

Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados

Hernández-Reyes, B.M.,¹ Rodríguez-Palacio, M.C.,^{2*} Lozano-Ramírez, C.² y Castilla-Hernández, P.¹

¹ Laboratorio de Biotecnología Ambiental, Departamento El Hombre y su Ambiente, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco C.P. 04960, México, D.F.

² Laboratorio de Ficología Aplicada, Departamento de Hidrobiología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa C.P. 09340, México, D.F.

*Autor de correspondencia: mony@xanum.uam.mx

Resumen

Las microalgas son el primer eslabón de la cadena trófica, aunque generalmente microscópicas algunas alcanzan tamaños que las pueden hacer visibles a simple vista, la mayoría de las veces de forma agregada, otras incluso, generan una turbiedad evidente en los cuerpos de agua. Las microalgas se han utilizado para la eliminación de nutrientes de aguas residuales de tipo municipal o industrial. Son una opción viable ya que los sistemas de tratamiento de aguas residuales que emplean microalgas requieren poca energía ya que utilizan la luz solar, producen biomasa que puede ser usada para diferentes fines, retiran CO₂ de la atmósfera y pueden producir sustancias con alto valor agregado como pigmentos, fármacos y biocombustibles entre otros. En este estudio se evaluó la capacidad para remover amonio (NH₄⁺) y ortofosfato (PO₄⁻³) por cultivos libres e inmovilizados de microalgas, utilizando para ello un cultivo Mixto obtenido a partir de agua residual municipal proveniente del reactor UASB de la UAM-I; y dos cultivos clonales de *Chlorella vulgaris* y *Spirulina subsalsa* que pertenecen a la colección de cultivos UAM-I. Las microalgas se inocularon en agua residual artificial a dos concentraciones de nutrientes, una baja 10 mgNH₄⁺/L y 5 mgPO₄⁻³/L y una alta 25 mgNH₄⁺/L y 10 mgPO₄⁻³/L, se monitoreo su crecimiento y se determinó la capacidad de remoción de los nutrientes, en los cultivos libres e inmovilizados en dos soportes lufa y polietileno, siendo la lufa el más eficiente en producción de biomasa algal y en fijación de las microalgas. En consumo de nutrientes, en cultivos libres a baja concentración, *C. vulgaris* presentó la mayor capacidad de remoción con un 50% para NH₄⁺ y un 74% para PO₄⁻³; mientras que en alta concentración la mejor remoción la alcanzó el cultivo Mixto con 68% para NH₄⁺ y 76% de PO₄⁻³. En los cultivos inmovilizados sobre lufa *C. vulgaris* y el cultivo Mixto presentaron el mayor consumo de nutrientes, siendo para NH₄⁺ del 70 al 99.9% y de PO₄⁻³ del 72.1 al 89.9%, respectivamente. Algunas de las especies de microalgas utilizadas en este estudio, demostraron ser eficientes en el consumo de nutrientes y en su capacidad de adherencia y crecimiento en los soportes utilizados. El empleo de soportes facilita la cosecha de la biomasa algal y hace posible su uso en sistemas de tratamiento continuos, lo cual hace más económico y eficiente el proceso al utilizarlas a gran escala para biorremediación de aguas residuales.

Palabras clave: Remoción de nutrientes, microalgas, cultivo mixto, aguas residuales municipales.

Abstract

Microalgae are primary producers. They normally are microscopic beings, however they can form aggregates big enough to make possible to see them with naked eye. Microalgae systems spend a low energy budget so the light of the sun is used and this is free, the biomass produced can be used for different purposes as food, pigments, medicines, even picking up CO₂ from atmosphere. Recently, microalgae have attracted our interest because they are a possible solution for the treatment of waste waters. It was evaluated microalgae cultures for ammonium (NH₄⁺) and orthophosphate (PO₄⁻³) removal using a free and immobilized mixed microalgae cultures obtained from an anaerobic UASB reactor located in UAM-I waste water plant. *Chlorella vulgaris* y *Spirulina subsalsa* clonal cultures from UAM-I microalgae collection were used too.

All cultures were maintained under light and temperature controlled conditions. Microalgae were inoculated in artificial waste water using two different nutrient concentrations, a low concentration, 10 mg NH₄⁺/L and 5 mg PO₄⁻³/L; and a high concentration, 25 mg NH₄⁺/L and 10 mg PO₄⁻³/L, respectively. Microalgae growth and nutrient removal capacity were measured. Bioassays were carried out using two different substrata, luffa and polyethylene. Luffa was the more efficient substratum in relation to biomass production and microalgae adhesion.

C. vulgaris in free microalgae cultures at low concentration was the most efficient in relation to nutrients removal, with 50 % removal efficiency for NH₄⁺ and 74% for PO₄⁻³, as long as the best removal results were showed by the mixed culture with 68% for NH₄⁺ and 76% for PO₄⁻³. The highest efficiency related to nutrient removal was found in immobilized *C. vulgaris* growth on luffa, 70-99.9% for NH₄⁺ and 72.1-89.9% for PO₄⁻³.

Some microalgae used during this experiment showed a good efficiency for nutrient removal. Luffa and polyethylene present good characteristics related to microalgae adhesion and biomass harvest, these conditions are promising for use them in waste water treatment systems.

Key words: *Microalgae cultures, nutrient removal, waste waters.*

1. Introducción

El deterioro de la calidad del agua, supone un grave problema medioambiental y socioeconómico, que se acentúa en zonas de escasos recursos. El uso del agua potable para abastecimiento urbano e industrial, debe ir acompañado de una correcta depuración que permita su reutilización para riego agrícola, de áreas verdes, aguas recreativas, reutilización industrial, piscicultura, o bien como elemento que no perturbe el equilibrio biológico de la zona de vertido y que evite la contaminación de acuíferos subterráneos y masas superficiales de aguas continentales o marinas (Aranda-Cirerol *et al.*, 2006; Asano *et al.*, 2007; EPA, 1997; Morató y Peñuela, 2009).

