

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO

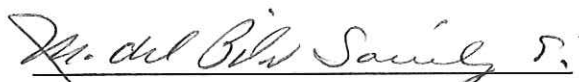
**Evaluación del crecimiento y la remoción de nutrientes de
Synechococcus elongatus coinmovilizada con
Azospirillum brasilense en alginato**

TESIS
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios
para obtener el grado de
BIOINGENIERO

Presenta:
DUAHMET ABDUL RUIZ GÜERECA

Ensenada, B.C., México, 2014

TESIS DEFENDIDA POR
Duahmet Abdul Ruiz Güereca
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director del comité



Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes
Miembro del comité



Dra. Claudia Mariana Gómez Gutiérrez
Miembro del comité



Dra. Graciela Guerra Rivas
Miembro del comité

Octubre, 2014

RESUMEN de la tesis de **Duahmet Abdul Ruiz Güereca**, presentada como requisito parcial para obtener el grado de BIOINGENIERO. Ensenada, Baja California. Octubre de 2014.

Evaluación del crecimiento y la remoción de nutrientes de *Synechococcus elongatus* coinmovilizada con *Azospirillum brasilense* en alginato

Resumen aprobado por:

Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra
Director de Tesis

Las aguas del mundo constituyen un recurso escaso, amenazado y en peligro, debido a su contaminación. Una de las consecuencias de la contaminación del agua a nivel mundial es la eutrofización, causada por el alto contenido de nutrientes que entran a los ecosistemas acuáticos. Por medio de métodos biológicos es posible contribuir al control de la eutrofización y entre estas metodologías, se encuentra el uso de microalgas inmovilizadas. Una de las nuevas estrategias para aumentar la remoción de nutrientes es la coinmovilización de microalgas con bacterias promotoras de crecimiento vegetal. El objetivo de esta investigación fue evaluar el crecimiento y la capacidad de remoción de nitrógeno y fósforo por la cianobacteria *Synechococcus elongatus* cuando fue coinmovilizada con la bacteria promotora de crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato. En un ensayo preliminar se determinó a cual proporción de inóculo de *S. elongatus* y de *A. brasilense*, había un mayor efecto alelopático en el crecimiento de la cianobacteria. *S. elongatus* tuvo un mayor crecimiento en la proporción 3:2 de cianobacteria:bacteria. Los tratamientos experimentales de coinmovilización, se mantuvieron en medio "2f" sin recambio de medio a 20 ± 1 °C y con iluminación continua ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) durante siete días. Como control de estos ensayos se colocaron cultivos de células libres e inmovilizadas en condiciones similares a las descritas para los cultivos con células coinmovilizadas. En el tratamiento de cocultivo con células libres de ambos microorganismos, se alcanzó la mayor concentración celular (3575×10^4 células/mL). Sin embargo, la mayor tasa de crecimiento (μ) fue para el tratamiento de coinmovilización (1.03 divisiones/día). Los cultivos en los tratamientos de coinmovilización tuvieron una fase de acondicionamiento menor a los tratamientos con células inmovilizadas. El contenido de clorofila *a* fue significativamente mayor en los tratamientos con

células coinmovilizadas respecto a las células de los demás tratamientos. Se observó un incremento continuo en el crecimiento de *A. brasilense* hasta el día 2, después hubo una disminución progresiva del crecimiento hasta el final del experimento. Los tratamientos con células libres tuvieron los mayores niveles de remoción de fosfatos. El tratamiento de cocultivo libre de *S. elongatus* y *A. brasilense* alcanzó una remoción máxima del 51% en el día 7 y el tratamiento con células libres de *S. elongatus* alcanzó una remoción máxima del 57% en el día 4. Los tratamientos con células inmovilizadas de *S. elongatus* alcanzaron una remoción máxima del 41%, mientras que los tratamientos con células coinmovilizadas de *S. elongatus* y *A. brasilense* lograron una remoción máxima del 48% ambos en el día 5 del experimento. Se evaluó una ligera disminución en la concentración de nitratos en la mayoría de los tratamientos. Se observó un ligero aumento en la concentración de nitritos en todos los tratamientos. Se concluye que la asociación artificial entre la cianobacteria *S. elongatus* y la bacteria *A. brasilense*, incrementa la tasa de crecimiento de la cianobacteria y también aumenta su capacidad de remoción de fosfatos del medio.

Palabras clave: *Synechococcus*, *Azospirillum*, bacteria promotora de crecimiento, coinmovilización, remoción de nutrientes.

ABSTRACT of the thesis presented by **Duahmet Abdul Ruiz Güereca** as a partial requirement to obtain the bachelor of Bioengineering degree. Ensenada, Baja California, México. October 2014.

Evaluation of growth and nutrient removal of *Synechococcus elongatus* coimmobilized in alginate with *Azospirillum brasilense*

Water is a scarce resource threatened by eutrophication and contamination. Eutrophication is caused by an enrichment of nutrients of the aquatic ecosystems, and biological methods such as microalgae immobilization, may contribute to control it. Moreover, the coimmobilization of microalgae with plant growth-promoting bacteria has shown to improve the removal of nutrients. The goal of this work was to evaluate the ability of nitrogen and phosphorous removal by *Synechococcus elongatus* coimmobilized with *Azospirillum brasilense* within alginate beads. A preliminary assay provided the suitable ratio of *S. elongatus* : *A. brasilense* for allowing the allelopathic growth of *S. elongatus*. The ratio 3:2 (*S. elongatus* : *A. brasilense*) show to be the best condition for growing *S. elongatus*. For the experiments, the coimmobilized cells were kept in "2f" medium at 20 ± 1 °C under continue light ($100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) for seven days. No renewal of medium was done. Culture of free and immobilized cells, under the same conditions as described above, were used as controls. The highest biomass is reached under free coculture (3575×10^4 cells/mL). However, the highest growth rate (μ) is obtained in coimmobilized treatments (1.03 divisions/day). Results show that coimmobilization shortens the conditioning phase of the cells, and contributes to significantly increase the chlorophyll a content compared to the immobilized cells. *A. brasilense* continuously grows until day 2 of the experiment, and then the culture decays until the end of the study. Regarding with nutrient removal, the free culture of *S. elongatus* show to remove higher amounts of phosphorous, 57% at day 4, compared to the 51% removed at day 7 by the coculture cells. When immobilized, the maximum phosphorous removal is 41%, while 48% is reached when coimmobilized, both at day 5 of the experiment. On the other hand, a non-significant decrease of nitrates (in most of the treatments) and increase of nitrites (for all the treatments) resulted in this study. As conclusion, the artificial association between *S. elongatus* and *A. brasilense*, increases the growth rate and phosphate removal ability of *S. elongatus*.

Keywords: *Synechococcus*, *Azospirillum*, plant growth promoting bacteria, coimmobilization, nutrient removal.

DEDICATORIAS

A mi padre

AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT, por el apoyo económico para la realización de esta tesis así como la beca de manutención obtenida a través del proyecto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACyT proyecto 130074).

Al CICESE, por aceptarme y permitirme formar parte de sus estudiantes y por los apoyos otorgados durante mi estancia. En especial al Departamento de Acuicultura.

Especialmente a la Dra. M. del Pilar Sánchez Saavedra por aceptarme como tesista, por ser la directora de este trabajo y por ser mi guía en esta etapa de mi desarrollo profesional. Gracias por enseñarme el amplio e interesante mundo de las microalgas, por dedicarme tiempo, atención y tenerme paciencia, pero sobre todo por ser un excelente ser humano.

A los miembros de mi comité de tesis: A la Dra. María Lucila del Carmen Lares Reyes, Dra. Graciela Guerra Rivas y Dra. Claudia M. Gómez Gutiérrez por las correcciones y valiosas observaciones para mejorar este trabajo.

Al Dr. Manuel Segovia Quintero por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme utilizar su equipo para las pruebas de medición de nutrientes.

A Ceres, gracias por toda la ayuda que me diste en las pruebas microbiológicas y en el análisis estadístico. Eres de las mejores personas con las que he trabajado, espero volver a trabajar juntos en un futuro.

A Ruperto por enseñarme las técnicas necesarias para el cultivo de microalgas a mi llegada al laboratorio y por esas largas charlas de fútbol.

A Ana por todos sus consejos para realizar este trabajo, sus atenciones en detalles que yo no me daba cuenta que eran importantes y por compartir su conocimiento de los aspectos académicos en México.

A Estrella por compartir conmigo su conocimiento acerca de las microalgas y enseñarme las diferentes técnicas que necesite en mis experimentos.

A Yuriar y Diego por no hacerme sentir tan chico, por sus puntos de vista, consejos y hacerme compañía durante el proceso de inmovilización.

A Miriam por su ayuda en mis pruebas microbiológicas y los aspectos relacionados con el almacenamiento de las muestra. También por su buen humor y sus pláticas amenas.

A Socorro por todos los libros que me proporcionaste y por sacarme de mis dudas acerca del tema de inmovilización de microalgas.

A Diana gracias por tenerme paciencia y por alentarme para que siga estudiando.

A Brenda del laboratorio de alimentación y nutrición por prestarme su plancha de agitación tantas veces para mis experimentos de inmovilización.

A los muchachos del laboratorio de diseño y desarrollo de tecnología acuícola: Juan Pablo, Salvador, Julio y Romy por enseñarme la técnica de medición de nutrientes en microplaca, pero sobre todo por hacer la cuantificación de nutrientes una de las partes más amenas de mis experimentos.

A mis compañeros de la tercera generación de Bioingeniería Juanma, Ricardo, Pepe, Dick, Shary, Tetoy, Andrea, Issa, Lamberto y Valeria. Sin duda por algo pasan las cosas y por algo me atrasé, bueno nos atrasamos más bien. No pude haber tenido mejores compañeros de clases que ustedes.

A mi apá Agustín, gracias por apoyarme siempre en especial durante todos estos 5 años, no pude haber tenido otro papá mejor.

A mi amá Magui y mi hermana Paola, gracias por apoyarme siempre y también todos estos 5 años con lo mucho o lo poco que podían aportarme. Ese apoyo fue de gran ayuda para lograr este objetivo, gracias.

A mis amigos Mauricio, Lozano, Fat, Serenil, Fede, Piojo, Ángel y Jerry, por aguantar todas mis locuras, soportarme y alentarme todos estos años.

A mis amigas Aler y Stacy, si en estos 5 años tuve algunos momentos de relajó, varios de ellos fueron gracias a ustedes. Gracias por apoyarme y animarme todos estos años.

A Erika por haber estado al principio de este proyecto. También por haber sido mi soporte durante probablemente la época más difícil de mi etapa universitaria, gracias.

CONTENIDO

	Página
Resumen en español	I
Resumen en inglés	III
Dedicatorias	IV
Agradecimientos	V
Contenido	VII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	XIII
Capítulo I.- Introducción	1
I.1.- Antecedentes	2
I.1.1.- Inmovilización de microalgas	3
I.1.2.- Inmovilización de microalgas para la remoción de nutrientes	4
I.1.3.- Consorcios microalgales	4
I.1.4.- Bacterias promotoras de crecimiento	6
Capítulo II.- Hipótesis	8
Capítulo III.- Objetivos	8
III.1.- Objetivo general	8
III.2.- Objetivos específicos	8
Capítulo IV.- Materiales y métodos	9
IV.1.- Microorganismos	9
IV.1.1.- Características de las especies	9
IV.2.- Condiciones de cultivo	10
IV.3.- Ensayo de coexistencia	10
IV.4.-Evaluación del crecimiento y la remoción de nutrientes de <i>S. elongatus</i> coinmovilizada con <i>A. brasilense</i> en alginato	11
IV.5.- Proceso de inmovilización	12
IV.5.1.- Proceso de coinmovilización	12
IV.6.- Medición de las esferas	13
IV.7.- Evaluación del crecimiento	13
IV.7.1- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i>	13
IV.7.1.1- Cuantificación de clorofila <i>a</i>	14
IV.7.2.- Evaluación del crecimiento de <i>A. brasilense</i>	14
IV.8.- Liberación de células al medio	15
IV.9.- Peso seco, de cenizas y orgánico	15
IV.10.- Remoción de nutrientes	15
IV.11.- Medición del pH	16
IV.12.- Tratamiento estadístico de los resultados	16

CONTENIDO (continuación)

V.- Resultados	17
V.1.- Ensayo de coexistencia	17
V.2.- Tamaño de las esferas	18
V.3.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i>	19
V.4.- Cuantificación de clorofila <i>a</i>	21
V.4.1.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i> por concentración de clorofila <i>a</i>	22
V.5.- Evaluación del crecimiento de <i>A. brasilense</i>	23
V.6.- Liberación de células al medio	24
V.7.- Peso seco, de cenizas y orgánico	24
V.8.- Remoción de nutrientes	25
V.9.- Medición del pH	31
Capítulo VI.- Discusión	34
VI.1.- Ensayo de coexistencia	34
VI.2.- Tamaño de las esferas	35
VI.3.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i>	35
VI.3.1.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i> en cultivos libres	35
VI.3.2.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i> con <i>A. brasilense</i> en cocultivos libres	36
VI.3.3.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i> en forma inmovilizada	37
VI.3.4.- Evaluación del crecimiento de <i>S. elongatus</i> coinmovilizada con <i>A. brasilense</i>	38
VI.3.5.- Cuantificación de clorofila <i>a</i>	40
V.4.- Evaluación del crecimiento de <i>A. brasilense</i>	42
V.5.- Liberación de células al medio	43
V.7.- Peso seco, de cenizas y orgánico	43
V.8.- Valores del pH	44
V.9.- Remoción de nutrientes	45
V.9.1.- Fósforo	45
V.9.2.- Nitrógeno	47
V.9.2.1.- Nitratos	47
V.9.2.2.- Nitritos	49
Capítulo VII.- Conclusiones	50
Capítulo VIII.- Recomendaciones	51
Literatura citada	52

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la densidad óptica de cocultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> con <i>Azospirillum brasilense</i> a diferentes proporciones en 5 mL de medio "2f". 4 mL <i>S. elongatus</i> : 1 mL <i>A. brasilense</i> (●), 3 mL <i>S. elongatus</i> : 2 mL <i>A. brasilense</i> (○), 2 mL <i>S. elongatus</i> : 3 mL <i>A. brasilense</i> (▼), 1 mL <i>S. elongatus</i> : 4 mL <i>A. brasilense</i> (Δ). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	17
2	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la densidad óptica de cultivos de <i>Synechococcus elongatus</i> a diferentes proporciones de inóculo en 5 mL de medio "2f". 4 mL <i>S. elongatus</i> (●), 3 mL <i>S. elongatus</i> (○), 2 mL <i>S. elongatus</i> (▼), 1 mL <i>S. elongatus</i> (Δ). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	18
3	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración celular de los cultivos mantenidos en los diferentes tratamientos en medio "2f". Cultivo libre de <i>Synechococcus elongatus</i> (●), cocultivo libre de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> (○), inmovilización de <i>S. elongatus</i> (▼), coinmovilización de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> (Δ). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	20
4	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de clorofila <i>a</i> en los cultivos mantenidos en los diferentes tratamientos en medio "2f". Cultivo libre de <i>Synechococcus elongatus</i> (■), cocultivo libre de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> (■), células de <i>S. elongatus</i> inmovilizadas en alginato (■), células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> coinmovilizadas en alginato (■). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	21
5	Valores promedio de la concentración de clorofila <i>a</i> y la concentración celular de los cultivos libres de <i>Synechococcus elongatus</i> .	22

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
6	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar del crecimiento de <i>Azospirillum brasilense</i> en los diferentes tratamientos en medio "2f". Cultivo libre de <i>A. brasilense</i> (●), cocultivo libre de <i>A. brasilense</i> y <i>Synechococcus elongatus</i> (○), células de <i>A. brasilense</i> y <i>S. elongatus</i> coinmovilizadas en alginato (▼). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	23
7	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la liberación de células hacia el medio de cultivo "2f". Células de <i>Synechococcus elongatus</i> inmovilizadas en alginato (■), células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> coinmovilizadas en alginato (■). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	24
8	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de fosfatos en los tratamientos control. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de fosfatos en los tratamientos control. Medio "2f" (●), esferas de alginato sin células (○). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	26
9	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de fosfatos en los tratamientos con células libres. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de fosfatos en los tratamientos con células libres. Cultivo con células de <i>Synechococcus elongatus</i> libres en el medio (●), cultivo con células de <i>Azospirillum brasilense</i> libres en el medio (○), cocultivo con células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> libres en el medio (▼). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	26
10	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de fosfatos en los tratamientos con células inmovilizadas. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de fosfatos en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de <i>Synechococcus elongatus</i> inmovilizadas en alginato (●), células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> coinmovilizadas en alginato (○). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	27

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
11	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de nitratos en los tratamientos control. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de nitratos en los tratamientos control. Medio "2f" (●), esferas de alginato sin células (○). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	28
12	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de nitratos en los tratamientos con células libres. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de nitratos en los tratamientos con células libres. Cultivo con células de <i>Synechococcus elongatus</i> libres en el medio (●), cultivo con células de <i>Azospirillum brasilense</i> libres en el medio (○), cocultivo con células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> libres en el medio (▼). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	28
13	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de nitratos en los tratamientos con células inmovilizadas. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de nitratos en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de <i>Synechococcus elongatus</i> inmovilizadas en alginato (●), células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> coinmovilizadas en alginato (○). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	29
14	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de nitritos en los tratamientos control. (B) Valores promedio del porcentaje de producción de nitritos en los tratamientos control. Medio "2f" (●), esferas de alginato sin células (○). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	30
15	(A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de nitritos en los tratamientos con células libres. (B) Valores promedio del porcentaje de producción de nitritos en los tratamientos con células libres. Cultivo con células de <i>Synechococcus elongatus</i> libres en el medio (●), cultivo con células de <i>Azospirillum brasilense</i> libres en el medio (○), cocultivo con células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> libres en el medio (▼). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.	30

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
16	(A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitritos en los tratamientos con células inmovilizadas. (B) Valores promedio del porcentaje de producción de nitritos en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de <i>Synechococcus elongatus</i> inmovilizadas en alginato (●), células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> coinmovilizadas en alginato (○). Las barras representan ± 1 error estándar.	31
17	Valores promedio ± 1 error estándar de las mediciones del pH en los tratamientos control. Medio "2f" (■), esferas de alginato sin células (■). Las barras representan ± 1 error estándar.	32
18	Valores promedio ± 1 error estándar de las mediciones del pH en los tratamientos con células libres. Células libres de <i>Synechococcus elongatus</i> (■), células libres de <i>Azospirillum brasilense</i> (■), cocultivo de células libres de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> (■). Las barras representan ± 1 error estándar.	32
19	Valores promedio ± 1 error de las mediciones del pH en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de <i>Synechococcus elongatus</i> inmovilizadas en alginato (■), células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> coinmovilizadas en alginato (■). Las barras representan ± 1 error estándar.	33

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Algunos ejemplos de los efectos adversos de la eutrofización (Smith, 2003).	2
II	Remoción de nutrientes por microalgas inmovilizadas (Modificada de: de-Bashan y Bashan, 2010).	5
III	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar del diámetro, área y volumen de las esferas elaboradas para los diferentes tratamientos. A: esferas de alginato sin células, I: esferas de alginato con <i>Synechococcus elongatus</i> y CI: esferas de alginato con <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> .	19
IV	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración celular inicial, concentración celular final y tasa de crecimiento (μ) para los diferentes tratamientos. SL: células de <i>Synechococcus elongatus</i> libres en el medio, CCL: células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> libres en el medio, I: células de <i>S. elongatus</i> inmovilizadas en alginato y CI: células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, en donde $a > b > c$.	20
V	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de clorofila <i>a</i> inicial y la concentración de clorofila <i>a</i> final, de los diferentes tratamientos. SL: células de <i>Synechococcus elongatus</i> libres en el medio, CCL: células de <i>S. elongatus</i> y <i>Azospirillum brasilense</i> libres en el medio, I: células de <i>S. elongatus</i> inmovilizadas en alginato y CI: células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, en donde $a > b > c$.	22

LISTA DE TABLAS (continuación)

Tabla		Página
VI	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración inicial, la concentración máxima y la concentración final, de los diferentes tratamientos con <i>Azospirillum brasilense</i> . AL: células de <i>A. brasilense</i> libres en el medio, CCL: células de <i>Synechococcus elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> libres en el medio y CI: células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, en donde $a > b$.	23
VII	Valores promedio $\pm$ 1 error estándar del peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico, de los diferentes tratamientos al final del experimento. A: esferas de alginato sin células, SL: células de <i>Synechococcus elongatus</i> libres en el medio, AL: células de <i>Azospirillum brasilense</i> libres en el medio, CCL: células libres de <i>S. elongatus</i> con <i>A. brasilense</i> libres en el medio, I: células de <i>S. elongatus</i> inmovilizadas en alginato, CI: células de <i>S. elongatus</i> y <i>A. brasilense</i> coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, en donde $a > b$.	25

Capítulo I

Introducción

Las aguas dulces del mundo constituyen un recurso escaso, amenazado y en peligro, debido a su contaminación. La contaminación del agua, se produce a través de la introducción directa o indirecta de sustancias sólidas, líquidas, gaseosas así como de energía calórica, entre otras (Tarazona, 2014). De acuerdo con los estudios sobre los balances hídricos del planeta solamente el 0.007% de las aguas dulces se encuentran realmente disponibles para uso humano. Este vital recurso se encuentra amenazado por la degradación de su calidad debido a la actividad antropogénica (Toledo, 2002). Una de las consecuencias de la actividad antropogénica a nivel mundial es la eutrofización, esta es causada debido al alto contenido de nutrientes que entran a los ecosistemas acuáticos. El nitrógeno y el fósforo provenientes de las aguas residuales urbanas e industriales de las ciudades, detritos orgánicos y de los lixiviados de fertilizantes, estimula el crecimiento excesivo de fitoplancton y organismos fitobentónicos, particularmente en ecosistemas acuáticos poco profundos y cerrados tales como lagos y lagunas. La degradación de los recursos acuáticos debido a la eutrofización puede resultar en la pérdida de los beneficios y servicios que estos recursos proveen (Postel y Carpenter, 1997). Además, la eutrofización tanto de los cuerpos de agua dulce así como de los sistemas marinos costeros causa una amplia gama de efectos adversos que están relacionados de manera directa o indirecta con el crecimiento excesivo de fitoplancton y organismos fitobentónicos (Tabla I). La eutrofización causa diversos efectos para los ecosistemas acuáticos y a los seres humanos, por lo tanto la restricción de esta sobrecarga de nutrientes es clave para el control de la eutrofización (Karydis y Kitsiou, 2012; Han *et al.*, 2013). Una de las alternativas para la depuración de aguas residuales es utilizar vegetales, bacterias y fitoplancton para la remoción de nutrientes y otros contaminantes *v. gr.* metales pesados. Por sus características fisiológicas el fitoplancton ofrece la ventaja de una alta eficiencia en la remoción de compuestos para el tratamiento de aguas residuales. Simultáneamente a la remoción de nutrientes con fitoplancton se tiene la producción de biomasa, que puede ser utilizada como aditivo de alimentos para el consumo animal, como materia prima para energías alternas *v. gr.* biogás o biodiesel, en la agricultura como fertilizante y para obtener productos de valor comercial *v. gr.* pigmentos, antioxidantes y polisacáridos (Mallick, 2002).

