



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ingeniería
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Microalgas aisladas de granjas porcinas para la remoción de ortofosfato y amonio de aguas residuales.

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría en Tecnología y Gestión del Agua

Presenta:

Sanjuana Cecilia Galicia Campos

Asesor:

Dr. Cristóbal Aldama Aguilera



San Luis Potosí, S. L. P.

Noviembre de 2015



Universidad Autónoma de San Luis Potosí
Facultad de Ingeniería
Centro de Investigación y Estudios de Posgrado

Microalgas aisladas de granjas porcinas para la remoción de ortofosfato y amonio de aguas residuales.

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Maestría en Tecnología y Gestión del Agua

Presenta:

Sanjuana Cecilia Galicia Campos

Dr. Cristóbal Aldama Aguilera

Director de tesis

Dr. Sergio Manuel Salcedo Martínez

Asesor externo



San Luis Potosí, S. L. P.

Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca 2013 correspondiente al segundo periodo, para la realización de la maestría y esta investigación. Así como a la beca mixta 2014- marzo 2015 para movilidad nacional.

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP).

A la Facultad de Ingeniería y el Centro de Investigación y Estudios de Posgrado (CIEP).

A los profesores, instalaciones, miembros del CIEP, y de los Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales de la UASLP.

Al Dr. Cristóbal Aldama, al Dr. Luis Armando Bernal y al Dr. Hilario Charcas por recibirme en su facultad y formar parte de mi comité.

A la UANL, a través del Laboratorio de Anatomía y Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Facultad de Agronomía, quienes fueron parte fundamental en el desarrollo y culminación de este trabajo, especialmente al Dr. Sergio Salcedo Martínez.

Al financiamiento parcial otorgado a través de los proyectos de investigación PROMEP/103.5/13/6575 (del Programa de Mejoramiento del Profesorado)

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A las personas que me ayudaron en el transcurso de la realización de este trabajo, amigos, maestros, compañeros de maestría y familia.

En especial al Doctor Sergio Salcedo por su guía, poyo, disposición, en pocas palabras por TODO lo que hizo para ayudarme y salir adelante con este proyecto. Sin usted esto no hubiera sido posible. ¡Le agradezco muchísimo!

DEDICATORIA

A mi Familia y a Daniel Guzmán.

“No crean nada por el simple hecho de que muchos lo crean o finjan que lo creen; créanlo después de someterlo al dictamen de la razón y la voz de la conciencia; Duda de todo, encuentra tú propia Luz”.
-Buda Siddharta Gautama

TABLA DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS.....	Vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Ix
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	Xii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS.....	3
1. ANTECEDENTES SOBRE MICROALGAS UTILIZADAS EN LA REMOCIÓN DE ORTOFOSFATO Y AMONIO EN AGUAS RESIDUALES.....	4
-Formas del nitrógeno y formas del fósforo en las excretas de cerdo.....	4
-Soluciones propuestas a los problemas generados por la porcicultura.....	6
-Definición de algas y usos.....	7
-Formas químicas en que aprovechan el N y P las algas.....	8
2. MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MICROALGAS AISLADAS DE AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE UNA GRANJA PORCINA, Y PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ORTOFOSFATO Y AMONIO EN AGUAS RESIDUALES.....	10
Área de trabajo.....	10
Obtención de las muestras de algas.....	11
Aislamiento y cultivo de microalgas.....	12
Conteo de algas.....	14
Identificación taxonómica.....	14
Medición de ortofosfato y amonio.....	14
Descripción de los ensayos.....	15
Análisis estadístico.....	17
Porcentajes de remoción.....	17
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN SOBRE LA IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS Y SU POTENCIAL EN LA REMOCIÓN DE ORTOFOSFATO Y AMONIO EN AGUA RESIDUAL ARTIFICIAL.....	18
Identificación taxonómica.....	18
Cinética de crecimiento en cultivo continuo.....	21
Determinación de ortofosfato y amonio.....	23

-Evaluación individual de las cepas para la remoción de ortofosfato.....	23
-Evaluación individual de las cepas para la remoción de amonio.....	30
-Evaluación de las combinaciones en pares y combinación de las cuatro cepas para la remoción de ortofosfato.....	36
-Evaluación de las combinaciones en pares y combinación de las cuatro cepas para la remoción de amonio.....	39
Porcentaje de remoción.....	43
-Evaluación individual de las cepas en el porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio.....	43
Evaluación en duplas y cuadruples de las cepas en el porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio.....	48
CONCLUSIONES.....	59
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Composición y forma de preparación de los medios Bristol y Bold.....	13
2	Composición y forma de preparación de medio Bristol modificado.....	13
3	Concentración de algas en los inóculos de los matraces utilizados en el ensayo 1.....	15
4	Concentración de algas en los inóculos de los matraces utilizados en el ensayo 2.....	16
5	Concentraciones celulares de cada una de las algas en el inóculo utilizado en el ensayo 3.....	16
6	Análisis de varianza para el ensayo 1 Ortofosfato.	23
6a	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día cero del ensayo 1.....	24
6b	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día cuatro del ensayo 1.....	25
6c	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día ocho del ensayo 1.....	25
6d	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día doce del ensayo 1.....	26
6e	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día dieciséis del ensayo 1.....	26
6f	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día veinte del ensayo 1.....	27
7	Análisis de varianza para el ensayo 1 (Amonio).....	30
7a	Prueba de Duncan para las concentraciones de Amonio al día cero del ensayo 1.....	31
7b	Prueba de Duncan para las concentraciones de Amonio al día cuatro del ensayo 1.....	31
7c	Prueba de Duncan para las concentraciones de Amonio al día ocho del ensayo 1.....	32
7d	Prueba de Duncan para las concentraciones de Amonio al día ocho del ensayo 1.....	32
7e	Prueba de Duncan para las concentraciones de amonio al día dieciséis del ensayo 1.....	33
7f	Prueba de Duncan para las concentraciones de Ortofosfato al día veinte del ensayo 1.	33
8	Análisis de varianza para el ensayo 2, Combinaciones en pares (Ortofosfato) y ensayo 3, combinación de las cuatro cepas.....	36
8a	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día cero del ensayo 2 y 3. (N: <i>Neochloris sp</i> , T: <i>Trachelomonas volvocina</i> , S: <i>Scotiellopsis sp</i> y A: <i>Acutodesmus dimorphus</i>).....	37
8b	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día siete del ensayo 2 y 3.....	37

8c	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día catorce del ensayo 2 y 3.....	38
8d	Prueba de Duncan para las concentraciones de ortofosfato al día veintiuno del ensayo 2 y 3.....	39
9	Análisis de varianza para el ensayo 2, combinaciones en pares (Amonio) y ensayo 3, combinación de las cuatro cepas.....	39
9a	Prueba de Duncan para las concentraciones de amonio al día cero del ensayo 2. (N: <i>Neochloris sp</i> , T: <i>Trachelomonas volvocina</i> , S: <i>Scotiellopsis sp</i> y A: <i>Acutodesmus dimorphus</i>).....	40
9b	Prueba de Duncan para las concentraciones de amonio al día siete del ensayo 2 y 3.....	41
9c	Prueba de Duncan para las concentraciones de amonio al día catorce del ensayo 2 y 3.....	41
9d	Prueba de Duncan para las concentraciones de amonio al día veintiuno del ensayo 2 y 3.....	42
10	Los números más altos representan las mejores características. Para el porcentaje: <70 (3), 70<50 (2) y 50<0 (1). Variabilidad: menor variabilidad (3), intermedia (2) y alta (1).....	47
11	Los números más altos representan las mejores características. Para el porcentaje: <70 (3), 70<50 (2) y 50<0 (1). Variabilidad: menor variabilidad (3), intermedia (2) y alta (1).....	56
12	Porcentajes de remoción para ortofosfato y amonio, inoculo y concentración inicial de microalgas y nutrientes.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig.		Página
1	Granja Porcina, 40 cabezas de marranos de engorda. Facultad de Agronomía, UANL.....	11
2	Desagüe de la Granja.....	11
3	Filtrado de muestra.....	11
4	Microlagunas.....	11
5	Area de cultivo: Campana de Flujo laminar, microplaca, micropipeta, mechero, cajas de Petri.....	12
6	Tubos de ensayo de 8 mL con medio Bold y Bristol inoculados con muestra de microlagunas.....	12
7	Cultivo en cajas Petri.....	12
8	Cultivo contenido en matraces Erlenmeyer de 500 mL.....	12
9	Microscopio. Cámara Newbawer.....	14
10	Campo de conteo.....	14
11	Fotometro Hanna HI 83225 y reactivos para determinacion de NH_4^{4+} y PO_4^{3-}	15
12	Fotografía en microscopio (objetivo 40X). <i>Scotiellopsis</i> sp.....	19
13	Fotografía en microscopio (objetivo 40X). <i>Neochloris</i> sp.....	19
14	Fotografía en microscopio (objetivo 40X). <i>Trachelomonas volvocina</i>	20
15	Fotografía en microscopio (objetivo 40X). <i>Acutodesmus dimorphus</i>	20
16	Cinética de crecimiento cepa 1, día 0: 33,000 – día 26: 1;550,000.....	21
17	Cinética de crecimiento cepa 2, día 0: 24,000 – día 26: 3;050,000.....	21
18	Cinética de crecimiento cepa 2, día 0: 24,000 – día 26: 3;050,000.....	22
19	Cinética de crecimiento cepa 2, día 0: 30,000 – día 26: 3;720,000.....	22
20	Promedio y variabilidad de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cero.....	28
21	Promedio y variabilidad de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cuatro.....	28

22	Promedio y variabilidad de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día ocho.....	28
23	Promedio y variabilidad de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día doce.....	28
24	Promedio y variabilidad de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día dieciséis.....	29
25	Promedio y variabilidad de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día veinte.....	29
26	Promedio y variabilidad de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cero.....	34
27	Promedio y variabilidad de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cuatro.....	34
28	Promedio y variabilidad de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día ocho.....	34
29	Promedio y variabilidad de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día doce.....	34
30	Promedio y variabilidad de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día dieciséis.....	35
31	Promedio y variabilidad de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día veinte.....	35
32	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Scotiellopsis</i> sp y sus respectivos controles.....	43
33	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Neochloris</i> sp y sus respectivos controles.....	44
34	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Trachelomonas volvocina</i> y sus respectivos controles.....	45
35	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Acutodesmus dimorphus</i> y sus respectivos controles.....	46
36	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Scotiellopsis</i> sp y <i>Neochloris</i> sp con sus respectivos controles.....	48
37	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Scotiellopsis</i> sp y <i>Trachelomonas volvocina</i> con sus respectivos controles.....	49
38	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Scotiellopsis</i> sp y <i>Acutodesmus dimorphus</i> con sus respectivos controles.....	50
39	Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por <i>Trachelomonas volvocina</i> y <i>Acutodesmus dimorphus</i> con sus respectivos controles.....	51

40	Disminución en concentración de mg/L de otoposfato y amonio por <i>Neochloris</i> sp y <i>Acutodesmus dimorphus</i> con sus respectivos controles.....	52
41	Disminución en concentración de mg/L de otoposfato y amonio por <i>Neochloris</i> sp y <i>Trachelomonas volvocina</i> con sus respectivos controles.....	53
42	Disminución en concentración de mg/L de otoposfato y amonio por <i>Scotiellopsis</i> sp, <i>Neochloris</i> sp, <i>Trachelomonas volvocina</i> y <i>Acutodesmus dimorphus</i> con sus respectivos controles.....	54
43	Porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por las cepas individuales (arriba) y duplas y cuádruples (abajo). Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.	56

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	grados centígrados
cm	centímetros
CO ₂	carbono
CH ₄	metano
g	gramos
Hg	mercurio
H ₂ S	ácido sulfhídrico
Kg	kilogramos
µg	microgramos
µmol	micromol
µL	microlitros
L	litro
M	molar
min	minutos
mL	mililitros
mg	miligramos
mm	milímetros
NO ³	nitrate
NH ₃	amoníaco
PO ₄ ⁻³	ortofosfato
pp	páginas
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
T	temperatura

INTRODUCCIÓN

Las actividades pecuarias tienen un impacto significativo en prácticamente todas las esferas del medio ambiente, incluidos el cambio climático y el aire, la tierra y el suelo, el agua y la biodiversidad (Steinfeld *et al.*, 2006).

Entre 1990 y 2005, la producción porcina en México incrementó en 50% y para el año 2009 se criaban y sacrificaban más de 15 millones de cerdos anualmente para el consumo humano, siendo Jalisco, Sonora, Yucatán y Guanajuato, los principales estados productores de cerdo en el país (SAGARPA, 2006).

La producción porcina como cualquier otra, genera productos de valor económico que se reparten en la población como alimento o divisas. Para ello requiere de la naturaleza, la cual aporta insumos y recibe una serie de residuos que si no son asimilados por ella, se comparten con la sociedad aunque ésta no lo desee (Pérez, 2006)

Las granjas porcinas se caracterizan por un método de producción intensivo, lo que implica la acumulación del 100% de las excretas generadas. En la mayoría de los casos, estas excretas son lavadas, utilizando agua como el "vehículo" para movilizarlas fuera de las instalaciones (Cheng y Liu 2001), ésta mezcla de residuos sólidos y líquidos que son acarreados por el agua de lavado se conoce como agua residual ("residuales", en varios países); sus principales ingredientes son las excretas (heces y orina), agua, alimento no consumido, suelo y otras partículas.

Las tasas de excreción de heces y orina dependen de múltiples factores: la edad del animal, sexo, madurez fisiológica, cantidad y calidad del alimento ingerido, volumen del agua consumida, clima y otros factores menos importantes (Pérez, 2006). De estudios estadísticamente significativos realizados sobre este tema en Estados Unidos, Malasia, Singapur y Chile, se sabe que la orina representa 45% y las heces 55% de la excreta; el contenido de humedad de la misma es del 88%; cerca de 90% de los sólidos se excretan en las heces y 10% en la orina en la forma de minerales, como potasio, fósforo y amoníaco-nitrógeno (Taiganides *et al.*, 1996).

Los lechones, destetes y hembras lactantes excretan cerca de 8% de su peso vivo por día; los cerdos en crecimiento y finalización excretan cerca del 7%; sementales y hembras gestantes y secas, que son animales que tienen un acceso limitado al alimento, excretan diariamente cerca de 3% de su peso vivo. La información sobre la tasa de excreción de los cerdos solo es confiable cuando se han obtenido numerosas muestras. En México, este tipo de muestreo exhaustivo nunca se ha realizado; por lo tanto, para los cálculos de ingeniería utilizados en el diseño de sistemas de tratamiento, se emplea un promedio de varias fuentes que es de 6.17 Kg de heces y orina por día por unidad de producción animal (6.1711 00 Kg de peso vivo) (Pérez, 2006).

En aguas residuales de granjas porcinas las cantidades de amonio varían entre 4.49 a 790 mg/L y las de ortofosfato entre 49 y 895 mg/L (Viquez, 2013).

La determinación del efecto ambiental de los desechos porcinos incluye, además de las repercusiones directas de los desechos sobre los recursos como agua, suelo y aire, factores de perturbación como olores y plagas de insectos, además de efectos indirectos sociales, políticos e incluso estéticos que son imposibles de cuantificar (Pérez, 2006)..

En 2006 la FAO publicó “La larga sombra del ganado: Problemas ambientales y opciones”, en el que se evaluaban los impactos del sector pecuario al ecosistema humano. La FAO concluyó que “la ganadería es uno de los dos o tres sectores con repercusiones más graves en los principales problemas medioambientales a todos los niveles, desde el ámbito local hasta el mundial”. La cría de animales para el consumo genera escasez de agua de diferentes maneras. A nivel mundial, el sector pecuario utiliza una cantidad significativa del agua disponible, mayormente destinándola para la producción del pienso (Ponette-González y Fry 2010).

Los animales de producción requieren de agua para su hidratación, y se necesita cada vez más agua, especialmente en las instalaciones industriales, para limpiar los recintos (por ejemplo, jaulas, establos, corrales), para desechar los residuos y para enfriar a los animales (Steinfeld *et al.*, 2006).

El procesamiento de productos animales también requiere de grandes volúmenes de agua y puede generar grandes cantidades de aguas de desecho (Steinfeld *et al.*, 2006).

Se ha informado que el nivel de agua del acuífero que se encuentra debajo del Valle de Perote en México, por ejemplo, se ha precipitado desde que la cría intensiva de cerdos se apoderó de la región a mediados de la década de los 90 (Ponette-González y Fry 2010).

El sector pecuario no sólo está disminuyendo las reservas de agua sino que también está contaminando cada vez más el agua que se encuentra disponible. De acuerdo con la FAO, “La ganadería es probablemente la mayor fuente de contaminación del agua y contribuye a la eutrofización, a las zonas ‘muertas’ en áreas costeras, a la degradación de los arrecifes de coral, a la aparición de problemas de salud en los seres humanos, a la resistencia a los antibióticos y a muchos otros problemas” (US EPA, 2004).

Gran parte del daño ambiental ocasionado por las granjas de cría intensiva se debe al volumen y contenido de los desechos animales, y los retos consiguientes en materia de almacenamiento y disposición de ellos. Los cerdos producen cuatro veces más desechos que los seres humanos y “una instalación con una gran cantidad de animales puede fácilmente igualar a una pequeña ciudad en términos de producción de desechos” (Trusts C. y Hopkins, 2008).

Esto resulta particularmente preocupante para ciertas regiones de México, como el Valle de Perote, el cual aloja la mayor concentración de granjas de cría intensiva de cerdos en el país, y cuenta con una población porcina cinco veces mayor que su población humana (Ponette-González y Fry 2010).

Los desechos de las granjas de cría intensiva, almacenados en lagunas o pozos (APHA. 2003) pueden contener sustancias químicas dañinas así como patógenos.

Estas lagunas de desechos de cerdo pueden presentar fugas o romperse, contaminando las fuentes cercanas de agua con excedentes de nitrógeno y fósforo, patógenos y otros contaminantes presentes en el estiércol (Mallin y Cahoon, 2003).

En el ámbito mundial se reconoce que los problemas más severos que provoca la porcicultura en el ambiente son:

- Contaminación del agua superficial y del subsuelo por el nitrógeno y fósforo contenido en las excretas.
- Deterioro de la calidad del aire por la generación de gases tóxicos, principalmente dióxido de carbono (CO₂), amoníaco (NH₃), ácido sulfhídrico (H₂S) y metano (CH₄), que afectan a los trabajadores de la granja, a las poblaciones vecinas y a los propios cerdos (Robinson *et al.*, 1993).
- Contaminación de suelo y agua por metales pesados, mayormente cobre y zinc, que el cerdo sólo absorbe en un 5 y 15%, respectivamente, excretando el resto (Scialabba, 1994).
- Contaminación microbiológica del suelo en la aplicación de excretas a terrenos agrícolas (Trusts y Hopkins, 2008).
- Los desechos tratados al mínimo (o no tratados) muchas veces también son regados en los campos cercanos, con el potencial de contaminar el agua, la tierra y (Trusts y Hopkins, 2008).

En 2006 la Comisión Nacional del Agua (CONAGUA) calculó que se le da tratamiento a sólo 20% de las aguas de desecho que se originan de la producción porcina en México.

HIPÓTESIS

Dadas las características de las aguas residuales porcinas, en cuanto a la alta concentración de materia orgánica y nutrientes, se pueden encontrar microalgas nativas capaces de asimilar o remover ortofosfato y amonio.

OBJETIVOS

Objetivo General:

- Aislar e identificar microalgas de agua residual de granjas porcinas, para determinar su capacidad de remoción de amonio y ortofosfato.

Objetivos específicos

1. Identificar las especies de microalgas que habitan en aguas residuales porcinas mediante claves taxonómicas de acuerdo a sus características morfológicas.
2. Evaluar la variación temporal de ortofosfato y amonio debida a la presencia de microalgas nativas de las aguas residuales porcinas.
3. Determinar que microalgas son eficientes en disminuir los niveles de ortofosfato y amonio en agua residual artificial.

1. ANTECEDENTES SOBRE MICROALGAS UTILIZADAS EN LA REMOCIÓN DE ORTOFOSFATO Y AMONIO EN AGUAS RESIDUALES

Formas del nitrógeno y formas del fósforo en las excretas de cerdo.

La contaminación generada por una granja porcina afecta al microambiente (la granja misma) y al ambiente en general. En lo que respecta al microambiente, se ha visto que la exposición a los gases producidos (amoníaco, sulfuro de hidrógeno, metano y bióxido de carbono) representa riesgos directos a la salud de los trabajadores y de los cerdos en producción. Esto es debido a que el amoníaco es irritante por lo que tiende a producir malestar. Drummond *et al.* (1980), constataron un decremento (del 12 al 30%) en la ganancia diaria de peso de cerdos alojados en lugares con concentraciones crecientes de amoníaco (50, 100 y 150 ppm). El amoníaco proviene del nitrógeno excretado principalmente en la orina (85%) y en las heces (15%) y su tasa de volatilización depende de la relación existente entre los iones amonio y amoníaco la cual depende del pH de la excreta (Hoeksma *et al.*, 1992). Así mismo, la producción de CO₂ y CH₄ por los cerdos contribuye al efecto invernadero mundial, aunque en mucho menor escala que el CO₂ y CH₄ producidos por los rumiantes (Kirchgessner *et al.*, 1997).