Algunos nutrientes como el amonio y el ortofosfato pueden ser incorporados a los sistemas acuáticos por arrastre de suelos fertilizados con abonos nitrogenados y fosfatados, pero también por descargas de aguas residuales industriales sin tratamiento, o por aguas tratadas insuficientemente que además de nutrientes contienen metales pesados y sustancias orgánicas refractarias (de la Noüe *et al.*, 1992; Vargas *et al.*, 2004). Las concentraciones de amonio en aguas residuales municipales se encuentran de 12 a 64 mgNH₄⁺/L, mientras que las concentraciones de PO₄⁻³ pueden estar entre 3 y 17 mg/L (Cervantes-Zepeda *et al.*, 2011; Chacón *et al.*, 2006; Punmia y Kumar 1998; Wang *et al.*, 2010), siendo el fósforo total

entre 4 y 15 mg/L (Punmia y Kumar 1998; Wang *et al.*, 2010).

Las microalgas, organismos autótrofos que ocupan el primer eslabón en la cadena trófica, han recibido mucha atención en los últimos años, especialmente en las regiones tropicales y subtropicales, en donde se emplean como un biosistema alternativo para la remoción de nutrientes de este tipo de aguas. Estos microorganismos incorporan nitrógeno en forma de amonio que es utilizado para formar aminoácidos; aunque tienen la capacidad de incorporarlo en forma de nitrato (Contreras, 1994; de la Noüe *et al.*, 1992; Jeanfils *et al.*, 1993).

La utilización de microalgas para remoción de nutrientes ha sido estudiada por más de 50 años (Abalde *et al.*, 1995; Andrade *et al.*, 2009; Becker, 1994; EPA, 1999; Hanumatha-Rao *et al.*, 2011; Hoffmann, 1998; Larsdotter, 2006; Lavole y de la Noüe, 1985; Mendez-Suaza *et al.*, 2011; Olguin, 2003; Sandbank y Hepher 1978; Shi *et al.*, 2007), comprobando que la biomasa algal obtenida tiene un alto contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos, y otros productos de valor agregado. Por lo tanto, los esfuerzos para cultivar este tipo de microorganismos en aguas residuales han buscado conseguir un doble beneficio, la producción de biomasa para diferentes usos y un efluente limpio con una tecnología relativamente simple (Pulz y Gross, 2004; Rawat *et al.*, 2011).

Los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*, así como algunas especies del grupo de las cianobacterias, se han reportado para el tratamiento de diferentes tipos de aguas residuales, destacando las provenientes de plantas de tratamiento convencionales de origen industrial y urbano (Andrade *et al.*, 2009; Escorihuela, 2007; Lavole y de la Noüe, 1985). Por otra parte, se ha evaluado el uso de excretas de cerdo, de aves y de otros compuestos orgánicos como el acetato sobre el crecimiento de microalgas

(Baumgarten *et al.*, 1999; Bermúdez *et al.*, 2003).

No obstante a la gran cantidad de estudios realizados, uno de los problemas es que la mayoría utiliza algas en suspensión, conocidos también como cultivos libres, donde los procesos de cosecha requieren de métodos complicados (Ruiz-Marin *et al.*, 2010) o costosos. Como una medida alternativa para revertir estos inconvenientes Chevelier y de la Noüe (1985), propusieron el uso de carragenina como soporte para *Scenedesmus*, aplicada en la remoción de nutrientes de efluentes secundarios. En este mismo soporte, la cianobacteria *Spirulina maxima* ha sido utilizada en el tratamiento terciario de desechos de cerdo (Cañizares *et al.*, 1994).

Por otra parte, la inmovilización en alginato también ha sido explorada por Jeanfils *et al.* (1993), reportando velocidades de incorporación de nitrato para cultivos de *Chlorella vulgaris* libre e inmovilizada, no encontrando diferencias significativas entre ambos cuando se alimentaron a concentraciones 2 μM (0.37 y 0.36 d^{-1}) y 4 μM (0.39 y 0.36 d^{-1}). Travieso *et al.* (1996), con *Chlorella vulgaris* y *Chlorella kessleri* lograron resultados exitosos con agua residual cruda. Al respecto, Tam y Wong (2000), con *Chlorella vulgaris* en alginato de calcio, en biorreactores, reportan buena remoción para amonio y ortofosfato. Con otro método de inmovilización (doble capa), Shi *et al.* (2007) mencionan que *Chlorella vulgaris* removió el 94 y 89% de estos nutrientes, respectivamente. Asimismo, diversos materiales para la inmovilización han sido reportados, entre estos lufa, quitosano, resinas, silica, etc. (de-Bashan y Bashan, 2010).

En el presente trabajo se determinó la capacidad de remoción de ortofosfato y amonio por cultivos de microalgas libres e inmovilizados en dos soportes, lufa y polietileno, ya que la inmovilización resulta una alternativa promisoría en este campo, con vías a mejorar las eficiencias de eliminación de nutrientes a través de la aplicación en sistemas de tratamiento continuo y para facilitar los sistemas de cosecha. La biomasa algal generada, por su origen, puede utilizarse para la producción de bioenergéticos como biodiesel, biohidrógeno o metano (Chisti, 2007; Wijffels *et al.*, 2010).

2. Materiales y Métodos

2.1. Establecimiento de un cultivo Mixto

Se colectaron muestras de agua provenientes del efluente de un reactor anaerobio tipo UASB ubicado en la UAM-I. Las muestras se colocaron en 3 bidones de 4 litros de volumen y se incubaron por 23 días a condiciones ambiente de luz y temperatura. Cada tercer día, y por un lapso de 20 días, se tomó un mililitro de muestra y fue fijada con acetato de lugol para la identificación de las microalgas que se establecieron en este periodo de tiempo (Rodríguez-Palacio *et al.*, 2011; Valencia-Soto, 2012).