Tabla I.- Algunos ejemplos de los efectos adversos de la eutrofización (Smith, 2003).

Incremento de la biomasa de fitoplancton
Incremento de la población de especies que pueden ser tóxicas o que no pueden ser consumidas por los herbívoros acuáticos
Reducción en la producción de peces y mariscos deseables
Afectación en la salud y el tamaño de las poblaciones de coral marino
Amenazas a especies acuáticas en peligro de extinción
Reducción en la transparencia de la columna de agua
Problemas de filtración, olor y sabor en los suministros de agua para beber
El agotamiento del oxígeno en aguas profundas
Impactos económicos negativos, reducción del valor y reducción de sus usos recreativos

Estos sistemas de biodepuración con microalgas tienen varias desventajas como son el alto costo de la remoción de la biomasa del agua tratada al final del proceso, además de que estos sistemas requieren grandes extensiones de cultivo con poca profundidad (Oswald, 1988; Mallick, 2002).

Una eficiente alternativa para el control de la eutrofización es el uso de sistemas de biodepuración por medio de la inmovilización de microalgas (*s. ampl.* incluyendo a microorganismos procariontes fotosintéticos como las cianobacterias) en diferentes tipos de matrices. Esto facilita la recuperación de la biomasa, provee una gran flexibilidad operacional, mantiene el alto valor de la biomasa para su futuro procesamiento y elimina el uso de grandes extensiones de cultivo (Mallick y Rai, 1993; de la Noüe y de Pauw, 1988). Los sistemas con microalgas inmovilizadas protegen a la biomasa de ser eliminada al ser consumida por herbívoros y permite mantener cultivos con altas densidades de células (Chevalier y de la Noüe, 1985a). Además del tratamiento de las aguas residuales, estos sistemas de biodepuración con células de microalgas inmovilizadas tienen varias aplicaciones entre las cuales están la remoción de metales, como suministro para el mantenimiento de cultivos y para la elaboración de productos químicos útiles para la industria (Cohen, 2001; Robison *et al.*, 1986).

I.1.- Antecedentes

La inmovilización de microalgas para el tratamiento de aguas de desecho se ha desarrollado desde hace más de dos décadas, sin embargo, se han investigado nuevas estrategias para aumentar el crecimiento de las células inmovilizadas así como su capacidad de remoción de contaminantes *v. gr.* la coinmovilización de dos microorganismos. También es imprescindible mejorar las técnicas de inmovilización para dar mayor soporte a la matriz de las cápsulas y aumentar el

tiempo de confinamiento de las células dentro de la matriz. A continuación se describen algunos estudios de inmovilización aplicados a la remoción de nutrientes de aguas residuales (de-Bashan y Bashan, 2010; Pires *et al.*, 2013).

I.1.1.- Inmovilización de microalgas

Los materiales que han sido más utilizados como matrices para inmovilizar células son polímeros sintéticos *v. gr.* poliuretano y poliestireno, así como polímeros naturales *v. gr.* carragenina, alginato, agar y quitosano (Mallick, 2002). Los principales requisitos que deben de cumplir este tipo de matrices para la inmovilización de células vivas vegetales, es que sean capaces de mantener la viabilidad y el crecimiento de los organismos que serán confinados (Becker, 1994). Además que no sean tóxicos, ser fototransparentes, estables en el medio de cultivo, con eficiente retención de la biomasa y resistencia al crecimiento de la biomasa confinada (Mallick, 2002). El uso de diferentes técnicas para inmovilizar microalgas y cianobacterias ha recibido atención considerable en décadas recientes (Mallick, 2002; de-Bashan y Bashan, 2010). Estas técnicas se pueden dividir en dos grupos, las pasivas y las activas. Las técnicas pasivas utilizan la tendencia natural de los microorganismos a adherirse a superficies ya sean estas naturales o artificiales. Las técnicas activas se llevan a cabo de manera artificial, utilizando agentes floculantes, el acoplamiento químico o el atrapamiento en gel, esta última es la técnica más utilizada (Moreno-Garrido, 2008). Los polímeros más utilizados para la inmovilización de células vivas son la carragenina y el alginato (Cohen, 2001). La carragenina es costosa económicamente y las temperaturas necesarias para realizar el proceso de inmovilización van de 30 °C a 50 °C, las cuales pueden ser muy altas para que sigan vivas algunas especies de microorganismos (Vorlop y Klein, 1987). El alginato es menos costoso económicamente y es la matriz más popular para la inmovilización de microalgas con el propósito de tratar aguas residuales (Lau *et al.*, 1998). El alginato está compuesto por copolímeros lineales constituidos por dos tipos de monómeros unidos en (1-4), el ácido β -D manurónico y el ácido α -L gulurónico en diferentes proporciones y secuencias, en función del organismo y tejido del que fue aislado (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990). Una de las ventajas de utilizar alginato como matriz de inmovilización es que las células inmovilizadas no pasan por cambios fisicoquímicos extremos durante el proceso de inmovilización. Además la preparación de las esferas de alginato es sencilla, barata, rápida y es más accesible que otros métodos (Romo y Pérez-Martínez, 1997). La gelificación ocurre cuando las sales monovalentes de este polisacárido (generalmente sodio) entran en contacto con una solución que contiene cationes monovalentes, el más utilizado es el Ca^{2+} (Moreno-Garrido, 2008).

I.1.2.- Inmovilización de microalgas para la remoción de nutrientes

Este campo de investigación comenzó hace casi treinta años (Mallick, 2002), cuando de la Noüe y sus colaboradores en Canadá, introdujeron el concepto de la utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes como parte del tratamiento de aguas residuales (Chevalier y de la Noüe, 1985b). Existen estudios que demuestran la capacidad para remover nutrientes por microalgas y cianobacterias inmovilizadas (Tabla II) y su potencial para ser utilizadas como parte del tratamiento terciario para aguas residuales (de-Bashan y Bashan, 2010).

La cianobacteria *Synechococcus* sp. ha sido estudiada ampliamente y ha mostrado tener un gran potencial para su uso en la acuicultura y la biotecnología, debido a sus características fisiológicas y su composición bioquímica. *Synechococcus* no es tóxica, puede remover varios compuestos químicos *v. gr.* metales pesados, fósforo y nitrógeno, es termotolerante y produce hidrógeno y glutamato (Ikeya *et al.*, 1997; Matsunaga *et al.*, 1988; Sasikala y Ramana, 1994; Wyman y Bird, 2007). Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) evaluaron el crecimiento de *Synechococcus elongatus* y la remoción de nitratos y fosfatos en células libres e inmovilizadas en quitosano. Encontraron que *S. elongatus* inmovilizada en esferas de quitosano puede remover nitratos y fosfatos, y que la tasa de crecimiento de las células inmovilizadas fue similar a la de los cultivos de células libres.

I.1.3.- Consorcios microalgales

También son importantes las interacciones entre especies de microalgas, en la cual dos o más especies pueden ocupar el mismo nicho ecológico puesto que el hábitat es heterogéneo por las fluctuaciones temporales y espaciales que ocurren en el medio ambiente, pudiendo de esta manera coexistir las especies de microalgas en equilibrio ya que cada una se ve limitada por diferentes recursos (Jiménez-Valera, 2008). Esta coexistencia entre microalgas sucede tanto en cultivos como en el medio natural. Tilman (1977) realizó cultivos de dos especies de diatomeas, *Asterionella formosa* y *Cyclotella meneghiniana*, en sistemas semicontinuos a diferentes proporciones de silicatos y diferentes concentraciones de fosfatos. Encontró que *Asterionella formosa* es competitivamente dominante cuando ambas especies estuvieron limitadas por fosfatos, así como que *Cyclotella meneghiniana* fue la dominante cuando los silicatos estuvieron limitados y que ambas especies coexistieron de manera estable cuando la tasa de crecimiento de cada especie estuvo limitada por un recurso diferente.

Tabla II.- Remoción de nutrientes por microalgas inmovilizadas (Modificada de: de-Bashan y Bashan, 2010).

Contaminante	Material de inmovilización	Especie de microalga	Referencia
Nitrógeno	Alginato	<i>Anabea</i> sp., <i>A. doliolum</i> , <i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Isochrysis galbana</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>	Chen (2003), de-Bashan <i>et al.</i> (2004), Jeanfils <i>et al.</i> (1993), Jeanfils y Thomas (1986), Lee <i>et al.</i> (1995), Mallick y Rai (1993) y Vilchez y Vega (1994)
Fósforo	Alginato	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. emersonii</i>	Hernández (2009), Robinson (1995), y Robinson <i>et al.</i> (1988)
Nitrógeno y fósforo	Alginato	<i>A. doliolum</i> , <i>C. reinhardtii</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. sorokiniana</i> , <i>C. kessleri</i> , <i>C. emersonii</i> , <i>Chlorosarcinopsis</i> sp., <i>Dunaliella salina</i> , <i>Euglena</i> sp., <i>Machrochloris</i> sp., <i>Nannochloris</i> sp., <i>Palmellopsis gelatinosas</i> , <i>Scenedesmus bijugatus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. quadricuada</i> , <i>S. bicellularis</i> , <i>Selenastrum carpicornutum</i>	de-Bashan <i>et al.</i> (2004), Faafeng <i>et al.</i> (1994), Garbayo <i>et al.</i> (1996), Jiménez-Pérez <i>et al.</i> (2004), Kaya y Picard (1995), Lau <i>et al.</i> (1997), Mallick y Rai (1993), Megharaj <i>et al.</i> (1992), Tam <i>et al.</i> (1994), Thakur y Kumar (1999), Travieso <i>et al.</i> (1992, 1996) y Zhang <i>et al.</i> (2008)
	Carragenina	<i>A. doliolum</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>C. kessleri</i> , <i>S. obliquus</i> , <i>S. quadricuada</i> , <i>S. acutus</i> , <i>Spirulina maxima</i>	Cañizares <i>et al.</i> (1994), Chevalier y de la Noüe (1985a,b), Lau <i>et al.</i> (1997), Mallick y Rai (1994) y Travieso <i>et al.</i> (1996)
	Quitosano	<i>A. doliolum</i> , <i>C. vulgaris</i> , <i>Phormidium</i> sp. <i>S. obliquus</i> , <i>S. bicellularis</i> , <i>Scenedesmus</i> sp. <i>Synechococcus elongatus</i>	Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009), de la Noüe y Proulx (1988), Fierro <i>et al.</i> (2008), Kaya y Picard (1996) y Mallick y Rai (1994)

Jiménez-Valera (2008) evaluó la remoción de distintas formas químicas de nitrógeno y fósforo, utilizando cultivos coinmovilizados en esferas de quitosano para ocho especies de microalgas y cianobacterias dulceacuícolas. Concluyó que es posible mantener cocultivos de las cepas *Synechococcus elongatus* y

Scenedesmus obliquus, así como las cepas de *Synechococcus elongatus* y *Chlorella vulgaris* en forma libre y coinmovilizadas en quitosano.

En la naturaleza la mayoría de las microalgas y cianobacterias se encuentran en asociación con microorganismos aerobios y anaerobios (Subashchandrabose *et al.*, 2011). Se han realizado diversas investigaciones tanto en laboratorio como en *in situ* que han demostrado procesos de estímulo e inhibición de crecimiento en microalgas y/o bacterias (Cole, 1982). Por ejemplo, las cianobacterias liberan una variedad de moléculas orgánicas, las cuales incluyen compuestos de bajo peso molecular y sustancias poliméricas extracelulares compuestas de proteínas, lípidos y ácidos nucleídos, que sirven a las bacterias como sustratos para su crecimiento (Subashchandrabose *et al.*, 2011). También el oxígeno producido por las microalgas, debido a la fotosíntesis, es utilizado por las bacterias como aceptor de electrones para poder degradar la materia orgánica. A su vez, el dióxido de carbono producido por la mineralización bacteriana es utilizado por las microalgas, completando así el ciclo fotosintético. Además, las bacterias producen vitaminas, azúcares, acetato y glicerol que estimulan el crecimiento microalgal (Subashchandrabose *et al.*, 2011). Existe un efecto antagonista entre ciertas especies de bacterias y fitoplancton en el cual algunos componentes de las comunidades bacterianas son capaces de lisar células microalgales (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003).

I.1.4.- Bacterias promotoras de crecimiento

Muchas bacterias asociativas son consideradas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) debido a su capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos, como el aporte de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (Boonjawat *et al.*, 1991; Döbereiner *et al.*, 1995; Elmerich *et al.*, 1992), producción de sustancias reguladoras del crecimiento (Arshad y Frankenberger 1998), solubilización de minerales y nutrientes (Crowley *et al.*, 1991), incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer *et al.*, 1991), inhibición del crecimiento de organismos antagónicos (Utkhede *et al.*, 1999) e interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo (Bashan *et al.*, 1996). Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal han sido utilizadas en la agricultura en experimentos como inoculantes para el control de fitopatógenos y para promover el crecimiento vegetal (Bashan, 1998). Los microorganismos más estudiados pertenecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y

Bacillus (Loredo-Osti, 2004). Las bacterias del género *Azospirillum* son bien conocidas como BPCV para un gran número de cultivos (Bashan y Holguin, 1997).

Recientemente se encontró que una cepa de la especie *Azospirillum brasilense* es capaz de promover parámetros de crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* (González y Bashan, 2000). Lebsky *et al.* (2001) evaluaron la interacción entre la especie de microalga *Chlorella vulgaris* en esferas de alginato con las especies de bacterias *Phyllobacterium myrsinacearum* y con *Azospirillum brasilense* que es promotora del crecimiento vegetal. Observaron que en el transcurso del tiempo las bacterias afectan el crecimiento del cultivo de la microalga, ya sea inhibiendo su crecimiento o con su reproducción. de-Bashan *et al.* (2004) coinmovilizaron, en esferas de alginato, a la bacteria *Azospirillum brasiliense* junto con *Chlorella vulgaris* o con *C. sorokiniana* para utilizarlas en la remoción de nitrógeno y fósforo presentes en aguas residuales domésticas. La coinmovilización de esta especie de bacteria con las microalgas resultó en un incremento significativo en el crecimiento de ambas especies de microalgas, así como en un 100% de remoción de amonio, un 94% de nitrato, y un 92% de fósforo en 6 días, comparado con un 75% de remoción de amonio, 84% de nitrato y 89% de fósforo cuando sólo inmovilizaron a las microalgas sin la adición de bacterias. Concluyeron que la coinmovilización puede usarse para el tratamiento de aguas residuales. Por lo tanto se puede considerar a *Azospirillum brasilense* como una bacteria promotora de crecimiento microalgal.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar la viabilidad para el crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes de *Synechococcus elongatus* coinmovilizada con *Azospirillum brasilense* en alginato. Por lo tanto este estudio es el primero en reportar la deliberada inoculación de *S. elongatus* con la bacteria terrestre promotora de crecimiento *A. brasilense*.

Capítulo II

Hipótesis

Las esferas que contengan las cianobacterias coinmovilizadas con las bacterias promotoras de crecimiento, tendrán un mayor crecimiento cianobacterial y removerán con mayor eficiencia compuestos de nitrógeno y fósforo del medio con respecto a las células libres en el medio.

Capítulo III

Objetivos

III.1.- Objetivo general

Evaluar la viabilidad para el crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* coinmovilizada con la bacteria *Azospirillum brasilense* en alginato.

III.1.- Objetivos específicos

- Evaluar la coexistencia de *Synechococcus elongatus* y *Azospirillum brasilense* cuando son coinmovilizadas en esferas de alginato.
- Evaluar el incremento en la capacidad de remoción de distintas formas químicas de nitrógeno y fósforo de *Synechococcus elongatus* coinmovilizada con *Azospirillum brasilense* en esferas de alginato.
- Evaluar el efecto en el crecimiento de *Synechococcus elongatus* por parte de *Azospirillum brasilense* cuando son coinmovilizadas en esferas de alginato.

Capítulo IV

Materiales y métodos

IV.1.- Microorganismos

Se utilizó la cianobacteria *Synechococcus elongatus* (SYX1), la cual fue obtenida de la colección del Laboratorio de Biología y Cultivo de Microalgas del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada.

La bacteria promotora de crecimiento *Azospirillum brasilense* (CDBB-B-1229) fue obtenida de la colección de microorganismos del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

IV.1.1.- Características de las especies

Synechococcus elongatus es una cianobacteria de forma esférica, con un tamaño promedio de 2.7 micrómetros. Además, forma cadenas de hasta 6 células según la fase de crecimiento. *Synechococcus elongatus* fue aislada de una granja de cultivo de camarón en Nayarit, México (Aguilar-May, 2006). Es una de las especies de fitoplancton ampliamente tolerante a variaciones en las condiciones ambientales, con alta tasa de crecimiento y alta capacidad de remoción de compuestos de nitrógeno, fósforo y metales pesados (Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2009; Valle-Ramírez de Arellano, 2007). *S. elongatus* es un componente dominante del picoplancton fotosintético en aguas eutróficas así como en oligotróficas, donde *S. elongatus* contribuye a la fijación del carbono (Waterbury *et al.*, 1986; Scalan, 2003).

Azospirillum brasilense es una bacteria promotora de crecimiento vegetal de las más estudiadas hasta el momento (Bashan y de-Bashan, 2005). Es una bacteria de la rizosfera, fijadora de nitrógeno, muy versátil en su transformación de nitrógeno. Además de fijar nitrógeno en condiciones microaeróbicas, también desnitrifica bajo condiciones anaeróbicas o microaerofílicas, puede asimilar NH_4 , NO_3 o NO_2 (Hartman y Zimmer, 1994).

IV.2.- Condiciones de cultivo

Los cultivos de la cianobacteria *S. elongatus* fueron monoespecíficos y no axénicos, desarrollados en matraces Erlenmeyer de 1 L con medio "f" (Guillard y Ryther, 1962). El medio se preparó con agua potable y fue esterilizado a 121 °C, 1.05 kg/cm² por 20 minutos, los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 20 ± 1 °C con luz continua a una intensidad de 100 µE/m²/s, proporcionada por lámparas de luz blanca fría.

Los cultivos de la bacteria *Azospirillum brasilense* se desarrollaron en matraces Erlenmeyer de 1 L con medio manitol líquido (Asai *et al.*, 1964). El medio fue esterilizado a 121 °C, 1.05 kg/cm² por 20 minutos y los cultivos se mantuvieron a una temperatura de 25 ± 2 °C.

IV.3.- Ensayo de coexistencia

Se realizaron cultivos mixtos de los dos microorganismos seleccionados. Estos experimentos se utilizaron para evidenciar las relaciones alelopáticas entre las especies y poder determinar qué proporción de los dos microorganismos es la más idónea para el crecimiento de *S. elongatus*.

Los cocultivos se realizaron con diferentes proporciones de inóculo de cada microorganismo, generando un gradiente de concentraciones. Se realizaron cuatro cocultivos a diferentes proporciones de inóculo.

1. El primer cocultivo contenía 4 mL de *S. elongatus* y 1 mL de *A. brasilense*.
2. El segundo cocultivo contenía 3 mL de *S. elongatus* y 2 mL de *A. brasilense*.
3. El tercer cocultivo contenía 2 mL de *S. elongatus* y 3 mL de *A. brasilense*.
4. El cuarto cocultivo contenía 4 mL de *S. elongatus* y 1 mL de *A. brasilense*.

Los cocultivos se mantuvieron por triplicado en tubos con tapa roscada con 5 mL de medio "f" y bajo las mismas condiciones de luz y de temperatura como lo descrito en la sección IV.2. Al mismo tiempo se realizaron cultivos monoespecíficos con las mismas concentraciones de *S. elongatus* que en los cocultivos, con el fin de utilizarlos como tratamientos control. Estos controles se mantuvieron bajo las mismas condiciones descritas para los cocultivos.

Diariamente se evaluó el crecimiento durante seis días, mediante la medición de la densidad óptica a una longitud de onda de 680 nm utilizando un espectrofotómetro (HACH modelo DR/4000 UV-VIS).

IV.4.-Evaluación del crecimiento y la remoción de nutrientes de *S. elongatus* coinmovilizada con *A. brasilense* en alginato

Se utilizaron como controles experimentales dos tratamientos por duplicado y como tratamientos experimentales cinco tratamientos realizados por triplicado.

Los dos tratamientos utilizados como controles experimentales consistieron en:

1. El medio de cultivo sin células, el cual se utilizó como control de las transformaciones químicas de los nutrientes.
2. El medio de cultivo sin células y con esferas de alginato sin células, el cual se utilizó como control de las transformaciones químicas de los nutrientes y de las esferas de alginato.

Los cinco tratamientos experimentales consistieron en:

1. El medio de cultivo y células libres de *S. elongatus*. Con este tratamiento se evaluó la eficiencia de la remoción de nutrientes y el crecimiento del cultivo monoespecífico.
2. El medio de cultivo y células libres de *A. brasilense*. Con este tratamiento se evaluó la viabilidad del crecimiento de esta bacteria en el medio "f" y la eficiencia en la remoción de nutrientes.
3. El medio de cultivo y los cocultivos de células libres de *S. elongatus* y *A. brasilense*. Con este tratamiento se evaluó la eficiencia de la remoción de nutrientes por las células de la cianobacteria y la bacteria.
4. El medio de cultivo con esferas de alginato que contenían células inmovilizadas de *S. elongatus*. Con este tratamiento se evaluó el crecimiento y la eficiencia de remoción de nutrientes de las células de *S. elongatus* y del alginato.
5. El medio de cultivo con esferas de alginato que contenían células coinmovilizadas de *S. elongatus* y *A. brasilense*. Con este tratamiento se evaluó el efecto de la coinmovilización en el crecimiento de *S. elongatus* y la eficiencia de remoción de nutrientes de las células de la cianobacteria, la bacteria y del alginato.