Sin embargo, según Peet-Scwering *et al.* (1999) el principal problema ocasionado por las excretas es la contaminación química debida a la excreción de grandes cantidades de nitrógeno, fósforo y potasio, en Holanda, también estimaron que bajo condiciones comerciales de producción, el fósforo consumido es excretado en proporciones variables, ya que una cerda excreta alrededor de 75%, los lechones destetados 38% y los cerdos de abasto 63%, la vía de excreción del fósforo es principalmente fecal; en lo referente al nitrógeno la proporción excretada para las mismas categorías de animales fue de 76, 46 y 67% respectivamente y este es excretado principalmente vía urinaria.

El nitrógeno es uno de los elementos de la naturaleza, de mayor importancia tanto en la agricultura como en aguas residuales, para el crecimiento de microorganismos, junto con el fósforo. (Crites y Tchobanoglous, 1998).

El nitrógeno se puede encontrar en las aguas residuales en tres formas predominantes: 1) Nitrógeno orgánico, este incluye proteínas, aminoácidos, aminas, entre otros. Puede ser soluble o insoluble en el agua. 2) Nitrógeno amoniacal (NH₃ <->NH₄⁺) que proviene de la descomposición del nitrógeno orgánico y según el pH, puede estar en forma de amoníaco (generador de malos olores) o como amonio (soluble en agua). 3) Nitrato (NO₃⁻), que básicamente es la forma de nitrógeno completamente oxidada, en otras palabras, es cuando el amonio se oxida a nitrato (Bradley, *et al.* 2002). En México los límites permisibles son: nitratos, 10.00 mg/L, nitritos 0.05 mg/L y nitrógeno amoniacal 0.50mg/L (DOF. 1994).

Existen aguas residuales de granjas porcinas que no contienen nitratos, pues no han sido expuestas a ningún ambiente de oxidación. Esto es importante para efectos de interpretar un análisis de aguas residuales, por ejemplo, el nitrógeno total equivale a la suma del nitrógeno orgánico, del amoniacal y del nitrato. Viéndolo desde otra perspectiva, la legislación mexicana pide que la suma total de las formas de nitrógeno, no exceda de 10.55 mg/L, por lo que si el sistema de tratamiento es bueno únicamente para convertir nitrógeno de una forma a otra; pero es incapaz de eliminar nitrógeno del todo, difícilmente se logrará cumplir con la legislación.

Las principales alternativas para la remoción de nitrógeno son por la asimilación de nitrógeno (consumo de nitrógeno por parte de microorganismos y/o plantas), por medio del proceso de nitrificación/desnitrificación, que consiste en oxidar la mayor parte del nitrógeno a nitrato y desnitrificación, esta reacción convierte el nitrato en nitrógeno elemental, el cual al ser un gas se libera al ambiente, eliminándose así el nitrógeno del agua residual. (Crites y Tchobanoglous, 1998).

Esto sucede gracias a la actividad microbiológica de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* (encargadas de convertir amonio a nitrito) y de *Nitrobacter* y *Nitrospira* (encargadas de convertir nitrito a nitrato) (Crites y Tchobanoglous, 1998; Rittmann y McCarty, 2001), estos microorganismos son aeróbicos obligados, lo que significa que necesitan condiciones estrictamente aeróbicas, con concentraciones de oxígeno superior o igual a 1 mg/L. (Crites y Tchobanoglous, 1998). Según cálculos estequiométricos, se estima que para cada gramo de NH_4^+ a degradar a nitrato, se requieren 4.14 g de oxígeno (Rittmann y McCarty, 2001). En otras palabras, considerando que el agua residual de una granja porcina completamente amonificada contiene 1 g de NH_4^+ , esto implica que se necesitan cerca de 16 L de aire, disueltos en agua, para lograr completar el proceso de nitrificación. Estas condiciones son poco probables en lagunas aeróbicas y/o de oxidación, situación que explica el por qué el nitrógeno no se logra remover efectivamente en este tipo de sistemas (Viquez, 2013).

El fósforo es un elemento esencial para la vida, que no puede ser sustituido por ningún otro elemento (Cordell *et al.*, 2009). Es un elemento clave en muchos procesos fisiológicos y bioquímicos, como la generación de ATP. El fósforo como elemento, no aparece de forma libre en la naturaleza ya que es muy radiactivo (Ashley *et al.*, 2011), siendo uno de los elementos más abundantes en la litosfera. Las plantas, solo pueden absorber al fósforo en su forma inorgánica, ortofosfato (PO_4^{3-}), mientras que las microalgas pueden hidrolizar fósforo orgánico y transformarlo en ortofosfato.

El fósforo es un nutriente esencial para el crecimiento de organismos, por lo que la descarga de fosfatos en cuerpos de aguas puede estimular el crecimiento de macro y microorganismos fotosintéticos en cantidades nocivas (SECOFI, 2001) y su exceso en el agua puede provocar eutrofización. Por lo que es importante el desarrollo de medidas de control de sus niveles.

El fósforo en aguas residuales es comúnmente removido por precipitación química con sales de aluminio o hierro para formar aluminio o fosfato férrico, dichas sales se agregan en exceso para competir con la alcalinidad natural (Larsdotter, 2006.b), sin embargo el producto de precipitación puede ser una complicada combinación del metal añadido, calcio, carbonato y fosfato (Henze *et al.*, 2002). Además de la precipitación química con sales de metales, la eliminación de fósforo también se puede lograr por adsorción con materiales que tienen superficies cargadas positivamente, por ejemplo, caliza, zeolitas, entre otras (Westholm, 2006).

Además de los medios químicos para la eliminación de fósforo, también existen métodos biológicos, como el proceso mejorado de eliminación de fósforo, en el cual bacterias en lodo activado, acumulan o sobre acumulan fósforo como respuesta a los cambios entre condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Cuando el ambiente es anaeróbico, las bacterias utilizan su fósforo almacenado como fuente de energía para tomar sustrato y así es liberado (Henze *et al.*, 2002), sin embargo, cuando la condición pasa a aeróbica, el fósforo que fue liberado es captado por las células y se consigue una absorción neta. El magnesio y el potasio son co-transportados con el fosfato, y es almacenado en las células como gránulos de polifosfato (Bitton, 2005).

La medición del fósforo total incluye distintos compuestos como diversos ortofosfato, polifosfatos y fósforo orgánico. La determinación se hace convirtiendo todos ellos en ortofosfato que son los que se determinan por análisis químico (Echarri, 2007).

Actualmente existe el Proyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-AA-029/1-SCFI-2008, Análisis de agua - Determinación de fósforo total en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. Parte 1: Método espectrométrico de molibdato de amonio; que cancelará a la NMX-AA-029-SCFI-2001. Este especifica métodos para la medición de: a) ortofosfato tras la extracción con disolvente, b) fosfato hidrolizable más ortofosfato y c) fósforo total previa descomposición, a fin de contar con un procedimiento homogéneo, mediante el cual se determine la calidad del agua. Su implementación hará más objetiva la determinación de este elemento, ya que en la legislación actual solo se toma en cuenta el fósforo total.

Soluciones propuestas a los problemas generados por la porcicultura.

El constante crecimiento de la población en la Tierra, ha generado la demanda de agua limpia y consecuentemente la generación de tratamientos de agua, que no generen un mayor consumo de energía, que sean autónomas, produzcan menos gases de efecto invernadero como el CO₂ y además sean económicamente viables (Loh y Vu-Tran, 2012).

Entre las soluciones más atractivas se encuentran los tratamientos que emulan los fenómenos que ocurren espontáneamente en la naturaleza, como los lagunares, estanques, sistemas de infiltración, humedales artificiales, entre otros (Arias y Brix, 2003).

Desde hace más de un siglo se ha comenzado a trabajar en la remoción de materia orgánica y de sólidos suspendidos contenidos en las aguas residuales de todo tipo. Más recientemente se han incorporado procesos que tienden a mejorar la remoción de nitrógeno y fósforo presentes (González *et al.*, 2008).

De acuerdo con Pérez (2006) a grandes rasgos, las técnicas y estrategias que se han propuesto para reducir los efectos negativos de la producción porcina en el ambiente se pueden clasificar en cinco grupos:

- 1) **Alimentación:** reducir excreciones de nutrientes, metano y polvo suministrando dietas mixtas; diferenciar dietas por peso y sexo; agregar enzimas que incrementan la digestibilidad de los hidratos de carbono, proteínas y fósforo, y reducir el número de animales mediante una mejor eficiencia productiva.
- 2) **Instalaciones:** mejorar el tipo de suelo y la forma de limpieza en la granja; instalar sistemas de ventilación (filtros y depuradores biológicos que absorben olores); hacer bebederos y comederos más eficientes.
- 3) **Almacenamiento y tratamiento de excretas:** implementar tratamientos a largo o mediano plazos, aerobios o anaerobios, dentro o fuera de las naves; empleo de electrólisis.
- 4) **Reciclaje:** uso científico en la agricultura vigilando las tasas de aplicación en función del suelo, cultivo y características de los residuos; emplear técnicas y maquinaria adecuadas (inyección o aplicación rápida).
- 5) **Investigación:** promover la investigación experimental en alimentación, sistemas de tratamiento, aplicación a la agricultura y en la producción de combustibles.

Definición de algas y usos.

El término microalga se refiere a aquellos microorganismos que contienen clorofila y otros pigmentos fotosintéticos capaces de realizar fotosíntesis oxigénica. Este término no tiene sentido taxonómico alguno y dentro del mismo se incluyen organismos con dos tipos celulares distintos; las cianobacterias que tienen estructura celular procariota y las restantes microalgas con estructura celular eucariota. Pese a las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas (eucariota y procariota) son similares en su metabolismo fotosintético, el cual es similar al de las plantas superiores. La reproducción es generalmente por división binaria, con tiempos de duplicación de una hora o menos para los procariotas (cianobacterias) y de 8 a 24 horas (o más) para las eucariotas (Carpenter, 1982; Dawes, 1991). Se estima que existen entre 200,000 y 1, 000,000 de especies de algas (Norton *et al.*, 1996).

Los ingredientes más importantes para el crecimiento de las microalgas, son la luz y el CO₂. Otros factores importantes son el pH, la alcalinidad, la densidad de células, presencia de otros microorganismos (Markou y Georgakakis, 2011). Además de las cantidades adecuadas de macronutrientes como carbono, fósforo y nitrógeno, magnesio, calcio, sulfuro y micronutrientes como zinc, hierro, magnesio, cobre (Graham y Wilcox, 2000; Andersen, 2005; Markou y Georgakakis, 2011)

A pesar de ser un grupo de organismos vivos bastante desconocido, las algas ofrecen un gran número de posibilidades en cuanto a su uso:

Alimentación animal y humana: Las algas microscópicas también se han usado en alimentación animal frecuentemente. En particular, la alimentación de rotíferos, moluscos y crustáceos en acuicultura marina se realiza a base de microalgas pertenecientes a distintos grupos taxonómicos. Otro destino de las microalgas ha sido la alimentación de ganado porcino (Álvarez, 2012).

Uso como fertilizantes: Las algas planctónicas no han sido intensivamente utilizadas en este sentido, pero resultan un fertilizante barato de simple aplicación, ya que concentran en su interior nitrógeno y fósforo y pueden administrarse a los cultivos mediante riego. El uso de biomasa algal como biofertilizante para maíz y pepino. La utilización de algas como fertilizante, podría además reducir la demanda de irrigación, mejorando la retención de nutrientes y reduciendo así la contaminación de agua subterránea (Wilkie y Mulbry, 2002).

Producción de sustancias de interés químico-farmacéutico: Estas sustancias pueden obtenerse mediante cultivos masivos de algas en condiciones controladas.

Depuración de aguas: En las aguas residuales de origen orgánico, bien sean urbanas, agrícolas o ganaderas, las sustancias nutritivas de carbono, nitrógeno y fósforo son muy abundantes, bien en formas orgánicas o ya mineralizadas por las bacterias y convertidas en inorgánicas.

Producción de sustancias de interés energético: Se ha demostrado que la biomasa de las microalgas puede proporcionar diversos productos ricos en energía, como son el bioetanol, el biodiesel y el hidrógeno (Álvarez, 2012).

La biotecnología consiste en hacer que los organismos trabajen en nuestro beneficio mediante un conjunto de técnicas que, combinadas con el conocimiento de la biología de los seres vivos, orienta la vida de éstos hacia procesos de interés económico-social para la humanidad. La biotecnología de las algas se ha enfocado principalmente hacia las algas microscópicas y consta principalmente de dos fases: producción controlada de la biomasa algal y aprovechamiento de dicha biomasa (Álvarez, 2012).

Actualmente, uno de los géneros de microalgas más utilizados es *Chlorella*. Este género ha sido aplicado al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo y metales, así como la reducción de la demanda química de oxígeno (Garza *et al.*, 2010). Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido bastante amplio, en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintéticos (Garza *et al.*, 2010). Un ejemplo es *Chlorella sorokiniana*, una microalga de rápido crecimiento, con alto potencial biotecnológico por su capacidad de sintetizar ácidos grasos de interés industrial y capacidad de adaptación a diferentes fuentes de nutrientes tanto en regímenes autotróficos como mixotróficos e inclusive heterotróficos (Ortiz *et al.*, 2012).

Formas químicas en que aprovechan el N y P las algas.

El fósforo es primordial para el crecimiento de las algas, pues puede limitar su crecimiento si no está disponible en la cantidad suficiente (Graham y Wilcox, 2000). Una baja concentración de fósforo está relacionada con una densidad baja de células. La forma de fósforo que es utilizada por las microalgas, es el ortofosfato. El fósforo orgánico disponible, es hidrolizado a PO_4^{3-} por la enzima extracelular alcalina fosfatasa (Correll, 1988). Las algas poseen comúnmente una cantidad de fósforo inorgánico interno, en específico un polifosfato. Por otra parte, el consumo de fosfato es mayor en presencia de luz (Boström, *et al.*, 1988) e influenciado por el pH, el cual decrece en ambientes ácidos (Stockner *et al.*, 2000).

El nitrógeno es el segundo nutriente más importante después del carbón y puede comprender más del 10% de la biomasa, siendo las microalgas las que logran la mayor eliminación del mismo en el tratamiento de aguas residuales, mediante su asimilación (Becker, 1994). El Nitrógeno existe en muchas formas y las formas más comunes asimilables por las microalgas son el amonio (NH_4^+) y el nitrato (NO_3^-) (Oliver y Ganf, 2000). Siendo el amonio el preferido al estar disponible, pero la urea y el nitrito pueden ser también utilizados. Sin embargo el amonio en altas concentraciones (>20 mg/L) puede ser tóxico para las células (Borowitzka, 1998). Debido al aumento del pH en los cultivos de algas, además de la asimilación del nitrógeno, el amonio puede ser volatilizado (Nunez *et al.*, 2001). Varias microalgas pueden realizar algo llamado consumo en bonanza o "luxury consumption" que consiste en tomar nitrógeno en exceso presente en el ambiente para después utilizarlo si es requerido (Larsdotter, 2006.a).

En cuanto a la interacción entre alga, fósforo y nitrógeno, una concentración de 30:1 favorece la eliminación de fosfato y una proporción de 5:1 la eliminación de nitrógeno (Borowitzka, 1998).

Las microalgas no solo transforman los compuestos, sino son capaces de integrar los elementos en sus biomoléculas, asimilando una cantidad significativa de nutrientes como nitrógeno y fósforo, que requieren en una alta cantidad para la síntesis de proteínas (45-65% de su peso seco), ácidos nucleicos, fosfolípidos. Esto hace a las microalgas candidatos óptimos para la biorremediación de aguas residuales porcinas.

Hernández *et al.* (2012), evaluaron la capacidad para remover amonio y ortofosfato por cultivos libres e inmovilizados de microalgas, utilizando para ello un cultivo mixto obtenido a partir de agua residual municipal proveniente del reactor UASB (por sus siglas en inglés, reactor anaerobio de flujo ascendente) de la UAM-I; y dos cultivos clonales de *Chlorella vulgaris* y *Spirulina subsalsa* que

pertenecen a la colección de cultivos UAM-I. Las microalgas se inocularon en agua residual artificial a dos concentraciones de nutrientes, una baja 10 mg/L de NH_4^+ y 5 mg/L de PO_4^{3-} y una alta 25 mg/L de NH_4^+ y 10 mg/L de PO_4^{3-} , se monitoreo su crecimiento y se determinó la capacidad de remoción de los nutrientes, en los cultivos libres e inmovilizados en dos soportes: lufa y polietileno, siendo la lufa el más eficiente en producción de biomasa algal y en fijación de las microalgas. En consumo de nutrientes, en cultivos libres a baja concentración, *C. vulgaris* presentó la mayor capacidad de remoción con 50% para NH_4^+ y un 74% para PO_4^{3-} ; mientras que en alta concentración la mejor remoción la alcanzó el cultivo mixto con 68% para NH_4^+ y 76% de PO_4^{3-} . En los cultivos inmovilizados sobre lufa, *C. vulgaris* y el cultivo mixto presentaron el mayor consumo de nutrientes, siendo para NH_4^+ de 70 a 99.9% y de PO_4^{3-} del 72.1 al 89.9%, respectivamente.

En 2012, Su *et al.* reportaron que en un tanque de PVC inoculado con microalgas, en su mayoría verde-azules filamentosas, se obtuvo una remoción de amonio de un 89% a los 14 días, donde el 100% o concentración inicial fue de 39.4 ± 5.5 mg/L y una remoción de ortofosfato de $54.4 \pm 2\%$, con una concentración inicial de 8.8 ± 0.9 mg/L.

Hee y Seung, obtuvieron en 2012 una remoción de $\text{NH}_3\text{-N}$ de 96.90% de un total de 11.30 mg/L al octavo día de ensayo realizado en matraces con 500 mL de agua residual artificial inoculada con 1 g/L de *Chlorella vulgaris*, a un pH de 7.5 ± 0.3 , una temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ y luz constante con una intensidad de $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{sec}$. Bajo estas mismas condiciones obtuvieron 44.80% de remoción de PO_4^{3-} de un total inicial de 4.04 mg/L.

Rawiwan *et al.* (2012) utilizaron un cultivo Batch, inoculado con una concentración de 140 mg/L del alga *Chlorella vulgaris* en un reactor de 8L con concentraciones de nitrógeno total de 24 ± 0.7 mg/L y fósforo total de 0.68 ± 0.5 mg/L y reportaron que después de ocho días, la densidad de cultivo aumentó a 320 mg/L para posteriormente entrar en la fase de muerte, donde la concentración del nitrógeno total inicialmente decreció rápidamente de 28.7 mg/L a 11 mg/L lo que significó una remoción de 61.7% en los primeros dos días de ensayo y al día siete 63.62% del total. En cuanto al fósforo total la concentración decreció de 0.149 mg/L a 0.061 mg/L en el primer día, con una remoción de 78.52% hasta el día siete.

Wang *et al.* (2012), concluyeron que los niveles de nitrógeno y fósforo influyen de manera sustancial el crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. La muestra de microalga la obtuvieron del lago Mulan en el centro de China, para cultivarla en matraces Erlenmeyer a un flujo de luz de $60 \mu\text{mol photon m}^2\text{S}^{-1}$, con ciclos de luz-oscuridad de 12/12 h; a 25°C de temperatura, cultivadas en medio Chu 13 modificado. El agua residual se obtuvo de una planta de tratamiento en Xiamen, China. Se esterilizó, filtró y diluyó en un 100% (38.03 mg/L de N y 1.83 mg/L de P), 75% (28.52 mg/L de N y 1.37 mg/L de P), 50% (19.01 mg/L de N y 0.92 mg/L de P) y 25% (Dato no disponible para N y 0.46 mg/L de P) para así ser colocada en matraces Erlenmeyer de 500 mL con tres repeticiones. Obteniendo como resultado una remoción del $58.85 \pm 1.55\%$, $51.51 \pm 1.58\%$ y $27.46 \pm 2.1\%$ de N para cada una de las diluciones y $97.08 \pm 0.26\%$, $95.35 \pm 0.87\%$, $92.91 \pm 0.77\%$ y $90.12 \pm 0.87\%$ de P. por lo que se reporta mayor remoción en las muestras con concentraciones más altas de N y una remoción similar para P.

En 2001, De-Bashan *et al.* registraron que un cultivo de *Chlorella vulgaris* coinmovilizada con *Azospirillum brasilense* en perlas de alginato, presentó bajo cultivo tipo Batch, continuo y semicontinuo, un buen crecimiento pero en diferentes grados. El mejor crecimiento fue obtenido bajo el cultivo batch, en el que la población alcanzó 4×10^6 células/perla después de seis días de incubación. Bajo la

condición de cultivo semicontinuo, el crecimiento de la población fue menor, alcanzando solo 1.3×10^6 células/perla. Cuando *C. vulgaris* fue inmovilizada sola en cultivo continuo la densidad de la población fue menor de 1.0×10^6 células/perla.