2.2. Cultivos libres

Se utilizaron las cepas de microalgas *Chlorella vulgaris* y *Spirulina subsalsa* que fueron aisladas del lago de origen volcánico Chalchoapan en la zona de los Tuxtlas en Veracruz, Ver., y en el estero del Río Barberena en Tampico, Tamaulipas, y un cultivo Mixto desarrollado a partir del efluente del reactor UASB que trata las aguas residuales de la UAM-I.

Los cultivos se sembraron en agua residual artificial (medio de cultivo F/2 modificado) en dos concentraciones de amonio y ortofosfato, la primera denominada “baja” que consistió de 15 y 5 mg/L de NH_4^+ y PO_4^{3-} , respectivamente, y “alta” de 25 y 10 mg/L

de NH_4^+ y PO_4^{3-} , respectivamente. Los inóculos fueron *Chlorella vulgaris* 1.23×10^{10} células/L, de *Spirulina subsalsa* 8 filamentos de entre 23-30 μm y el cultivo Mixto de 12.3×10^9 células/L, integrado por 40.5% de *Chlorella* sp., 35.8% de *Scenedesmus* sp. y 23.6% *Chlamydomonas* sp. Los cultivos se incubaron a una temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$, una irradianza de $90.5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y un ciclo luz-oscuridad de 12:12 horas. Para evaluar la remoción de los nutrientes y el crecimiento se tomó una muestra de 30 mL cada tercer día, tiempos similares a los reportados por otros autores (Shi *et al.*, 2007; Ruiz-Marin *et al.*, 2010).

2.3. Inmovilización de cultivos en polietileno y lufa

En matraces de 0.5 y 1L se adicionó agua residual artificial (con baja y alta concentración) y se les agregaron los soportes: 30 g polietileno de baja densidad con un tamaño de partícula entre 0.7 y 0.9 mm y lufa (*L. aegyptiaca* o estropajo) cortada en cuadros aproximadamente de 2.25 cm, 11.2 g. Ambos soportes fueron previamente esterilizados por luz ultravioleta.

Posteriormente los matraces se inocularon con: *C. vulgaris*, *S. subsalsa* y el cultivo Mixto; se incubaron durante 20 días en las mismas condiciones que los cultivos libres. La remoción de nutrientes y la biomasa inmovilizada durante este periodo se estimaron a partir de muestras colectadas al inicio y al final del experimento.

2.4. Cultivos inmovilizados

La biomasa inmovilizada de los cultivos de *C. vulgaris* y Mixto alcanzada en ambos soportes en el experimento anterior, fue realimentada únicamente con amonio y ortofosfato a alta concentración; se colectaron muestras cada tercer día para evaluar su capacidad de remoción y para cuantificar la producción de nueva biomasa. El cultivo de *S. subsalsa* no fue evaluado en esta etapa

debido a la escasa biomasa inmovilizada en los soportes.

2.5. Medio de cultivo

Se preparó el medio denominado agua residual artificial tomando como base el medio de cultivo F/2 (Guillard y Ryther, 1962, Guillard, 1975), del cual se retiró la fuente de nitrógeno y fósforo, substituyéndose por las concentraciones de amonio y ortofosfato necesarias para obtener las concentraciones experimentales (baja y alta).

2.6. Técnicas analíticas

La determinación de la concentración de amonio y ortofosfato se realizó por colorimetría utilizando el método de azul de indofenol para el primero y por el método del ácido ascórbico para el segundo, siguiendo los procedimientos reportados en Contreras (1994) y APHA (1995). Inicialmente se realizaron curvas de calibrado para la estimación de la concentración de ambos nutrimentos.

La determinación de la tasa de crecimiento en los cultivos libres se llevó a cabo por la cuantificación de microalgas encontradas en un microlitro de cada muestra y se hizo por triplicado; en los cultivos inmovilizados la biomasa algal se determinó por el método de peso seco (Arredondo-Vega y Voltolina, 2007), antecedido por el desprendimiento de las microalgas por intervalos cortos de sonicación de las muestras (1 minuto), procedimiento que se repitió hasta que los soportes quedaron libres de biomasa algal.

Para la interpretación de los resultados se utilizó el análisis de varianza de un factor (ANOVA) y la *t* de Student, ambos con un nivel de significancia de 0.05.

3. Resultados

3.1 Cultivo Mixto

En el cultivo Mixto se desarrollaron microalgas de los grupos Clorofitas, Euglenofitas y Bacilariofitas. Dentro de las Clorofitas se encontraron microalgas del género *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Pediastrum*; del grupo de las Bacilariofitas fueron observadas *Fragilaria* sp1. y *Fragilaria* sp2., mientras que en el grupo de las Euglenofitas, predominó *Euglena* sp.

3.2 Cultivos libres

3.2.1. Baja concentración

La remoción de amonio para los cultivos de *C. vulgaris*, *S. subsalsa* y Mixto fue de 50, 16 y 23% (Figura 1a); para el ortofosfato la remoción fue de 74, 96 y 23%, respectivamente (Figura 1b), mostrando diferencias significativas ($p = 0.0124$). En cuanto a la densidad celular los tres cultivos presentaron un crecimiento distinto ($p = 0.0266$) siendo el cultivo de la especie *C. vulgaris* el más exitoso.

3.2.2 Alta concentración

La remoción de amonio (Figura 2a) a concentración alta para los cultivos Mixto, *C. vulgaris* y *S. subsalsa* fue de 68, 37, 26%; para ortofosfato fue del 76, 45 y 24% (Figura 2b), existiendo diferencia entre estas ($p = 0.001$). Respecto al crecimiento, *C. vulgaris* exhibió el nivel más alto (Figura 2c), pero estadísticamente los tres cultivos mostraron ser iguales.