Todos los tratamientos antes mencionados se mantuvieron en matraces Erlenmeyer de 1 L con 400 mL de un medio de agua residual artificial llamado "2f". El medio "2f" fue diseñado para simular las concentraciones de nitrógeno y fósforo en aguas de desecho (Aguilar-May y Sánchez-Saavedra, 2009). El medio "2f" se preparó con agua de uso potable y se esterilizó como fue descrito en la sección IV.2. En los tratamientos en los que se adicionaron esferas con células

coinmovilizadas, células inmovilizadas y esferas de alginato sin células, para cada experimento se adicionaron 800 esferas. Para los tratamientos con células libres (cultivos monoespecíficos y cultivos mixtos), se adicionó una cantidad equivalente de inóculo al utilizado para los cultivos con células inmovilizadas y coinmovilizadas. Todos los ensayos se realizaron bajo las condiciones de mantenimiento de los cultivos descritas en la sección IV.2.

IV.5.- Proceso de inmovilización

Para la inmovilización de células de *S. elongatus* se siguió el procedimiento estándar de inmovilización con alginato descrito por Smidsrød y Skjåk-Bræk (1990), utilizando alginato de sodio al 4% (peso/volumen).

Se concentró, un volumen de 50 mL del cultivo de *S. elongatus* en fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a 4000 rpm por 25 minutos y a 20 °C. Se utilizó una proporción de 20 mL de alginato al 4% y 100 µL de cultivo concentrado de células de *S. elongatus*. La mezcla de alginato con células se colocó en una bureta de 25 mL y en el extremo inferior de la bureta se colocó una punta desechable para micropipeta de 200 µL. La elaboración de las esferas se obtuvo a partir del goteo de la mezcla de alginato con células en un vaso de precipitado con una solución de cloruro de calcio al 2% (peso/volumen). Estas gotas se dejaron durante 30 minutos en agitación constante, a 200 rpm para la formación de las esferas (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990). Después de este tiempo las esferas elaboradas fueron enjuagadas con agua destilada estéril durante 10 minutos para eliminar los residuos de la solución de cloruro de calcio.

Las esferas elaboradas con las células inmovilizadas en alginato se mantuvieron en dos litros de medio de cultivo "f/2" por un periodo de al menos 12 horas, a 20 °C y 100 µE/m²/s, para disminuir el estrés de las células por efecto del proceso de inmovilización.

IV.5.1.- Proceso coinmovilización

Con los resultados que se obtuvieron de la caracterización del crecimiento de los cultivos mixtos, se seleccionó la proporción en la cual las dos especies pudieron coexistir exitosamente y la que obtuvo el mayor crecimiento. Para la coinmovilización se utilizó el procedimiento estándar de inmovilización con alginato como ya se describió en la sección anterior (IV.5) y tomando en consideración los resultados obtenidos en el ensayo de coexistencia.

Se concentró un volumen de 50 ml del cultivo de *S. elongatus*, en fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a 4000 rpm por 25 minutos y a 20

°C. De este cultivo concentrado se tomaron 100 µL y se mezclaron con 20 mL de alginato al 4% (peso/volumen). A su vez, se concentró un volumen de 35 mL del cultivo de *A. brasilense* en fase exponencial de crecimiento, por centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos y a 20 °C. Se tomaron 66 µL de este cultivo concentrado y se mezclaron con los 20 mL de alginato al 4% que ya contenían las células de *S. elongatus*. Esta nueva mezcla se colocó en una bureta de 25 mL con una punta desechable para micropipeta de 200 µL en el extremo inferior y se dejó gotear dentro de un vaso de precipitado con una solución de cloruro de calcio al 2% (peso/volumen). Estas gotas se dejaron 30 minutos en agitación constante, a 200 rpm para la formación de las esferas (de-Bashan *et al.*, 2004). Después de este tiempo, las esferas elaboradas fueron enjuagadas con agua destilada estéril durante 10 minutos para eliminar los residuos de la solución de cloruro de calcio.

Las esferas elaboradas con las células coinmovilizadas en alginato se mantuvieron en dos litros de medio de cultivo "f/2" por un periodo de al menos 12 horas, a 20 °C y 100 µE/m²/s, para disminuir el estrés de las células por efecto del proceso de inmovilización.

IV.6.-Medición de las esferas

Para medir las esferas de alginato se utilizó un microscopio estereoscópico OLYMPUS SZ61 con una rejilla de calibración y se midió el diámetro promedio de 3 esferas de cada tratamiento. Estas mediciones se utilizaron para calcular el área y volumen de las esferas. Para la toma de las imágenes al microscopio se utilizó una cámara Olympus Camedia C-5060.

IV.7.-Evaluación del crecimiento

IV.7.1-Evaluación del crecimiento de *S. elongatus*

El crecimiento en la densidad celular de *S. elongatus* se evaluó diariamente desde el inicio del cultivo (día 0) hasta el día 7, para esto se colectaron dos esferas por cada condición experimental. Para solubilizar las esferas colectadas se utilizó 1 mL de una solución de fosfato de sodio 0.5 M por cada 2 esferas, las cuales se dejaron en esta solución durante 30 minutos, según lo descrito por Pérez-Coutiño (2011). Adicionalmente, se utilizó una micropipeta para agitar la mezcla y ayudar a solubilizar las esferas. Completado este procedimiento de solubilización, se agregó una gota de Lugol como fijador para el conteo celular. Para los cultivos con células libres se tomó 1 mL de muestra y se preservó con una gota de Lugol. Los conteos de células libres e inmovilizadas se realizaron con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX-31). Con estos

conteos se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) descrita por Fogg y Thake (1987), utilizando la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\log_2 N_2 - \log_2 N_1}{t_2 - t_1}$$

En donde:

μ = tasa de crecimiento específica

$\log_2$ = logaritmo base dos

N_1 = número de células en el t_1

N_2 = número de células en el t_2

t_1 = tiempo inicial

t_2 = tiempo final

IV.7.1.1.- Cuantificación de clorofila a

Como medida indirecta de la evaluación del incremento en la biomasa de los cultivos de cada condición experimental, diariamente se evaluó el contenido de clorofila a mediante la técnica descrita por Parsons *et al.* (1984). Para ello, se filtró 1 mL de los cultivos con células libres y para las células inmovilizadas se tomaron 2 esferas. Estas muestras fueron colocadas en viales color ámbar para evitar la entrada de luz y degradación de los pigmentos. Para la extracción de los pigmentos se agregó 1 mL de acetona al 90% a cada vial, se taparon y se refrigeraron durante 24 horas. Después de este tiempo se midió la absorción por un barrido de 400 nm a 750 nm con un espectrofotómetro (HACH modelo DR/4000 UV-VIS).

IV.7.2- Evaluación del crecimiento de *A. brasilense*

Para evaluar el número de bacterias promotoras de crecimiento presentes en los diferentes tratamientos, para los cultivos con células en forma libre se tomó 1 mL de cultivo y para los tratamientos con células coinmovilizadas se tomaron dos esferas. Para solubilizar las esferas colectadas, se utilizó una solución de fosfato de sodio 0.5 M según lo descrito en la sección IV.7.1. Después se realizaron diluciones seriadas en solución salina hasta 10^{-5} y posteriormente se tomó 0.1 mL de estas diluciones, los cuales fueron sembrados en cajas Petri que contenían 20 mL de medio manitol. Las cajas con cultivo se incubaron a 25 °C durante 40 horas y se realizó el conteo de las colonias que crecieron durante el periodo de

incubación, las cuales se expresaron en unidades formadoras de colonia presentes en 1 mL (UFC/mL).

IV.8.- Liberación de células al medio

Para los tratamientos de inmovilización y coinmovilización, cada dos días desde el día 0 hasta el día 8, se colectó una muestra de 1 mL del medio de cultivo, se observó al microscopio y se cuantificó la cantidad de células de *S. elongatus* liberadas al medio por medio de conteos directos con un hematocitómetro de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Olympus CX-31).

IV.9.- Peso seco, de cenizas y orgánico

La estimación gravimétrica del peso seco microalgal, es uno de los métodos más directos para determinar la producción de biomasa. Por ello, al final del experimento se evaluaron, el peso orgánico, el peso seco y el peso de las cenizas para cada tratamiento según la técnica descrita por Sorokin (1973). Para las células inmovilizadas, se tomaron 10 esferas y se colocaron sobre filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C de 1 μ m de abertura de poro y de 47 mm de diámetro. Para el caso de células libres se tomó una alícuota de 10 mL del medio de cultivo y se filtraron con la ayuda de una bomba de vacío, en filtros de fibra de vidrio GF/C de 1 μ m de abertura de poro y de 47 mm de diámetro.

Las muestras se mantuvieron en una estufa a 60 °C hasta obtener valores de peso constante. Para cuantificar el contenido de cenizas las muestras fueron incineradas en una mufla a 470 °C por 4 horas, posterior a esto, se pesaron las muestras hasta obtener valores de peso constante. El peso orgánico se obtuvo por diferencia entre el peso seco y el peso de cenizas.

IV.10.- Remoción de nutrientes

La remoción de nutrientes se evaluó diariamente desde el inicio del cultivo (día 0) hasta el día 7. Para los tratamientos con células libres se colectaron 3 mL de los cultivos y se filtraron para eliminar la biomasa microalgal. Para los tratamientos con células inmovilizadas se colectaron 3 mL del medio de cultivo. Los nitratos se analizaron por el método de espectroscopia ultravioleta, los nitritos por el método de diazotización y los fosfatos por el método de ácido ascórbico. La cuantificación de nutrientes se realizó mediante la técnica en microplaca, en la que se utilizó un espectrofotómetro de microplacas (EPOCH Biotek).

IV.11.- Medición del pH

De la muestra de agua colectada para cada tratamiento, diariamente se midió el pH del medio de los tratamientos con un potenciómetro portátil (HANNA HI 1208).

IV.12.- Tratamiento estadístico de los resultados

Para evaluar las diferencias en el crecimiento de *S. elongatus* en los diferentes tratamientos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con los valores de la tasa de crecimiento máxima (μ_{max}). Este mismo análisis estadístico se aplicó para evaluar las posibles diferencias entre tratamientos en la capacidad de remoción de nutrientes, el crecimiento de *A. brasilense*, el contenido de pigmentos y de peso seco orgánico. Para evaluar las diferencias en la liberación celular debido a la coinmovilización se realizó una prueba t-Student.

Cuando se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba *a posteriori* de Tukey, con la que se estableció las diferencias entre los tratamientos. Para todos los análisis estadísticos se tomaron en consideración las hipótesis que fundamentan estas pruebas, que son la normalidad y la homogeneidad de varianzas (Sokal y Rohlf, 1979; Zar, 1984). Para realizar estas pruebas se utilizó el software STATISTICA® versión 7.0 (Stat Soft Inc., 2004) y se consideró un nivel de significancia de 0.05.

Capítulo V

Resultados

V.1.- Ensayo de coexistencia

En las curvas de crecimiento evaluadas por densidad óptica se observó una fase exponencial de 4 días, así como un crecimiento significativamente mayor en el cocultivo con la proporción 3 mL de *S. elongatus* : 2 mL de *A. brasilense* con respecto a los otros cocultivos ($F=40.681$, $P=0.001$) (Figura 1).

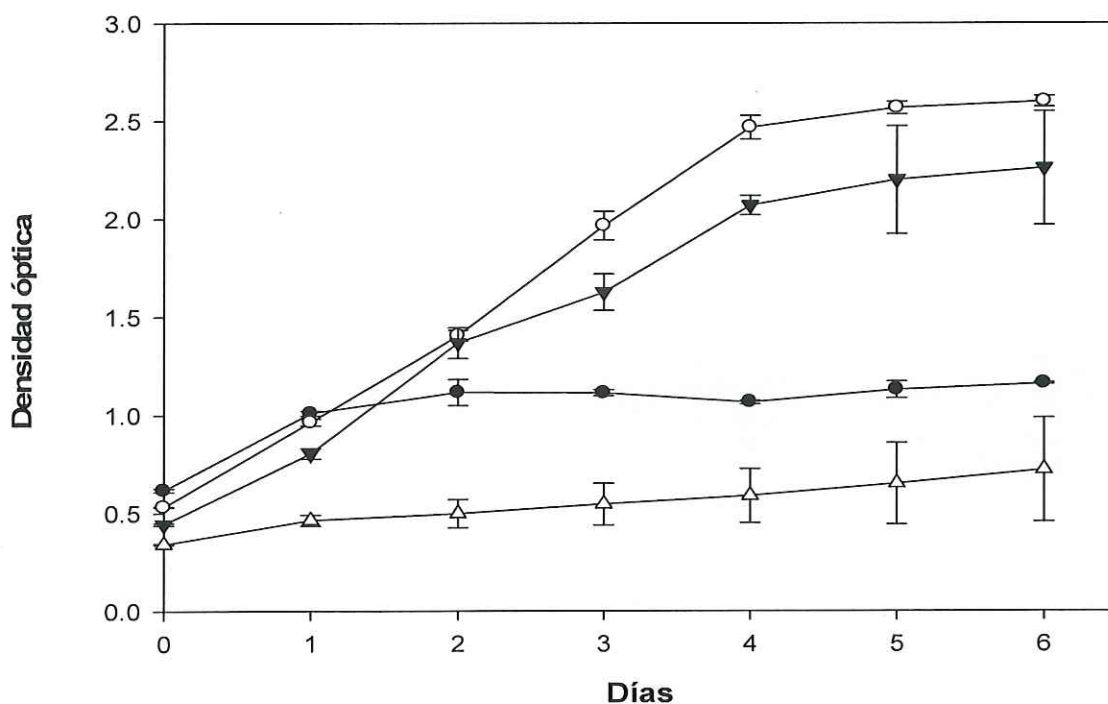


Figura 1.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la densidad óptica de cocultivos de *Synechococcus elongatus* con *Azospirillum brasilense* a diferentes proporciones en 5 mL de medio "2f". 4 mL *S. elongatus* : 1 mL *A. brasilense* (●), 3 mL *S. elongatus* : 2 mL *A. brasilense* (○), 2 mL *S. elongatus* : 3 mL *A. brasilense* (▼), 1 mL *S. elongatus* : 4 mL *A. brasilense* (△). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.

No se encontraron diferencias significativas en las curvas de crecimiento de los cultivos utilizados como control del crecimiento ($P>0.05$) y que fueron evaluados por densidad óptica. Se observó una fase exponencial de 3 días, después de este tiempo todos los cultivos entraron en fase estacionaria (Figura 2).

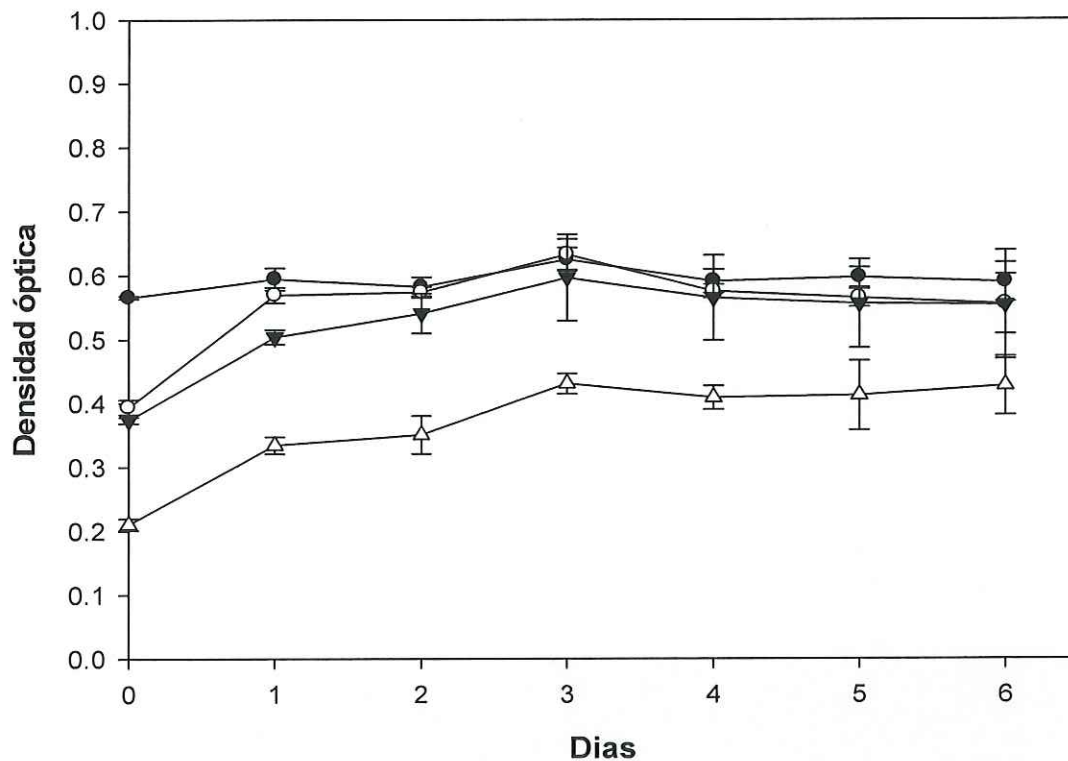


Figura 2.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la densidad óptica de cultivos de *Synechococcus elongatus* a diferentes proporciones de inóculo en 5 mL de medio "2f". 4 mL *S. elongatus* (●), 3 mL *S. elongatus* (○), 2 mL *S. elongatus* (▼), 1 mL *S. elongatus* (△). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.

V.2.- Tamaño de las esferas

Se obtuvieron esferas con una diámetro promedio de 3.260 mm para los tratamientos con alginato, 3.257 mm para las esferas del tratamiento de inmovilización y 3.272 mm para las esferas del tratamiento de coinmovilización. No se encontró diferencia significativa en el tamaño inicial de las esferas utilizadas para los diferentes tratamientos ($P>0.05$). Con estos valores se calculó el área y el volumen promedio de las esferas, que después fueron utilizados para determinar el factor de dilución en pruebas posteriores (Tabla III).

Tabla III.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar del diámetro, área y volumen de las esferas elaboradas para los diferentes tratamientos. A: esferas de alginato sin células, I: células de *Synechococcus elongatus* inmovilizadas en alginato y CI: células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizadas en alginato.

Tratamiento	Diámetro (mm)	Área (mm ²)	Volumen (mm ³)
A	3.260 $\pm$ 0.146	33.449 $\pm$ 2.984	19.90 $\pm$ 0.522 x 10 ⁶
I	3.257 $\pm$ 0.087	33.358 $\pm$ 1.798	19.54 $\pm$ 0.320 x 10 ⁶
CI	3.272 $\pm$ 0.120	33.673 $\pm$ 2.473	20.20 $\pm$ 0.440 x 10 ⁶

V.3.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus*

Se evaluó el crecimiento de *S. elongatus* en los distintos tratamientos durante un periodo de siete días, se presentó una fase de acondicionamiento de un día para los tratamientos con células libres y coinmovilizadas, mientras que para los tratamientos con células inmovilizadas se presentó una fase de acondicionamiento de dos días (Figura 3).

El tratamiento de células libres de *S. elongatus* mostró una fase exponencial del día dos hasta el día cinco de cultivo, después de esto se observó una fase estacionaria del quinto día hasta el séptimo día de cultivo. El tratamiento con células de ambos microorganismos en forma libre presentó una fase exponencial constante del día uno hasta el día siete. Los tratamientos inmovilizados y coinmovilizados mostraron una fase exponencial del día dos hasta el día siete (Figura 3). Al comparar el crecimiento se encontró diferencias significativas ($F=56.064$, $P=0.001$) entre los tratamientos. En el tratamiento de cocultivo libre se alcanzó la mayor concentración celular (3575×10^4 células/mL). Sin embargo, la mayor tasa de crecimiento (μ) fue para el tratamiento de coinmovilización (1.056 divisiones/día) (Tabla IV).

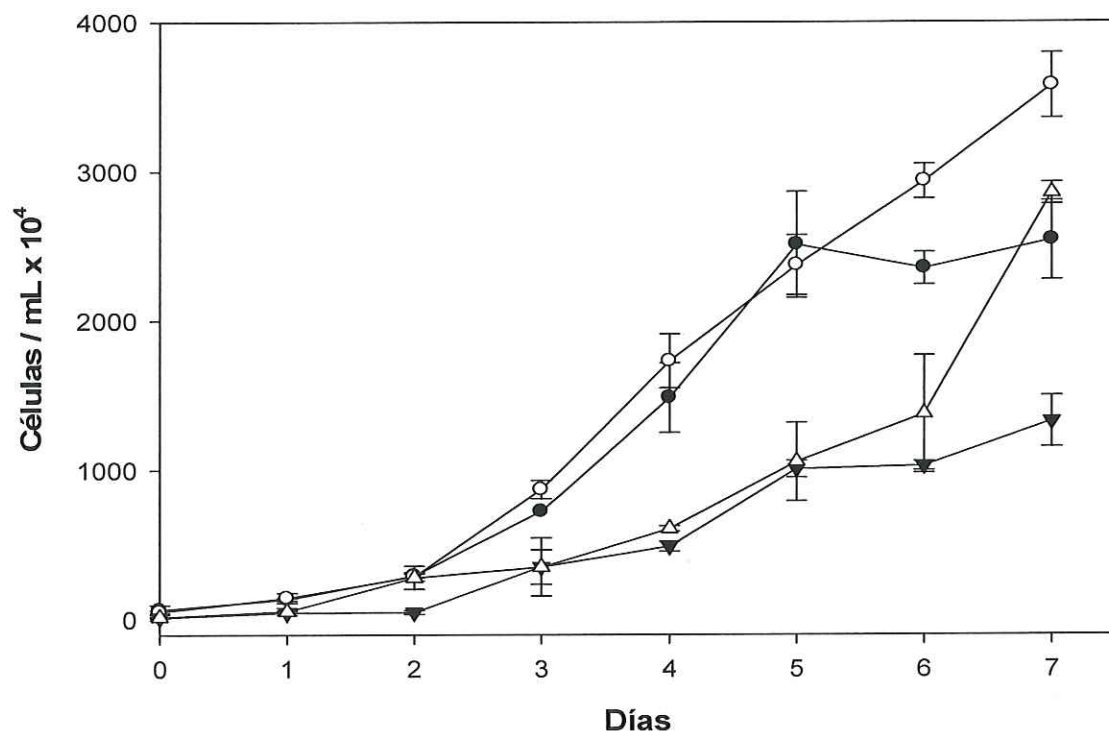


Figura 3.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración celular de los cultivos mantenidos en los diferentes tratamientos en medio "2f". Cultivo libre de *Synechococcus elongatus* (●), cocultivo libre de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* (○), inmovilización de *S. elongatus* (▼), coinmovilización de *S. elongatus* y *A. brasilense* (Δ). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.