El alga marina *Dunaliella salina*, fue utilizada por Ayu y Moh en 2010, para registrar su crecimiento y capacidad de remoción de fósforo y amonio iónico en agua residual con alta cantidad de materia orgánica y bajo pH. Los resultados que obtuvieron fueron que después de cinco días de incubación *D. salina* creció de 3×10^6 a 1.5×10^7 células/mL. Después de cinco días de cultivo, en una concentración inicial variable de 1.2 a 3.1 mg/L se redujo ortofosfato en un rango de 38 a 47% y para el amonio iónico con una concentración inicial variable de 3.2-6.6 mg/L una remoción de entre 20.8-64.7%.

Un experimento compuesto por seis tratamientos con cuatro replicaciones cada uno, donde a cuatro frascos se les adicionó $18 \mu\text{mol/L}$ de PO_4^{3-} , a otros cuatro $120 \mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ , a los siguientes cuatro $68 \mu\text{mol/L}$ de NO_3^- , cuatro frascos más con $\text{NO}_3^- + \text{PO}_4^{3-}$, cuatro más con $\text{NH}_4^+ + \text{PO}_4^{3-}$ y los últimos cuatro sólo con los nutrientes iniciales ($<2 \mu\text{mol/L}$ de P inorgánico, $<20 \mu\text{mol/L}$ de NH_4^+ y $6 \mu\text{mol/L}$ de NO_3^-) encontrados en el lago de donde se obtuvieron las muestras de la microalga *Chaetomorpha linum*; a partir de este experimento Menéndez *et al.* (2002) estudiaron la influencia de la disponibilidad de nutrientes disueltos en el crecimiento, contenido en nutrientes y sus tasas de absorción de dicha especie, obteniendo como resultado que la fertilización con N dio como resultado un aumento de la concentración de clorofila a los cuatro días de iniciado el experimento. La fertilización con P no produjo efecto significativo sobre las concentraciones en clorofila. En todos los tratamientos se observó un aumento de biomasa al cabo de diez días y este incremento fue mayor cuando se fertilizaba con N+P. La tasa de absorción de P fue significativamente más elevada en los tratamientos simples, con solo P, mientras que en el caso del nitrato la tasa de absorción fue mayor cuando se fertilizaba con N+P.

2. MATERIALES Y MÉTODOS PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE MICROALGAS AISLADAS DE AGUA RESIDUAL PROVENIENTE DE UNA GRANJA PORCINA, Y PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ORTOFOSFATO Y AMONIO EN AGUAS RESIDUALES

2.1 Área de trabajo.

Las microalgas fueron recolectadas en una Granja Porcina ubicada en la Facultad de Agronomía de la UANL en,Marín, N.L. La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, laboratorio de Botánica de la UANL, San Nicolás de los Garza, N.L.

2.2 Obtención de las muestras de algas.

Se tomaron 600 L del desagüe de una granja porcina con cuarenta cabezas de marranos de engorda (Figs.1 y 2). Dicha muestra fue homogeneizada, filtrada y vertida en palanganas de plástico de 60 cm de diámetro y 25 cm de profundidad, para formar microlagunas (Fig.3). Se utilizaron seis palanganas a las que se les agregó agua residual en tres concentraciones, dos al 100% (60 L de agua residual), dos

al 50% (30 L agua residual, 30 L de agua de la llave) y dos al 25% (15 L agua de residual 45 L agua de la llave) (Fig.1) y se inoculó con suelo obtenido de los canales de desagüe de las granjas (Fig.4).

Las palanganas se dejaron destapadas, para que tuvieran contacto con aves y atmósfera. Posteriormente, se tomaron 50 mL de muestra de cada una de las concentraciones a los 7, 14 y 21 días.



Fig.1 Granja Porcina, 40 cabezas de marranos de engorda. Facultad de Agronomía, UANL.



Fig.2 Desague de la Granja.



Fig.3 Filtrado de muestra.



Fig.4 Microlagunas.

2.3 Aislamiento y cultivo de microalgas.

A partir de las muestras recolectadas en las microlagunas se aislaron cuatro cepas de microalgas. Mediante dilución, cultivo en placa y cultivo continuo en matraces Erlenmeyer de 500 mL (Fig.5).

En tubos de ensayo de 8 mL se colocó un mililitro de cada una de las concentraciones muestra de las microlagunas y 5 mL de medio Bold o Medio Bristol (Fig.6) (Tabla 1).



Fig.5 Area de cultivo: Campana de Flujo laminar, microplaca, micropipeta, mechero, cajas de Petri



Fig.6 Tubos de ensayo de 8 mL con medio Bold y Bristol inoculados con muestra de microlagunas.



Fig.7 Cultivo en cajas Petri.



Fig.8 Cultivo contenido en matraces Erlenmeyer de 500 mL.

Después de 7 a 14 días, tiempo en que los cultivos se comenzaron a tornar verdes, se realizaron diluciones en microplaca, para aislar las poblaciones y realizar su cultivo en cajas Petri con medio Bristol con antibiótico y antifúngico, solidificado con agar y cultivo contenido en matraces Erlenmeyer de 500 mL, con iluminación con lámparas fluorescentes (200 W) a $400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y bombeo constante de aire estéril a razón de $2800 \text{ cm}^3/\text{min}$, sin agitación, a una temperatura de 24°C (Figs.7 y 8).

Tabla 1. Composición y forma de preparación de los medios Bristol y Bold (UTEX).

Medio	
Bristol	Bold
* Soluciones Patrones de Macronutrientes.	* Solución patrón de Micronutrientes
Nitrato de Sodio..... 10 g	Etilendiamintetracético.....50 g
Cloruro de Calcio Dihidratado..... 1 g	Hidróxido de Potasio.....31 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado..... 3 g	Agua.....1000 mL
Fosfato de Potasio, dibásico..... 7 g	* Ácido Bórico.....11.42 g
Fosfato de Potasio, monobásico.....3 g	Agua destilada.....1000 mL
Cloruro de Sodio.....1 g	* Sulfato de Hierro Heptahidratado
	Agua Acidificada.....1000 mL (1 mL de
	Ácido Sulfúrico por cada litro de agua).
	*Sulfato de Zinc Heptahidratado...8.82 g
	Cloruro de Manganeso Dihidratado
	.1.44 g
	Trióxido de Molibdeno.....0.71 g
	Sulfato de Cobre Pentahidratado.....
	1.57 g
	Nitrato de Cobalto Hexahidratado.....
	0.49 g
	Agua..... 1000 mL
Método de preparación:	Método de preparación:
1) Disolver cada una de las sales en 400 mL de agua destilada o desmineralizada.	1) A 900 mL de agua destilada agregar 10 mL de cada una de las soluciones de Macronutrientes y 1 mL de las soluciones de micronutrientes.
2) Almacenar las 6 soluciones en frascos color ámbar y en refrigeración.	2) Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C)

Tabla 2. Composición y forma de preparación de medio Bristol modificado.

Medio Bristol modificado
* Soluciones Patrones de Macronutrientes.
Nitrato de Sodio..... 10 g
Cloruro de Calcio Dihidratado..... 1 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado..... 3 g
Fosfato de Potasio, dibásico..... 7 g
Fosfato de Potasio, monobásico.....3 g
Cloruro de Sodio.....1 g
Método de preparación:
1) Disolver cada una de las sales en 400 mL de agua destilada o desmineralizada.
2) Almacenar las 6 soluciones en frascos color ámbar y en refrigeración.

3) A 900 mL de agua destilada agregar 100 μ l de Hidróxido de amonio, 10 mL de cada una de las soluciones de Macronutrientes, excepto Fosfato de Potasio dibásico y monobásico de los cuales solo se agrega 100 μ l de cada una de las soluciones stock.

2) Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C)

2.4 Conteo de algas

Los conteos de algas se realizaron en una cámara de Newbawer siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron conteos de algas por cepa a los 0, 7, 14, 21 y 26 días de cultivo, para determinar su cinética de crecimiento en un cultivo continuo. Para ello se utilizó el medio Bristol, el cual tuvo una variación de ortofosfato de 170 a 211 mg/L y amonio de 4 a 6 mg/L (Figs.9 y 10).



Fig.9 Microscopio. Cámara Newbawer.

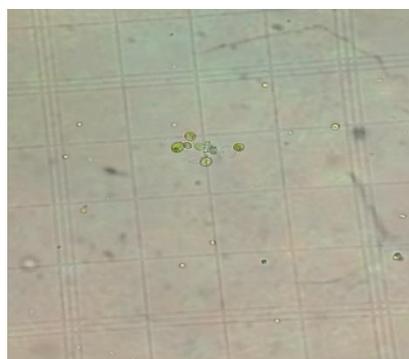


Fig.10 Campo de Conteo.

2.5 Identificación taxonómica

Las algas fueron identificadas mediante su morfología y características anatómicas. De acuerdo a las técnicas de laboratorio, descritos por Sime (2004) editado por Whitton y Brook y Jhon (2003) editado por Wehr y Sheath. Entre otras fuentes se utilizaron las claves especializadas para género de Bourrelly (1966, 1968, 1979); Smith (1950) y Wher y Sheath (2003) y para especie los trabajos de Tifany y Britton (1952), Ortega (1984) y Whitford y Schumacher (1984).

2.6 Medición de Ortofosfato y Amonio.

El ortofosfato y amonio se determinaron mediante un fotómetro de la marca Hanna (Hanna Instruments multiparameter photometer HI 83225) y los reactivos HI93706-A Y -B para ortofosfato y los HI9371-03 y -01 para amonio. La temperatura y pH se determinaron con una precisión de ± 0.1 unidades, mediante un termómetro sumergible y un potenciómetro Eco Testr pH2 de Eutech Instruments, respectivamente.



Fig.11 Fotometro Hanna HI 83225 y reactivos para determinación de NH_4^{++} y PO_4^{3-} .

Las mediciones de ortofosfato y amonio se realizaron por triplicado. Las muestras para las mediciones se obtuvieron de matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 400 mL de medio Bristol modificado (tabla 2) e inoculados con 100 mL de uno de los cultivos de algas de 15 días (o una parte proporcional de los mismos en las combinaciones: 50 mL de cada cultivo en los ensayos con dos algas y 25 mL de cada uno en el ensayo con cuatro algas)

2.6.1 Descripción de los ensayos

Se realizaron un total de tres ensayos. En el primero se determinó cuál de los cuatro aislados de microalgas fue más eficiente para remover amonio y ortofosfato a lo largo de 20 días, las determinaciones se hicieron a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días de iniciado el experimento a partir de una concentración inicial de 20 mg/L y 10 mg/L respectivamente, con una temperatura constante de 24°C y un pH inicial de 8.3. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los testigos consistieron en matraces con las mismas concentraciones de nutrientes en el mismo tipo de medio, sin inóculo. El inóculo consistió en 100 mL de un cultivo de 15 días, de alguna de las algas (Tabla 3).

Tabla 3. Concentración (células) de algas en los inóculos de los matraces utilizados en el ensayo 1.

Ensayo 1 (3 repeticiones)	
Cepas	Inóculo ensayo 1 (100 mL de cultivo)
1	1.5×10^7
2	1×10^7
3	2×10^7
4	1.5×10^7

En el segundo ensayo se utilizaron combinaciones de algas en pares, para determinar cuál de las combinaciones resultaría más eficiente en la remoción de ortofosfato y amonio en cultivos de 21 días,

donde las determinaciones se realizaron a los 0, 7, 14 y 21 días. En este ensayo se utilizaron 50 mL de cada uno de los cultivos para obtener el inóculo. El conteo de células aportado por cada cepa en los inóculos se muestra en la tabla 4.

Para el tercer ensayo se utilizaron como inóculo 25 mL de cada una de las cuatro cepas de microalgas. El ensayo duró 21 días y las determinaciones de ortofosfato y amonio se realizaron al igual que en el ensayo anterior a los 0, 7, 14 y 21 días de cultivo. Las concentraciones iniciales de células en el inóculo se muestran en la Tabla 5.

Tabla 4. Concentración de algas en los inóculos de los matraces utilizados en el ensayo 2.

Ensayo 2 (3 repeticiones)	
Cepas	50 mL de cada cepa de un cultivo de 15 días.
1-2	7.5×10^6 - 5×10^6 células
1-3	7.5×10^6 - 1×10^7
1-4	7.5×10^6 - 7.5×10^6
2-3	5×10^6 - 1×10^7
2-4	5×10^6 - 7.5×10^6
3-4	1×10^7 - 7.5×10^6

Tabla 5. Concentraciones celulares de cada una de las algas en el inóculo utilizado en el ensayo 3.

Ensayo 3 (3 repeticiones)	
Cepas	25mL de cada una de las cepas
1-2-3-4	3.7×10^6 - 2.5×10^6 - 5×10^6 - 3.7×10^6 células.
Control (3 repeticiones)	
500 mL de medio Bristol modificado	

2.7 Análisis estadístico.

El análisis de varianza (ANOVA) fue la técnica estadística que se empleó para contrastar las hipótesis. El valor de alfa se determinó para una confiabilidad del 95% (Alfa = 0.05). La hipótesis nula siempre postuló la igualdad entre los tratamientos, mientras que la hipótesis alternativa siempre postuló que al menos uno de los tratamientos produce un efecto diferente. La regla de decisión fue que no existen diferencias significativas entre los tratamientos cuando en el ANOVA el valor de $p \geq 0.05$ y por el contrario, se presentan diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$.

Adicionalmente, se empleó la prueba de comparación de medias de Duncan cuando en los ANOVAs se presentaron diferencias significativas. El análisis de medias de Duncan permitió determinar cuál o cuáles tratamientos (cepas o consorcios algales) fueron más eficientes para remover ortofosfato o amonio, clasificándolos en diferentes grupos dependiendo de la similitud que presenten las medias entre sí.

Para el ANOVA y las pruebas de Duncan se empleó el programa SPSS 17.

Para determinar si hubo diferencia significativa en la disminución de la cantidad de amonio y ortofosfato entre los matraces testigo (sin algas) y los tratamientos (con algas). Se compararon las concentraciones de los nutrientes a diferentes tiempos de incubación por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con ayuda del paquete estadístico SPSS 17.

Al existir diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó una comparación de medias por el método de DUNCAN para determinar cuál cepa (o consorcio) fue la más eficiente para remover cada nutriente.

2.8 Porcentajes de Remoción.

Se calculó el porcentaje de remoción, a los 20 días (ensayo 1) y 21 días (ensayos 2 y 3), mediante la fórmula 1:

$$[(C_i - C_f) \div C_i] \times 100 = \%R$$

Donde:

%R: Porcentaje de remoción

C_i: Concentración inicial

C_f: Concentración final

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN SOBRE LA IDENTIFICACIÓN DE MICROALGAS Y SU POTENCIAL EN LA REMOCIÓN DE ORTOFOSFATO Y AMONIO EN AGUA RESIDUAL ARTIFICIAL.

3.1 Identificación taxonómica

De los aislados realizados a partir de las microlagunas con agua residual proveniente de una granja porcina, se identificaron cuatro géneros, dos de ellos se llevaron a especie.

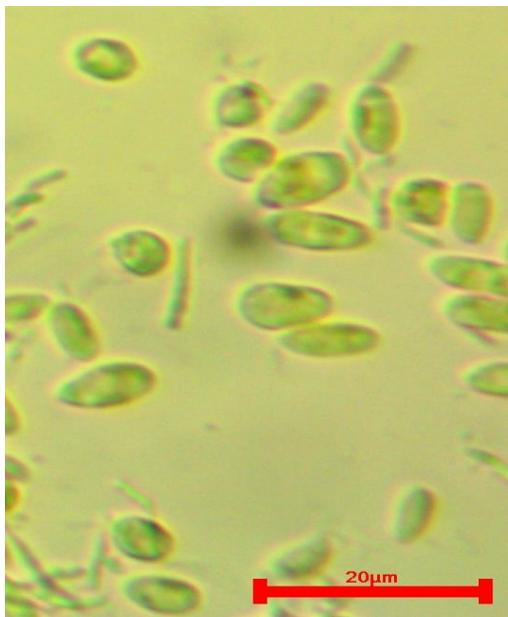
Scotiellopsis sp (Fig.12), tiene células individuales, autoesporas y células jóvenes con forma fusiforme, mientras que las células adultas son ovales, con engrosamientos apicales y las células viejas con forma globosa. Posee una pared celular con polisacárido en el interior y trilaminar en el exterior. Células uninucleadas, con centriolos, cloroplastos parietales. Presentan reproducción asexual por autoesporas, que se liberan por la pared celular. Probablemente cosmopolita.

Neochloris sp (Fig.13) son células esféricas, con pared que puede ser delgada o laminada, cloroplasto con forma de taza, con uno o varios pirenoides; reproducción asexual con zoosporas ovoides; es un género de algas verdes perteneciente a la familia Neochloridaceae, conocida por su capacidad para la producción de aceites.

T. volvocina (Fig.15) posee células esféricas solitarias encerradas en una lorica, con paredes amarillentas y lisas, poro apical sin cuello, dos cloroplastos por célula o más, cada uno con doble pirenoide envainado; con reproducción por células inmóviles, donde las células hijas emergen y secretan una nueva lorica. Especie cosmopolita, en aguas superficiales, ríos, estanques, zanjas, charcos y aguas residuales; indicador de aguas ligeramente a muy contaminadas.

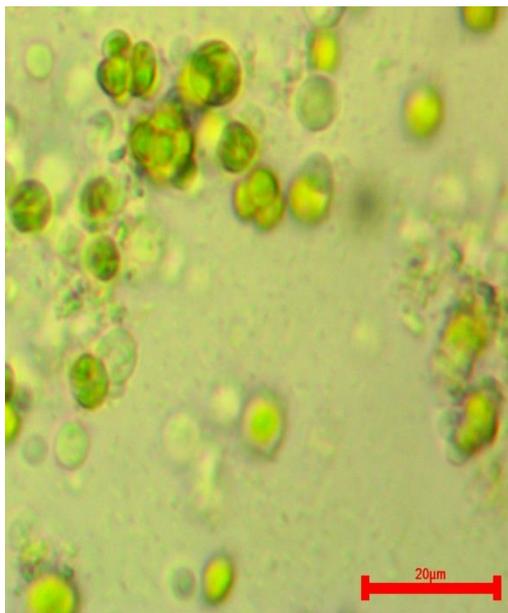
A. dimorphus (Fig.16) células de rectas a curvas, en una a dos filas de cuatro a ocho células, acomodadas en línea o alternadas, con células en forma de huso o elongadas, con ápice puntiagudo, sin espinas, poseen cloroplasto parietal con un solo pirenoide; reproducción asexual por autoesporas. Cosmopolita, encontrada en hábitats acuáticos que van desde los tanques de agua abierta en corrales a grandes lagos poco profundos, que van desde agua prístina a leve o moderadamente enriquecida con nutrientes. (Sime, 2004; John, 2003 y Prescott, 1984).

La historia de la utilización comercial de los cultivos de microalgas, tiene aproximadamente 75 años con aplicación al tratamiento de aguas residuales y la producción en masa de cepas, como *Chlorella* y *Dunaliella* (Abdel-Raouf, 2012). Palmer (1969) reportó varios géneros de algas encontrados en lagunas de estabilización. En orden de abundancia y ocurrencia, las algas encontradas fueron, *Chlorella*, *Ankistrodesmus*, *Scenedesmus*, *Euglena*, *Chlamydomonas*, *Oscillatoria*, *Micractinium* y *Golenkinia*. Además, también enumeró en orden de su tolerancia a los contaminantes orgánicos según lo informado por 165 autores. La lista fue compilada por 60 géneros y 80 especies, los ocho géneros más tolerantes fueron, *Euglena*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Nitzschia*, *Navicula* y *Stigeoclonium*, además menciona que dichos géneros pueden utilizarse como indicadores de agua contaminada. Groeneweg *et al.* (1980) reportaron el crecimiento de *Scenedesmus sp* y *Coelastrum sp* y De Pauw *et al.* (1978) para *Scenedesmus acutus* en aguas diluidas procedentes de una granja porcina.



Reino Plantae
Phylum Chlorophyta
Alga Verde
Clase Chlorophyceae
Orden Chlorellales
Familia Chlorellaceae
Género *Scotiellopsis* Vinatzer, 1975

Fig. 12. Fotografía en microscopio (objetivo 40X).
Scotiellopsis sp,



Reino Plantae
Phylum Chlorophyta
Algas verdes
Clase Chlorophyceae
Orden Sphaeropleales
Familia Neochloridaceae
Género *Neochloris* Starr, 1955

Fig. 13. Fotografía en microscopio (objetivo 40X).
Neochloris sp



Reino Protozoa
Phylum Euglenozoa
Clase Euglenophyceae
Orden Euglenales
Familia Euglenaceae
Género *Trachelomonas*
Especie *T. volvocina* (Ehrenberg) Ehrenberg, 1834

Fig. 14. Fotografía en microscopio (objetivo 40X).
Trachelomonas volvocina.



Turpin Tsarenko in Tsarenko & Petlovanny 2001: 10
Reino Plantae
Phylum Chlorophyta
Clase Chlorophyceae
Orden Sphaeropleales
Familia Scenedesmaceae
Género *Acutodesmus*
Especie *A. dimorphus* (Turpin) P.M.Tsarenko in
Tsarenko & Petlovanny 2001: 10

Fig. 15. Fotografía en microscopio (objetivo 40X).
Acutodesmus dimorphus.