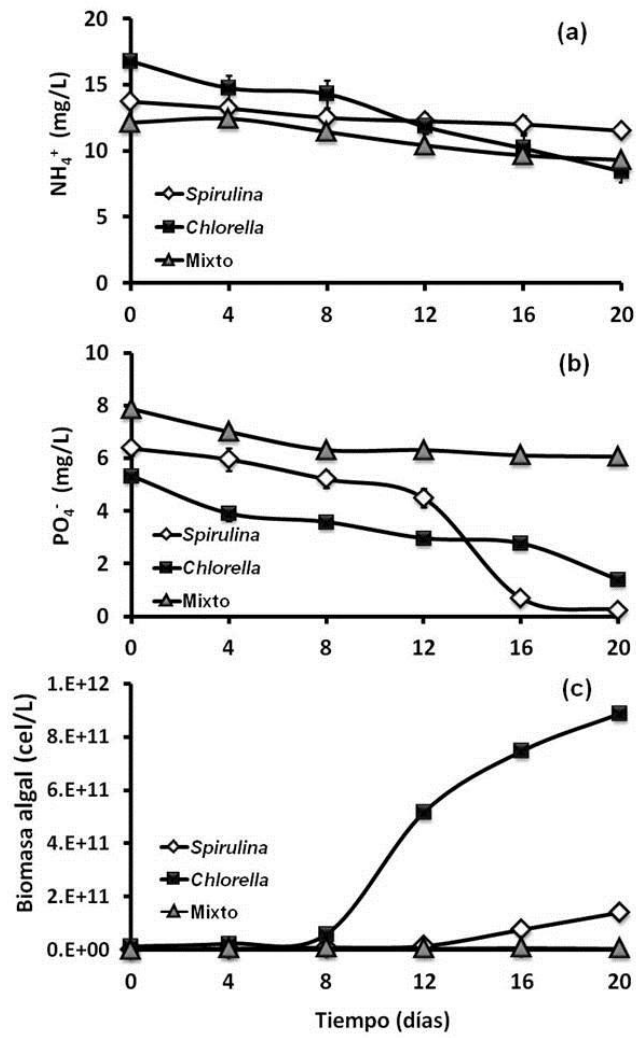


Figura 1. (a) Perfil de remoción de amonio; (b) ortofosfato y (c) crecimiento celular, a baja concentración, con cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Spirulina subsalsa* y Mixto.

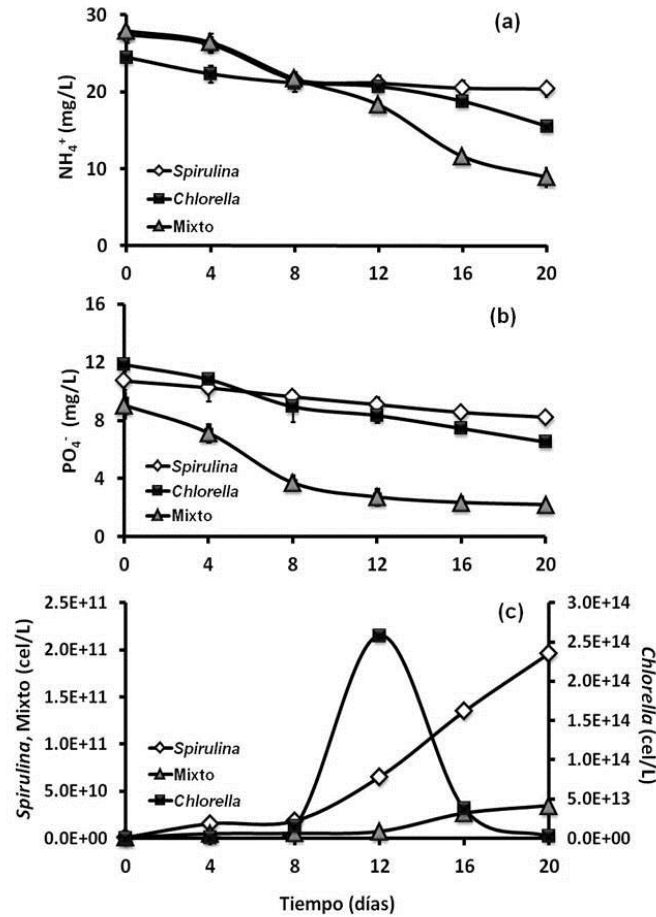


Figura 2. (a) Perfil de remoción de amonio, (b) ortofosfato y (c) densidad celular, a alta concentración, con los cultivos de *Chlorella vulgaris*, *Spirulina subsalsa* y Mixto.

3.3 Inmovilización de cultivos en polietileno y lufa

La biomasa inmovilizada en cada uno de los soportes y para cada uno de los tres cultivos ensayados se muestra en la Tabla 1. En esta se observa que el cultivo Mixto en polietileno alcanzó la concentración más alta de biomasa, pero no fue significativamente diferente a la de los otros dos cultivos. En lufa, la mayor biomasa la obtuvo el cultivo Mixto, a continuación *C. vulgaris* y por último *S. subsalsa*, siendo significativamente diferentes ($p = 0.013$).

Asimismo, comparando cada cultivo en ambos soportes, los resultados exhibieron que no hubo diferencias entre estos. En las Figuras 3 y 4 se muestran imágenes de los soportes antes y después de la inmovilización. Adicionalmente, la mejor remoción de nutrientes fue obtenida por el cultivo Mixto; mientras que *C. vulgaris* y *S. subsalsa* presentaron las más bajas eficiencias de remoción de NH_4^+ .

Tabla 1. Biomasa inicial y final de los cultivos de *Chlorella*, *Spirulina* y Mixto, y porcentaje de remoción de nutrientes, durante la inmovilización en los soportes.

Soporte	Polietileno			Lufa		
	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)
<i>C. vulgaris</i>						
^{a,b} Biomasa	^a 1.3 x 10 ⁹	^b 0.0037	-	^a 1.3 x 10 ⁹	^b 0.0061	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	40.5	27.2	32.8	40.5	11.1	72.6
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	4.9	0	100	3.6	1.1	69.4
<i>S. subsalsa</i>						
^{a,b} Biomasa	^a 1.3x10 ¹⁰	^b 0.0004	-	^a 1.3x10 ¹⁰	^b 0.0033	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	81.4	63.3	22.2	84.3	77.8	7.71
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	5.9	1.2	79.6	6.4	3.4	46.8
Mixto						
^{a,b} Biomasa	^a 1.2x10 ⁷	^b 0.0058	-	^a 1.2x10 ⁷	^b 0.0173	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	63.2	19.8	68.6	64.4	15.7	75.6
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	6.8	1.2	82.4	6.5	1.2	81.5

^acélulas/L; ^bg biomasa algal/g soporte seco.