Tabla IV.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración celular inicial, concentración celular final y tasa de crecimiento (μ) para los diferentes tratamientos. SL: células de *Synechococcus elongatus* libres en el medio, CCL: células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* libres en el medio, I: células de *S. elongatus* inmovilizadas en alginato y CI: células de *S. elongatus* y *A. brasilense* coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, en donde $a > b > c$.

Tratamiento	Concentración celular inicial (cél/mL)	Concentración celular final (cél/mL)	μ (divisiones/día)
SL	$67.0 \times 10^4 \pm 5.1^a$	$2537.5 \times 10^4 \pm 265.1^b$	0.717 ± 0.036^c
CCL	$53.6 \times 10^4 \pm 8.6^b$	$3575.0 \times 10^4 \pm 217.9^a$	0.867 ± 0.007^b
I	$15.0 \times 10^4 \pm 2.5^c$	$1325.2 \times 10^4 \pm 171.4^c$	0.890 ± 0.024^b
CI	$17.3 \times 10^4 \pm 2.0^c$	$2852.5 \times 10^4 \pm 74.20^b$	1.056 ± 0.029^a

V.4.- Cuantificación de clorofila a

Las concentraciones de clorofila a tuvieron un cambio significativo ($F=64.169$, $P=0.0002$) por efecto de los diferentes tratamientos y también por efecto del tiempo de cultivo (Tabla V). Los mayores valores de clorofila a se encontraron el día 4 para el tratamientos de coinmovilización (345.98 $\mu\text{g/L}$). Los menores valores correspondieron al tratamiento con células coinmovilizadas en el día 0 (4.49 $\mu\text{g/L}$) (Figura 4). La tendencia general en todos los tratamientos, fue un aumento en la concentración de clorofila a con respecto al incremento en el tiempo (Figura 4).

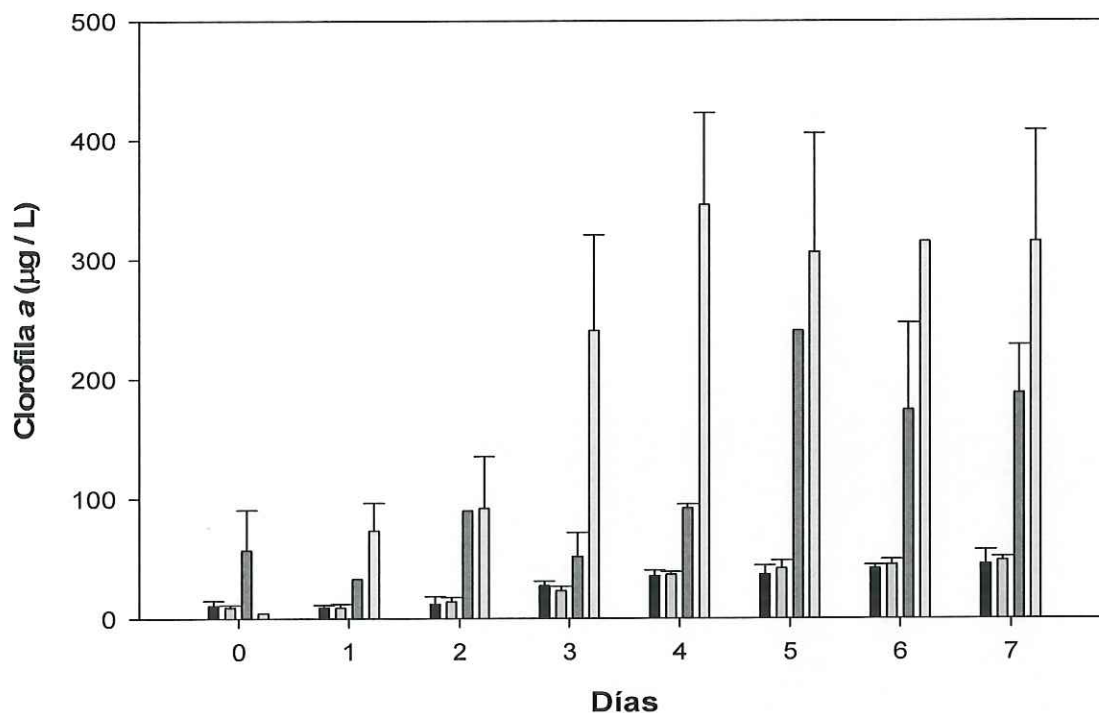


Figura 4.- Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de clorofila a en los cultivos mantenidos en los diferentes tratamientos en medio "2F". Cultivo libre de *Synechococcus elongatus* (■), cocultivo libre de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* (■), células de *S. elongatus* inmovilizadas en alginato (■), células de *S. elongatus* y *A. brasilense* coinmovilizadas en alginato (■). Las barras representan ± 1 error estándar.

Tabla V.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de clorofila *a* inicial y la concentración de clorofila *a* final, de los diferentes tratamientos. SL: células de *Synechococcus elongatus* libres en el medio, CCL: células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* libres en el medio, I: células de *S. elongatus* inmovilizadas en alginato y CI: células de *S. elongatus* y *A. brasilense* coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tratamientos, en donde $a > b > c$.

Tratamiento	Concentración clorofila <i>a</i> inicial ($\mu\text{g/L}$)	Concentración clorofila <i>a</i> final ($\mu\text{g/L}$)
SL	10.5 ± 4.1^b	45.1 ± 12.1^b
CCL	9.0 ± 2.0^b	48.3 ± 3.3^b
I	56.8 ± 33.6^a	188.3 ± 40.2^a
CI	4.4 ± 0.0^c	315.3 ± 93.1^a

V.4.1.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus* por concentración de clorofila *a*

El crecimiento de los cultivos con células libres de *S. elongatus* presentó una relación directa entre la densidad de las células y su concentración de clorofila *a*. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.905 y se muestra la ecuación de la relación de la recta (Figura 5). Esta relación se utilizó para inferir el crecimiento de las células inmovilizadas a partir de su concentración de clorofila *a*.

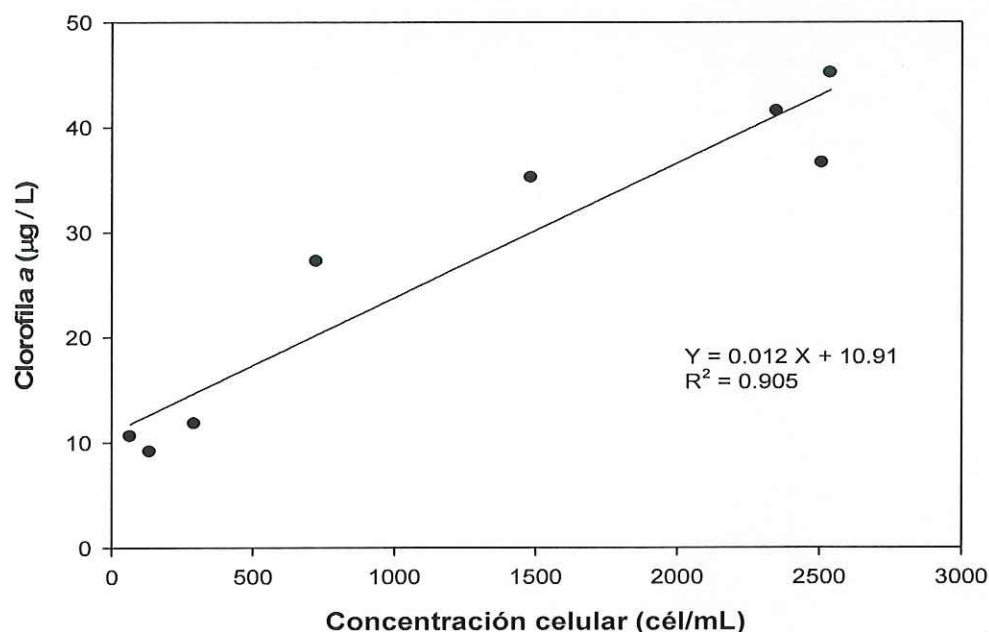


Figura 5.- Valores promedio de la concentración de clorofila *a* y la concentración celular de los cultivos libres de *Synechococcus elongatus*.

V.5.- Evaluación del crecimiento de *A. brasilense*

El número de bacterias de *A. brasilense* al inicio de los tratamientos se evaluó en 130 UFC/mL en promedio (con excepción del tratamiento de cocultivo libre) y con el paso de los días registró un incremento continuo hasta el día dos, después se observó una disminución progresiva hasta el día siete (Figura 6). Al comparar el crecimiento de *A. brasilense* se encontraron diferencias significativas ($F=15.95$, $P=0.01$) entre los tratamientos (Tabla VI). Se alcanzó la máxima concentración de *A. brasilense* al segundo día en todos los tratamientos (Figura 6).

Tabla VI.- Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración inicial, la concentración máxima y la concentración final, de los diferentes tratamientos con *A. brasilense*. AL: células de *Azospirillum brasilense* libres en el medio, CCL: células de *Synechococcus elongatus* y *A. brasilense* libres en el medio y CI: esferas de alginato con *S. elongatus* y *A. brasilense*. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre los tratamientos, en donde $a>b$.

Tratamiento	Concentración celular inicial (UFC/mL)	Concentración celular máxima (UFC/mL)	Concentración celular final (UFC/mL)
AL	156 ± 62.0^b	$13.0 \times 10^3 \pm 1942.5^a$	520 ± 169.7^a
CCL	900 ± 56.5^a	$10.9 \times 10^3 \pm 989.94^a$	220 ± 26.45^b
CI	110 ± 14.1^b	$7.30 \times 10^3 \pm 141.42^b$	580 ± 113.1^a

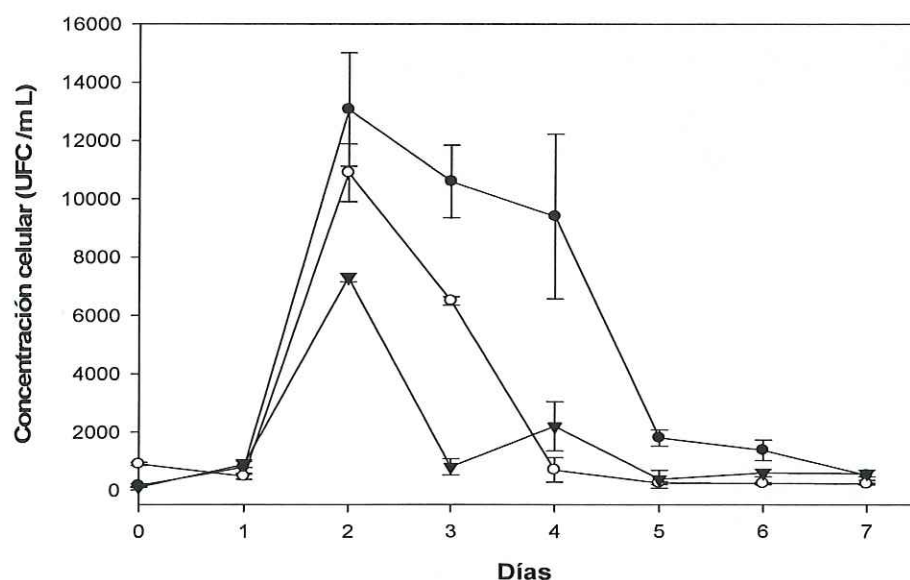


Figura 6.- Valores promedio ± 1 error estándar del crecimiento de *Azospirillum brasilense* en los diferentes tratamientos en medio "2f". Cultivo libre de *A. brasilense* (●), cocultivo libre de *A. brasilense* y *Synechococcus elongatus* (○), células de *A. brasilense* y *S. elongatus* coinmovilizadas en alginato (▼). Las barras representan ± 1 error estándar.

V.6.- Liberación de células al medio

Los tratamientos con células inmovilizadas en esferas de alginato iniciaron a liberar células de *S. elongatus* al medio de cultivo significativamente durante el sexto día del experimento. No se encontró diferencia significativa ($t=-6.1$, $P>0.05$) en la liberación de células al medio entre los tratamientos.

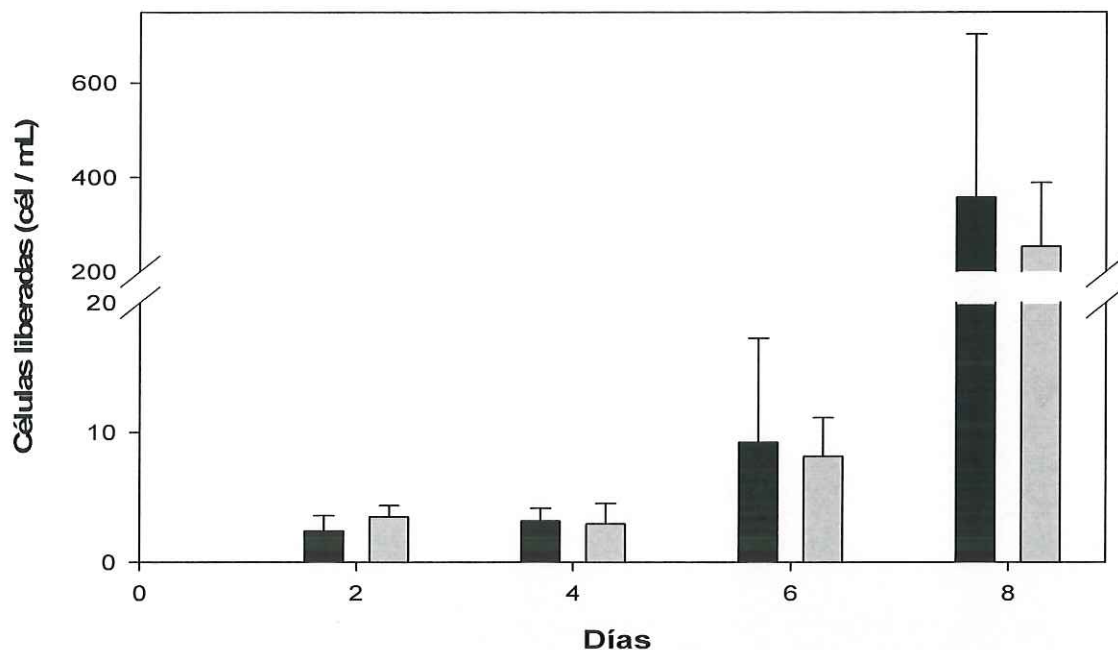


Figura 7.- Valores promedio ± 1 error estándar de la liberación de células hacia el medio de cultivo "2f". Células de *Synechococcus elongatus* inmovilizadas en alginato (■), células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizadas en alginato (▒). Las barras representan ± 1 error estándar.

V.7.- Peso seco, de cenizas y orgánico

Se evaluó el peso seco total, el peso de cenizas y el peso seco orgánico de los diferentes tratamientos (Tabla VII). Se encontró diferencia significativa en el peso seco total entre tratamientos ($F=24.522$, $P=.0001$). No se encontró diferencia significativa entre tratamientos en los valores del peso de cenizas ($P>0.05$) y se encontró diferencia significativa en el peso seco orgánico entre los tratamientos ($F=56.721$, $P=0.0001$).

Tabla VII.- Valores promedio $\pm$ 1 error estándar del peso seco total, peso de cenizas y peso seco orgánico, de los diferentes tratamientos al final del experimento. A: esferas de alginato sin células, SL: células de *Synechococcus elongatus* libres en el medio, AL: células de *Azospirillum brasilense* libres en el medio, CCL: células libres de *S. elongatus* con *A. brasilense* libres en el medio, I: células de *S. elongatus* inmovilizadas en alginato, CI: células de *S. elongatus* y *A. brasilense* coinmovilizadas en alginato. Las letras distintas indican diferencia significativa ($P<0.05$) entre los tratamientos, en donde $a>b$.

Tratamiento	Peso seco total (mg/mL)	Peso de cenizas (mg/mL)	Peso seco orgánico (mg/mL)
A	0.670 ± 0.074^a	0.194 ± 0.013	0.475 ± 0.060^a
SL	0.280 ± 0.048^b	0.095 ± 0.035	0.185 ± 0.006^b
AL	0.130 ± 0.033^b	0.038 ± 0.021	0.091 ± 0.016^b
CCL	0.302 ± 0.019^b	0.110 ± 0.018	0.192 ± 0.001^b
I	0.619 ± 0.127^a	0.152 ± 0.031	0.466 ± 0.158^a
CI	0.646 ± 0.102^a	0.112 ± 0.005	0.534 ± 0.135^a

V.8.- Remoción de nutrientes

Se evaluaron las diferencias en la concentración de las distintas formas químicas de nitrógeno y de fósforo entre los siete tratamientos.

La concentración inicial de fosfatos fue aproximadamente de 8.25 ± 0.83 mg/L en todos los tratamientos (Figura 8 a 10). Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en la concentración final entre los tratamientos ($F=28.518$, $P=0.0001$). Todos los tratamientos mostraron decremento de la concentración de fosfatos. La concentración final de fosfatos para los tratamientos control medio "2f" y esferas de alginato sin células fue de 7.36 mg/L y 6.27 mg/L, respectivamente (Figura 8A). Estos tratamientos control presentaron remoción, el tratamiento que sirvió de control experimental y que consistió en usar sólo medio "2f" alcanzó una remoción máxima del 24% el día 3, mientras que el tratamiento con esferas de alginato sin células logró una remoción máxima del 31% el día 5 del experimento (Figura 8B).

Los tratamientos con células libres obtuvieron los mayores valores de remoción de fosfatos. La concentración final de fosfatos para los tratamientos de células libres de *S. elongatus*, células libres de *A. brasilense* y el cocultivo de células libres de ambos microorganismos, fueron 3.93 mg/L, 6.19 mg/L y 4.38 mg/L, respectivamente (Figura 9A). El tratamiento de cocultivo de células libres de *S. elongatus* con *A. brasilense* alcanzó una remoción máxima del 51% el día 7, mientras que el tratamiento con células libres de *A. brasilense* logró una remoción

máxima del 37% el día 3 y el tratamiento con células libres de *S. elongatus* alcanzó una remoción máxima del 57% en el día 4, siendo ésta la mayor remoción entre todos los tratamientos (Figura 9B).

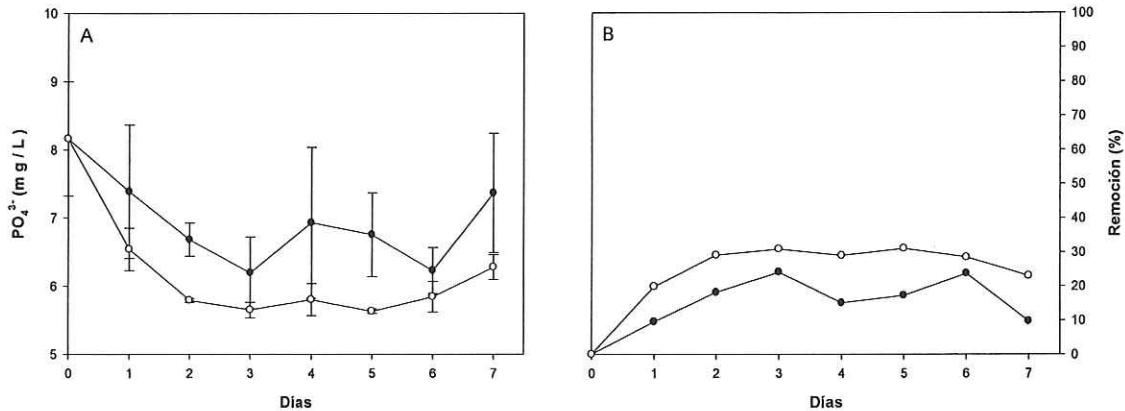


Figura 8.- (A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de fosfatos en los tratamientos control. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de fosfatos en los tratamientos control. Medio "2F" (●), esferas de alginato sin células (○). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.

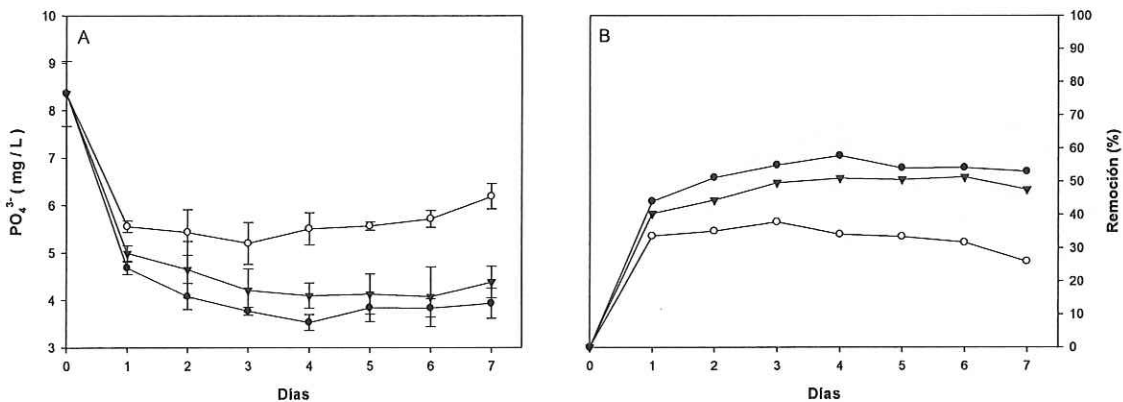


Figura 9.- (A) Valores promedio $\pm$ 1 error estándar de la concentración de fosfatos en los tratamientos con células libres. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de fosfatos en los tratamientos con células libres. Cultivo con células de *Synechococcus elongatus* libres en el medio (●), cultivo con células de *Azospirillum brasilense* libres en el medio (○), cocultivo con células de *S. elongatus* y *A. brasilense* libres en el medio (▼). Las barras representan $\pm$ 1 error estándar.

Los tratamientos con células inmovilizadas lograron una remoción significativa. La concentración final de fosfatos para el tratamiento de inmovilización de células de *S. elongatus* en alginato y para el tratamiento de coinmovilización de células de *S. elongatus* con *A. brasilense* fueron de 5.67 mg/L y 4.60 mg/L, respectivamente (Figura 10A). El tratamiento de inmovilización de células de *S. elongatus* alcanzó una remoción máxima del 41% el día 5, mientras que el tratamiento de coinmovilización de *S. elongatus* con *A. brasilense* logró una remoción máxima del 48% en el cuarto día del experimento (Figura 10B).