3.2 Cinética de crecimiento en cultivo continuo.

La cinética de crecimiento se realizó contando el número de células presentes en los cultivos cada siete días durante periodo de 26 días, mediante una cámara de Newbauer.

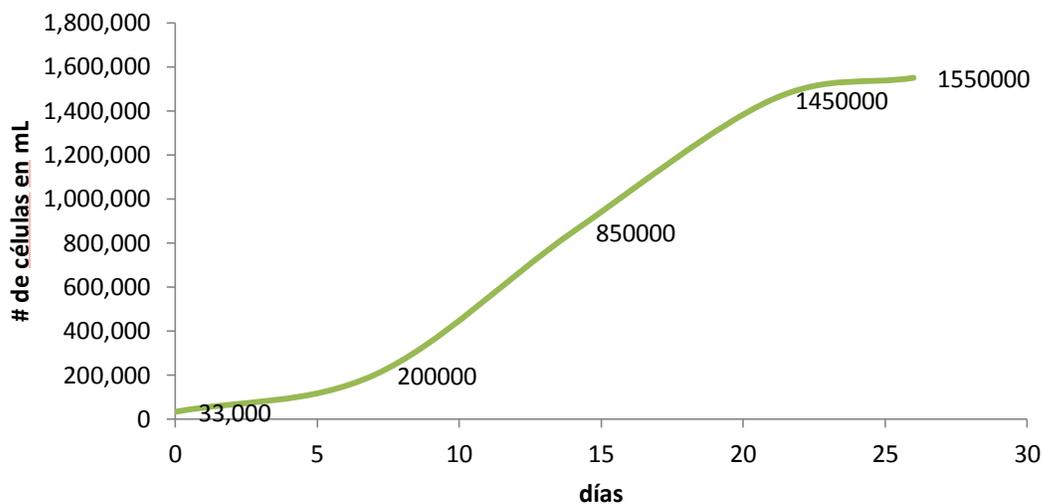


Fig. 16. Cinética de crecimiento cepa 1, día 0: 33,000 – día 26: 1;550,000.

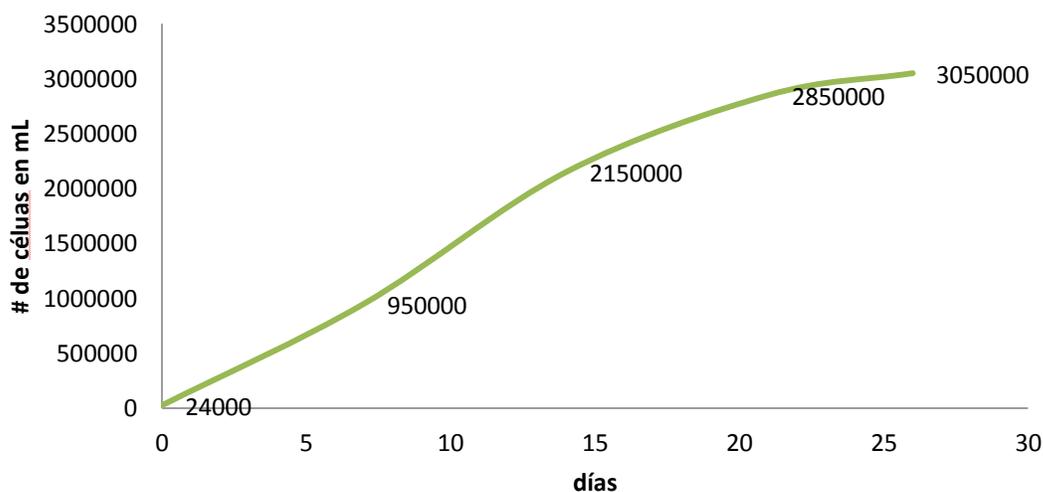


Fig. 17. Cinética de crecimiento cepa 2, día 0: 24,000 – día 26: 3;050,000.

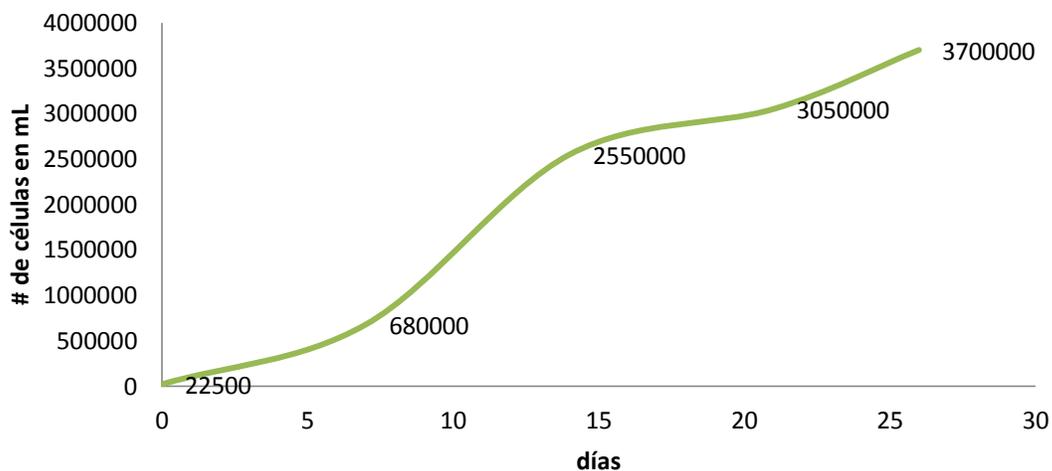


Fig. 18. Cinética de crecimiento cepa 3, día 0: 22,500 – día 26: 3,700,000.

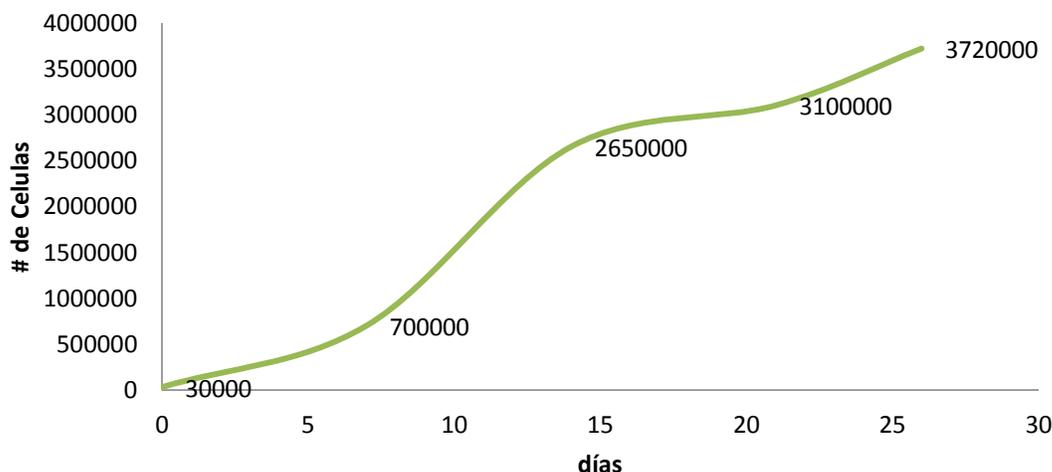


Fig. 19. Cinética de crecimiento cepa 2, día 0: 30,000 – día 26: 3,720,000.

En las Figs. 16 a 19 se puede apreciar que en las cuatro cepas la fase de adaptación o Lag ocurre en los primeros cinco días, pues apenas logran duplicar la cantidad de células inoculada al día cero. Dicha fase es influenciada por factores como la luz, pH, temperatura, en otras palabras por su microcosmos o ambiente de cultivo. Algunos autores como Romo (2002) mencionan que en esta fase es posible que el número de microalgas pueda llegar a disminuir con respecto al inóculo inicial, ninguna de las cuatro cepas de este estudio, presentó dicho comportamiento.

La fase exponencial inicia cuando las microalgas están adaptadas y todas empiezan a multiplicarse cada cierto tiempo, este aumento en número de microalgas se acelera continuamente y en forma exponencial, como se aprecia en las gráficas a partir del quinto día y hasta el día veinte aproximadamente, en las cepas 1 y 2; mientras que las cepas 3 y 4 aparentan tener una división más rápida, pero al día quince hay una declinación relativa que puede deberse a la disminución de

nutrientes, cambios de pH y alteración de otros factores, como consecuencia del incremento poblacional, esto provoca que exista una segunda la fase estacionaria y una nueva fase exponencial después de cinco días. En un cultivo continuo, debido a que se le agrega más medio y se retira cultivo, no se presenta una fase de muerte.

3.3 Determinación de Ortofosfato y Amonio.

Después de determinar la cinética de crecimiento, donde las concentraciones de ortofosfato y amonio variaron entre 170 mg/L a 211 mg/L y 4 mg/L a 6mg/L respectivamente, las cepas fueron colocadas en un periodo de adaptación a las nuevas concentraciones de ortofosfato y amonio, 10 mg/L y 20 mg/L respectivamente, que se requerían para comparar los resultados de los ensayos con los antecedentes. Alargándose aproximadamente 5 días más la fase de adaptación.

A continuación se muestran los resultados de la determinación de ortofosfato y amonio en cada uno de los 3 ensayos.

3.3.1 Ensayo 1: Evaluación individual de las cepas para la remoción de ortofosfato.

Para determinar cuál de los cuatro aislados de microalgas fue más eficiente para remover ortofosfato a lo largo de 20 días, las mediciones se hicieron a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días a partir de una concentración inicial de 10 mg/L. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los testigos consistieron en matraces con la misma concentración de ortofosfato en el mismo tipo de medio, sin inóculo. El inóculo consistió en 100 mL de un cultivo de 15 días, de alguna de las algas. Con los resultados de estas mediciones se realizó el Análisis de varianza que se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Análisis de varianza para el ensayo 1 Ortofosfato.

ANOVA						
	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F	Sig.
Dia_0	Entre los grupos	3.600	4	0.900	2.700	0.092
	Dentro de los grupos	3.333	10	0.333		
	Total	6.933	14			
Dia_4	Entre los grupos	27.733	4	6.933	10.400	0.001
	Dentro de los grupos	6.667	10	0.667		
	Total	34.400	14			
Dia_8	Entre los grupos	50.933	4	12.733	15.917	0.000
	Dentro de los grupos	8.000	10	0.800		
	Total	58.933	14			
	Entre los grupos	63.333	4	15.833	33.929	0.000

Dia_12	Dentro de los grupos	4.667	10	0.467		
	Total	68.000	14			
Dia_16	Entre los grupos	73.333	4	18.333	30.556	0.000
	Dentro de los grupos	6.000	10	0.600		
Dia_20	Total	79.333	14			
	Entre los grupos	111.600	4	27.900	38.045	0.000
Dia_20	Dentro de los grupos	7.333	10	0.733		
	Total	118.933	14			

La Tabla 6a muestra que al día cero no existe diferencia significativa entre tratamientos, a los días cuatro, ocho, doce, dieciséis y veinte si se presenta esta diferencia ($p > 0.05$).

Tabla 6a. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día cero del ensayo 1. (Alfa = 0.05).

Tratamientos	N	Grupos Duncan
		1
<i>Neochloris</i> sp (C2)	3	9.3333
<i>Scotiellopsis</i> sp (C1)	3	9.6667
<i>Acutodesmus dimorphus</i> (C4)	3	9.6667
Control	3	10.3333
<i>Trachelomonas volvocina</i> (C3)	3	10.6667
Sig.		0.102

La Tabla 6b muestra que al comparar al cuarto día las concentraciones de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron tres grupos, siendo *Scotiellopsis* sp la cepa en el grupo tres junto al control, con la cantidad más alta de ortofosfato, seguida en menor concentración por *Neochloris* sp en un grupo intermedio, posteriormente en el grupo 1, con la menor concentración de ortofosfato al día cuatro se encuentran *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus*.

Tabla 6b. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día cuatro del ensayo 1. Las diferencias entre los tratamientos al día 4 permitieron la formación de tres grupos. (Alfa = 0.05).

Día_4				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	6.3333		
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3	6.6667		
<i>Neochloris sp</i>	3	7.3333	7.3333	
<i>Scotiellopsis sp</i>	3		8.6667	8.6667
Control	3			10.0000
Sig.		0.182	0.073	0.073

Al comparar al día ocho las concentraciones de mg/L de ortofosfato, la Tabla 6c muestra que en cada uno de los cultivos, se separaron cuatro grupos. El control queda solo en el grupo 3, separándose por completo de las cuatro cepas, seguido por *Scotiellopsis sp* en el grupo 2 con una menor concentración. *Neochloris sp* y *Trachelomonas volvocina* se sitúan en el grupo intermedio 1-2, con una cantidad de ortofosfato todavía menor y en el grupo 1 se encuentra *Acutodesmus dimorphus*, con la menor concentración de ortofosfato.

Tabla 6c. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día ocho del ensayo 1. Las diferencias entre los tratamientos al día 8 permitieron la formación de 4 grupos. (Alfa = 0.05).

Día_8				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	4.6667		
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3	5.6667	5.6667	
<i>Neochloris sp</i>	3	6.0000	6.0000	
<i>Scotiellopsis sp</i>	3		7.3333	
Control	3			10.0000
Sig.		.112	.054	1.000

En Tabla 6d se observa que al comparar al día doce las concentraciones de mg/L de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cuatro grupos. El control quedó aislado por completo en el grupo 3, seguido, al igual que en el octavo día, con menor concentración por *Scotiellopsis sp* en el grupo 2, *Trachelomonas volvocina* y *Neochloris sp* como grupo intermedio 1-2 y posteriormente en el grupo 1, con la menor concentración de ortofosfato al día doce *Acutodesmus dimorphus*, el cual presenta la menor concentración de ortofosfato desde el cuarto día.

Tabla 6d. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día doce del ensayo 1. Las diferencias entre los tratamientos al día 12 permitieron la formación de cuatro grupos. (Alfa = 0.05).

Día_12				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	4.3333		
<i>Neochloris</i> sp	3	4.6667	4.6667	
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3	5.3333	5.3333	
<i>Scotiellopsis</i> sp	3		5.6667	
Control	3			10.0000
Sig.		.117	.117	1.000

La Tabla 6e muestra que al comparar al día dieciséis las concentraciones de mg/L de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron dos grupos, quedando sólo el control en el grupo 2 y las cuatro cepas dentro del grupo 1, en el siguiente orden, de mayor a menor concentración de mg/L de ortofosfato, *Trachelomonas volvocina*, *Scotiellopsis* sp, *Acutodesmus dimorphus* y *Neochloris* sp teniendo por primera vez la concentración más baja de ortofosfato entre las cuatro cepas. El día dieciséis, según la cinética de crecimiento, está entre los días donde comienza la fase estacionaria donde ya no se aprecia una división celular neta, es decir el número de células se mantiene constante por cierto periodo de tiempo, debido al balance entre la natalidad y la mortalidad que presenta la población en cultivo, esto podría explicar por qué no hubo diferencia en la remoción del ortofosfato al no haber más división celular.

Tabla 6e. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día dieciséis del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_16				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	
<i>Neochloris</i> sp	3	4.0000		
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	4.3333		
<i>Scotiellopsis</i> sp	3	4.6667		
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3	5.3333		
Control	3			10.0000
Sig.		.078		1.000

Al día veinte las concentraciones de mg/L de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron en cinco grupos. El control se encontró en el grupo 4, *Trachelomonas volvocina* en el grupo

3, *Neochloris sp* en el grupo intermedio 2-3, *Scotiellopsis sp* en el grupo 1-2 y *Acutodesmus dimorphus* en el grupo 1. Después de la fase estacionaria, se presenta la fase de muerte, esto podría explicar el porqué de la formación de grupos, es probable que las cepas con menor concentración de ortofosfato (*A. dimorphus*) tarden más tiempo en llegar a esta fase que las que ya no lo removieron (*T. volvocina*) (Tabla 6f).

Tabla 6f. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día veinte del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_20					
Tratamientos	N	Grupos Duncan			
		1	2	3	4
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	1.6667			
<i>Scotiellopsis sp</i>	3	2.3333	2.3333		
<i>Neochloris sp</i>	3		3.3333	3.3333	
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3			4.6667	
Control	3				9.3333
Sig.		.363	.183	.086	1.000

-Para determinar la variación de la concentración de ortofosfato entre las repeticiones, se elaboraron las siguientes gráficas que muestran la desviación estándar:

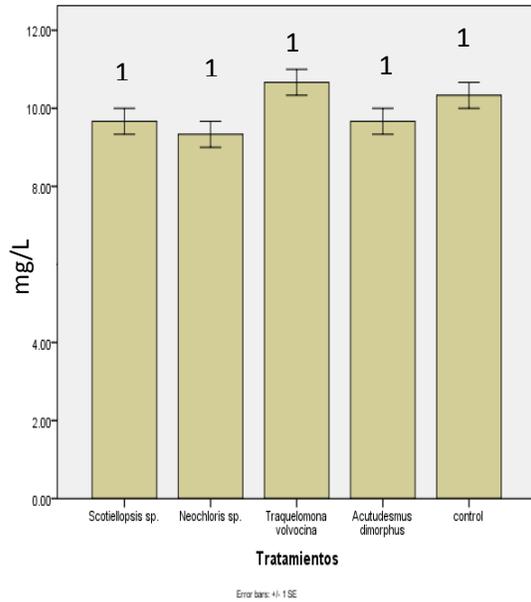


Fig. 20. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar, barras) de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cero. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

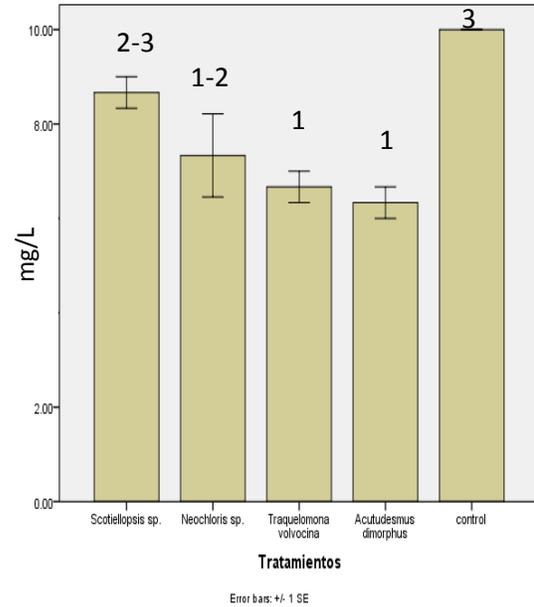


Fig. 21. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar, barras) de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cuatro. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

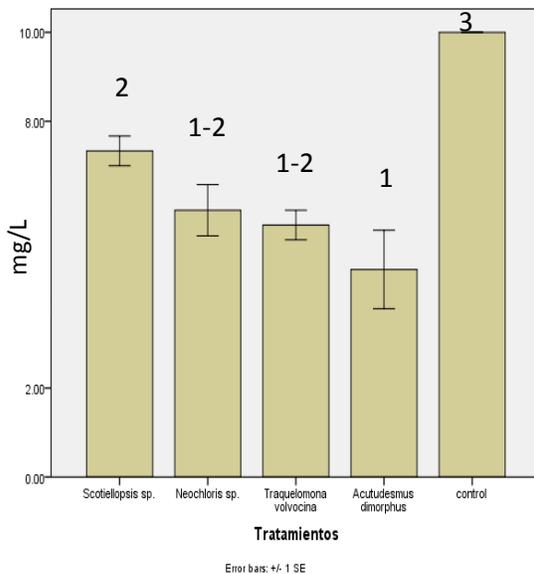


Fig. 22. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar, barras) de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día ocho. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

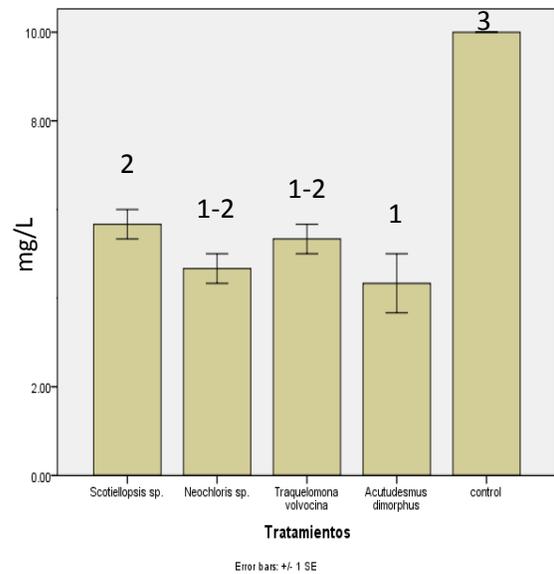


Fig. 23. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar, barras) de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día doce. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

