zhang, E., Wang, B., Ning, S., Sun, H., Yang, B., Jin, M. y Hou, L. 2012. Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Chlorella* sp. Isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. *African Journal of biotechnology* 11 (24):6529-6534.