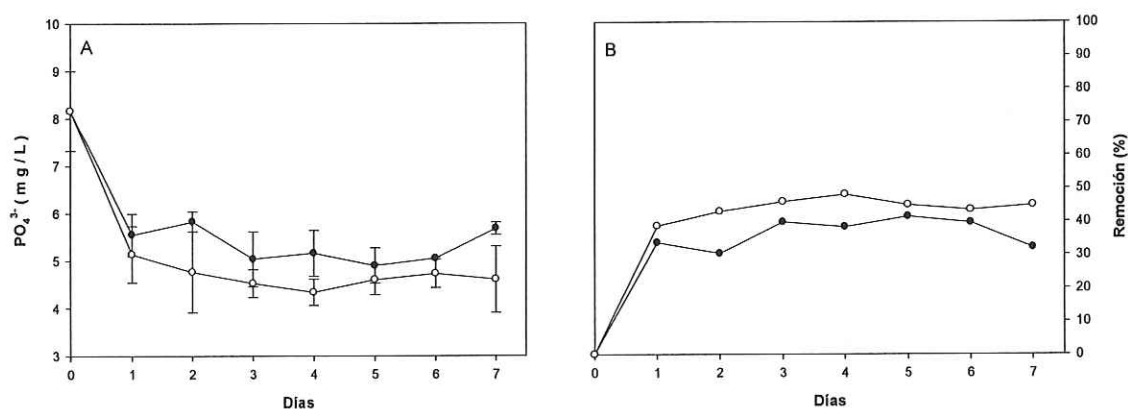


Figura 10.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de fosfatos en los tratamientos con células inmovilizadas. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de fosfatos en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de *Synechococcus elongatus* inmovilizadas en alginato (●), células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizadas en alginato (○). Las barras representan ± 1 error estándar.

La concentración inicial de nitratos fue aproximadamente de 22.38 ± 0.06 mg/L en todos los tratamientos (Figura 11 a 13). Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en la concentración final entre los tratamientos ($F=22.488$, $P=0.0001$). Se observó una baja disminución en la concentración de nitratos en casi todos los tratamientos. El mayor porcentaje de remoción para los tratamientos que sirvieron como control experimental, que consistieron de sólo medio de cultivo "2f", fue de un 0.57% al tercer día (Figura 11B). Los tratamientos con células libres de *S. elongatus* y de *A. brasilense* al contrario mostraron un leve incremento (Figura 12A). Los menores valores finales en la concentración de nitratos fueron en los tratamientos con células de *S. elongatus* inmovilizadas en alginato con 22.22 mg/L y en el tratamiento con células de *S. elongatus* y *A. brasilense* coinmovilizadas en alginato con 22.20 mg/L (Figura 13A).

Los tratamientos de inmovilización de células de *S. elongatus* en alginato tuvieron un porcentaje de remoción máximo del 0.76% en el tercer día y el mayor

porcentaje de remoción entre todos los tratamientos, fue para los tratamientos de coinmovilización en alginato de células de *S. elongatus* y *A. brasilense*, con un 0.86% en el día 1 (Figura 13B).

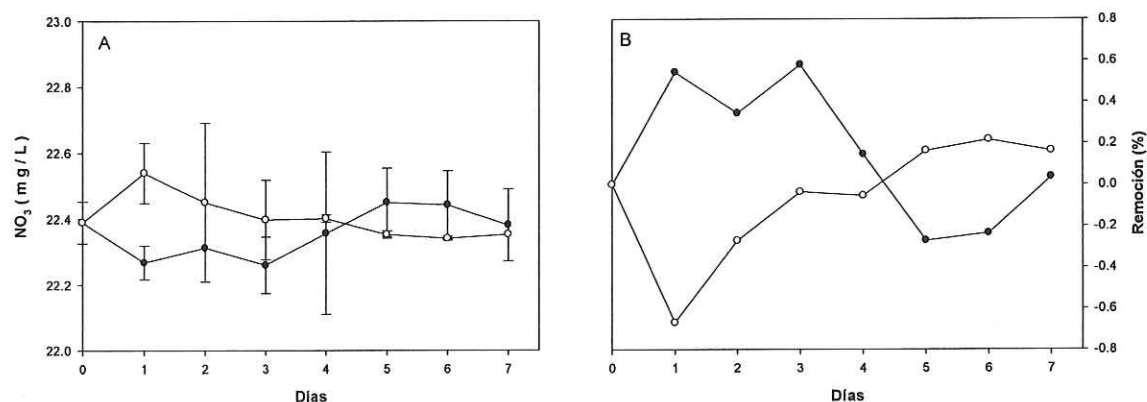


Figura 11.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitratos en los tratamientos control. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de nitratos en los tratamientos control. Medio "2f" (●), esferas de alginato sin células (○). Las barras representan ± 1 error estándar.

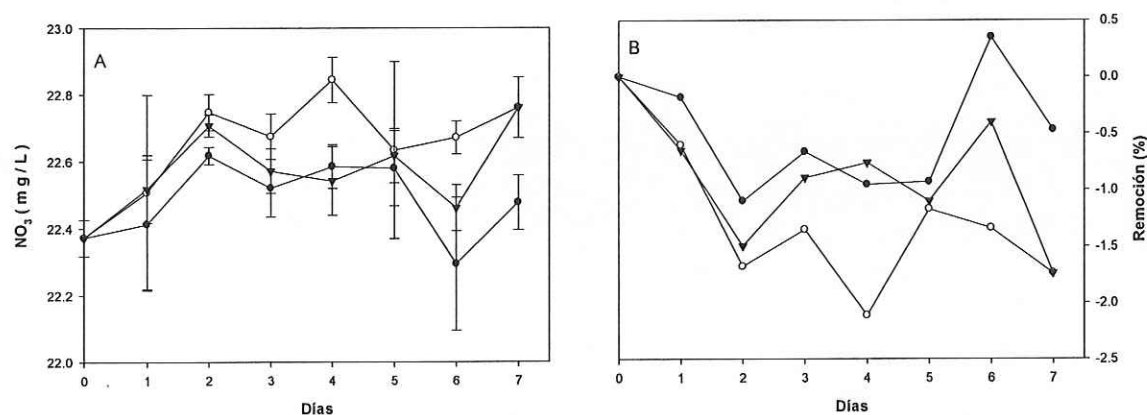


Figura 12.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitratos en los tratamientos con células libres. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de nitratos en los tratamientos con células libres. Cultivo con células de *Synechococcus elongatus* libres en el medio (●), cultivo con células de *Azospirillum brasilense* libres en el medio (○), cocultivo con células de *S. elongatus* y *A. brasilense* libres en el medio (▼). Las barras representan ± 1 error estándar.

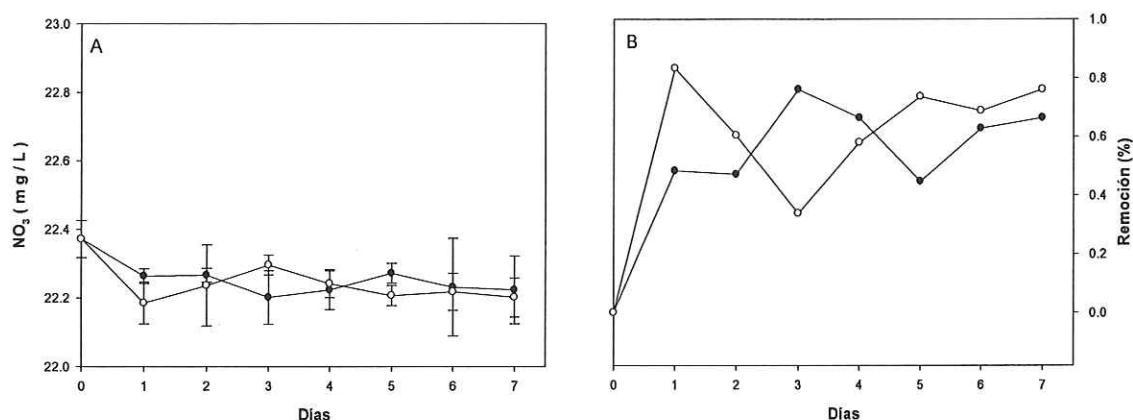


Figura 13.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitratos en los tratamientos con células inmovilizadas. (B) Valores promedio del porcentaje de remoción de nitratos en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de *Synechococcus elongatus* inmovilizadas en alginato (●), células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizadas en alginato (○). Las barras representan ± 1 error estándar.

Debido a las transformaciones del nitrógeno en el medio se evaluó la producción de nitritos en todos los tratamientos. La concentración inicial de nitritos fue aproximadamente de 0.38 ± 0.00 mg/L en todos los tratamientos (Figura 14 a 16). Los resultados del análisis de varianza mostraron diferencias significativas en la concentración final de nitritos entre todos los tratamientos ($F=4.416$, $P=0.019$). Se observó un ligero aumento en la concentración de nitritos en todos los tratamientos. Los mayores valores finales en la concentración de nitritos fueron evaluados en el tratamiento que sirvió como control experimental, que consistió solamente de medio "2f", con 0.47 mg/L (Figura 14A), seguido del tratamiento de cocultivo de células libres de *S. elongatus* y *A. brasilense*, con 0.46 mg/L (Figura 15A). El mayor valor de producción fue para el tratamiento de cocultivo de células libres de *S. elongatus* y *A. brasilense*, con 31.7% en el día 2 (Figura 15B), seguido del porcentaje de producción para el tratamiento de inmovilización de células de *S. elongatus* en alginato, con un 28.7% en el día 1 (Figura 16B).

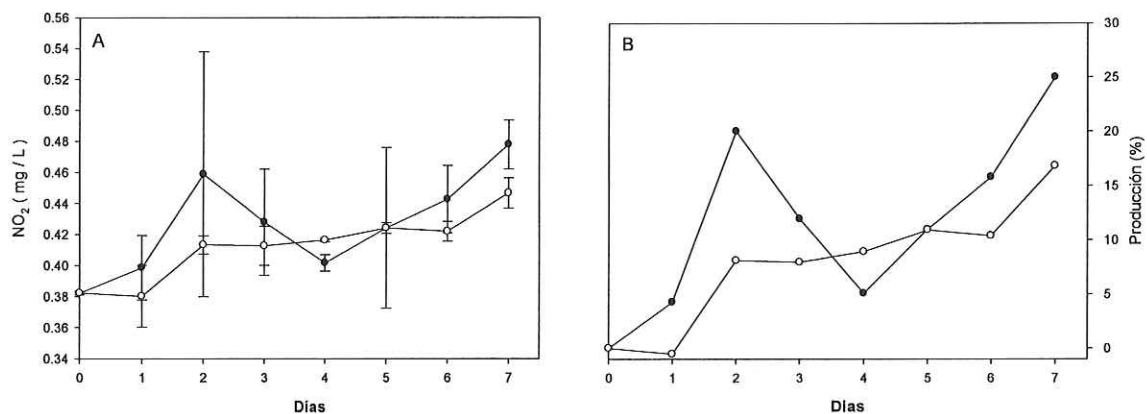


Figura 14.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitritos en los tratamientos control. (B) Valores promedio del porcentaje de producción de nitritos en los tratamientos control. Medio "2f" (●), esferas de alginato sin células (○). Las barras representan ± 1 error estándar.

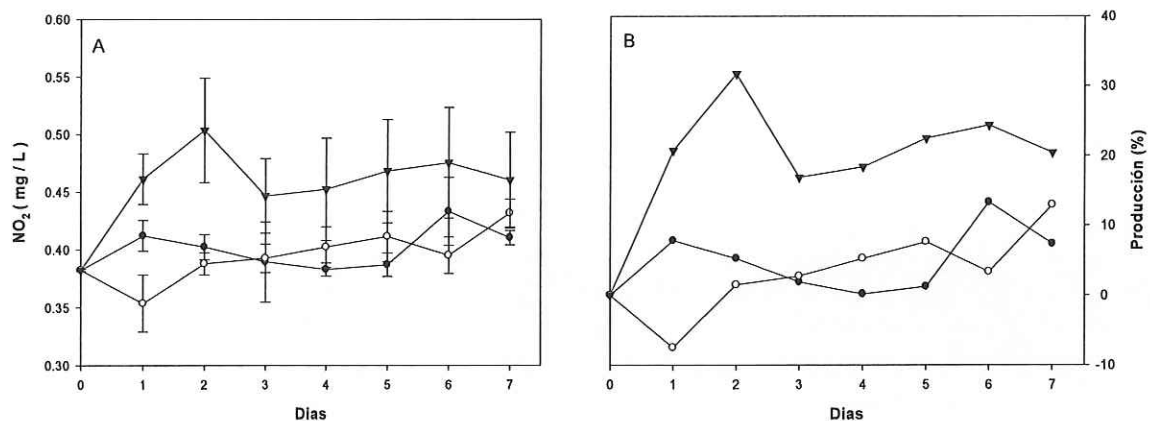


Figura 15.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitritos en los tratamientos con células libres. (B) Valores promedio del porcentaje de producción de nitritos en los tratamientos con células libres. Cultivo con células de *Synechococcus elongatus* libres en el medio (●), cultivo con células de *Azospirillum brasilense* libres en el medio (○), cocultivo con células de *S. elongatus* y *A. brasilense* libres en el medio (▼). Las barras representan ± 1 error estándar.

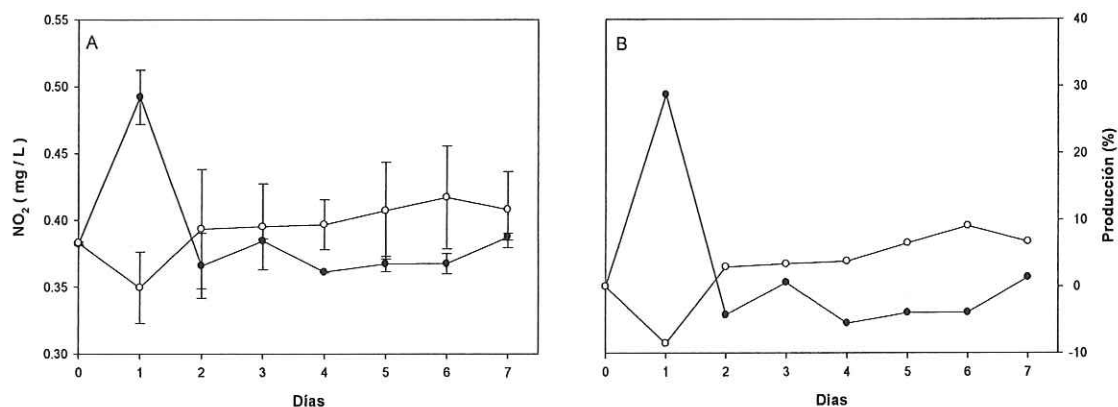


Figura 16.- (A) Valores promedio ± 1 error estándar de la concentración de nitritos en los tratamientos con células inmovilizadas. (B) Valores promedio del porcentaje de producción de nitritos en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de *Synechococcus elongatus* inmovilizadas en alginato (●), células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizadas en alginato (○). Las barras representan ± 1 error estándar.

V.9.- Medición del pH

Se evaluaron diariamente los valores de pH para los siete tratamientos. Debido a que los datos obtenidos no cumplieron las hipótesis de normalidad y de homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis mostraron diferencias significativas en los valores de pH entre los tratamientos ($P=0.0271$). El pH inicial en todos los tratamientos fue aproximadamente 8.4 ± 0.03 . Los tratamientos control que consistieron solamente de medio "2f", así como los que consistieron en sólo esferas de alginato sin células presentaron una disminución en los valores de pH hasta a un valor de 8.0 (Figura 17). Los tratamientos con células libres que fueron cultivo de *S. elongatus*, cultivo de *A. brasilense* y cocultivo de ambos microorganismos, mostraron un incremento en los valores de pH hasta 9.0, 8.7 y 8.8, respectivamente (Figura 18). Los tratamientos con células de *S. elongatus* inmovilizadas y de células de *S. elongatus* coinmovilizadas con células de *A. brasilense*, ambos mostraron un incremento en los valores de pH hasta un valor de 9.0 (Figura 19).

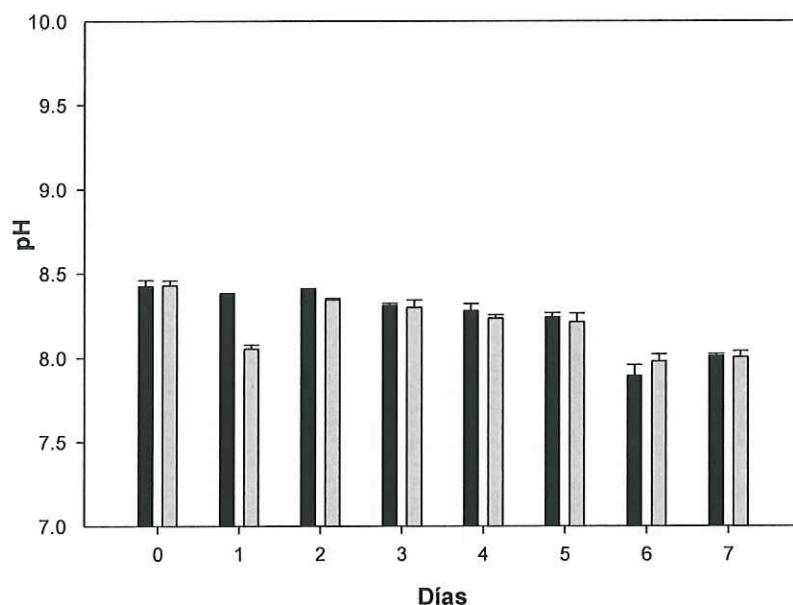


Figura 17.- Valores promedio ± 1 error estándar de las mediciones del pH en los tratamientos control. Medio "2f" (■), esferas de alginato sin células (▒). Las barras representan ± 1 error estándar.

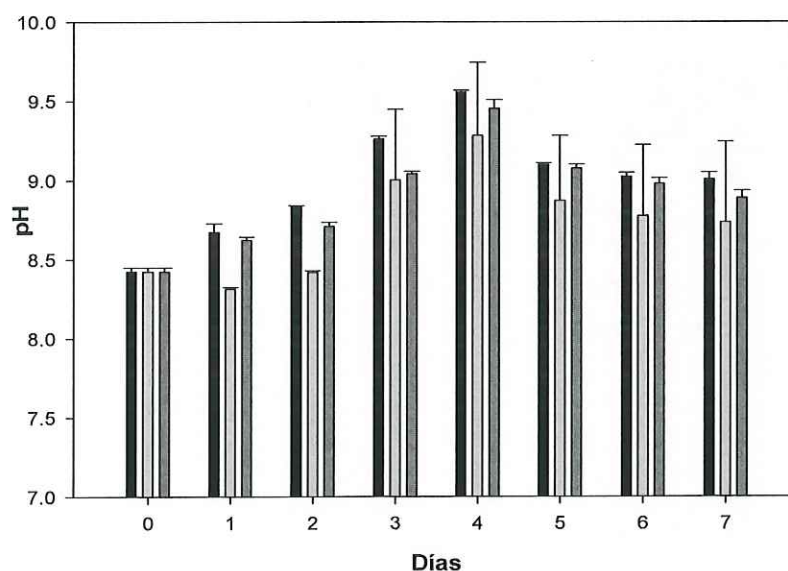


Figura 18.- Valores promedio ± 1 error estándar de las mediciones del pH en los tratamientos con células libres. Células libres de *Synechococcus elongatus* (■), células libres de *Azospirillum brasilense* (▒), cocultivo de células libres de *S. elongatus* con *A. brasilense* (▒). Las barras representan ± 1 error estándar.

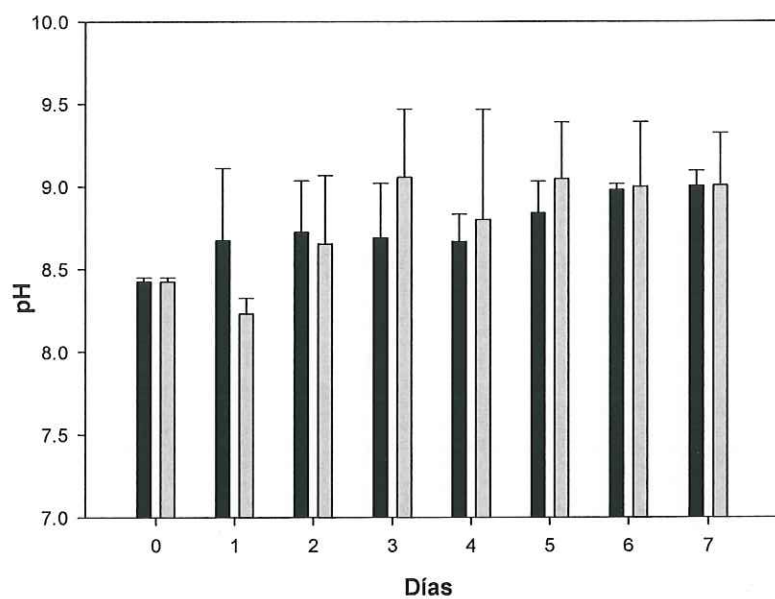


Figura 19.- Valores promedio ± 1 error de las mediciones del pH en los tratamientos con células inmovilizadas. Células de *Synechococcus elongatus* inmovilizadas en alginato (■), células de *S. elongatus* y *Azospirillum brasilense* coinmovilizadas en alginato (▒). Las barras representan ± 1 error estándar.

Capítulo VI

Discusión

VI.1.- Ensayo de coexistencia

Hay diversos estudios sobre las interacciones entre bacterias-microalgas que constituyen una alternativa para ser utilizados como control de las proliferaciones de bacterias y fitoplancton causantes de daños a los ambientes naturales y sistemas cerrados de cultivo. Estas investigaciones se han hecho tanto en laboratorio como *in situ* y han demostrado procesos de estímulo e inhibición del crecimiento de las microalgas y/o bacterias (Riquelme y Avendaño-Herrera, 2003). En comparación con la cantidad de estudios del efecto alguicida de algunas bacterias, el papel de algunas bacterias como factor estimulador en el crecimiento de fitoplancton no ha sido igualmente estudiado (Liu *et al.*, 2008). Algunas bacterias han demostrado promover el crecimiento de fitoplancton por medio de la fijación de nitrógeno inorgánico (de-Bashan *et al.*, 2002a, 2004), remineralización y/o solubilización de nutrientes inorgánicos (Azam, 1998; Vassilev *et al.*, 2006), reducción del estrés oxidativo (Mouquet *et al.*, 1995), la producción metabólica de CO₂ (Chirac *et al.*, 1985) y su potencial redox (Parker y Bold, 1996). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se centran en bacterias provenientes de colecciones de microorganismos, en especial aquellas especies que se sabe que tienen un efecto promotor de crecimiento vegetal como *Azospirillum* sp. (Lebsky *et al.*, 2001; de-Bashan *et al.*, 2002a, 2004).