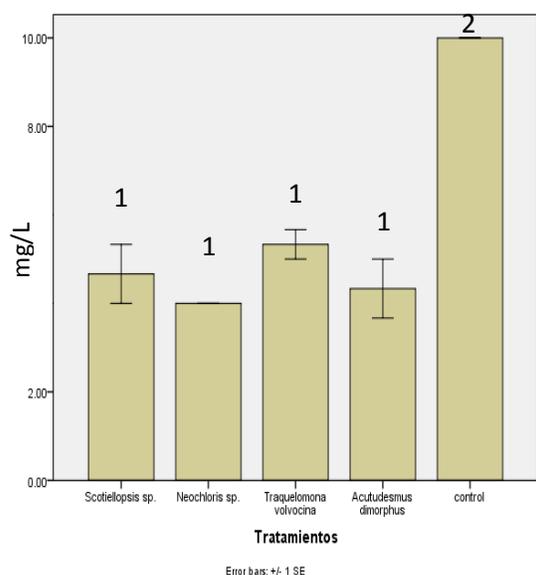


Fig. 24. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar, barras) de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día dieciséis. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

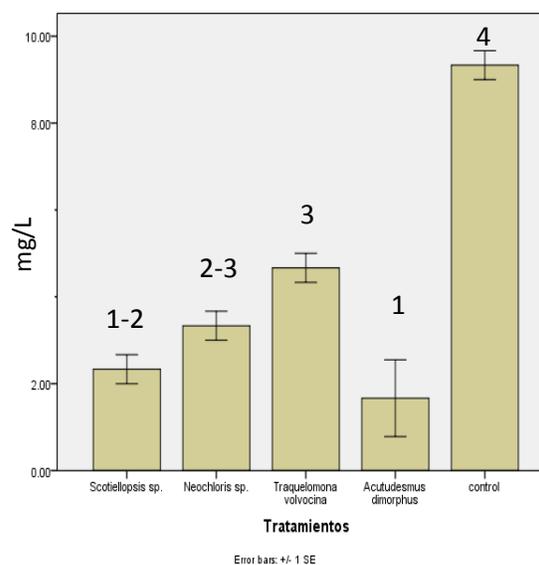


Fig. 25. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar, barras) de las concentraciones de ortofosfato entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día veinte. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

En la Fig. 20 se puede apreciar como la variación en las concentraciones es similar en las 4 cepas y en el control. Para el día cuatro, (Fig.21) el control se estabiliza y la variabilidad en *Neochloris sp* es alta comparada con las demás cepas, de 2 mg/L mientras que en las otras cepas se presenta una variabilidad 0.5 mg/L. Para el día ocho (Fig.22), el control permanece constante, así también la variabilidad en *Scotiellopsis sp* y *Trachelomona volvocina*, mientras que *Acutodesmus dimorphus* presenta una variabilidad de 2 mg/L al igual que *Neochloris sp*. Al día doce (Fig.19), las cuatro cepas han absorbido la mitad o más del ortofosfato inicial en el ensayo (10 mg/L), *Acutodesmus dimorphus* con la mayor remoción, pero también con la mayor variabilidad entre las repeticiones del ensayo, seguida por *Neochloris sp* que disminuye su variabilidad y *Trachelomona volvocina* y *Scotiellopsis sp* que permanecen constantes. Para el día dieciséis (Fig.23) la variabilidad en *Neochloris sp* desaparece, en *Scotiellopsis sp* aumenta colocándose a la par con *Acutodesmus dimorphus*, mientras que *Trachelomona volvocina* continua constante, pero con la concentración más alta de ortofosfato. Al día veinte, día final del ensayo, *Acutodesmus dimorphus* alcanzó la menor concentración de ortofosfato, con un promedio de 1.6 mg/L, pero con la variabilidad más alta entre las repeticiones, de aproximadamente 1.5 mg/L, enseguida con la concentración más baja de ortofosfato esta *Scotiellopsis sp*, posteriormente *Neochloris sp* y *Trachelomona volvocina* con una variabilidad de 0.5 mg/L aproximadamente. En general se puede observar que *Acutodesmus dimorphus* y *Neochloris sp* presentan un comportamiento más variable en el consumo de ortofosfato en cada una de las repeticiones, mientras que *Scotiellopsis sp* y *Trachelomona volvocina* presentan un comportamiento más estable, esto puede ser debido a la afectación que el ambiente (temperatura, pH, Luz, aireación) tiene sobre las microalgas, es importante mencionar, que se expusieron a condiciones extremas de nutrientes, 20 mg/L es la cantidad de amonio en la que comienza a ser nocivo para las microalgas y poca cantidad de ortofosfato limita la división celular. Otro factor importante es la velocidad de división celular, según la cinética de crecimiento, una de las que presenta una velocidad mayor de división es

Acutodesmus dimorphus, quien además según observaciones cualitativas, fue quien tardó menos en adaptarse al cambio en la concentración de nutrientes.

Ya que de los gráficos se desprende que la variabilidad es más consistente sólo en los cultivos de *Acutodesmus* y *Neochloris*, a lo largo de todo el ensayo; esto nos indica que tanto el manejo de las muestras como las determinaciones de los nutrientes tuvieron poca influencia en esta variabilidad, de no ser así, la variabilidad debió presentarse en diferentes cepas a diferentes tiempos. No obstante a la variabilidad entre matraces, *A. dimorphus* alcanzó los niveles más altos de remoción de ortofosfato de una manera significativamente diferente a las otras cepas.

3.3.2 Ensayo 1: Evaluación individual de las cepas para la remoción de amonio

Para determinar cuál de los cuatro aislados de microalgas fue más eficiente para remover amonio a lo largo de 20 días, las mediciones se hicieron a los 0, 4, 8, 12, 16 y 20 días a partir de una concentración inicial de 20 mg/L. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los testigos consistieron en matraces con la misma concentración de ortofosfato en el mismo tipo de medio, sin inóculo. El inóculo consistió en 100 mL de un cultivo de 15 días, de alguna de las algas. Con los resultados de estas mediciones se realizó el siguiente Análisis de varianza:

Tabla 7. Análisis de varianza para el ensayo 1 (Amonio). ($p > 0.05$).

ANOVA						
Fuente de variación	Suma de cuadrados	gl	Cuadrado medio	F	Sig.	
Dia_0	Entre los grupos	3.600	4	.900	1.688	.229
	Dentro de los grupos	5.333	10	.533		
	Total	8.933	14			
Dia_4	Entre los grupos	241.733	4	60.433	6.125	.009
	Dentro de los grupos	98.667	10	9.867		
	Total	340.400	14			
Dia_8	Entre los grupos	331.733	4	82.933	9.215	.002
	Dentro de los grupos	90.000	10	9.000		
	Total	421.733	14			
Dia_12	Entre los grupos	538.400	4	134.600	48.071	.000
	Dentro de los grupos	28.000	10	2.800		
	Total	566.400	14			
Dia_16	Entre los grupos	580.667	4	145.167	62.214	.000
	Dentro de los grupos	23.333	10	2.333		
	Total	604.000	14			
Dia_20	Entre los grupos	599.600	4	149.900	83.278	.000
	Dentro de los grupos	18.000	10	1.800		
	Total	617.600	14			

La Tabla 7a muestra que al día cero no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Tabla 7a. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de Amonio (mg/L) al día cero del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_0		
Tratamientos	N	Grupos Duncan
		1
<i>Scotiellopsis sp (C1)</i>	3	19.3333
<i>Neochloris sp .(C2)</i>	3	19.6667
<i>Trachelomonas volvocina(C3)</i>	3	20.3333
<i>Acutodesmus dimorphus(C4)</i>	3	20.3333
Control	3	20.6667
Sig.		.067

En la Tabla 7b se observa que al comparar al cuarto día las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cinco grupos, el control en el grupo 3, seguido por *Scotiellopsis sp* con la cantidad más alta de amonio en el grupo intermedio 2-3. Es seguida en menor concentración por *Trachelomonas volvocina* en el grupo 2, enseguida *Acutodesmus dimorphus* en un grupo intermedio 1-2 y *Neochloris sp* en el grupo 1, con la menor concentración de amonio.

Tabla 7b. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de Amonio (mg/L) al día cuatro del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_4				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Neochloris sp</i>	3	8.3333		
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	12.3333	12.3333	
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3		14.6667	
<i>Scotiellopsis sp</i>	3		15.0000	15.0000
Control	3			20.6667
Sig.		.150	.344	.052

La Tabla 7c muestra que al comparar al día ocho las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos, se formaron cuatro grupos, donde ahora el control se separó por completo de las cuatro cepas, quedando solo en el grupo 3, seguido con menor concentración por *Scotiellopsis sp*

en el grupo 2, *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus* como grupo intermedio 1-2 y en el grupo 1, con la menor concentración de amonio, *Neochloris* sp

Tabla 7c. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de Amonio (mg/L) al día ocho del ensayo 1. Las diferencias entre los tratamientos al día 8 permitieron la formación de 4 grupos. (Alfa = 0.05)

Día_8				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Neochloris</i> sp	3	6.6667		
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	9.0000	9.0000	
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3	10.3333	10.3333	
<i>Scotiellopsis</i> sp	3		13.0000	
Control	3			20.3333
Sig.		.183	.150	1.000

La comparación de las concentraciones de mg/L de amonio al día doce presentes en cada uno de los cultivos (Tabla 7d), se separaron cuatro grupos, el control en el grupo 3, seguido al igual que en el octavo día y con una menor concentración por *Scotiellopsis* sp en el grupo 2, *Trachelomonas volvocina* y *Neochloris* sp como grupo intermedio 1-2 y finalmente en el grupo 1, con la menor concentración de amonio al *Acutodesmus dimorphus*. Estos resultados son iguales a los que se presentaron al día doce con el ortofosfato.

Tabla 7d. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de Amonio (mg/L) al día ocho del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_12				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	4.0000		
<i>Neochloris</i> sp	3	4.3333		
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3	7.0000	7.0000	
<i>Scotiellopsis</i> sp	3		8.3333	
Control	3			20.3333
Sig.		.062	.352	1.000

La Tabla 7e muestra que al comparar al día dieciséis las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos, se separaron tres grupos, quedando sólo el control en el grupo 3, posteriormente en el grupo 2 *Scotiellopsis* sp y *Trachelomonas volvocina* y en el grupo 1 con la menor concentración de amonio *Neochloris* sp y *Acutodesmus dimorphus* y teniendo desde el día cuatro la concentración más baja de amonio entre las cuatro cepas.

Tabla 7e. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de amonio (mg/L) al día dieciséis del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_16				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	3.0000		
<i>Neochloris sp</i>	3	3.3333		
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3		6.6667	
<i>Scotiellopsis sp</i>	3		7.0000	
Control	3			20.0000
Sig.		.795	.795	1.000

Se distingue que al comparar al día veinte las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos (Tabla 7f), se separaron cuatro grupos. El control en el grupo 3, *Trachelomonas volvocina* en el grupo 2, *Scotiellopsis sp* en el grupo intermedio 1-2 y *Neochloris sp* y *Acutodesmus dimorphus* en el grupo 1. Se observa que desde el día dieciséis hasta el día veinte, dejaron de consumir amonio, esto puede ser debido a la reducción de la tasa de división celular y velocidad de crecimiento de las cepas, así como la capacidad de adaptación al medio.

Tabla 7f. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de Ortofosfato (mg/L) al día veinte del ensayo 1. (Alfa = 0.05)

Día_20				
Tratamientos	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	3	3.0000		
<i>Neochloris sp</i>	3	3.3333		
<i>Scotiellopsis sp</i>	3	5.3333	5.3333	
<i>Trachelomonas volvocina</i>	3		6.3333	
Control	3			20.0000
Sig.		.069	.383	1.000

-Para determinar la variación de la concentración de amonio entre las repeticiones, se elaboraron las siguientes gráficas, que muestran la desviación estándar:

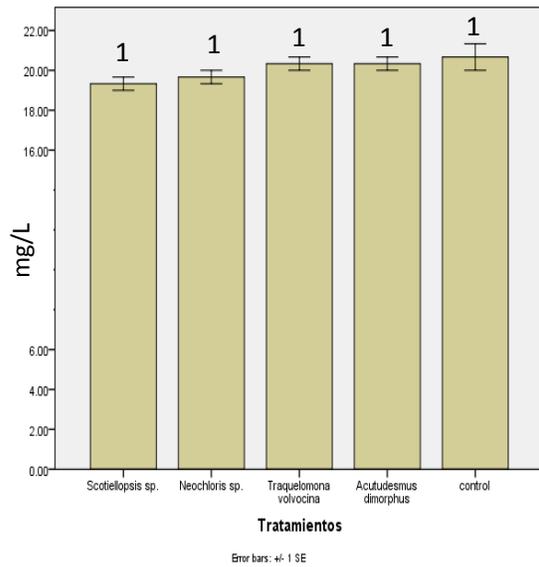


Fig. 26. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar) de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cero. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

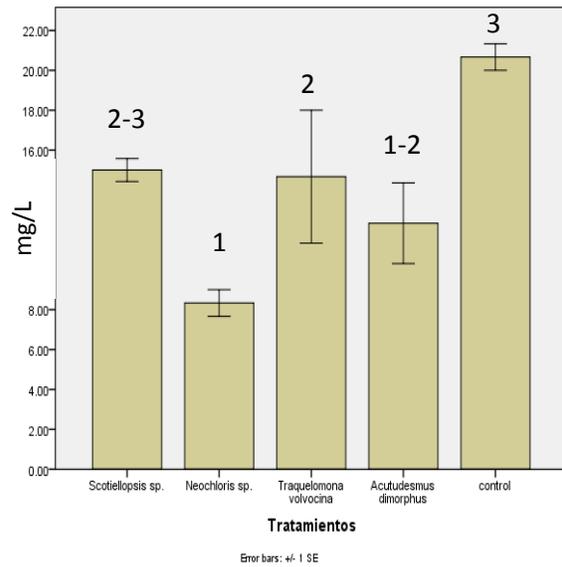


Fig. 27. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar) de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día cuatro. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

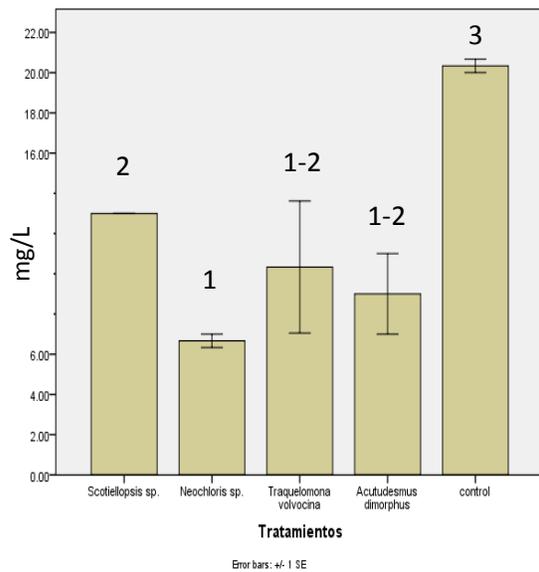


Fig. 28. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar) de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día ocho. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

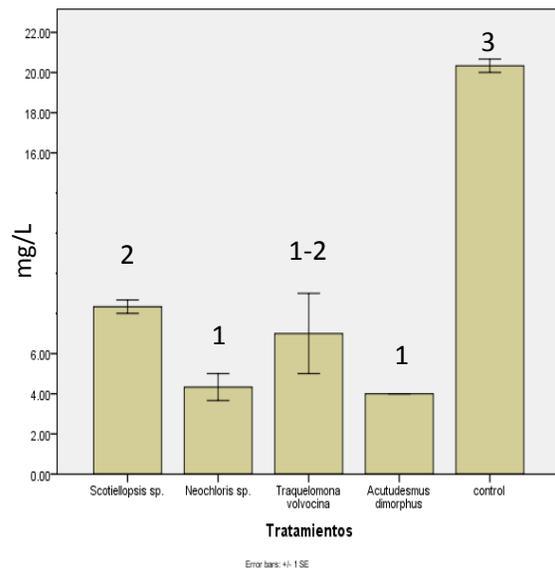


Fig. 29. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar) de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día doce. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

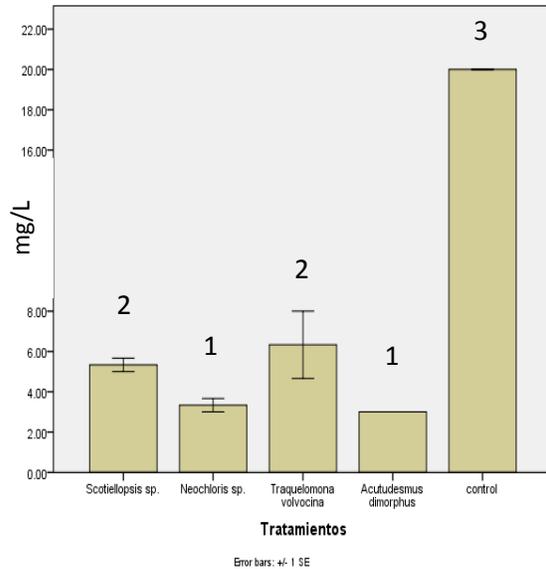


Fig. 30. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar) de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día dieciséis. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

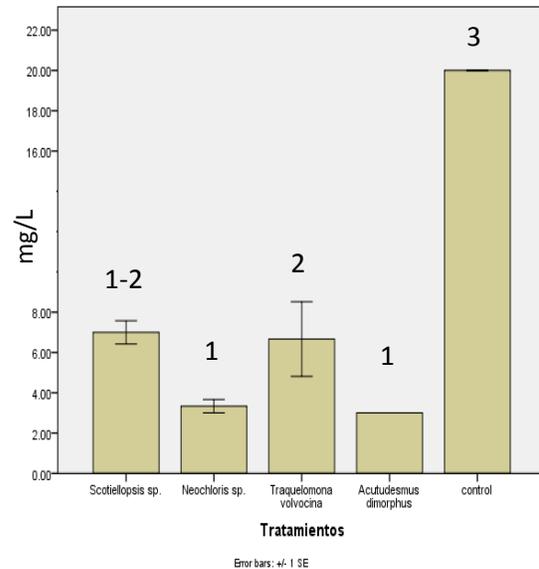


Fig. 31. Promedio (columnas) y variabilidad (desviación estándar) de las concentraciones de amonio entre cada una de las tres repeticiones para cada cepa y el control al día veinte. Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

En la Fig. 24 se puede apreciar como la variación en las concentraciones es similar en las cuatro cepas y en el control al día cero. Para el día cuatro, (Fig.25) se observa que *Trachelomona volvocina* posee la mayor variabilidad, de aproximadamente 5 mg/L, seguida por *Acutodesmus dimorphus* con una variabilidad aproximada de 4 mg/L, *Scotiellopsis sp* y *Neochloris sp* presentan similar y baja variabilidad, por otro lado *Neochloris sp* ha consumido más de la mitad del amonio apenas al cuarto día. Al día ocho (Fig.26) *Trachelomonas volvocina* presenta la mayor variabilidad, seguida de *Acutodesmus dimorphus*, mientras *Neochloris sp* y *Scotiellopsis sp* tienen una variabilidad casi nula. Para el día doce (Fig.27) *Trachelomona volvocina* continúa con la mayor variabilidad seguida por *Neochloris sp*, *Scotiellopsis sp* y *Acutodesmus dimorphus*. En el día dieciséis (Fig.28) *Trachelomona volvocina* continúa con una amplia variabilidad (2 mg/L) comparada con las demás cepas que tienen una variabilidad de 0.5 mg/L o menos. Al día veinte la variabilidad se conserva como igual que el día dieciséis. En general, *Trachelomona volvocina* fue quien mayor variabilidad tuvo a lo largo del ensayo, mientras que las demás cepas a partir del día ocho comenzaron a estabilizarse y presentar una variabilidad entre las repeticiones muy similar, por otro lado *Scotiellopsis sp* tuvo un consumo más constante de nutrientes pero dicha cepa y *Trachelomona volvocina* presentaron las concentraciones más altas de amonio al finalizar el ensayo. Como se mencionó anteriormente, este comportamiento puede ser ligado a las condiciones de cultivo y/o capacidad de adaptación de las microalgas.

3.3.3 Ensayo 2 y 3, Evaluación de las combinaciones en pares y combinación de las cuatro cepas para la remoción de ortofosfato.

En el ensayo 2 se utilizaron combinaciones de algas en pares, para determinar cuál de las combinaciones resultaría más eficiente en la remoción de ortofosfato en cultivos de 21 días, donde las determinaciones se realizaron a los 0, 7, 14 y 21 días a partir de una concentración inicial de 10 mg/L de ortofosfato. En este ensayo se utilizaron 50 mL de cada uno de los cultivos para obtener el inóculo.

Para el ensayo 3 se utilizó como inóculo 25 mL de cada una de las cuatro cepas de microalgas. El ensayo duró 21 días y las determinaciones de ortofosfato se realizaron al igual que en el ensayo anterior a los 0, 7, 14 y 21 días de cultivo a partir de una concentración inicial de 10 mg/L de ortofosfato. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los testigos consistieron en matraces con la misma concentración de ortofosfato en el mismo tipo de medio, sin inóculo. Con los resultados de estas mediciones se realizó el siguiente Análisis de varianza:

Tabla 8. Análisis de varianza para el ensayo 2, Combinaciones en pares (Ortofosfato) y ensayo 3, combinación de las cuatro cepas. ($p > 0.05$).