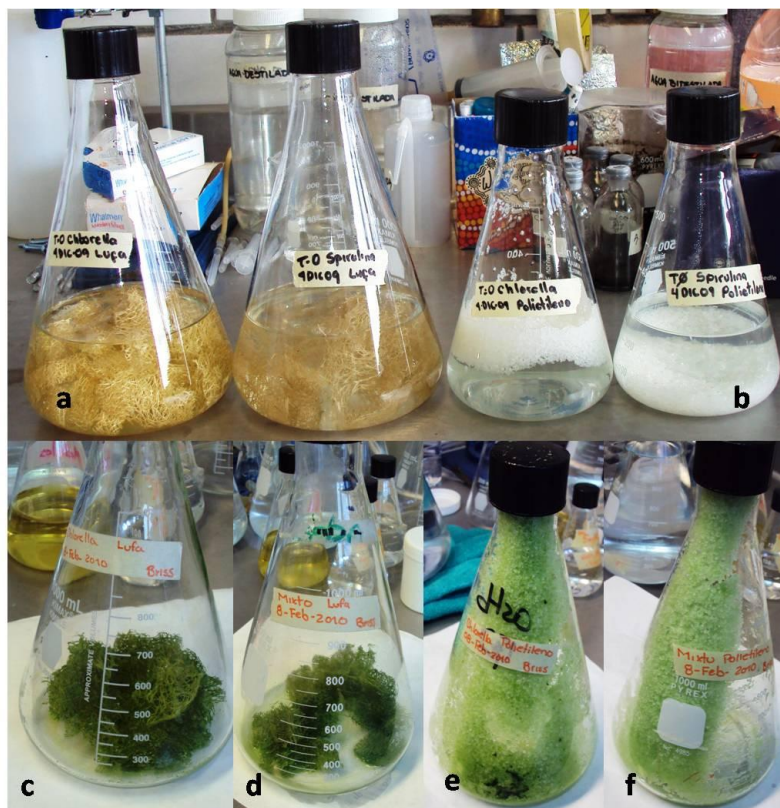


Figura 3. Muestra los soportes, (a) lufa y (b) polietileno en el tiempo cero. Los cultivos inmovilizados después de 20 días: en lufa, (c) Mixto y (d) *Chlorella vulgaris*; en polietileno, (e) Mixto y (f) *Chlorella vulgaris*.

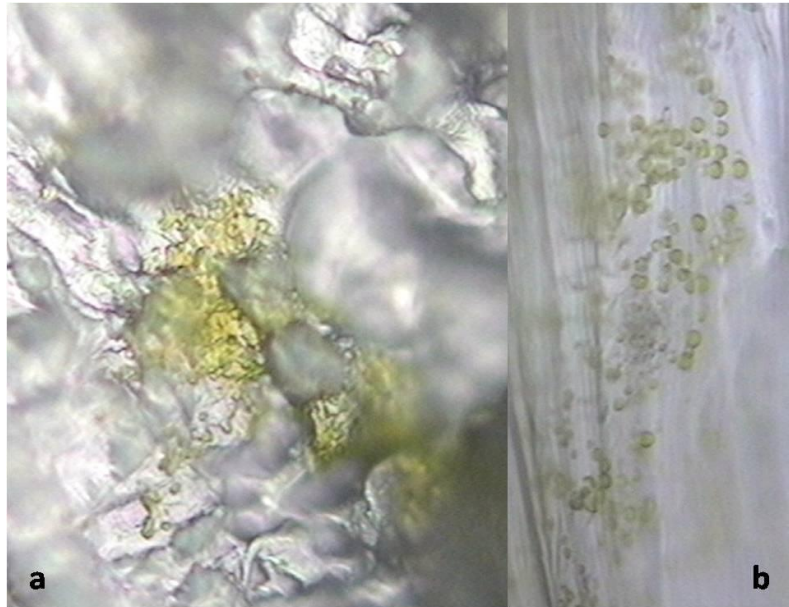


Figura 4. Fotografías de microscopio de luz, polietileno con cultivo Mixto (a) y con *Chlorella vulgaris* (b).

3.4 Cultivos inmovilizados

Los cultivos en lufa (Figura 5 y Tabla 2) presentaron una mejor remoción de ambos nutrientes, entre el 70 y 99.9%.

El crecimiento de *C. vulgaris* fue similar en ambos soportes, mientras que el del cultivo Mixto fue mayor en lufa ($p = 0.0215$).

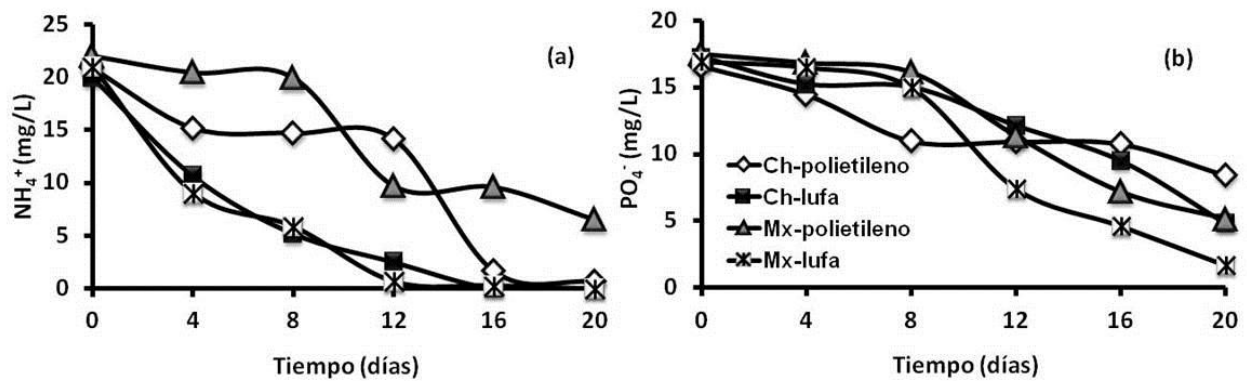


Figura 5. Consumo de (a) amonio y (b) ortofosfato por los cultivos de *Chlorella vulgaris* y Mixto inmovilizados en polietileno y lufa. Ch: *Chlorella vulgaris* y Mx: Mixto.