En este estudio se realizaron cultivos mixtos de una especie de cianobacteria y una especie de bacteria promotora de crecimiento a diferentes concentraciones, para establecer relaciones alelopáticas exitosas. El cocultivo a la proporción 3:2 de *S. elongatus* y *A. brasilense*, respectivamente fue el que tuvo una mayor densidad óptica al compararlo con las otras proporciones de especies cuya densidad óptica fue menor. Al comparar esta proporción del cocultivo con un monocultivo de *S. elongatus* con la misma cantidad de inóculo, la densidad óptica fue cinco veces mayor en el cocultivo. Liu *et al.* (2008) evaluaron el efecto promotor de crecimiento sobre siete especies de microalgas por parte de una bacteria que aislaron en las costas de Carolina del Sur, utilizando distintas proporciones de cultivo de forma análoga a como se realizó en este trabajo. La especie de bacteria que aislaron Liu *et al.* (2008), resultó cercana al género *Bacillus* y tuvo un efecto en el crecimiento

de las siete especies de microalgas: *Heterosigma akashiwo*, *Chatonella subsalsa*, *Fibrocapsa japonica*, *Chaetoceros neogracile*, *Nitzschia* sp., *Cryptomonas* sp. y *Ankistrodesmus* sp. Recientemente Abed (2010), encontró que al tener un cocultivo de una bacteria del genero *Pseudomonas* con la cianobacteria *Synechocystis* PCC6803, llevó a un incremento de ocho veces en la biomasa cianobacterial. Los trabajos realizados acerca de la coinmovilización de *Azospirillum brasilense* con las microalgas *Chlorella vulgaris* o *C. sorokiniana* (de-Bashan *et al.*, 2002a, 2004; Lebsky *et al.*, 2001), han utilizado una proporción 2:1 de microalga y bacteria respectivamente, la cual es cercana a la que se determinó como la mejor en este trabajo.

VI.2.- Tamaño de las esferas

Las propiedades mecánicas y de expansión de las esferas de alginato han demostrado depender fuertemente de la composición monomérica, la estructura y el tamaño de las moléculas que componen el alginato. El tamaño y el grado de esfericidad de las cápsulas dependen principalmente de la viscosidad de la solución de alginato, de la distancia que hay entre el orificio por donde sale esta solución y la superficie de la solución gelificante y de la concentración de la solución usada para gelificar (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990). La composición del alginato puede también influenciar el tamaño de las esferas. El gel de alginato se contrae durante la formación de la esferas, lo que genera una pérdida de agua y un incremento en la concentración de alginato relativa a la que había en la solución. Esta contracción causa un incremento relativo en la concentración de células inmovilizadas en la matriz (Smidsrød y Skjåk-Bræk, 1990). En este trabajo, independientemente del tratamiento, se obtuvieron esferas con un diámetro promedio de 3.26 mm, un área aproximada de 33.5 mm² y un volumen aproximado de 20 µL. Estos valores son similares a los obtenidos en estudios que se han realizado con el mismo proceso de inmovilización utilizado en este trabajo (Fierro-Reséndiz, 2004; Aguilar-May, 2006), así como en trabajos en los que se inmovilizó *S. elongatus* en esferas de alginato (Matsunaga *et al.*, 1988).

VI.3.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus*

VI.3.1.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus* en cultivos libres

Existen una variedad de factores que intervienen en el crecimiento de cianobacterias y microalgas, siendo cuatro los más relevantes en los ambientes acuáticos y corresponden al nitrógeno, el fósforo, el carbono y la luz, ya que tienen un efecto sobre la respuesta fisiológica de las microalgas (Owens y Esaias, 1976). Además de estos factores, la temperatura y el pH también son importantes ya que

deben estar en valores adecuados según los requerimientos de cada especie (Mora, 2002; Rosales *et al.*, 2006). En el tratamiento que consistió en cultivos libres de *S. elongatus* se observó una fase de acondicionamiento de un día, se obtuvo la menor tasa de crecimiento comparada con los otros tratamientos y alcanzaron la fase estacionaria al quinto día (Figura 3). Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) cultivaron a *S. elongatus* en agua de mar obteniendo una alta tasa de crecimiento de 0.86 divisiones/día similar a la obtenida en este estudio (0.71 divisiones/día). Pero al comparar las concentraciones celulares finales se encuentra una gran diferencia, Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) obtuvieron una concentración celular de 3.37×10^8 cél/mL, mientras que en este estudio la concentración celular final fue de 0.25×10^8 cél/mL. Esta diferencia en las concentraciones finales de *S. elongatus* pudo deberse a un estrés salino, ya que esta especie fue cultivada en agua dulce. La cepa de la cianobacteria *S. elongatus* proviene de un aislamiento realizado en muestras de agua de una granja de producción de camarón (Aguilar-May, 2002). Aun cuando es una especie que se ha reportado como halotolerante (Billini *et al.*, 2008), su crecimiento pudo verse afectado por la diferencia en la concentración de sales inorgánicas disueltas y por la influencia de factores como la concentración y el tipo de nutrientes, ya que Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) utilizaron nitrato de amonio como aporte de nitrógeno en lugar de nitrato de sodio como fue utilizado en este trabajo. Estas diferencias en las tasas de crecimiento también pudieron estar influenciadas por la distinta cantidad de inóculo utilizado en los cultivos, ya que en el estudio de Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) la concentración celular inicial fue de 0.06×10^8 cél/mL mientras que para este estudio fue de 0.006×10^8 cél/mL. La densidad del inóculo y la viabilidad de las células son muy importantes para el desarrollo del cultivo, ya que la mayoría de las células por el cambio de las condiciones de cultivo pueden modificar su metabolismo (Fogg y Thake, 1987) y en consecuencia modificar la duración de las distintas fases de las curvas de crecimiento.

VI.3.2.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus* con *A. brasilense* en cocultivos libres

Se han descrito diversos estudios sobre las interacciones entre bacterias-microalgas que constituyen una alternativa para controlar el crecimiento microalgal. La práctica del cultivo masivo de microalgas, ocasionalmente se enfrenta a problemas inesperados o a colapsos de los cultivos. Una solución a estos problemas es utilizar bacterias promotoras del crecimiento microalgal (Hirayama e Hirayama, 1997). El tratamiento de cocultivo libre fue el que obtuvo la mayor concentración celular final entre todos los tratamientos. Comparando las

tasas de crecimiento entre los tratamientos de células de *S. elongatus* de forma libre y el de cocultivo de células de *S. elongatus* y *A. brasilense* de forma libre, este último presentó la mayor tasa de crecimiento. Resultados similares se han obtenido en otros estudios. Hirayama e Hirayama (1997) cultivaron tres especies de microalgas marinas *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri*, con la bacteria *Flavobacterium* sp. en cocultivos libres de 2.5 litros. Encontraron que las bacterias promueven el crecimiento de la diatomea *C. gracilis* que es utilizada como alimento en las granjas de ostras. Garg y Bhatnagar (1999) evaluaron el efecto de la inoculación de pozas de acuicultura de agua dulce con las bacterias promotoras de crecimiento vegetal *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp. y encontraron que estas bacterias incrementaron significativamente la cantidad de fitoplancton y consecuentemente la producción de peces.

VI.3.3.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus* en forma inmovilizada

Una célula inmovilizada es definida como una célula que por medio natural o artificial es privada de moverse independientemente y confinada con un grupo de células dentro de un sistema de estudio (Tampion y Tampion, 1987). Cuando se describe un sistema tradicional de tratamiento de aguas residuales con microalgas se consideran dos componentes: las microalgas y el agua de desecho que incluyen las interacciones entre estos dos componentes. Al incorporar la tecnología de inmovilización se introduce en el sistema un tercer componente, la matriz polimérica. Por lo anterior, se requiere considerar las interacciones entre la matriz-polímero y las células de la microalga. Estas interacciones están relacionadas con los cambios en las células durante el proceso de inmovilización, incluyendo cambios morfológicos, características de crecimiento y de actividades metabólicas (Mallick, 2002). Después del proceso de inmovilización es importante conocer cuál es el porcentaje de viabilidad celular, ya que la viabilidad del cultivo se reduce en dependencia de varios factores tales como: el método de inmovilización, el tipo de polímero, la concentración del polímero y el diámetro de la esfera, entre otros como son las características de la especie de microalga, en especial los rangos de tolerancia a factores fisicoquímicos, por ejemplo el pH (Kaya y Picard, 1995). La principal limitante para la viabilidad y el crecimiento de células inmovilizadas, es la baja tasa de intercambio de gases y nutrientes con el medio y su dependencia en el tamaño, forma y densidad del polímero (Cohen, 2001). En el tratamiento de inmovilización de células de *S. elongatus* se obtuvo la menor concentración de células, pero también se obtuvo la segunda mejor tasa de crecimiento. Se observó una fase de acondicionamiento de dos días, la cual fue un poco más larga que para los cultivos de células de *S. elongatus* de forma libre (Figura 3). Este mayor tiempo de acondicionamiento se debe a que el proceso de

inmovilización causó una fase de aclimatación a las nuevas condiciones de cultivo. La inmovilización de microorganismos en polímeros provoca un estrés significativo en los microorganismos debido a las fuerzas químicas y las interacciones entre la matriz de inmovilización y la pared celular (de-Bashan y Bashan, 2010). Este efecto ha sido descrito previamente en varios estudios de inmovilización de microalgas. Chevalier y de la Noüe (1985a) reportaron que *Scenedesmus obliquus* exhibió una fase de acondicionamiento un día más larga cuando era inmovilizada en carragenina. Lau *et al.* (1998) observó la misma tendencia para *Chlorella vulgaris* cuando se inmovilizaba en carragenina. Aguilar-May y Sánchez- Saavedra (2009) observaron también una fase de acondicionamiento de dos días cuando inmovilizaron *S. elongatus* en quitosano, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. Después de esta fase de acondicionamiento las tasas de crecimiento pueden ser muy similares entre las células libres y las inmovilizadas (Lau *et al.*, 1998; Mallick, 2002). Se ha encontrado que debido al proceso de inmovilización, se pueden producir cambios fisiológicos en las células para mantener una tasa de crecimiento similar a cuando están libres en el medio (Cohen, 2001; Mallick, 2002). En los organismos inmovilizados existe una gran variedad de cambios respecto a los organismos mantenidos en forma libre. Kolot (1988) menciona que en los organismos inmovilizados existe una mayor actividad metabólica y una disminución del tiempo de generación respecto a los organismos mantenidos en forma libre, lo cual podría explicar la mayor tasa de crecimiento de los cultivos inmovilizados con respecto a los cultivos en forma libre. Aguilar-May y Sánchez- Saavedra (2009) obtuvieron tasas de crecimiento y concentraciones celulares muy similares entre los tratamientos con células libres de *S. elongatus* y cuando fueron inmovilizadas en quitosano, lo cual difiere de los resultados obtenidos en este trabajo. En los estudios relacionados con la inmovilización de células vivas se menciona que no todas las cepas de microalgas y cianobacterias responden igual a un distinto método de inmovilización (Yang y Wang, 1990; Kaya y Picard, 1995).

VI.3.4.- Evaluación del crecimiento de *S. elongatus* coinmovilizada con *A. brasilense*

Se han descrito diversos estudios sobre las interacciones entre bacterias-fitoplancton que constituyen una alternativa para controlar el crecimiento microalgal. En la sección anterior VI.3.3 se trataron los efectos que tiene la inmovilización en matrices poliméricas sobre diferentes especies de microalgas y cianobacterias. Recientemente se han hecho esfuerzos en el campo de la coinmovilización. Una de las nuevas estrategias en el campo de la coinmovilización, con el propósito de tratar aguas residuales, es el uso de

bacterias promotoras del crecimiento vegetal, las cuales son comúnmente utilizadas en la agricultura (Bashan y de-Bashan, 2005). Esto con el fin de incrementar el crecimiento y la capacidad de remoción de nutrientes de las microalgas. Las especies bacterianas utilizadas hasta ahora pertenecen al género *Azospirillum*, el cual es usado ampliamente como inóculo para promover el crecimiento y producción en numerosos tipos de cultivos *v. gr.* algodón, trigo y tomate (Bashan, 1998). El efecto promotor de crecimiento microalgal por parte de varias cepas de *Azospirillum* spp. ha sido reportado solamente en dos especies de microalgas, *Chlorella vulgaris* y *C. sorokiniana* (González y Bashan, 2000; Lebsky *et al.*, 2001; de-Bashan *et al.*, 2002b). Por lo tanto, no se ha establecido si el efecto promotor de crecimiento del género *Azospirillum* es exclusivo para las microalgas del género *Chlorella* o es una respuesta más amplia con otras especies de microalgas y cianobacterias.

El crecimiento de *S. elongatus* en el tratamiento de coinmovilización en este trabajo, tuvo una fase de acondicionamiento de un día al igual que los tratamientos con células libres (Figura 3). También este tratamiento presentó la mejor tasa de crecimiento y su concentración celular final fue muy similar al tratamiento de células de *S. elongatus* en forma libre, la cual es el doble de la concentración celular final si la comparamos con el tratamiento de inmovilización de células de *S. elongatus* (Tabla IV). En un cocultivo libre de microalgas con bacterias, ambos microorganismos están dispersos, la microalga a través de la agitación del medio cultivo y la bacteria por su propia movilidad (Zhulin y Armitage, 1992). La inmovilización de estos dos microorganismos dentro de la matriz de alginato, asegura el establecimiento de esta asociación artificial y el efecto mutuo ya que debido a que los microorganismos están atrapados, el movimiento de *A. brasilense* se ve limitado. Los mecanismos por los cuales las bacterias de *A. brasilense* afectan a las microalgas, cuando ambos microorganismos son coinmovilizados, han sido investigados recientemente. Los nutrientes en el medio de cultivo se difunden libremente dentro de la matriz. En un tiempo entre 6 y 48 horas, dependiendo de la combinación específica microalga-bacteria, los dos microorganismos se unen en la misma cavidad dentro de la esfera después de que se disuelven pequeñas partes de la estructura interna (de-Bashan y Bashan, 2008a). Los mecanismos celulares están probablemente relacionados con la capacidad de *A. brasilense* para producir fitohormonas, *v. gr.* ácido indolacético. Esta idea es sustentada por el efecto promotor de crecimiento similar a la coinmovilización, al aplicar ácido indolacético al cultivo de microalgas antes de su inmovilización (González y Bashan, 2000). También se ha observado que mutantes de *A. brasilense* que no producen suficiente ácido indolacético fallan en

incrementar el crecimiento y el metabolismo de las microalgas (de-Bashan y Bashan, 2008b). Otro mecanismo celular relacionado es el incremento en la actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en las microalgas, *v. gr.* la glutamato deshidrogenasa y la glutamino sintetasa (de-Bashan y Bashan, 2008c).

Se ha observado que los efectos negativos por la falta de nutrientes en cultivos de *Chlorella* sp., pueden ser mitigados al coinmovilizar la microalga con *A. brasilense* (Hernández *et al.*, 2006). Esto puede explicar porque la fase de adaptación del tratamiento de coinmovilización de *S. elongatus* con *A. brasilense*, haya sido de un día como en los tratamientos con células de *S. elongatus* en forma libre. Es posible que *A. brasilense* haya mitigado el estrés en *S. elongatus* debido a la inmovilización. González y Bashan (2000) coinmovilizaron durante seis días a *C. vulgaris* con *A. brasilense* en medio "agua residual sintética", al comparar el crecimiento de *C. vulgaris* coinmovilizada con *C. vulgaris* inmovilizada al final del experimento, encontraron que el crecimiento de la microalga coinmovilizada fue tres veces mayor que en la inmovilización de la microalga en solitario. de-Bashan *et al.* (2004) coinmovilizaron a *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* con *A. brasilense* en agua residual doméstica, encontraron que la población de bacterias incrementó significativamente el crecimiento de las dos especies de *Chlorella*, en comparación con los tratamientos donde sólo inmovilizaron a las microalgas. de-Bashan y Bashan (2008a) indican que el efecto más notorio de la coinmovilización es que la población de la microalga aumenta significativamente de dos a tres veces en comparación a la inmovilización de solamente las microalgas, lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

VI.3.5.- Cuantificación de clorofila *a*

El crecimiento de los cultivos microalgales es expresado usualmente como el incremento de la cantidad de biomasa, número de células, peso seco y la cantidad de pigmentos, en un periodo de tiempo. La evolución del contenido celular de pigmentos a lo largo del tiempo de cultivo sigue tendencias diferentes no sólo en función de la especie, sino además del aporte de nutrientes en el medio y de los factores medioambientales (Jiménez-Estrada, 2011). La determinación espectrofotométrica de las concentraciones de pigmentos se ha propuesto como un método rápido para conocer el crecimiento microalgal. Es común encontrar elevadas producciones de clorofila *a* en células microalgales inmovilizadas debido al efecto "pantalla" de la matriz de inmovilización (Lau *et al.*, 1998; Pane *et al.*, 1998), por lo tanto este proceso debe de ser tomado en cuenta cuando se estima la cantidad de biomasa mediante la cuantificación de clorofila *a*. En este trabajo se

encontró una producción aproximadamente del triple de clorofila *a* en los tratamientos con células de *S. elongatus* inmovilizadas respecto a los tratamientos con células libres de *S. elongatus*. Sin embargo, la mayor producción de clorofila *a* se obtuvo en los tratamientos con células de *S. elongatus* y *A. brasilense* coinmovilizadas, los cuales duplicaron la producción de clorofila *a* de los tratamientos donde se inmovilizó solamente a la cianobacteria. El mayor contenido de clorofila *a*, es atribuido a un mecanismo de compensación al autosombreado y a una limitación de la penetración de la luz debido a la matriz polimérica. (Tamponnet *et al.*, 1985; Trevan y Mak, 1988; Lau *et al.*, 1997; Pane *et al.*, 1998). En otras investigaciones realizadas con células de microalgas y de cianobacterias inmovilizadas, se encontró que al estar las células confinadas dentro de la matriz de alginato, se produce un efecto de atenuación y de empaquetamiento celular principalmente en el centro de la cápsula, causando que disminuya el paso de la luz hacia el interior de la cápsula. Por lo anterior, se produce un cambio en el sistema fotosintético y se incrementan los centros de reacción como estrategia para utilizar la baja cantidad de luz (Lau *et al.*, 1998; Aguilar-May, 2006; Ruíz-Marín *et al.*, 2011). Algunos autores concluyen que la evaluación de la concentración de clorofila *a*, no es un buen estimador del crecimiento para comparar el crecimiento de células libres respecto de células inmóviles. Se ha evaluado que el contenido de clorofila *a* en cultivos de células inmovilizadas es mayor que en los cultivos de células libres y esto causa una sobrestimación de la biomasa microalgal cultivada (Lau *et al.*, 1997; Pane *et al.*, 1998). Por otra parte en los tratamientos de coinmovilización se ha observado un fenómeno en el que la producción de clorofila *a* aumenta significativamente. González y Bashan (2000) coinmovilizaron durante seis días a *C. vulgaris* con *A. brasilense* en medio "agua residual sintética" y obtuvieron una mayor producción de clorofila *a* cuando coinmovilizaron *C. vulgaris* con *A. brasilense*, en comparación con solamente la inmovilización de *C. vulgaris*. de-Bashan *et al.* (2002b) coinmovilizaron en esferas de alginato a *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* cada una con *A. brasilense*. Para ambas especies de microalgas obtuvieron una producción de clorofila *a* 50% mayor en los cultivos coinmovilizados en comparación con los que solamente inmovilizaron a las microalgas.

La concentración de clorofila *a* en el presente trabajo con células inmovilizadas fue mayor y concuerda con lo descrito por Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) quienes obtuvieron una mayor producción de clorofila *a* en los cultivos inmovilizados de *S. elongatus* comparados con los cultivos de células libres. Los resultados para los tratamientos de coinmovilización en este trabajo, presentaron la tendencia de tener una mayor producción de clorofila *a* en comparación con los

tratamientos en los que se inmoviliza sólo a las células de microalgas, como ha sido reportado en otros trabajos (González y Bashan, 2000; de-Bashan *et al.*, 2002b). Por último es evidente que la síntesis de clorofila *a* en las células inmovilizadas en distintos tipos de polímeros, cambiará con base en la capacidad fisiológica de las células microalgales para adaptarse al microambiente causado por la matriz y a las características del polímero utilizado para la inmovilización.

V.4.- Evaluación del crecimiento de *A. brasilense*

Hasta donde se conoce existen pocos trabajos en la literatura relacionados con la coinmovilización de microalgas con bacterias como *A. brasilense* y que describan el crecimiento de la población de las bacterias durante el tiempo de cultivo (Hernández *et al.*, 2009; Covarrubias *et al.*, 2012).

En este trabajo se observó un crecimiento exponencial por parte de *A. brasilense* hasta el segundo día, después se observó una disminución progresiva en el crecimiento hasta el final del experimento. Los tratamientos con células libres mostraron un mayor crecimiento respecto al tratamiento con células coinmovilizadas. Una posible explicación a este resultado es, que se ha observado que el proceso de inmovilización reduce el número de células de *A. brasilense* en las esferas, por lo que algunos estudios indican que es necesaria una segunda incubación en caldo nutritivo diluido después del proceso de coinmovilización (de-Bashan *et al.*, 2002a; de-Bashan *et al.*, 2004). Esta indicación de una incubación de las células coinmovilizadas no se hizo en este trabajo, por lo que puede ser la explicación de las bajas densidades de bacterias evaluadas en los cultivos coinmovilizados. Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Covarrubias *et al.* (2012) que cultivaron de forma libre células de *A. brasilense* en agua residual estéril y no estéril. Observaron una reducción progresiva en la concentración celular de las bacterias en el medio, mientras que al coinmovilizar *C. sorokiniana* con *A. brasilense* encontraron igualmente una reducción progresiva en la concentración de las bacterias dentro de las esferas de alginato. Hernández *et al.* (2009) coinmovilizaron en alginato células de *Bacillus pumilus* y *C. vulgaris* en medio "agua residual sintética" y detectaron un crecimiento constante de la población de las bacterias hasta las 72 horas, después de este tiempo se presentó una disminución progresiva en la concentración celular de las bacterias. Este fenómeno de la disminución en la concentración celular de las bacterias tal vez se deba a la falta de una fuente de carbono que las bacterias puedan utilizar como nutriente para su crecimiento.

V.5.- Liberación de células al medio

La matriz de alginato tiene la desventaja de presentar baja estabilidad en presencia de citratos y fosfatos (Kierstan y Coughlan, 1985), así como en agua de mar ya que los cationes monovalentes principalmente sodio pueden sustituir los cationes divalentes de calcio (Moreno-Garrido, 2008). Por lo tanto, el tiempo de retención de las células en las esferas es limitado debido al aumento de la biomasa de células y al desgaste de la pared de la matriz, por lo que se ha investigado distintos tipos de tratamientos para mejorar la matriz de alginato. Entre ellos se encuentran los recubrimientos con otros polímeros (Pérez-Coutiño, 2011; Flores-Páez, 2011), la recalcificación del polímero con CaCl_2 (Jiménez-Estrada, 2011) y el endurecimiento con otros cationes divalentes como el estroncio (Moreno-Garrido, 2008).