ANOVA						
Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GI	Cuadrado Medio	F	Sig.	
Dia_0	Entre los grupos	.292	7	0.042	0.143	0.993
	Dentro de los grupos	4.667	16	.292		
	Total	4.958	23			
Dia_7	Entre los grupos	62.667	7	8.952	15.347	0.000
	Dentro de los grupos	9.333	16	0.583		
	Total	72.000	23			
Dia_14	Entre los grupos	130.500	7	18.643	7.850	0.000
	Dentro de los grupos	38.000	16	2.375		
	Total	168.500	23			
Dia_21	Entre los grupos	119.292	7	17.042	10.225	0.000
	Dentro de los grupos	26.667	16	1.667		
	Total	145.958	23			

La Tabla 8a muestra que al día cero no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Tabla 8a. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día cero del ensayo 2 y 3. Al no existir diferencias de respuesta entre los tratamientos no se forman grupos diferentes. (N: *Neochloris sp*, T: *Trachelomonas volvocina*, S: *Scotiellopsis sp* y A: *Acutodesmus dimorphus*). (Alfa = 0.05)

Día_0		
Tratamiento	N	Grupos Duncan
		1
NxT	3	10.0000
SxN	3	10.3333
SxT	3	10.3333
SxA	3	10.3333
TxA	3	10.3333
NxA	3	10.3333
SxNxTxA	3	10.3333
Control	3	10.3333
Sig.		.511

La Tabla 8b muestra que al comparar al séptimo día las concentraciones de mg/L de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cinco grupos, el control en el grupo 4, seguido por la combinación SxA con la cantidad más alta de ortofosfato en el grupo intermedio 3-4, posteriormente las combinaciones SxN, SxNxTxA y NxA en el grupo intermedio 2-3, seguidas por la combinación TxA en el grupo 2 y SxT y NxT con las concentraciones más bajas de ortofosfato a los siete días, 5.6 y 4.6 mg/L respectivamente.

Tabla 8b. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día siete del ensayo 2 y 3. Las diferencias entre los tratamientos al día 7 permitieron la formación de 5 grupos. (Alfa = 0.05)

Día_7					
Tratamiento	N	Grupos Duncan			
		1	2	3	4
NxT	3	4.6667			
SxT	3	5.6667			
TxA	3		7.0000		
NxA	3		7.6667	7.6667	
SxNxTxA	3		7.6667	7.6667	
SxN	3		8.3333	8.3333	
SxA	3			9.0000	9.0000
Control	3				10.0000
Sig.		.128	.065	.065	.128

Se observó en la Tabla 8c que al comparar al día catorce las concentraciones de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cinco grupos, el control en el grupo 4, seguido por la combinación SxA con la cantidad más alta de ortofosfato en el grupo intermedio 3-4, posteriormente las combinaciones SxN, SxNxTxA y NxA en el grupo intermedio 2-3, seguidas por la combinación TxA en el grupo 2 y SxT y NxT con las concentraciones más bajas de ortofosfato a los catorce días.

Tabla 8c. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día catorce del ensayo 2 y 3. Las diferencias entre los tratamientos al día 14 permitieron la formación de 5 grupos. (Alfa = 0.05)

Día_14					
Tratamiento	N	Grupos Duncan			
		1	2	3	4
TxA	3	3.3333			
SxNxTxA	3	3.3333			
NxA	3	3.6667	3.6667		
NxT	3	3.6667	3.6667		
SxT	3	4.0000	4.0000		
SxN	3		6.3333	6.3333	
SxA	3			7.6667	7.6667
Control	3				10.0000
Sig.		.638	.067	.305	.082

La Tabla 8d muestra que al comparar al día veintiuno las concentraciones de mg/L de ortofosfato presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cuatro grupos, el control en el grupo 3, seguido por la combinación SxN, SxA y SxT con la cantidad más alta de ortofosfato en el grupo 2, posteriormente las combinaciones NxT, NxA y TxA en el grupo intermedio 1-2 y finalmente SxNxTxA el grupo 1 con la concentración más baja de ortofosfato al día final del ensayo.

Tabla 8d. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de ortofosfato (mg/L) al día veintiuno del ensayo 2 y 3. Las diferencias entre los tratamientos al día 21 permitieron la formación de 4 grupos. (Alfa = 0.05)

Día_21				
Tratamiento	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
SxNxTxA	3	1.3333		
TxA	3	3.3333	3.3333	
NxA	3	3.3333	3.3333	
NxT	3	3.3333	3.3333	
SxT	3		4.0000	
SxA	3		5.3333	
SxN	3		5.6667	
Control	3			9.3333
Sig.		.099	.065	1.000

3.3.4 Ensayo 2 y 3, Evaluación de las combinaciones en pares y combinación de las cuatro cepas para la remoción de amonio.

En el ensayo 2 se utilizaron combinaciones de algas en pares, para determinar cuál de las combinaciones resultaría más eficiente en la remoción de amonio en cultivos de 21 días, donde las determinaciones se realizaron a los 0, 7,14 y 21 días a partir de una concentración inicial de 20 mg/L de ortofosfato. En este ensayo se utilizaron 50 mL de cada uno de los cultivos para obtener el inóculo.

Para el ensayo 3 se utilizó como inóculo 25 mL de cada una de las cuatro cepas de microalgas. El ensayo duró 21 días y las determinaciones de amonio se realizaron al igual que en el ensayo anterior a los 0, 7, 14 y 21 días de cultivo a partir de una concentración inicial de 20 mg/L de amonio. Los ensayos se realizaron por triplicado. Los testigos consistieron en matraces con la misma concentración de amonio en el mismo tipo de medio, sin inóculo. Con los resultados de estas mediciones se realizó el siguiente Análisis de varianza:

Tabla 9. Análisis de varianza para el ensayo 2, combinaciones en pares (Amonio) y ensayo 3, combinación de las cuatro cepas. Día cero no muestra diferencia significativa, día siete, catorce y veintiuno si presentan diferencia significativa entre los tratamientos ($p>0.05$).

ANOVA						
Fuente de variación		Suma de cuadrados	GI	Cuadrado medio	F	Sig.
Dia_0	Entre los grupos	29.167	7	4.167	4.348	0.007
	Dentro de los grupos	15.333	16	0.958		
	Total	44.500	23			
Dia_7	Entre los grupos	199.333	7	28.476	20.101	0.000
	Dentro de los grupos	22.667	16	1.417		

		grupos				
Total		222.000	23			
Entre los grupos		433.625	7	61.946	11.799	0.000
Dia_14	Dentro de los	84.000	16	5.250		
		grupos				
Total		517.625	23			
Entre los grupos		510.625	7	72.946	22.737	0.000
Dia_21	Dentro de los	51.333	16	3.208		
		grupos				
Total		561.958	23			

La Tabla 9a muestra que al día cero no existe diferencia significativa entre los tratamientos

Tabla 9a. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de amonio (mg/L) al día cero del ensayo 2. (Alfa = 0.05)

Día_0		
Tratamiento	N	Grupos Duncan
		1
SxT	3	17.0000
SxA	3	19.6667
NxA	3	19.6667
SxN	3	20.0000
TxA	3	20.0000
SxNxTxA	3	20.3333
NxT	3	20.6667
Control	3	20.6667
Sig.		.063

La Tabla 9b muestra que al comparar al séptimo día las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cinco grupos, el control en el grupo 4, seguido por la combinación SxN en el grupo intermedio 3-4 con la cantidad más alta de amonio, posteriormente las combinaciones, TxA y NxA en el grupo intermedio 2-3, seguidas por la combinación NxT, SxT y SxA en el grupo 2 y con un consumo de la mitad (10.3 mg/L) de la concentración inicial (20 mg/L) la combinación SxNxTxA.

Tabla 9b. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de amonio (mg/L) al día siete del ensayo 2 y 3. (Alfa = 0.05)

Día_7					
Tratamiento	N	Grupos Duncan			
		1	2	3	4
SxNxTxA	3	10.3333			
SxA	3		14.0000		
SxT	3		14.3333		
NxT	3		14.6667		
NxA	3		15.3333	15.3333	
TxA	3		16.3333	16.3333	
SxN	3			18.3333	18.3333
Control	3				20.6667
Sig.		1.000	.304	.099	.304

La Tabla 9c muestra que al comparar al día catorce las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cinco grupos, el control en el grupo 3, seguido por la combinación SxN con la cantidad más alta de amonio en el grupo intermedio 2-3, seguidas por las combinaciones SxA y TxA en el grupo 2 y NxT, SxT y NxA en el grupo intermedio 1-2, finalmente con la concentración más baja de amonio a los catorce días se mantiene SxNxTxA.

Tabla 9c. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de amonio (mg/L) al día catorce del ensayo 2 y 3. (Alfa = 0.05)

Día_14					
Tratamiento	N	Grupos Duncan			
		1	2	3	
SxNxTxA	3	5.0000			
NxA	3	8.6667	8.6667		
SxT	3	9.3333	9.3333		
NxT	3	9.6667	9.6667		
TxA	3		11.6667		
SxA	3		12.0000		
SxN	3		14.3333	14.3333	
Control	3			20.3333	
Sig.		.265	.110	.080	

La Tabla 9d muestra que al comparar al día veintiuno las concentraciones de mg/L de amonio presentes en cada uno de los cultivos, se separaron cuatro grupos, el control en el grupo 3, seguido por la combinación SxN con la cantidad más alta de amonio en el grupo intermedio 2-3, seguidas por las

combinaciones SxA y TxA en el grupo 2 y NxT, SxT y NxA en el grupo intermedio 1-2, finalmente con la concentración más baja de amonio a los veintiún días continúa SxNxTxA.

Tabla 9d. Prueba de Duncan para las concentraciones (medias) de amonio (mg/L) al día veintiuno del ensayo 2 y 3. (Alfa = 0.05)

Día_21				
Tratamiento	N	Grupos Duncan		
		1	2	3
SxNxTxA	3	3.3333		
NxA	3	6.6667	6.6667	
SxT	3	8.0000	8.0000	
TxA	3	8.0000	8.0000	
NxT	3		8.6667	
SxA	3		10.0000	
SxN	3		10.6667	
Control	3			20.3333
Sig.		.082	.181	1.000

3.4 Porcentaje de remoción.

3.4.1 Ensayo 1. Evaluación individual de las cepas en el porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio

En el modelo de regresión, el coeficiente de correlación indica la precisión con la cual la recta describe el comportamiento de los puntos experimentales en el ensayo, entre más cercano a un valor de uno el modelo es mejor. La pendiente en la ecuación de la recta corresponde a la razón de cambio o en este caso a la velocidad con la cual el cultivo está removiendo el nutriente. De modo que en el ensayo 1, *Scotielloopsis sp*, remueve 0.35 mg/L/día de ortofosfato y 0.7 mg/L/día de amonio. Los valores correspondientes a las algas restantes son: *Neochloris sp* con 0.29 mg/L/día de ortofosfato y 0.7 mg/L/día amonio, *Trachelomonas volvocina* con 0.24 mg/L/día de ortofosfato y 0.69 mg/L/día de amonio y *Acutodesmus dimorphus* con 0.33 mg/L/día de ortofosfato y 0.85 mg/L/día de amonio.

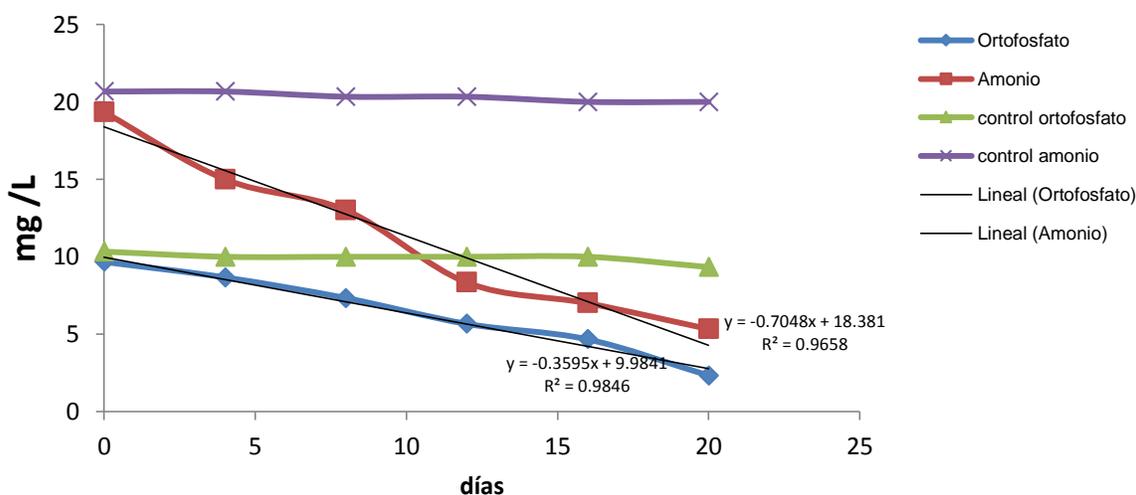


Fig. 32. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Scotielloopsis sp* y sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Scotielloopsis sp* a los 20 días, mediante la fórmula 1:

$$\%R = [(C_i - C_f) \div C_i] \times 100$$

Donde:

%R: Porcentaje de remoción

C_i: Concentración inicial

C_f: Concentración final

$$[(9.6 - 2.3) \div 9.6] \times 100 : 75.8 \%R.$$

$$[(19.3 - 5.3) \div 19.3] \times 100 : 72.4 \%R.$$

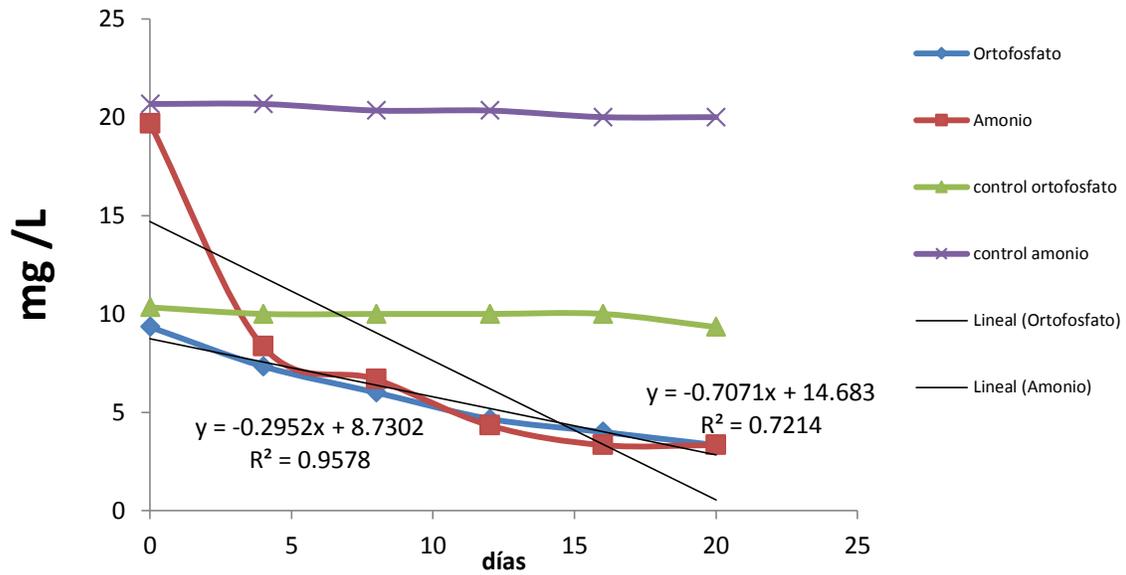


Fig. 33. Gráfico de la disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Neochloris* sp y sus respectivos controles.

-Cálculo porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Neochloris* sp a los 20 días, mediante la fórmula 1:

$$[(9.3 - 3.3) \div 9.3] \times 100 : 64.2 \%R$$

$$[(19.6 - 3.3) \div 19.6] \times 100 : 83 \%R$$

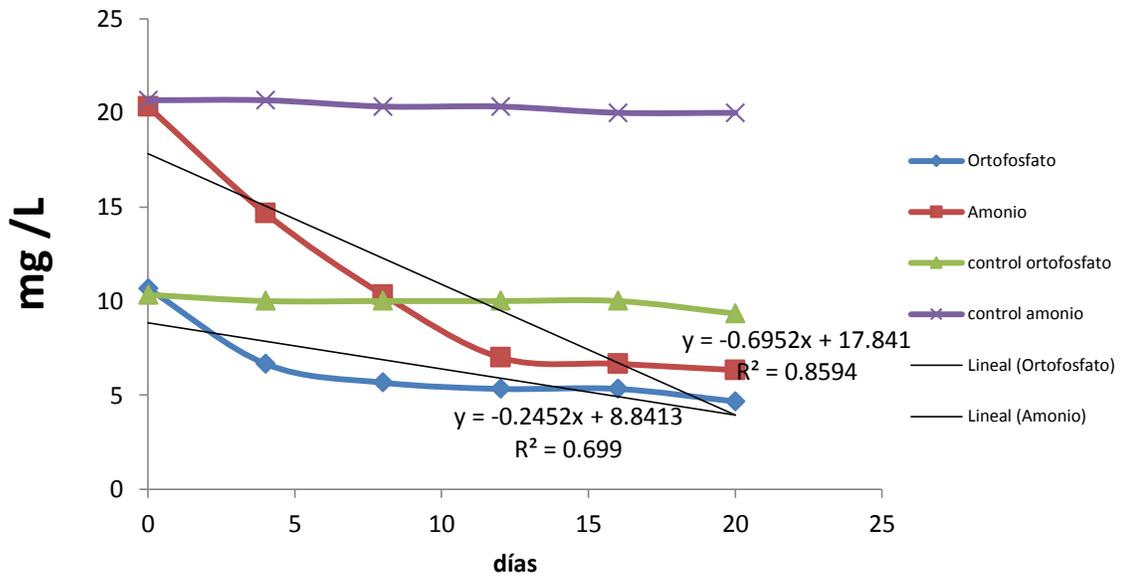


Fig. 34. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Trachelomonas volvocina* y sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Trachelomonas volvocina* a los 20 días, mediante la fórmula:

$$[(10.6 - 4.6) \div 9.3] \times 100 : 56.2 \%R$$

$$[(20.3 - 6.3) \div 20.3] \times 100 : 68.8 \%R$$

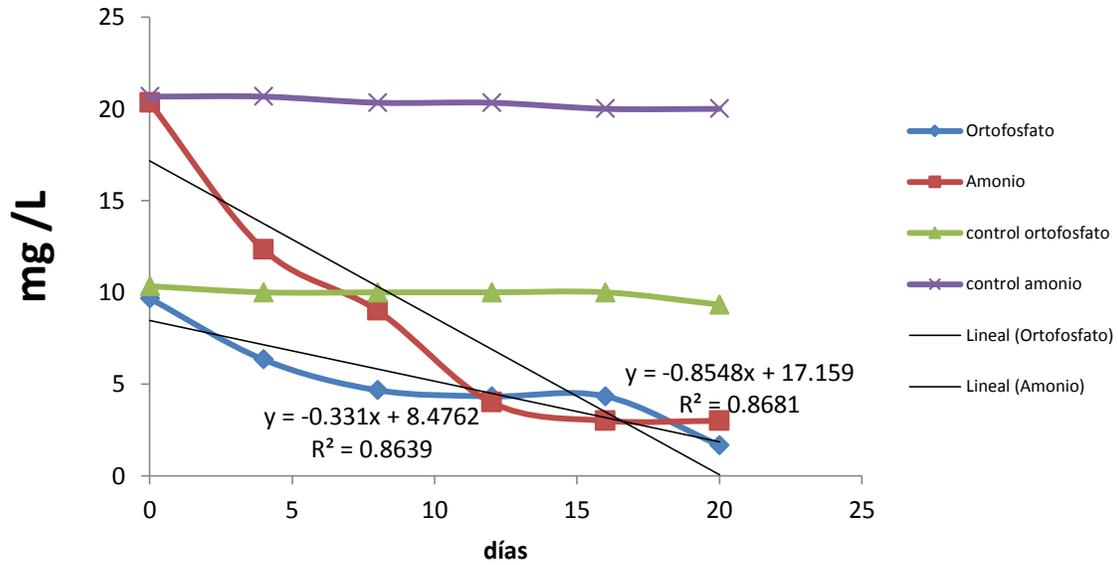


Fig. 35. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Acutodesmus dimorphus* y sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Acutodesmus dimorphus* a los 20 días, mediante la fórmula:

$$[(9.6 - 1.6) \div 9.6] \times 100 : 82.7 \%R$$

$$[(20.3 - 3) \div 20.3] \times 100 : 85.2 \%R$$

Tabla 10. Los números más altos representan las mejores características. Para el porcentaje: <70 (3), 70<50 (2) y 50<0 (1). Variabilidad: menor variabilidad (3), intermedia (2) y alta (1).