Tabla 2. Producción de biomasa y remoción de nutrientes por los cultivos de *C. vulgaris* y Mixto inmovilizados en los soportes.

Soporte	Polietileno			Lufa		
	Inicial	Final	Rem. (%)	Inicial	Final	Rem. (%)
<i>C. vulgaris</i>						
^a Biomasa	0.0037	0.0057	-	0.0061	0.1539	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	20.8	0.06	99.0	19.9	0.006	99.9
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	16.5	8.4	49.2	17.2	4.8	72.1
Mixto						
^a Biomasa	0.0058	0.0098	-	0.0173	0.1073	-
NH ₄ ⁺ (mg/L)	22.0	6.5	70.0	21	0.008	99.9
PO ₄ ⁻³ (mg/L)	17.5	5.1	70.8	16.9	1.7	89.9

^ag biomasa algal/g soporte seco.

4. Discusión

De los cultivos libres con agua residual artificial a baja concentración de nutrientes, el Mixto fue el que presentó los niveles menores de consumo, esto podría ser debido a que por su origen, el agua residual, las microalgas están adaptadas a concentraciones más elevadas de nutrientes en comparación con las probadas en este experimento. Por otra parte, se considera que *C. vulgaris* mostró una mejor respuesta ya que removió ambos nutrientes eficientemente. En el caso de *S. subsalsa*, la elevada remoción de PO₄⁻³ (96%), no coincidente con la escasa remoción de NH₄⁺ (16%), podría deberse a una precipitación del ortofosfato con la subsecuente formación de minerales como la estruvita (MgNH₄PO₄), tal como lo reportan de-Bashan y Bashan (2010).

Algunos estudios como el de Vargas *et al.* (2004), reportan que en una laguna facultativa se establecieron cultivos de cianofitas y clorofitas que alcanzaron una

remoción de amonio del 36.4% a partir de una concentración de 16.9 mg/L, nivel menor al alcanzado por *C. vulgaris* (50%) en este estudio y mayor a los cultivos de *S. subsalsa* y Mixto (16 y 23%). Por su parte Ruiz-Marin *et al.* (2010) mencionan que *C. vulgaris* removió 74.3 y 70.2% de NH₄⁺ y PO₄⁻³.

Las altas eficiencias de remoción alcanzadas por el cultivo Mixto a alta concentración de nutrientes, en comparación de los otros dos, podría ser debido a la diversidad de microalgas establecidas a partir del agua residual, además por este origen, probablemente tienen la capacidad para incorporar concentraciones más elevadas de nutrientes.

En el cultivo Mixto a baja concentración de nutrientes, al final del ensayo se encontraron *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas* en proporción de 83.7, 14.3 y 1.9% y en alta concentración en 16.8, 3.9 y 79.3%, respectivamente. Escorihuela *et al.* (2007), mencionan que en la entrada y salida de una

laguna de pulimiento predominó una población perteneciente a cianofitas, con 99.5 y 97.4%, respectivamente, siendo el género más frecuente *Synechocystis* con un 96.2%. La diferencia de las microalgas encontradas en ambos trabajos, podría explicarse a que crecieron en efluentes distintos, ya que un tratamiento es aerobio (laguna de pulimiento) y el otro anaerobio (reactor UASB).

De los cultivos clonales que fueron probados, el de *C. vulgaris* en cultivo libre presentó buenos niveles de producción de biomasa, y comparando con Chacón *et al.* (2006), que alcanzaron 6.2×10^{10} cel/L en 27 días, en este estudio se obtuvo un mayor número de células en 20 días. Sin embargo, se observó una caída repentina en la curva de crecimiento a los 12 días del cultivo (Figura 2), aunque aún se encontraban nutrientes, esto puede deberse a que los microorganismos fotosintéticos utilizan la energía luminosa y CO_2 (Bermúdez *et al.*, 2003), pero cuando los cultivos se someten a una alta carga de nutrientes y no se les suministra una fuente externa de CO_2 o de carbonato, se limita la fotosíntesis y ya no pueden asimilar dichos nutrientes. Un suministro de CO_2 ya sea como gas puro o adicionado por una corriente de aire, aumenta significativamente la productividad de los cultivos masivos de microalgas y actúa como fuente de carbono para la fotosíntesis (Abalde *et al.*, 1995).

También es de considerar que los gradientes gaseosos imponen restricciones a las tasas de crecimiento de los cultivos, ya que una alta densidad de células fotosintéticamente activas provocan concentraciones extremadamente altas de oxígeno disuelto, que llevan a una sobre saturación de oxígeno, inclusive por encima de 400%; ante esto se produce inhibición de la fotosíntesis y los cultivos tienden a caer (Abalde *et al.*, 1995). En este estudio ambos factores podrían haber afectado el consumo total de nutrientes, debido a las condiciones en las

que se realizaron las pruebas (matraces cerrados y sin suministro de gases).

Cañizares *et al.* (1994), reportan una buena capacidad de inmovilización en carragenina por *Spirulina* sp., que fue contrario a los resultados obtenidos en este estudio, donde el cultivo de *S. subsalsa* no tuvo una buena adherencia al polietileno, ni a la lufa. Mientras que los cultivos de *C. vulgaris* y Mixto se inmovilizaron positivamente en ambos soportes.