En este trabajo se observó que la liberación celular de *S. elongatus* comenzó al sexto día (15 cél/mL), para al final del experimento en el octavo día la liberación celular fue elevada en comparación con el sexto día (400 cél/mL). Otros trabajos han presentado la misma tendencia de liberar células de microalgas al medio de cultivo, generalmente a partir del séptimo día en adelante. Jiménez-Estrada (2011) inmovilizó *Dunaliella tertiolecta* en alginato y observó que la liberación celular comenzó a ser significativa al octavo día. Flores-Páez (2011) inmovilizó *Scenedesmus* sp. en alginato con distintos tiempos de calcificación y encontró, en general, una liberación celular significativa en todos los tratamientos al décimo día. Por lo tanto, es necesario realizar diferentes tratamientos para mejorar la matriz de inmovilización de tal manera que adquiera un mayor tiempo de retención celular.

V.7.- Peso seco, de cenizas y orgánico

La medición gravimétrica del peso seco orgánico microalgal, es uno de los métodos directos utilizados para evaluar la producción de biomasa. Para determinar el peso seco orgánico de una muestra de microalga, se puede partir de una fase de crecimiento específica, o bien, una vez que las células alcancen un estado estable éstas se cosechan. En este trabajo se obtuvo, como se esperaba, un mayor peso seco orgánico en el tratamiento de coinmovilización. Sin embargo, una buena parte del peso seco orgánico (95%) pertenece a las esferas de alginato. Pérez-Coutiño (2011) obtuvo resultados similares a los encontrados en este trabajo, cuando evaluó el peso seco orgánico de *C. vulgaris* en forma libre, inmovilizada en alginato y al ser inmovilizada en alginato con recubrimiento de quitosano. Encontró diferencias significativas entre los tres tratamientos, siendo el

tratamiento de inmovilización en alginato con recubrimiento de quitosano el de mayor peso, seguido del tratamiento de inmovilización en alginato y menor en el tratamiento de células libres en el medio. Lo anterior, parece indicar que la matriz polimérica aporta una buena parte del valor del peso seco orgánico en la cuantificación de la biomasa microalgal. Jiménez-Valera (2008) cultivó de forma libre a *S. elongatus* en medio "2f" y obtuvo valores de peso seco orgánico menores a los obtenidos en este trabajo. Se ha evaluado que el peso seco orgánico cambia por efecto del aporte de nitrógeno en el medio y de la fase de crecimiento, aunque no se pueden establecer patrones comunes para las diferentes especies (Flores-Páez, 2011).

V.8.- Valores del pH

El pH del medio de cultivo es uno de los parámetros importantes en la remoción de nutrientes, ya que al aumentar el pH a valores mayores de 9 puede existir una pérdida de nitrógeno por volatilización del amonio y pérdida de fósforo por precipitación (Azov y Shelef, 1987; Mallick, 2002). Algunos autores mencionan que valores de pH entre 6 y 8 favorecen una remoción eficiente de nutrientes (Mallick y Rai, 1993; 1994). Sin embargo, cada organismo tiene requerimientos específicos de pH, las cianobacterias requieren valores de pH alcalinos para un mejor crecimiento y por lo tanto una mayor actividad metabólica la cual se traduce en una mayor remoción de nutrientes (Fogg *et al.*, 1973). En este trabajo se encontró una ligera disminución del pH en el tratamiento que sirvió como control experimental que consistió en sólo usar medio "2f" y en el tratamiento usado como control que consistió solamente en esferas de alginato sin células, por otra parte en todos los tratamientos con células hubo un aumento en los valores de pH entre 8.4 a 9.0. Cuando en un cultivo se utiliza el amonio o nitratos como aporte de nitrógeno, se modifican los valores de pH, si las células consumen nitratos se incrementa el pH en el medio (Fogg y Thake, 1987). Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) reportan un incremento en los valores de pH de todos los tratamientos, tanto en células libres como inmovilizadas de *S. elongatus*, de 7.8 a 8.8, al final del experimento, mientras que para los tratamientos control, que fueron similares a los de este trabajo, el pH subió sólo a 7.9. Pérez-Coutiño (2011) obtuvo resultados con una tendencia similar a los de este trabajo en su estudio con *C. vulgaris*, reportó un valor de pH inicial (7.9) similar entre todos los tratamientos. Para los tratamientos control, que fueron similares a los de este trabajo, los valores de pH se incrementaron entre 8.2 y 8.5, al final del experimento, por otra parte los tratamientos con células libres e inmovilizadas alcanzaron valores de pH de 9.2 al final del experimento debido al crecimiento de la población microalgal.

V.9.- Remoción de nutrientes

El uso de tratamientos biológicos para depurar las aguas de desecho que se generan por distintas actividades humanas se ha intensificado en los últimos años, principalmente en los países industrializados o en desarrollo. La necesidad de hacer más eficientes los procesos de producción ya sea en la industria, la agricultura y la acuicultura, ha generado que sus efluentes sean cada vez más ricos en nutrientes principalmente en nitrógeno y fósforo, que pueden causar la eutrofización de las aguas receptoras. Existen tratamientos físicos y químicos para las aguas de desecho, sin embargo son costosos, algunos son poco eficientes y algunos pueden causar problemas secundarios de contaminación (Mohn, 1988; Oswald, 1988). Los tratamientos biológicos, entre ellos la biotecnología solar a través del uso de microalgas y cianobacterias, es uno de los tratamientos con mayor potencial, ya que además, como resultado del proceso se genera biomasa la cual puede ser aprovechada para varios propósitos en la acuicultura y la biotecnología (de la Noüe y de Pauw, 1988).

La eficiencia de la remoción de nutrientes con microalgas y cianobacterias es influenciada por una gran variedad de factores, los más importantes son la cantidad de luz incidente en el cultivo, la concentración de nutrientes, la forma molecular de los nutrientes, la temperatura de cultivo, el pH, la disponibilidad de carbono, la especie de microorganismo a utilizar, las condiciones de cultivo en las que se encontraba la especie antes de ser utilizada para remover nutrientes, la concentración celular en el medio de cultivo, entre otros (Garbisu *et al.*, 1992; Jeanfils *et al.*, 1993; Mallick y Rai 1993; Urrutia *et al.*, 1995; Donald *et al.*, 1997). A la remoción de nutrientes con células inmovilizadas, se suman factores tales como el tipo de matriz polimérica utilizada, el tipo y técnica de inmovilización, la concentración del polímero utilizado y el diámetro de la matriz polimérica, entre otros (Mallick y Rai, 1994; Tam y Wong, 2000; Mallick, 2002).

V.9.1- Fósforo

En la actualidad el principal proceso comercial para remover fósforo de efluentes de aguas residuales es la precipitación química mediante la adición de sales de iones metálicos de valencia múltiple que forman precipitados de fosfatos poco solubles, las sales más comunes son las de calcio, aluminio y hierro (Donnert y Salecker, 1999; Penetra *et al.*, 1999). Y en menor medida la remoción biológica (de-Bashan y Bashan, 2010).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la remoción de fósforo fue más eficiente que la remoción del nitrógeno, lo cual es una ventaja para el uso

potencial de *S. elongatus*, porque en general la remoción de fósforo es un proceso más lento con respecto a la remoción del nitrógeno (Syrett, 1981). La remoción de fósforo está relacionada a un desbalance en la razón de la relación N : P, donde el nitrógeno se torna limitante y por lo tanto cesa la incorporación del fósforo (Chevalier y de la Noüe 1985a; Mallick, 2002). La remoción de fósforo con *S. elongatus* fue más eficiente en los cultivos con células libres, comparada con la de las células inmovilizadas y es posible que esto se deba al estado fisiológico de la cianobacteria después del proceso de inmovilización y a las características de la especie por acumular fosfatos. Comparando los tratamientos con células libres y los tratamientos con células inmovilizadas, las células suspendidas en el medio por lo general alcanzan mayores tasas de remoción, este fenómeno puede ser justificado por una resistencia adicional en la transferencia de nutrientes debido a la matriz de inmovilización (Pires *et al.*, 2013). Los porcentajes de remoción de fosfatos evaluados en este trabajo (< al 60%) resultan menores a los encontrados por Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) para *S. elongatus* en cultivos de células libres (89%) e inmovilizadas en quitosano (78%). Sin embargo, los autores indican que la matriz de quitosano pudo contribuir a la remoción de fosfatos debido a la liberación de iones de calcio de la matriz de quitosano que provocó una precipitación química de los fosfatos. Zamani *et al.* (2012) inmovilizaron siete especies de microalgas en alginato, entre ellas *Synechococcus* sp. y obtuvieron resultados similares a los de este trabajo. Encontraron que la matriz de alginato tiene una capacidad de remoción de fosfatos del 25%, cercana a la que se obtuvo en este trabajo (30%). Esto podría deberse a la continua precipitación de fosfatos, ya que los fosfatos al igual que los citratos tienen una gran afinidad por los iones de calcio. Por lo tanto, los fosfatos secuestran los iones de calcio de la matriz de alginato y se precipitan. En este mismo trabajo (Zamani *et al.*, 2012), se obtuvo una remoción de fosfatos al octavo día del 32% en los cultivos inmovilizados de *Synechococcus* sp., la cual es menor a la obtenida en este trabajo (40%). Como se esperaba los tratamientos coinmovilizados tuvieron una mayor capacidad de remoción de fosfatos (45%), lo cual coincide con lo reportado en otros estudios de coinmovilización (de-Bashan *et al.*, 2002a; de-Bashan *et al.*, 2004). de-Bashan *et al.* (2004) evaluaron la capacidad de remoción de nutrientes en aguas residuales utilizando *C. vulgaris* y *C. sorokiniana* de forma inmovilizada y de forma coinmovilizada con *A. brasilense*. Después de seis días encontraron una mayor remoción de fósforo en los tratamientos coinmovilizados (36%), en comparación con los inmovilizados (19%). La mayor remoción de fósforo con *S. elongatus* en este trabajo (57%) no fue tan eficiente respecto a la evaluada en otros estudios (> al 60%) (Pires *et al.*, 2013). Sin embargo, en los trabajos que obtuvieron altas remociones de fósforo, las células fueron puestas en inanición antes de comenzar

los experimentos de remoción de nutrientes. Cuando el fósforo es limitante y luego se encuentra disponible en exceso, la célula lo acumula en el citoplasma, un proceso de acumulación de nutrientes que Droop (1968) llamó "consumo de lujo". Hernández *et al.* (2006) evaluaron la limitación de fósforo en dos especies de *Chlorella* previo a su coinmovilización con *A. brasilense*. Encontraron que la limitación de fósforo tuvo un efecto sinérgico en la remoción de fosfatos, además que los efectos negativos en el crecimiento, a causa de la limitación, fueron mitigados por la población de bacterias de *A. brasilense*.

V.9.2.- Nitrógeno

Los resultados de remoción de nitrógeno total por células inmovilizadas en el presente trabajo fueron menores (< al 1%), respecto a los valores encontrados por otros autores (> al 40%) (Mallick, 2002; de-Bashan y Bashan, 2010; Moreno-Garrido, 2008; Pires *et al.*, 2013). Sin embargo, estas diferencias en la capacidad de remoción se deben a las distintas concentraciones y formas químicas del aporte de nitrógeno que existan en el medio de cultivo, al tipo de polímero, la técnica de inmovilización, la capacidad de remoción según la especie de microalga, las condiciones de cultivo y el estado fisiológico de las células antes de comenzar la remoción de nutrientes (Faafeng *et al.*, 1994; Fierro-Reséndiz, 2004; Kaya y Picard, 1995; Omar, 1993). Algunos elementos esenciales para el crecimiento del fitoplancton existen en numerosas y diferentes formas químicas, siendo el nitrógeno particularmente un buen ejemplo de esto (Fogg y Thake, 1987).

V.9.2.1.- Nitratos

La ligera remoción de nitratos en la mayoría de los tratamientos fue similar (< al 1%). Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) evaluaron la capacidad de remoción de nitrógeno por parte de *S. elongatus* en forma libre e inmovilizada en quitosano, en un medio de cultivo "2f" similar al utilizado en este trabajo, pero con la excepción de que sustituyeron el nitrato de sodio por nitrato de amonio. Encontraron que la remoción de nitratos al séptimo día fue mayor en los tratamientos con células libres (45%) en comparación con los tratamientos con células inmovilizadas (39%). Mientras que para el amonio encontraron que en los tratamientos con células libres fue mayor la remoción (54%) en comparación con las células inmovilizadas (29%).

Algunas especies de *Synechococcus* pueden utilizar nitrógeno molecular, nitratos, nitritos, amonio, urea y algunos aminoácidos como único aporte de nitrógeno para su crecimiento (Collier *et al.*, 1999; Spiller y Shanmugam, 1987; Waterbury *et al.*,

1986). Aguilar-May (2006) evaluó el crecimiento de *S. elongatus* con el aporte de distintas formas químicas de nitrógeno. Encontró que los cultivos de *S. elongatus* mantenidos con nitrato de sodio mostraron un menor crecimiento, respecto al obtenido con urea como único aporte de nitrógeno. Con los resultados antes mencionados se pudo inferir que *S. elongatus* incorpora el nitrógeno de forma preferencial en el siguiente orden: urea, amonio y por último nitratos, cuando es cultivada en una concentración equivalente al medio "f". Se conoce que para el fitoplancton, la preferencia por determinados aportes de nitrógeno depende del estado de oxidación de la molécula de nitrógeno. Los nitratos tradicionalmente siguen siendo la mejor fuente de nitrógeno, pero debido a que los estados de oxidación están directamente relacionados con la energía requerida para su asimilación, es común que la mayoría de las microalgas utilicen amonio preferentemente. Ya que en la reducción completa del nitrato a glutamato, se emplea cinco veces más energía mientras que para la reducción de amonio a glutamato sólo se requiere de dos electrones (García-Fernández *et al.*, 2004).

Como ya se mencionó para el caso de los fosfatos, una alternativa para aumentar la remoción de nitratos podría ser la limitación de este nutriente, para provocar un estado de inanición de nitrógeno. Cuando las microalgas o cianobacterias son privadas temporalmente de uno o más elementos nutrimentales tales como el nitrógeno y el fósforo, se genera un cambio en los procesos metabólicos y al ser expuestas nuevamente a un medio rico en nutrientes la respuesta es la acumulación innecesaria de nutrientes (Kaya y Picard, 1995). Urrutia *et al.* (1995) encontraron que la limitación de nitrógeno incrementa significativamente la tasa de consumo de este nutriente en *Scenedesmus obliquus*. Como ya se mencionó anteriormente los posibles efectos negativos causados por la limitación de nitrógeno podrían ser mitigados al coinmovilizar *S. elongatus* con la bacteria *A. brasilense*. En la mayoría de los estudios de coinmovilización con bacterias promotoras de crecimiento para la remoción de nutrientes, sólo se ha evaluado el nitrógeno en forma de amonio. de-Bashan *et al.* (2005) evaluaron la capacidad de remoción de nitrógeno por parte de *C. vulgaris* inmovilizada con *A. brasilense* y encontraron que cuando suplementaban el medio "agua residual sintética" con un aporte de carbono la población de *A. brasilense* dentro de las esferas se incrementó, lo que provocó un efecto sinérgico en la capacidad de remoción de amonio por parte de los tratamientos coinmovilizados. Además, observaron que la población de la bacteria no remueve cantidades significantes de nitrógeno.

V.9.2.2- Nitritos

Los nitritos no forman parte de la formulación del medio "2f". El aumento en la concentración de nitritos obtenido en los tratamientos experimentales con *S. elongatus*, es comparable a los resultados obtenidos en otros trabajos. Aguilar-May y Sánchez-Saavedra (2009) obtuvieron una producción de 0.04 mg/L en los tratamientos con células de *S. elongatus* de forma libre e inmovilizada. Fierro *et al.* (2008) mencionan que durante la elaboración de las cápsulas se puede propiciar la proliferación de bacterias, por la falta de condiciones estériles y que la presencia de bacterias anaeróbicas puede aumentar la producción de nitritos por la falta de aireación. Cabe destacar que los cultivos de *S. elongatus* mantenidos en las distintas condiciones experimentales en este trabajo se tuvieron sin aireación y únicamente se realizó una agitación manual cada día durante la colecta de muestras. Cruz-Fraga (2003) inmovilizó *Arthospira maxima* en esponjas de quitosano y el autor atribuye la producción de nitritos a la presencia de bacterias y a los procesos de transformación de las formas químicas del nitrógeno al ser utilizadas por las microalgas. La excreción de nitritos al medio de cultivo por distintas especies de cianobacterias ya ha sido estudiada, la excreción de nitritos al medio lo atribuyen a una limitación por CO₂ ocasionando un incremento de amoníaco intracelular, lo cual se debe a que el amoníaco ya no puede ser utilizado para formar moléculas nitrogenadas por la deficiencia de carbono (Suzuki *et al.*, 1995). Esto ocasiona un incremento de la concentración de nitritos intracelularmente. Altas concentraciones de nitritos intracelulares son tóxicas para las células, sin embargo, con la finalidad de mantener un equilibrio interno de la concentración de nitritos las células recurren al mecanismo de excreción de nitritos al medio (Reyes *et al.*, 1993).

Capítulo VII

Conclusiones

Es viable la coexistencia de la cianobacteria *Synechococcus elongatus* con la bacteria promotora de crecimiento vegetal *Azospirillum brasilense*. Ya sea de forma libre en el medio o coinmovilizadas en alginato.

Los cultivos de la cianobacteria *S. elongatus* tuvieron un mayor crecimiento al ser cultivado en conjunto con la bacteria *A. brasilense*, en la proporción 3:2 de cianobacteria-bacteria.

La técnica desarrollada para la coinmovilización de células vivas de *S. elongatus* con *A. brasilense*, permite que las células se reproduzcan con tasas de crecimiento similares a las obtenidas para células libres.

Los tratamientos coinmovilizados presentaron una fase de acondicionamiento menor a la de los tratamientos inmovilizados.

El contenido de clorofila *a* fue significativamente mayor en células de *S. elongatus* coinmovilizadas respecto a las células de *S. elongatus* en los tratamientos con células libres e inmovilizadas.

El contenido de peso seco orgánico fue mayor para los tratamientos con células inmovilizadas y coinmovilizadas con respecto a los tratamientos con células libres.

La liberación de células de *S. elongatus* comenzó a darse al sexto día de cultivo para los tratamientos con células inmovilizadas y coinmovilizadas.

Los cultivos de la cianobacteria *S. elongatus* pueden ser utilizados para la biorremediación de efluentes agroindustriales, ya que tienen una alta tasa de remoción de fosfatos.

Se demostró que la bacteria *A. brasilense* es una bacteria promotora de crecimiento microalgal para la cianobacteria *S. elongatus*.

Se demostró que la asociación artificial entre *S. elongatus* y *A. brasilense* de forma libre o coinmovilizada, incrementa la capacidad de remoción de fosfatos de la cianobacteria.

Capítulo VIII

Recomendaciones

Realizar curvas de calibración para la determinación de la densidad celular tanto de la cianobacteria como de la bacteria.

Utilizar otras especies de microalgas y de cianobacterias para evaluar su respuesta fisiológica al mantener cultivos coinmovilizados con *A. brasilense*.

Realizar recubrimientos o entrecruzamientos a las esferas de alginato, para evitar ruptura de la pared por efecto del tiempo y aumento en la cantidad de biomasa microalgal.

Desarrollar una tecnología adecuada para la producción masiva de esferas de alginato con células inmovilizadas.

Agregar una fuente de carbono al medio, que pueda incrementar el crecimiento de *A. brasilense* dentro de las esferas de alginato.

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

Utilizar otro método para contar las células inmovilizadas, como el uso de un contador de partículas o un software especializado en el tema.

Obtener imágenes con microscopía electrónica de las cápsulas y de las células mantenidas en los distintos tratamientos de inmovilización para evaluar si existen cambios morfológicos y estructurales.

Realizar ensayos de remoción de nutrientes utilizando distintos aportes de nitrógeno por ejemplo urea o amonio.

Realizar análisis proximales para evaluar los cambios bioquímicos en *S. elongatus* a causa de la coinmovilización.

Literatura citada

Abed R.M.M. 2010. **Interaction between cyanobacteria and aerobic heterotrophic bacteria in the degradation of hydrocarbons.** Int. Biodeterior. Biodegrad. 64:58-64.

Aguilar-May, B., Sánchez-Saavedra, M.P. 2009. **Growth and removal of nitrogen and phosphorus by free-living and chitosan-immobilized cells of the marine cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.** J. Appl. Phycol. 21:353-360.

Aguilar-May, B. 2002. **Remoción de nutrientes con microalgas marinas en un medio equivalente al efluente tipo promedio de una granja camaronícola.** Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California, México. 104 pp.

Aguilar-May, B. 2006. **Inmovilización de células de la cianobacteria *Synechococcus* sp. para remover nutrientes de efluentes acuícolas.** Tesis de Doctorado. Posgrado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California México. 117 pp.

Arshad, M., Frankenberger, W.T. 1998. **Plant growth regulating substances in the rhizosphere: Microbial production and functions.** Adv. Agron. 62:45-151.

Asai T., Iizuka H., Komagata, K. 1964. **The flagellation and taxonomy of genera *Gluconobacter* and *Acetobacter* with reference to the existence of intermediate strains.** J. Gen. Appl. Microbiol. 10:95-126.

Azam, F. 1998. **Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens.** Science. 280:694-696.

Azov, Y., Shelef, G. 1987. **The effect of pH on the performance of the high-rate oxidation ponds.** Water Sci. Tech. 19:381-383.

Bashan, Y. 1998. **Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture.** Biotechnol. Adv. 16:729-770.

Bashan, Y., Holguin, G. 1997. ***Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances.** Can. J. Microbiol. 43:103-121.

Bashan, Y., Holguín G., Ferrera-Cerrato R. 1996. **Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera.** Terra 14:195-210.

Bashan, Y., de-Bashan, L.E. 2005. **Bacteria / Plant growth-promotion.** En: Hillel, D. (ed). **Encyclopedia of Soils in the Environment.** Elsevier, Oxford, U.K. 103-115 pp.

Becker, E.W. 1994. **Microalgae: Biotechnology and Microbiology.** Cambridge University Press, Cambridge. 293 pp.