Cepa	Porcentaje de remoción ortofosfato	Porcentaje de remoción amonio	Variabilidad entre repeticiones ortofosfato	Variabilidad entre repeticiones amonio	Adaptación al medio	Frecuencia de aparición en el grupo estadístico 1 (ortofosfato)	Frecuencia de aparición en el grupo estadístico 1 (amonio)	Sumatoria
<i>Scotiellopsis</i> sp (C1)	75.8 (3)	72.4 (3)	3	3	1	2	1	16
<i>Neochloris</i> sp (C2)	64.4 (2)	83 (3)	1	2	3	2	6	19
<i>Trachelomonas volvocina</i> (C3)	56.2 (2)	68.8 (2)	3	1	2	2	1	13
<i>Acutodesmus dimorphus</i> (C4)	82.7 (3)	85.2 (3)	1	2	3	6	4	22

La Tabla 10 muestra que la cepa *Acutodesmus dimorphus* (C4), posee las mejores características comparada con las demás cepas, la mejor remoción para ambos nutrientes, buena adaptación al medio, estuvo siempre en el grupo uno, con las más bajas concentraciones de ortofosfato durante todo el ensayo y 4 veces para amonio, sólo superada por *Neochloris* sp (C2), quien después de *Acutodesmus dimorphus* es considerada la mejor debido a su alta y constante remoción de amonio así como su buena capacidad de adaptación, por otro lado se sabe que al someter las microalgas a estrés pueden ser capaces de producir aceites, tornándose pardas, característica observada en *Neochloris* sp y *Trachelomonas volvocina*, Leonardi 2011, menciona que la especie *Neochloris oleoabundans* tiene una alta capacidad de acumular lípidos (36 a 54% en peso seco). *Scotiellopsis* sp (C1) fue quien tuvo el consumo más constante de nutrientes y buena remoción de éstos, pero su capacidad de adaptación fue baja y su división celular se vio mermada a esta concentración de ortofosfato y amonio.

3.4.2 Ensayo 2 y 3. Evaluación en duplas y cuádruples de las cepas en el porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio.

En el modelo de regresión, el coeficiente de correlación indica la precisión con la cual la recta describe el comportamiento de los puntos experimentales en el ensayo, entre más cercano a un valor de uno el modelo es mejor. La pendiente en la ecuación de la recta corresponde a la razón de cambio o en este caso a la velocidad con la cual el cultivo está removiendo el nutriente. De modo que en los ensayos 2 y 3, *Scotielloopsis sp* y *Neochloris sp*, remueve 0.22 mg/L/día de ortofosfato y 0.45 mg/L/día de amonio. Los valores correspondientes a las algas restantes son: *Scotielloopsis sp* y *Trachelomonas volvocina* con 0.29 mg/L/día de ortofosfato y 0.45 mg/L/día amonio, *Scotielloopsis sp* y *Acutodesmus dimorphus* con 0.23 mg/L/día de ortofosfato y 0.44 mg/L/día de amonio, *Trachelomonas volvocina*. y *Acutodesmus dimorphus* con 0.35 mg/L/día de ortofosfato y 0.58 mg/L/día de amonio, *Neochloris sp* y *Acutodesmus dimorphus* con 0.35 mg/L/día de ortofosfato y 0.65 mg/L/día de amonio, *Neochloris sp* y *Trachelomonas volvocina* con 0.3 mg/L/día de ortofosfato y 0.58 mg/L/día de amonio y la combinación *Scotielloopsis sp*, *Neochloris sp*, *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus* con 0.44 mg/L/día de ortofosfato y 0.8 mg/L/día de amonio.

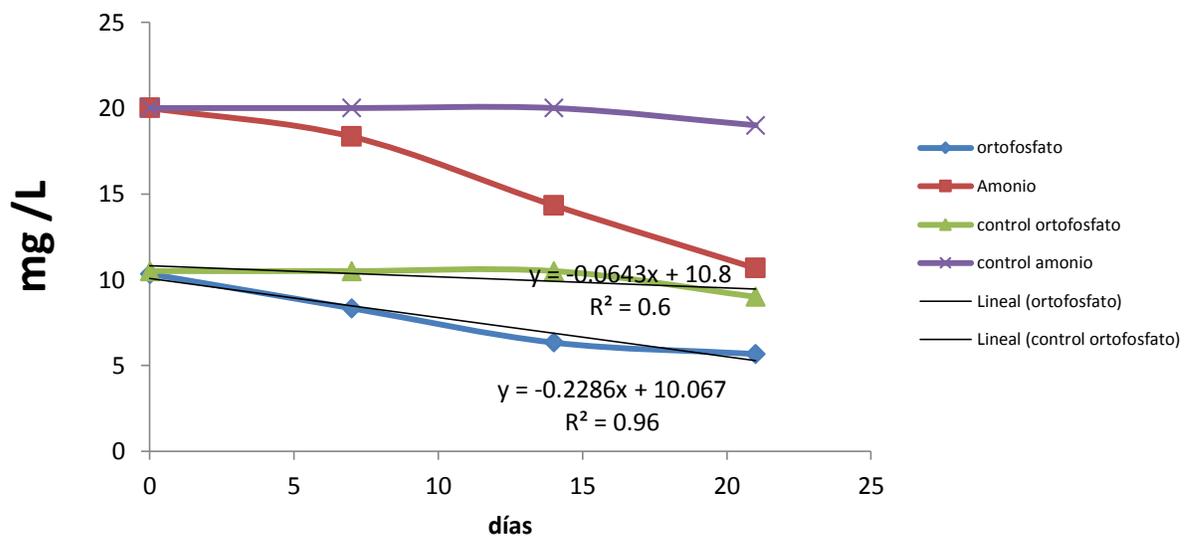


Fig. 36. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Scotielloopsis sp* y *Neochloris sp* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Scotielloopsis sp* y *Neochloris sp* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 5.6) \div 10.3] \times 100 : 45.1 \%R$$

$$[(20 - 3) \div 20] \times 100 : 46.6 \%R$$

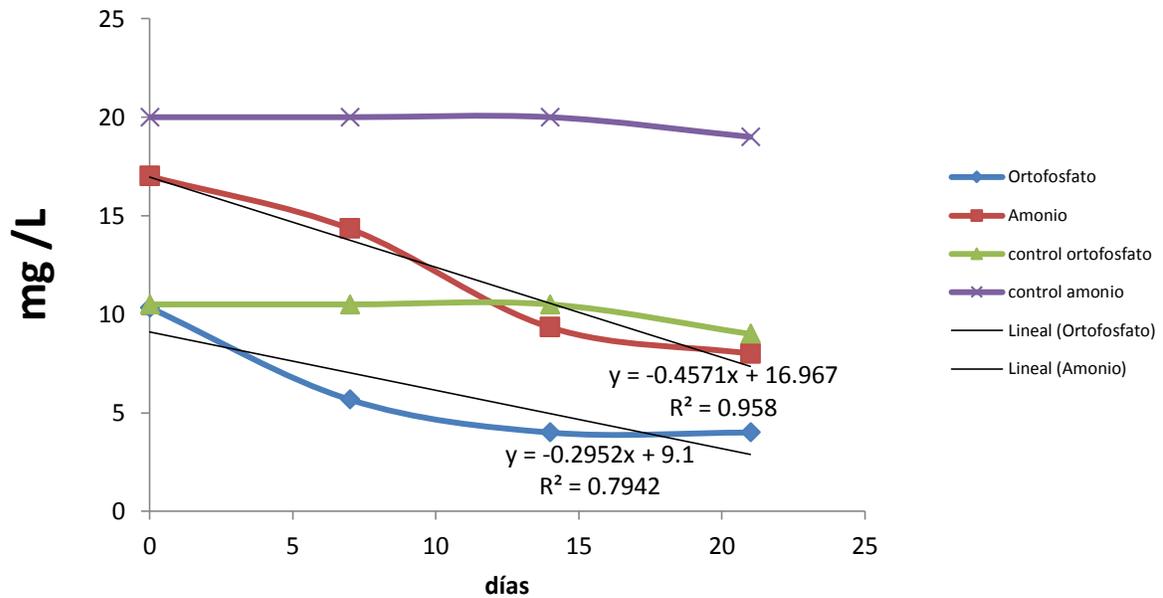


Fig. 37. Gráfico de la disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Scotiellopsis sp* y *Trachelomonas volvocina* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Scotiellopsis sp* y *Trachelomonas volvocina* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 4) \div 10.3] \times 100 : 61.2 \%R$$

$$[(17 - 8) \div 17] \times 100 : 52.9 \%R$$

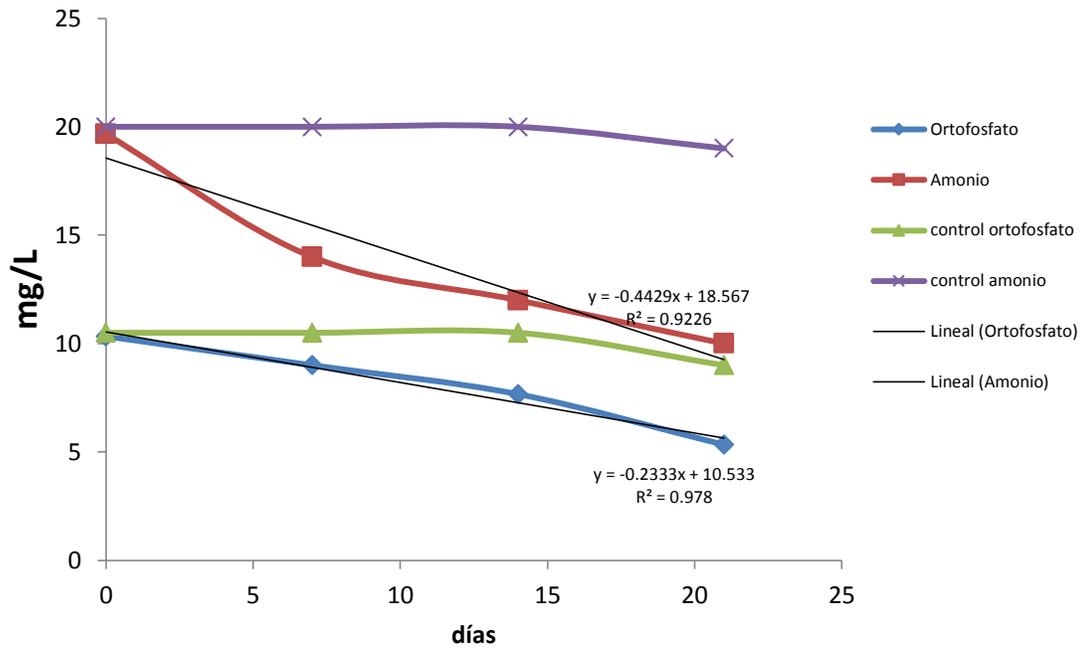


Fig. 38. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Scotiellopsis sp* y *Acutodesmus dimorphus* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Scotiellopsis sp* y *Acutodesmus dimorphus* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 5.3) \div 10.3] \times 100 : 48.3 \%R$$

$$[(19.6 - 10) \div 19.6] \times 100 : 49.1 \%R$$

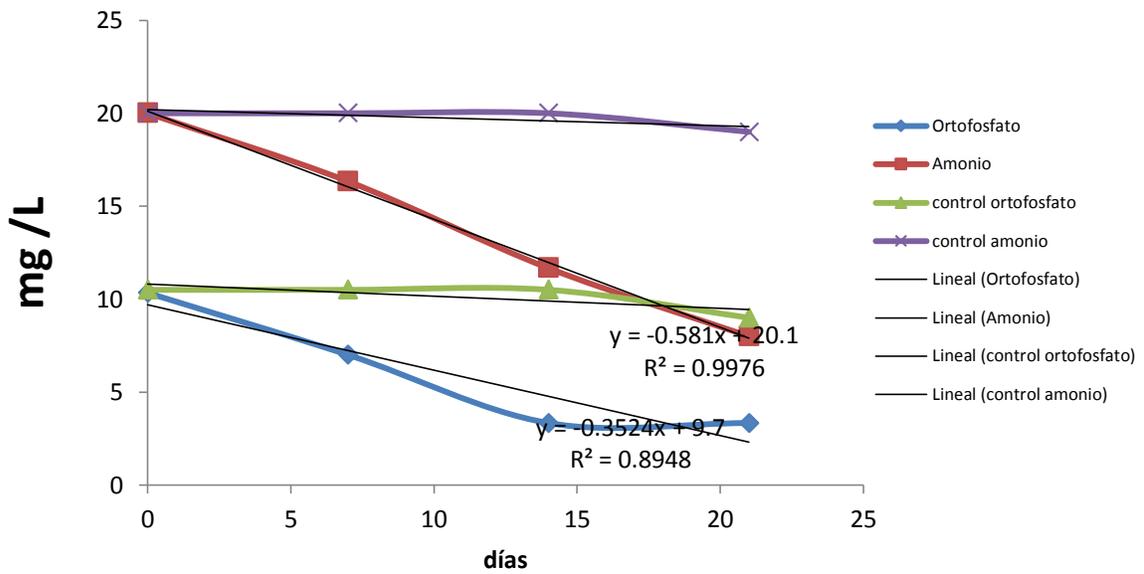


Fig. 39. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 5.3) \div 10.3] \times 100 : 67.7 \%R$$

$$[(20 - 8) \div 20] \times 100 : 60 \%R$$

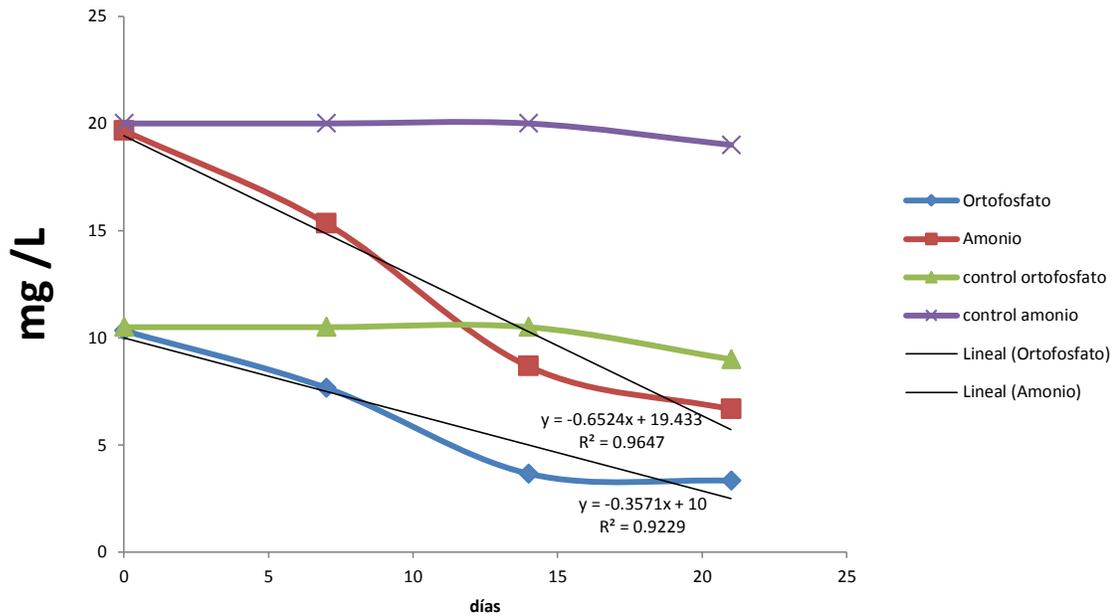


Fig. 40. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Neochloris sp* y *Acutodesmus dimorphus* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Neochloris sp* y *Acutodesmus dimorphus* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 3.3) \div 10.3] \times 100 : 67.7 \%R$$

$$[19.6 - 6.6] \div 19.6 \times 100 : 66.1 \%R$$

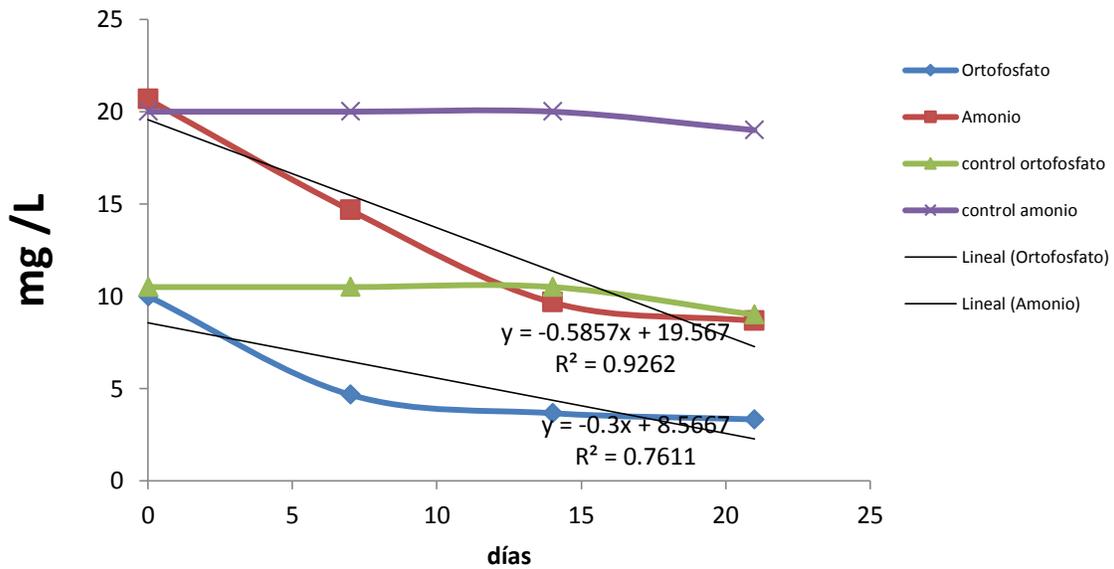


Fig. 41. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Neochloris sp* y *Trachelomonas volvocina* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Neochloris sp* y *Trachelomonas volvocina* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 3.3) \div 10.3] \times 100 : 67.7 \%R$$

$$[20 - 8] \div 20] \times 100 : 60 \%R$$

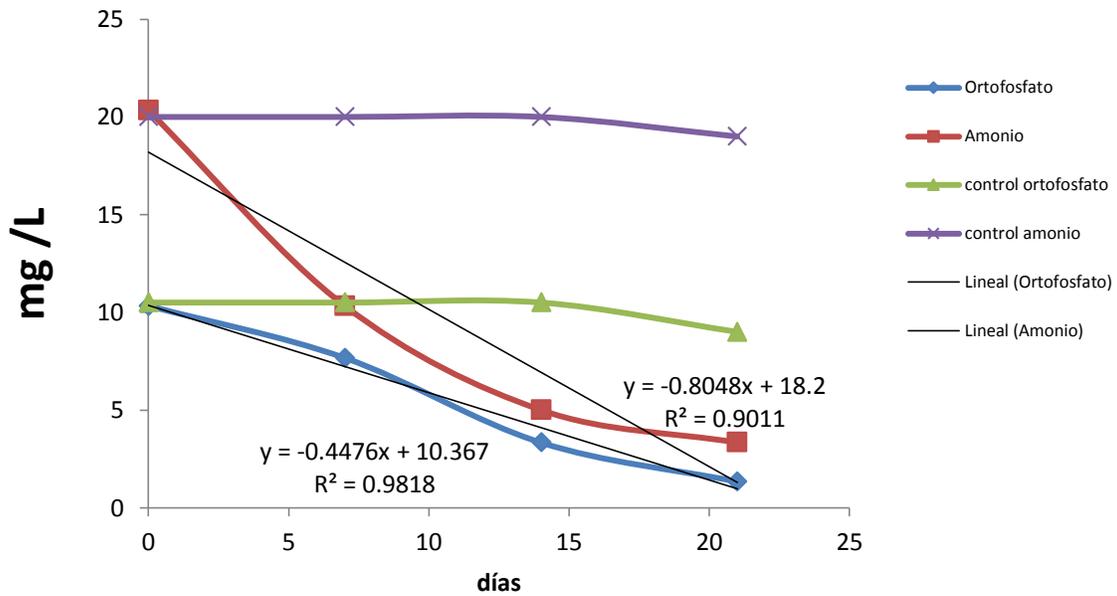


Fig. 42. Disminución en concentración de mg/L de ortofosfato y amonio por *Scotiellopsis sp*, *Neochloris sp*, *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus* con sus respectivos controles.