Respecto a los nutrientes durante el periodo de inmovilización, el cultivo Mixto tanto para polietileno como para lufa fue el que obtuvo una mejor capacidad de remoción. Comparando con lo reportado por Shi *et al.* (2007), con cultivos inmovilizados de *C. vulgaris* y *Scenedesmus* sp. alimentados alrededor de 20 mg/L de NH_4^+ y 3.0 mg/L de PO_4^{-3} , obtuvieron en 9 días eficiencias de remoción del 94 y 89%, mientras que en este estudio en 20 días, el cultivo de *C. vulgaris* alcanzó un remoción del 99.0 y 49.2% en polietileno y del 99.9 y 72.1% en lufa, respectivamente, esto podría ser debido al tipo de inmovilización que utilizaron (doble capa). Además, para el cultivo de *C. vulgaris* (polietileno) y *S. subsalsa* (polietileno y lufa) el consumo de NH_4^+ no equivalente al PO_4^{-3} removido, puede suponer pérdida por precipitación.

En relación a la concentración de biomasa, Akhtar *et al.* (2003) en un estudio sobre remoción de metales pesados por *Chlorella sorokiniana* inmovilizada en lufa, alcanzan una biomasa de 0.263 g biomasa/g soporte seco en 24 días, con una remoción de níquel del 97%, en este estudio se alcanzaron valores entre 0.0057 y 0.1539 g biomasa/g soporte seco, lo que indicaría que el tipo de compuesto a remover tienen un efecto sobre el crecimiento de la biomasa. Con *Synechococcus* sp. inmovilizada alcanzaron una biomasa de 0.0094 g biomasa/g soporte seco cuando fue empleada para la depuración de cadmio (Saeed y Iqbal, 2006), que fue igual a la encontrada en el cultivo

Mixto con polietileno y 16 veces menor a la máxima obtenida para *Chlorella vulgaris* en lufa. Los dos autores coinciden en que la utilización de microalgas inmovilizadas en este soporte, es un método viable para la remoción de metales pesados de aguas residuales, y al igual que en el presente estudio la lufa resultó mejor para la inmovilización y remoción de nutrientes. Saeed y Iqbal (2006), mencionan que esto puede ser debido a que las microalgas tienen más superficie para la inmovilización por lo largo de los hilos de la fibra de este soporte. En este estudio se proponen ambos soportes como alternativas de inmovilización de la biomasa algal, debido a que en la mayoría de los experimentos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la fijación de la biomasa. Sin embargo en el polietileno las eficiencias de remoción fueron menores que con la lufa, por lo que, probablemente sólo se requiere tener los cultivos en agitación para que exista un mayor contacto entre los nutrientes y las microalgas adheridas al polietileno.

5. Conclusiones

En los cultivos libres a baja concentración, la mayor capacidad de remoción la tuvo *C. vulgaris* por disminuir ambos nutrientes (NH_4^+ y PO_4^{-3}) en un 50 y 74%. A alta concentración, la mejor remoción se alcanzó con el cultivo Mixto (68% de NH_4^+ y 76% de PO_4^{-3}).

A baja concentración la mayor biomasa algal fue alcanzada por *C. vulgaris*, mientras que en la segunda condición los tres cultivos exhibieron un crecimiento similar.

La inmovilización de cultivos fue baja para *S. subsalsa* en lufa y en polietileno (≤ 0.0004 g biomasa algal/g soporte seco), pero los cultivos de *C. vulgaris* y Mixto fueron inmovilizados favorablemente en ambos soportes, obteniendo una biomasa algal de hasta 0.0061 y 0.0173 g/g de soporte seco; la remoción de nutrientes fluctuó entre 32.8 y

75.6% para el NH_4^+ y de 69.4 al 100% de PO_4^{-3} , aunque para el ortofosfato pudo haber perdida por precipitación.

Los cultivos de *C. vulgaris* y Mixto inmovilizados alcanzaron los mayores porcentajes de remoción de los nutrientes, 70 al 99.9% (NH_4^+) y 72.1 al 89.9% (PO_4^{-3}), mientras que el incremento de biomasa algal fue similar en ambos cultivos.

El utilizar especies de microalgas, que provienen del agua residual tratada, como alternativa para biorremediación de las mismas es una opción viable debido a que de manera natural, están adaptadas a altas concentraciones de nutrientes y a otras sustancias presente en las mismas. Por otro lado, las especies de microalgas que se desarrollaron a partir de este tipo de aguas, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* y *Pediastrum* resultaron ser interesantes para un segundo uso biotecnológico.

6. Reconocimientos

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), por el financiamiento para la realización de este estudio, a través del proyecto “Calidad del agua del Río Zahuapan y Biotratamientos”. Folio UAM-PTC-117.

7. Referencias

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J.P., Torres, E., Herrero, C. 1995. Microalgas: Cultivo y Aplicación. Ed. Universidad Coruña, Coruña. 210p.
- Akhtar, N., Iqbal, J., Iqbal, M. 2003. Microalgal-luffa sponge immobilized disc: a new efficient biosorbent for the removal of Ni (II) from aqueous solution. *Lett Appl Microbiol* 37:149–153.
- Andrade, R.C., Vera, B.A.L., Cardenas, L.C.H., Morales-Avendaño, E.D. 2009. Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas

- residuales de pescadería. *Rev Tec Ing Univ Zulia* 32(2):126–134.
- APHA. 1995. Standard methods: For the examination of water and wastewater. 19th edition. Ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Aranda-Cirerol, N., Herrera-Silveira, J.A., Comín, F.A. 2006. Nutrient water quality in a tropical coastal zone with ground water discharge, northwest Yucatán, Mexico. *Estuar Coast Shelf Scien* 68:445–454.
- Arredondo-Vega, B.O., Voltolina, D. 2007. Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal. Ed. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S.C., La Paz, B.C.S., México. 97p.
- Asano, T., Burton, F.L., Leverenz, H.L., Tsuchihashi, R., Tchobanoglous, G. 2007. Water Reuse, Issues, Technologies, and Applications. Metcalf and Eddy. Ed. AECOM. 310p.
- Baumgarten, E., Nagel, M., Tischner, R. 1999. Reduction of the nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol* 52(2):281–284.
- Becker, E.W. 1994. Microalgae, Biotechnology and Microbiology. Ed. Cambridge University Press, New York. 291p.
- Bermúdez, J.L., Sánchez, G., Fuenmayor, G., Morales, E. 2003. Efecto de la fuente de carbono sobre el crecimiento y producción de la microalga marina *Chroomonas* sp. *Ciencia* 11(4):265–269.
- Cañizares, R.O., Rivas, L., Montes, C., Domínguez, A.R., Travieso, L., Benítez, F. 1994. Aerted swine wastewater treatment with k-carrageenan immobilized *Spirulina maxima*. *Bioresource Technol* 47:89–91.
- Cervantes-Zepeda, A.I., Cruz-Colín, M.R., Aguilar-Corona, R., Castilla-Hernández, P., Meraz-Rodríguez, M. 2011. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua tratada en un reactor UASB escala piloto. *Rev Mex Ing Quím* 10(1):67–77.
- Chacón, C., Andrade, C., Cárdenas, C., Araujo, I., Morales, E. 2006. 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.
- Chevalier, P., de La Noüe, J. 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carreegeenan. *Enzyme Microb Tech* 7:621–624.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25:294–306.
- Contreras, E.F. 1994. Manual de técnicas hidrobiológicas. Ed. Trillas. Ciudad de México, 141p.
- de la Noüe, J., Laliberté, G., Proulx, D. 1992. Algae and waste water. *J Appl Phycol* 4:247–254.
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technol* 101:1611–1627.
- EPA. Environmental Protection Agency U.S. 1999. Folleto informativo de tecnología de aguas residuales: Desinfección con cloro. Office of Water, Washington, D.C., EPA 832-F99-062.
- EPA. Environmental Protection Agency U.S. 1997. Protecting Coastal Waters from Nonpoint Source Pollution. *En*: U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C. USA. 841-F 96-004E.
- Escorihuela, A. 2007. Dinámica de población de microorganismos fotosintéticos en un sistema de tratamiento avanzado de aguas residuales urbanas. Tesis de Maestría en Microbiología. Universidad de Zulia, Venezuela. 120p.
- Escorihuela, A., Núñez, M., Rosales, N., Morales, E. 2007. Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas

- residuales urbanas. *Rev Fav Agron* 24(1):225–230.
- Guillard, R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: W.L. Smith y M.H. Chanley (Eds.). *Culture of Marine Invertebrates Animals*. Ed. Plenum Publishing, New York. 29–60p.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H. 1962. Studies on the marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* husted and *Detonella cofervacea* (Cleve). *Can J Microbiol* 8:229–39.
- Hanumatha-Rao, P., Ranjith Kumar, R., Raghavan, B.G., Subramanian, V.V., Sivasubramanian, V. 2011. Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. *Water SA* 37(1):07–14.
- Hoffmann, P.J. 1998. Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *J Phycol* 34:757–763.
- Jeanfils, J., Canisius, M.F., Burlion N. 1993. Effect of high nitrate concentrations on growth and nitrate uptake by free-living and immobilized *Chlorella vulgaris* cells. *J Appl Phycol* 5:369–374.
- Larsdotter, K. 2006. Wastewater treatment with microalgae a literature review. *Vatten* 62:31–38.
- Lavole, A., de La Noue, J. 1985. Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Wat Res* 19(11):1437–1442.
- Mendez-Suaza, L., Albarracin, I., Cravero, M., Salomón, R. 2011. Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. *Revista Cubana de Investigaciones Pesqueras* 28(1):36–41.
- Morató, J., Peñuela, G. 2009. Manual de tecnologías sostenibles en tratamiento de aguas. Ed. Red ALFA TECSPAR (Tecnologías Sostenibles para la Potabilización y el Tratamiento de Aguas Residuales). Financiado por la Comisión Europea. ISBN: 978-958-44-5307-5. 115p.
- Olguin, E.J. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal process. *Biotechnol Adv* 22(8):81–91.
- Pulz, O., Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol* 65:635–648.
- Punmia, B.C., Kumar, A.J. 1998. Wastewater engineering (including air pollution). Ed. LAXMI PUBLICATIONS (P) LTD, New Delhi. 660p.
- Rawat, I., Ranjith, K.R., Mutanda, T., Bux, F. 2011. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Appl Energ* 88:3411–3424.
- Rodríguez-Palacio, M.C., Crisóstomo-Vázquez, L., Álvarez-Hernández, S., Lozano-Ramírez, C. 2011. Strains of toxic and harmful microalgae, from wastewater, marine, brackish and freshwater. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 29(2):304–313.
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Stephenson, T. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technol* 101:58–64.
- Saeed, A., Iqbal, M. 2006. Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system. *World J Microb Biot* 22:775–782.
- Sandbank, E., Hopher, B. 1978. The utilization of microalgae as a feed for fish. *Arch Hydrobiol* 11:86–97.
- Shi, J., Podola, B., Melkonian, M. 2007. Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study. *J Appl Phycol* 19(5):417–423.

- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ Pollut* 107(1): 145–151.
- Travieso, L., Benitez, F., Weiland, P., Sánchez, E., Dupeyrón, R., Domínguez A. R. 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresource Technol* 55(3):181–186.
- Valencia-Soto, D. A. 2012. Capacidad de remoción de amonio y fósforo en cultivos a gran escala de tres especies de microalgas en aguas residuales municipales. Tesis de Especialidad en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 45p.
- Vargas, L., Cárdenas, F.C.H., Hernández, M., Araujo, I., Yabroudi, S., López, F. 2004. Efecto de las microalgas en la remoción de los compuestos nitrogenados presentes en la laguna facultativa de una planta de tratamiento de aguas residuales. <http://www.bvsde.paho.org/bvsAIDIS/PuertoRico29/cardevene.pdf> (Consultada 20 mayo de 2012).
- Wang, L., Min M., Li. Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol* 162(4):1174–1186.
- Wijffels, H.R., Barbosa, H.M.J., Eppink, M.H. 2010. Microalgae for the production of bulk chemicals and biofuels. *Biofuel Bioprod Bioref* 4:287–295