Billini, M., Stamatakis, K., Sophianopoulou, V. 2008. **Two members of a network of putative Na/H antiporters are involved in salt and pH tolerance of the freshwater cyanobacterium *Synechococcus elongatus*.** J. Bacteriol. 190: 6318-6329.

Boonjawat, J., Chaisiri, P., Limpananont, J., Soontaros, S., Pongsawasdi, P., Chaopongpang, S., Pornpattkul, S., Wongwaitayakul, B., Sangduan, L. 1991. **Biology of nitrogen- fixing rhizobacteria.** Plant Soil. 137:119 -125.

Bowen, G.D., Rovira, A.D. 1999. **The rhizosphere and its management to improve plant growth.** Adv. Agron. 66:1-102.

Cañizares, R.O., Rivas, L., Montes, C., Dominguez, A.R., Travieso, L., Benitez, F. 1994. **Aerated swine wastewater treatment with carrageenan immobilized *Spirulina maxima*.** Bioresour. Technol. 47:89-91.

Chen, Y.C. 2003. **Immobilized *Isochrysis galbana* (Haptophyta) for long-term storage and applications for feed and water quality control in clam (*Meretrix lusoria*) cultures.** J. Appl. Phycol. 15:439-444.

Chevalier, P., de la Noüe, J. 1985a. **Efficiency of immobilized hyperconcentrated algae for ammonium and orthophosphorus removal from wastewater.** Biotechnol. Lett. 7:395-400.

Chevalier, P., de la Noüe, J. 1985b. **Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan.** Enzyme Microb. Technol. 7:621-624.

Chirac, C., Casadevall, E., Largeau, C., Metzger, P. 1985. **Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green algal *Botryococcus braunii*.** J. Phycol. 21:380-387.

Cohen, Y. 2001. **Biofiltration the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review.** Bioresour. Technol. 77:257-274.

Cole, J.J. 1982. **Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems.** Annu. Rev. Ecol. Syst. 13:291-314.

Collier, J.L., Brahamsha, B., Palenik, B. 1999. **The marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. WH7805 requires urease (urea amidohydrolase, EC3.5.1.5) to utilize urea as a nitrogen source: molecular-genetic and biochemical analysis of the enzyme.** Microbiology. 145:447-459.

Covarrubias, S.A., de-Bashan, L.E., Moreno, M., Bashan, Y. 2012. **Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 93:2669-2680.

Crowley, D.E., Wang, Y.C., Reid, C.P.P., Szaniszlo, P.J. 1991. **Mechanisms of iron acquisition from siderophores by microorganisms and plants.** Plant Soil. 130:179-198.

Cruz-Fraga, C.E. 2003. **Uso de la cianobacteria *Arthrospira maxima* para remover macronutrientes de efluentes producidos por cultivos.** Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 83 pp.

de-Bashan, L.E., Antoun, H., Bashan, Y., 2005. **Cultivation factors and population size control uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** FEMS Microbiol. Ecol. 54:197-203.

de-Bashan, L. E., Bashan, Y. 2008a. **Bacterias promotoras de crecimiento en plantas y microalgas verdes: un modelo conveniente para el estudio básico de las interacciones planta-bacteria.** En: Cassán F.D. y García de Salomone I. (eds.). *Azospirillum* sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. 276 pp.

de-Bashan, L.E., Antoun, H., Bashan, Y., 2008b. **Involvement of indole-3-acetic-acid produced by the growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. in promoting growth of *Chlorella vulgaris*.** J. Phycol. 44:938-947.

de-Bashan, L.E., Magallon, P., Antoun, H., Bashan, Y. 2008c. **Role of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in *Chlorella vulgaris* during assimilation of ammonium when jointly immobilized with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** J. Phycol. 44:1188–1196.

de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2010. **Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects.** Bioresour. Technol. 6:1611-1627.

de-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernández, J.P., Bashan, Y. 2002a. **Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** Water Res. 36:2941-2948.

de-Bashan, L.E., Bashan, Y., Moreno, M., Lebsky, V.K., Bustillos, J.J. 2002b. **Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** Can. J. Microbiol. 48:514–521.

de-Bashan, L.E., Hernández, J.P., Morey, T., Bashan, Y. 2004. **Microalgae growth promoting bacteria as “helpers” for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater.** Water Res. 38:466-474.

de la Noüe, J., de Pauw, N., 1988. **The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae .** Biotechnol. Adv. 6:725–770.

de la Noüe, J., Proulx, D., 1988. **Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan immobilized *Phormidium*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 29:292–297.

Döbereiner, J., Urquiaga, S., Boddey, R.M., Ahmad, N. 1995. **Alternatives for nitrogen of crops in tropical agriculture. Nitrogen economy in tropical soil.** Fertil. Res. 42:339-346.

Donald, K.M., Scanlan, D.J., Carr, N.G., Mann, N.H., Joint, I. 1997. **Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*.** J. Plankton Res. 12:1793-1813.

Donnert, D., Salecker, M. 1999. **Elimination of phosphorus from waste water by crystallization**. Environ. Technol. 20:735–742.

Droop, M.R. 1968. **Vitamin B-12 and marine ecology: IV. The kinetics of uptake, growth and inhibition in *Monochysis lutheri***. J. Mar. Biol. Assoc. UK. 48:689-733.

Elmerich, C., Zimmer, W., Vielle, C. 1992. **Associative nitrogen fixing bacteria**. 212-258 pp. En: Stacey, G., Burris, R.H. y Evans, H.J. (eds.). **Biological Nitrogen Fixation**. Chapman and Hall. New York. 943 pp.

Faafeng, B.A., Van Donk, E., Källqvist, S.T. 1994. **In situ measurement of algal growth potential in aquatic ecosystems by immobilized algae**. J. Appl. Phycol. 6:301–308.

Fierro-Reséndiz, S. 2004. **Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de nutrientes en efluentes de cultivos acuícolas**. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 103 pp.

Fierro-Reséndiz, S., Sánchez-Saavedra, M.P., Copalcúa, C. 2008. **Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus***. Bioresour. Technol. 99:1274-1279.

Flores-Páez, L.M. 2011. **Microalgas inmovilizadas con distintos tipos de recubrimiento para su potencial uso en la remoción de nutrientes de efluentes de cultivos acuícolas**. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 91 pp.

Fogg, G.E., Stewart, W.D.P., Fay, P., Walsby, E. 1973. **The Blue-Green Algae**. Academic Press. London. 437 pp.

Fogg, G.E., Thake, B.J. 1987. **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**. University of Wisconsin Press, London. 269 pp.

Garbayo, I., Braban, C., Lobato, M.V., Vilchez, C. 1996. **Nitrate uptake by immobilized growing *Chlamydomonas reinhardtii* cells**. En: Wijffels, R.H., Buitelaar, R.M., Bucke, C. y Tramper, J. (eds.). **Immobilized Cells: Basics and Applications**. Elsevier Science B.V. 410–415 pp.

Garbisu, C., Hall, D.O., Serra, J.L. 1992. Nitrate and nitrite uptake by free-living and immobilized N-started cells of *Phormidium laminosum*. J. Appl. Phycol. 4: 139-148.

García-Fernández, J.M., Tandeau de Marsac, N., Diez, J. 2004. Streamlined regulation and gene loss as adaptive mechanisms in *Prochlorococcus* for optimized nitrogen utilization in oligotrophic environments. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:630-638.

Garg, S.K., Bhatnagar, A. 1999. Effect of *Azospirillum* and *Azotobacter* inoculation on pond productivity and fish growth under fresh water conditions. Indian J. Microbiol. 39:227-233

González, L.E., Bashan, Y. 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 4:1527-1531.

Guillard, R.L.L., Ryther, J.H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). Gran. Can. J. Microbiol. 8:229-239.

Han, P., Vijayaraghavan, K., Reuben, S., Estrada, E.S., Joshi U.M. 2013. Reduction of nutrient contaminants into shallow eutrophic waters through vegetated treatment beds. Water Sci. Technol. 6:1280-1287.

Hartman, A., Zimmer, W. 1994. Physiology of *Azospirillum*. En: Okon, Y. (ed). *Azospirillum / Plant Associations*. CRC Press. Boca Raton, FL. 15-39 pp.

Hernández, J.P., de-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. Enzyme Microb. Technol. 38:190–198.

Hernández, J.P., de-Bashan, L.E., Rodriguez, D.J., Rodriguez, Y., Bashan, Y. 2009. Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from aridzone soils. Eur. J. Soil Biol. 45:88–93.

Hirayama, S., Hirayama, K. 1997. Application of a growth-promoting bacteria for stable mass culture of three marine microalgae. Hydrobiology. 358:223-230.

Ikeya, T., Ohki, K., Takahashi, M., Fujita, Y. 1997. **Study on phosphate uptake of the marine cyanophyte *Synechococcus* sp. NIBB 1071 in relation to oligotrophic environments in the open ocean.** Mar. Biol. 129:195-202.

Jeanfils, J., Thomas, D. 1986. **Culture and nitrite uptake in immobilized *Scenedesmus obliquus*.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 24:417-422.

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.

Jiménez-Estrada, M.Y. 2011. **Evaluación del crecimiento, composición bioquímica y fotosíntesis de *Dunaliella tertiolecta* en cultivos con células libres e inmovilizadas para su potencial uso en la remoción de nutrientes de aguas residuales acuícolas.** Tesis de Licenciatura. Universidad de Occidente. Guasave, Sinaloa. México. 53 pp.

Jiménez-Pérez, M.V., Sánchez-Castillo, P., Romera, O., Fernández-Moreno, D., Pérez-Martínez, C. 2004. **Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure.** Enzyme Microb. Technol. 34: 392-398.

Jiménez-Valera, S. 2008. **Remoción de nutrientes inorgánicos con microalgas coinmovilizadas en quitosano.** Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias en Acuicultura. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada, Baja California, México. 103 pp.

Karydis, M., Kitsiou, D. 2012. **Eutrophication and environmental policy in the Mediterranean Sea: a review.** Environ. Monit. Assess. 8:4931-4984.

Kaya, V.M., Picard, G. 1995. **The viability of *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on alginate screens following nutrient starvation in air at 100% relative humidity.** Biotechnol. Bioeng. 46:459-464.

Kaya, V.M., Picard, G. 1996. **Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cells immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater.** Bioresour. Technol. 56:147-155.

Kierstan M.P.J. y M.P. Coughlan. 1985. **Immobilization of cells and enzymes by gel entrapment.** 39-48. En: Woodward, J. (Ed.). **Immobilized Cells and Enzymes: A Practical Approach.** IRL. Oxford. 177 pp.

Kolot, F.B. 1988. **Principles, techniques and industrial Applications.** En: Robert, E. (ed.). **Immobilized Microbial Systems.** Krieger, New York. 206 pp.

Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1997. **Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*.** Environ. Technol. 18:945–951.

Lau, P.S., Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 1998. **Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*.** Bioresour. Technol. 63:115-121.

Lebsky, V.K., González-Bashan, L.E., Bashan, Y. 2001. **Ultraestructure of interaction in alginate beads between the microalga *Chlorella vulgaris* with its natural associative bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* and with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*.** Can. J. Microbiol. 47:1-8.

Lee, C.M., Lu, C., Lu, W.M., Chen, P.C. 1995. **Removal of nitrogenous compounds from wastewaters using immobilized cyanobacteria *Anabaena* CH3.** Environ. Technol. 16:701–713.

Liu, J., Lewitus, A.J., Brown, P., Wilde, S.B. 2008. **Growth-promoting effects of a bacterium on raphidophytes and other phytoplankton.** Harm. Algae. 7:1-10.

Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., Espinosa-Victoria, D. 2004. **Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión.** Terra Latinoam. 2:225-239.

Mallick, N. 2002. **Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review.** Biometals. 15:377-390.

Mallick N., Rai, L.C. 1993. **Influence of culture density, pH, organic acids and divalent cations on the removal of nutrients and metals by immobilized *Anabaena doliolum* and *Chlorella vulgaris*.** World J. Microbiol. Biotechnol. 9:196-201.

Mallick, N., Rai, L.C. 1994. **Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae.** World J. Microbiol. Biotechnol. 10:439–443.

Matsunaga, T., Noriyuki, N., Naoko, T., Hiroyuki, T. 1988. **Selective production of glutamate by an immobilized marine blue-green alga, *Synechococcus* sp.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 28:373–376.

Megharaj, M., Pearson, H.W., Venkateswarlu, K. 1992. **Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil.** Enzyme Microb. Technol. 14:656–658.

Mohn, F.H. 1988. **Harvesting of microalgal biomass.** En: Borowitzka M.A. y L.J. Borowitzka, (eds.). **Micro-algal Biotechnology.** New York, Cambridge University Press. 395-414 pp.

Mora, R., Ortiz, N., Clemente, Y., Bermúdez, J., Avendaño, D., Morales, E. 2002. **Efecto del nitrato, irradiancia y salinidad sobre la producción de clorofila “a” de microalgas cultivadas y aisladas en la región noroccidental de Venezuela.** Oceanología. 17:73-83.

Moreno-Garrido, I. 2008. **Microalgae immobilization: Current techniques and uses.** Bioresour. Technol. 99:3949-3964.

Mouguet, J., Dakhama, A., Lavoie, M.C., Noüe, J. 1995. **Algal growth enhancement by bacteria: is consumption of photosynthetic oxygen involved?** FEMS Microbiol. Ecol. 18:35-44.

Omar, S.H. 1993. **Oxygen diffusion through gels employed for immobilization in the presence of microorganisms.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 40:173–181.

Oswald, W.J. 1988. **Micro-algae and waste-water treatment.** En: Borowitzka, M.A. y Borowitzka, L.J. (eds.). **Micro-algal Biotechnology.** Cambridge University Press, Cambridge. 305-328 pp.

Owens, O.H., Esaias, W.E. 1976. **Physiological responses of phytoplankton to major environmental factors.** Annu. Rev. Plant Physiol. 27:461-483.

Pane, L., Feletti, M., Bertino, C., Carli, A. 1998. **Viability of the marine microalga *Tetraselmis suecica* grown free and immobilized in alginate beads.** Aquac. Int. 6:411-420.

Parker, B.C., Bold, H.C. 1996. **Biotic relationships between soil algae and other microorganisms.** Limnol. Oceanogr. 25:943-948.

Parsons, T.R., Maita, Y., Lalli, C.M. 1984. **A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis.** Pergamon Press, Oxford. 173 pp.

Pérez-Coutiño, M.D. 2011. **Remoción de nutrientes y fotosíntesis de *Chlorella vulgaris* inmovilizadas en alginato y recubiertas con quitosano.** Tesis de Licenciatura en Ingeniero Biotecnólogo. Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México. 25 pp.

Penetra, R.G., Reali, M.A.P., Foresti, E., Campos, J.R., 1999. **Post-treatment of effluents from anaerobic reactor treating domestic sewage by dissolved-air flotation.** Water Sci. Technol. 40:137–143.

Pires, J.C.M., Alvim-Ferraz, M.C.M., Martins, F.G., Simoes, M. 2013. **Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture.** Environ. Sci. Pollut. Res. 20:5096–5105.

Postel, S.L., Carpenter, S.R. 1997. **Freshwater ecosystem services.** 195-214. En: G. Daily (ed.). **Nature's services.** Island Press. Washington, DC, USA.

Reyes, J.C., Chávez S., Muro-Pastor, M.I., Candau, P., Florencio, F.J. 1993. **Effect of glucose utilization on nitrite excretion by the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803.** Appl. Environ. Microbiol. 59:3161-3163.

Riquelme, C.E., Avendaño-Herrera, R.E. 2003. **Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura.** Rev. Chil. Hist. Nat. 76: 725-736.

Robinson, P.K. 1995. **Effect of pre-immobilization conditions on phosphate uptake by immobilized *Chlorella*.** Biotechnol. Lett. 17:659–662.

Robinson, P.K., Mak, A.L., Trevan, M.D. 1986. **Inmobilized algae: A review.** Process Biochem. 21:122-127.

Robinson, P.K., Reeve, J.O., Goulding, K.H. 1988. **Kinetics of phosphorus uptake by immobilized *Chlorella*.** Biotechnol. Lett. 10:17–20.

Romo, S., Pérez-Martínez, C. 1997. **The use of immobilization in alginate beads for long-term storage of *Pseudanabaena galeata* (Cyanobacteria) in the laboratory.** J. Phycol. 33:1073-1076.

Rosales, N., Jonte, L., Morales, E. 2006. **Crecimiento y composición bioquímica de *Synechococcus* sp. modulados por nitrato de sodio.** Bol. Cent. Invest. Biol. 40:120-132.

- Ruiz-Marín, A., Mendoza-Espinosa, L.G., Sánchez-Saavedra, M.P. 2011. **Photosynthetic characteristics and growth of alginate-immobilized *Scenedesmus obliquus***. *Agrociencias*. 45:303-313.
- Sasikala, C.H., Ramana, C.H.V. 1994. **Growth and H₂ production by *Synechococcus* spp. using organic/inorganic electron donors**. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 10:531-533.
- Scalan, D.J. 2003. **Physiological diversity and niche adaptation in marine *Synechococcus***. *Adv. Microbiol. Physiol.* 47:1-64.
- Smidsrød, O., Skjåk-Bræk, G. 1990. **Alginate as immobilization matrix for cells**. *Trends Biotechnol.* 8:71-78.
- Smith, V.H. 2003. **Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems**. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2:126-139.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. 1979. **Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica**. H. Blume Ediciones, España. 832 pp.
- Sorokin, C. 1973. **Dry weight, packed cell volume and optical density**. En: J.R. Stein (ed.). **Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements**. Cambridge University Press. New York. 448 pp.
- Spiller, H., Shanmugam, K.T. 1987. **Physiological conditions for nitrogen fixation in a unicellular marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain SF1**. *J. Bacteriol.* 12:5379-5384.
- StatSoft, Inc. 2004. **Statistica for Windows** [computer program manual].Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 23000 East 14th Street, Tulsa OK 74104, Phone: (918) 749-111-, Fax: (918) 749-2217.
- Subashchandrabose, S.R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., Naidu, R. 2011. **Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria: biotechnological potential**. *Biotechnol. Adv.* 6:896-907.
- Suzuki, I., Horie, N., Sugiyama, T., Omata. 1995. **Identification and characterization of two nitrogen-regulated genes of the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 required for maximum efficiency of nitrogen assimilation**. *J. Bacteriol.* 177:290-296.

- Syrett, P.J. 1981. **Nitrogen metabolism of microalgae**. En: Platt, T. (ed.). **Physiological Bases of Phytoplankton Ecology**. Dep. Fish. Oc. Bull. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 210 pp.
- Tam, N.F.Y., Lau, P.S., Wong, Y.S. 1994. **Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris***. Water Sci. Technol. 30:369–374.
- Tam, N.F.Y., Wong, Y.S. 2000. **Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal**. Environ. Pollut. 107:145-151.
- Tampion, J., Tampion M.D. 1987. **Immobilized Cells: principles and applications**. Cambridge UK: Cambridge University Press. 257 pp.
- Tamponnet, C., Costantino, F., Barbontin, J.N., Calvairac, R. 1985. **Cytological behaviour of *Euglena gracilis* cells entrapped in a calcium alginate gel**. Physiol. Plant. 63:277-283.
- Tarazona, J.V. 2014. **Pollution, Water**. Encyclopedia. Toxicol. 3:1024–1027.
- Thakur, A., Kumar, H.D. 1999. **Nitrate, ammonium, and phosphate uptake by the immobilized cells of *Dunaliella salina***. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 62: 70–78.
- Tilman, D. 1977. **Resource competition between planktonic algae: an experimental and theoretical approach**. Ecology. 58:338-348.
- Travieso, L., Benitez, F., Dupeiron, R. 1992. **Sewage treatment using immobilized microalgae**. Bioresour. Technol. 40:183–187.
- Travieso, L., Benitez, F., Weiland, P., Sanchez, E., Dupeyron, R., Dominguez, A.R. 1996. **Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments**. Bioresour. Technol. 55:181–186.
- Trevan, M.D., Mak, A.L. 1988. **Immobilized algae and their potential for use as biocatalysts**. Trends Biotechnol. 6:68-73.
- Toledo, A. 2002. **El agua en México y el mundo**. Instituto Nacional de Ecología, Distrito Federal, México. Gaceta Ecológica. 64:9-18.
- Urrutia, I., Sierra, J.L., Llama, M.J. 1995. **Nitrate removal from water by *Scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams**. Enzyme Microb. Technol. 17:200-205.

- Utkhede, R.S., Koch, C.A., Menzies, J.G. 1999. **Rhizobacterial growth and yield promotion of cucumber plants inoculated with *Pythium aphanidermatum*.** Can. J. Plant Pathol. 21:265-271.
- Valle-Ramírez de Arellano, G.A. 2007. **Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas.** Posgrado en Ecología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. Ensenada Baja California México. 70 pp.
- Van Peer, R., Niemann, G.J., Schippers, B. 1991. **Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* spp. Strain WCS417r.** Phytopathology. 81:728-734.
- Vassilev, N., Vassileva, M., Nikolaeva, I. 2006. **Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 71:137-144.
- Vilchez, C., Vega, J.M. 1994. **Nitrate uptake by *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized in calcium alginate.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 41:137-141.
- Vorlop, K.D., Klein J. 1987. **Entrapment of microbial cells in chitosan.** Methods Enzymol. 135:259-268.
- Waterbury, J.B., Watson, S.W., Valois, F.W., Franks, D.G. 1986. **Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*.** Can. Bull. Fish. Aquat. Sci. 472:71-120.
- Wyman, M., Bird, C. 2007. **Lack of control nitrite assimilation by ammonium in an oceanic picocyanobacterium *Synechococcus* sp. Strain WH 8103.** Appl. Environ. Microbiol. 9:3028-3033.
- Yang, P.Y. Wang, M.L. 1990. **Entrapment of microbial cells for wastewater treatment.** En: Tyagi, R. D. y K. Vembu (eds.). **Wastewater Treatment by Immobilized Cell.** CRC Press. New York. 45-77 pp.
- Zhang, E., Wang, B., Wang, Q., Zhang, S., Zhao, B. 2008. **Ammonia-nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus* sp. isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment.** Boresour.Technol. 99:3787-3793.
- Zar, J.H. 1984. **Biostatistical Analysis.** Prentie-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey. 718 pp.

Zamani, N., Noshadi, M., Amin, S., Niazi, A., Ghasemi, Y. 2012. **Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater.** J. Appl. Phycol. 24:649-656.

Zhulin, I.B. Armitage, J.P. 1992. **The role of taxis in the ecology of *Azospirillum*.** Symbiosis. 13:199-206.