-Cálculo del porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por *Scotiellopsis sp*, *Neochloris sp*, *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus* a los 21 días, mediante la fórmula 1:

$$[(10.3 - 1.3) \div 10.3] \times 100 : 87 \%R$$

$$[20.3 - 3.3] \div 20.3 \times 100 : 83.6 \%R$$

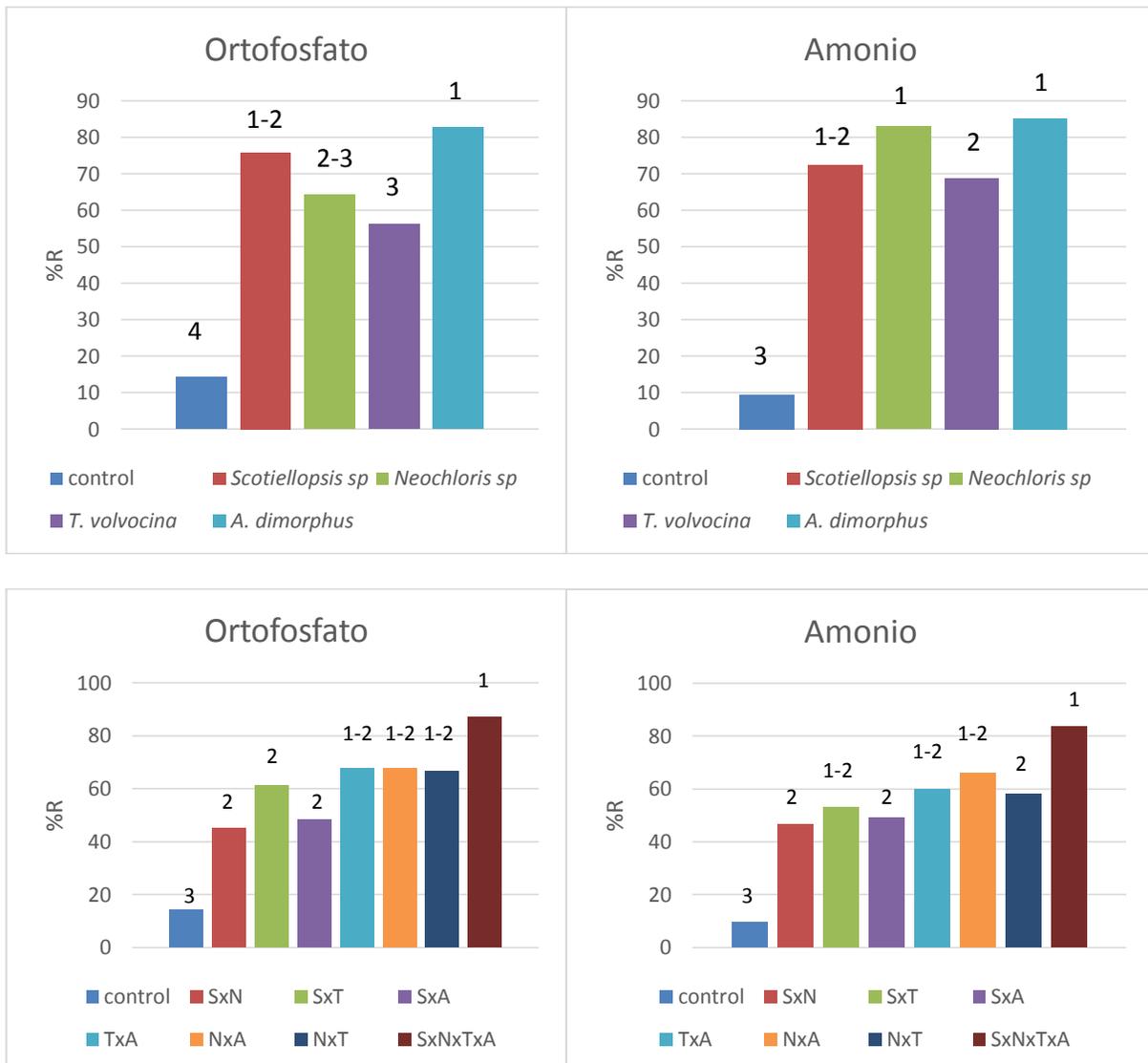


Fig. 43. Porcentaje de remoción de ortofosfato y amonio por las cepas individuales (arriba) y duplas y cuádruples (abajo). Números iguales sobre las columnas indican que no hay diferencia significativa.

En Fig. 43 se puede observar que para ortofosfato en los ensayos individuales, quien tiene la remoción más alta es *A. dimorphus*, pero no es significativamente distinto a *Scotiellopsis sp*, seguidas por *Neochloris sp* y *T. volvocina*. Mientras que en el ensayo de duplas y cuádruple, la interacción entre las cuatro cepas resulto ser la mejor, colocándose en el grupo uno, seguida por las interacciones NxT, NxA y TxA. En la remoción de amonio, de manera individual, *A. dimorphus* y *Neochloris sp* quedaron en el mismo grupo con los porcentajes de remoción más altos. Para el ensayo de duplas y cuádruple la interacción entre las cuatro cepas obtuvo la remoción más alta, quedando en el grupo uno, seguida por las interacciones entre NxT, NxA y TxA. Por lo tanto, puede distinguirse que las mejores cepas, tanto individuales como en interacciones, son *A. dimorphus* y *Neochloris sp*, por su constante aparición en los grupos con mayor remoción.

Tabla 11. Los números más altos representan las mejores características. Para el porcentaje: <70 (3), 70<50 (2) y 50<0 (1). Variabilidad: menor variabilidad (3), intermedia (2) y alta (1).

Cepas	Porcentaje de remoción ortofosfato	Porcentaje de remoción amonio	Variabilidad entre repeticiones ortofosfato	Variabilidad entre repeticiones amonio	Adaptación al medio	Frecuencia de aparición en el grupo estadístico 1 (ortofosfato)	Frecuencia de aparición en el grupo estadístico 1 (amonio)	Sumatoria
SxN	45.18 (1)	46.6 (2)	3	3	1	1	0	11
SxT	61.2 (2)	52.9 (2)	3	3	1	2	1	14
SxA	48.3 (1)	49.1 (1)	3	3	1	1	0	10
TxA	67.7 (2)	60 (2)	3	3	3	2	0	15
NxA	67.7 (2)	66.1 (2)	3	3	3	1	0	14
NxT	67.7 (2)	60 (2)	3	3	3	2	0	15
SxNxTxA	87 (3)	83.6 (3)	3	3	3	3	3	21

La Tabla 11 muestra que la combinación de todas las cepas (SxNxTxA) posee las mejores características, seguida por la combinación TxA y NxT, quienes en la tabla de características individuales también resultan de las mejores, esto sugiere que la buena remoción y características en la interacción de todas las cepas se debe a *Neochloris* sp y *Acutodesmus dimorphus*, puesto que las demás combinaciones resultan con una sumatoria inferior a la que presentan las cepas individuales, esto puede ser debido a la competencia por nutrientes y capacidad de adaptación, es importante mencionar que en las observaciones al microscopio *Scotiellopsis* sp disminuyó tanto su número de células que al final del ensayo era difícil observarla.

Hernández et al. (2012), evaluaron la capacidad para remover amonio (NH_4^+) y ortofosfato (PO_4^{3-}) por cultivos libres, se utilizaron las cepas de microalgas *Chlorella vulgaris* (inoculo: 1.23×10^{10} células/L.) y *Spirulina subsalsa* (Inoculo: 8 filamentos de entre 23-30 μm) que fueron aisladas del lago de origen volcánico Chalchoapan en la zona de los Tuxtlas en Veracruz, Ver., y en el estero del Río Barberena en Tampico, Tamaulipas, y un cultivo mixto (inoculo: 12.3×10^9 células/L, integrado por 40.5% de *Chlorella* sp, 35.8% de *Scenedesmus* sp y 23.6% *Chlamydomonas* sp) aislado a partir del efluente del reactor UASB (por sus siglas en inglés, reactor anaerobio de flujo ascendente) que trata las aguas residuales de la UAM-I.

Los cultivos se sembraron en agua residual artificial (medio de cultivo F/2 modificado) con concentraciones de amonio y ortofosfato, de 25 y 10 mg/L respectivamente.

La remoción de amonio para los cultivos Mixto, C. vulgaris y S. subsalsa fue de 68, 37, 26%; para ortofosfato fue del 76, 45 y 24% a los veinte días, porcentajes que resultan inferiores a los obtenidos en

esta investigación donde las concentraciones iniciales de amonio y ortofosfato fueron de 20 y 10 mg/L respectivamente.

Tabla 12. Porcentajes de remoción para ortofosfato y amonio, inoculo y concentración inicial de microalgas y nutrientes.

Cepas	Inoculo	PO ₄ ³⁻ (mg/L)	NH ₄ mg/L	Días	% de remoción PO ₄ ³⁻	% de remoción NH ₄
<i>Chlorella vulgaris</i> ¹ (aislada)	1.23x10 ¹⁰	10	25	20	45	36
<i>Spirulina subsalsa</i> ¹ (aislada)	8 filamentos	10	25	20	24	26
(Mixto) <i>Chlorella</i> sp <i>Scenedesmus</i> sp <i>Chlamydomonas</i> sp ¹ (aisladas)	12.3 x 10 ⁹	10	25	20	<u>76</u>	68
Algas filamentosas verde-azules ² (aisladas)	1200 mL	8.8 +- 0.9	39.4 +- 5.5	14	54	<u>89</u>
<i>Chlorella vulgaris</i> ³ (cepa de colección)	1 g/L	4.04 mg	11.30	8	44.8	<u>96.9</u>
<i>Chlorella vulgaris</i> ⁴ (cepa de colección)	140 mg/L	0.68	24	7	<u>78.5</u>	63.6
<i>Scotiellopsis</i> sp	1.5x10 ⁷	10± 1	20± 1	20	<u>75.8</u>	<u>72.4</u>
<i>Neochloris</i> sp	1x10 ⁷	10± 1	20± 1	20	64.2	<u>83.0</u>
<i>Traquelomonas volvocina</i>	2x10 ⁷	10± 1	20± 1	20	56.2	68.8
<i>Acutodesmus dimorphus</i>	1.5x10 ⁷	10± 1	20± 1	20	<u>82.7</u>	<u>85.2</u>
(mixto) <i>Scotiellopsis</i> sp y <i>Neochloris</i> sp	7.5x10 ⁶ - 5x10 ⁶ células	10± 1	20± 1	21	45.1	46.6
(mixto) <i>Scotiellopsis</i> sp y <i>Trachelomonas volvocina</i>	7.5x10 ⁶ - 1x10 ⁷	10± 1	20± 1	21	61.2	52.9
(mixto) <i>Scotiellopsis</i> sp y <i>Acutodesmus dimorphus</i>	7.5x10 ⁶ - 7.5x10 ⁶	10± 1	20± 1	21	48.3	49.1
(mixto) <i>Trachelomonas volvocina</i> y <i>Acutodesmus dimorphus</i>	1x10 ⁷ - 7.5x10 ⁶	10± 1	20± 1	21	67.7	60
(mixto) <i>Neochloris</i> sp y <i>Acutodesmus dimorphus</i>	5x10 ⁶ - 7.5x10 ⁶	10± 1	20± 1	21	67.7	66.1
(mixto) <i>Neochloris</i> sp y <i>Trachelomonas volvocina</i>	5x10 ⁶ - 1x10 ⁷	10± 1	20± 1	21	67.7	60
(mixto) <i>Scotiellopsis</i> sp, <i>Neochloris</i> sp, <i>Trachelomonas volvocina</i> y <i>Acutodesmus dimorphus</i>	3.7x10 ⁶ - 2.5x10 ⁶ -5x10 ⁶ - 3.7x10 ⁶ células.	10± 1	20± 1	21	<u>87</u>	<u>83.6</u>

(¹Hernández et al., 2012); ²Su et al., 2012; ³Hee y Seung, 2012; ⁴Rawiwan et al., 2012)

En la Tabla 12 se puede observar como en previas investigaciones se ha trabajado tanto con microalgas de colección y aisladas, en diferentes tipos de concentración para ortofosfato y amonio, así como diferente inoculo, por tanto es evidente que estos factores (concentración de nutrientes e inoculo de microalgas) son cruciales para obtener cierto porcentaje de remoción, se sabe que el fósforo es primordial para el crecimiento de las algas, pues puede limitar su crecimiento si no está disponible en las cantidad suficiente y Una baja concentración de fósforo está relacionada con una densidad baja de células (Graham y Wilcox, 2000). Por otro lado los porcentajes de remoción más altos se observan en la remoción de amonio, tal vez debido a la capacidad que tienen algunas microalgas, llamada "luxury consumption" que consiste en tomar nitrógeno en exceso presente en el ambiente para después utilizarlo si es requerido (Larsdotter, 2006.a). Este comportamiento se puede observar en la Figura 29 donde se observa que *Neochloris sp* reduce en más de un 50% la cantidad de amonio inicial en los primeros cinco días.

CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron cuatro cepas de microalgas a partir de agua residual obtenida de una granja porcina, correspondientes a *Scotiellopsis sp*, *Neochloris sp*, *Trachelomonas volvocina* y *Acutodesmus dimorphus*.

Todas las cepas aisladas fueron capaces de remover ortofosfato y amonio. *A. dimorphus* resultó ser la más eficiente en la remoción de ortofosfato y amonio con 82.7 y 85.2% respectivamente, mientras que *T. volvocina* obtuvo los porcentajes de remoción más bajos, 56.2% para ortofosfato y 68.8% para amonio.

Cuando se evaluaron en pares, la interacción que presentó la remoción más alta fue *Neochloris sp* con *Acutodesmus dimorphus* con 67.7% para ortofosfato y un 66.1% para amonio. Los cultivos en pares obtuvieron menores porcentajes de remoción que las cepas individuales, debido probablemente a la competencia por nutrientes y capacidad de adaptación. Por otro lado, en las observaciones realizadas al microscopio, el número de células de *Scotiellopsis sp* disminuyó a tal grado que, al final del ensayo en duplas, era difícil encontrarlas, por lo que se asume un posible antagonismo.

El desempeño de la comunidad, es decir de las cuatro microalgas, logró el porcentaje de remoción más alto para ortofosfatos (87%) y el segundo más alto para amonio (83.6%). Es posible que esta alta cantidad de remoción fuese influenciada por las cepas *Acutodesmus dimorphus* y *Neochloris sp* quienes de forma individual tuvieron los porcentajes más altos de remoción y que además presentaron la más rápida adaptación al medio.

REFERENCIAS

- Álvarez, G. 2012. Biofijación de CO₂ mediante el cultivo de algas. Diseño de un prototipo de Fotobiorreactor para el Cultivo de "*Spirulina Platensis*". Simposio: Medio Ambiente 26-30 de Noviembre 2012, Madrid, España (No. 11).
- APHA (American Public Health Association), American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation. 2003. Standard methods for the examination of water and wastewater. Elsevier/Academic Press (Vol. 2).
- Arias C. y Brix H. 2003. Humedales artificiales para el tratamiento de las aguas residuales. Ciencia e Ingeniería Neogranadina.
- Ashley, K., Cordell, D., y Mavinic, D. 2011. A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, 84(6), 737-746.
- Ayu W. y Moh D. 2010. Phosphorus and Ammonium Ions Removal by Using The Microalgae *Dunaliella salina*. Universidad de Lampung, Indonesia. *Jurnal Penelitian Sains*. 13(3) -14.
- Becker, E. 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bitton, G. 2005. *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons.
- Borowitzka, M. 1998. Limits to growth. In: Y.-S. Wong y N.F.Y. Tam (Eds), *Wastewater treatment with algae*, Springer Verlag, 203-226.
- Boström, B., Andersen, J., Fleischer, S., y Jansson, M. 1988. Exchange of phosphorus across the sediment-water interface. In *Phosphorus in Freshwater Ecosystems*. Springer Netherlands.
- Bourrelly, B. Les algues d'eau douce. Tomos 1-3. Tomo 1 1966. Les algues verts, Tomo II 1968 Les algues jaunes et brunes, Tomo III 1970 Les algues blues et rouges. Éditions N. Boubée et Cle. Paris.
- Bradley, B. Daigger, G., Rubin, R., y Tchobanoglous, G. 2002. Evaluation of onsite wastewater treatment technologies using sustainable development criteria. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 4(2), 87-99.
- Carpenter P. 1982. *Microbiología*. Ed. Interamericana México.
- Cheng, J. y Liu, B. 2001. Nitrification/denitrification in intermittent aeration process for swine wastewater treatment. *Journal of Environmental Engineering* 127(8): 705-711.
- Comisión Nacional del Agua (CONAGUA). 2006. Estadísticas del Agua en México. Sistema Nacional de Información sobre cantidad, calidad, usos y conservación del agua. 4ta Ed. México.

- Cordell, D., Drangert, J. y White, S. 2009. The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305.
- Correll, D. 1998. The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of Environmental Quality*, 27(2), 261-266.
- Crites, R. y Tchobanoglous, G. 1998. Small and decentralized wastewater management systems. Boston, WCB/McGraw-Hill. Print.
- Dawes, C. 1991. Botánica Marina Ed. Umusa. México.
- De-Bashan, L., Hernandez J., Bashan Y. 2002. Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater. The environmental Microbiology group. The Center for Biological Research of the Northwest.
- De Pauw, N., Bruggeman, E., y Persoone, G. 1978. Research on the tertiary treatment of swine manure by mass culturing of algae. Simposio: Experimental use of Algal Culture in Limnology 26-28 de Octubre 1976, Sandefjord, Noruega. Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie, *Mittlungen* (No. 21).
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 1994. NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental, agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse para su potabilización.
- Drummond, J., Curtis, S., Simon, J. y Norton, H. W. 1980. Effects of aerial ammonia on growth and health of young pigs. *Journal of Animal Science*, 50(6), 1085-1091.
- Echarri L. 2007. Población, Ecología y Ambiente. Publicaciones de la Universidad de Navarra. Barcelona España.
- Garza, M., Almaguer, V., Rivera, J. y Loredó, J. 2010. Bioingeniería aplicada a una columna empacada con *Chlorella* sp. Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UNAL*: 13(2), 174-177.
- González, C., Marciniak, J., Villaverde, S., García-Encina, P. y Muñoz, R. 2008. Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggery wastewaters. *Applied microbiology and biotechnology*, 80(5), 891-898.
- Graham, L. y Wilcox, L. 2000. In Rye T., Tarabojkia L. (Eds.), *Algae* (first ed.). United States of America: Prentice-Hall, Inc.
- Groeneweg, J., Klein, B., Mohn, F., Runkel, H., y Stengel, E. 1980. First results of outdoor treatment of pig manure with algal-bacterial systems. *Algae biomass: production and use* [sponsored by the National Council for Research and Development, Israel and the Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF), Munich, Germany]; editors, Gedaliah Shelef, Carl J. Soeder.

- Hee J. y Seung M. 2012. Effects of Microalgae on the Removal of Nutrients from Wastewater: Various concentrations of *Chlorella vulgaris*. Kwangong University, Korea. *Environ. Eng. Res.* 2012, 17(s1):S3-S8.
- Henze, M., Harremoës, J. Jansen y Arvin E. 2002. Wastewater treatment: Biological and chemical processes. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hernández R., Rodríguez P., Lozano R. y Castilla H. 2012. Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco. Mexico D.F. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal* 3(1):80-9.
- Hoeksma, P., Verdoes, N., Oosthoek, J. y Voermans, J. 1992. Reduction of ammonia volatilization from pig houses using aerated slurry as recirculation liquid. *Livestock Production Science*, 31(1), 121-132.
- John, D. 2003 Filamentous and plantlike green algae. In: J. Wher and R. Sheath (Eds.) *Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification*. San Diego, CA: Academic Press, pp. 311-352.
- Kirchgessner, D. Lott R., Cowgill, R., Harrison M. y Shires, T. 1997. Estimate of methane emissions from the US natural gas industry. *Chemosphere*, 35(6), 1365-1390.
- Larsdotter K. 2006. (a) Wastewater treatment with microalgae – a literatura review. *Vatten* 62:31-38.
- Larsdotter K. 2006. (b) Microalgae for phosphorus removal from wastewater in a Nordic climate. A doctoral thesis from the School of Biotechnology, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden. ISBN: 91-7178-288-5.
- Loh K. y Vu-Tran K. 2012. Symbiotic Hollow Fiber Membrane Photobioreactor for Microalgae Growth and Activated Sludge Waste Water Treatment. National University of Singapore, Singapore.
- Leonardi P., Popovich C. y Damiani D. 2011. Feedstocks for Second-Generation Biodiesel: Microalgae's Biology and Oil Composition, Economic Effects of Biofuel Production, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-178-7.
- Mallin M. y Cahoon L. 2003. Industrialized Animal Production – A Major Source of Nutrient and Microbial Pollution to Aquatic Ecosystems. *Pollution and Environment* 24(5): 369-385.
- Markou, G. y Georgakakis, D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401.
- Menéndez M., Herrera J y Comin, F. 2002. Effect of nitrogen and phosphorus supply on growth, chlorophyll content and tissue composition of the macroalga *Chaetomorpha linum* in a Mediterranean coastal lagoon. Universidad de Barcelona, España. *Scientia Marina.*, 66(4): 355-364.
- Norton, T., Melkonian, M. y Andersen, R. 1996. Algal biodiversity. *Phycologia*, 35(4), 308-326.

- Oliver, R. y Ganf G. 2000. Freshwater blooms. In: B.A. Whitton and M. Potts (Eds), The ecology of cyanobacteria: their diversity in time and space, Kluwer, Dordrecht, 149-194.
- Ortega M. 1984. Catálogo de las algas continentales recientes de México. UNAM. México, D.F.
- Ortiz M., Cortés. C., Sanchez J., Padilla J., Otero P. 2012 Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. Orinoquia, Universidad de los Llanos – Villavicencio, Meta. Colombia Vol. 16-No 1.
- Palmer M. 1969. A composite rating of algae tolerating organic pollution. *Journal of Phycology*. (5) 78-82 pp.
- Peet-Schwering, C., Aarnink A., Rom H. y Dourmad. 1999. Ammonia Emissions from Pig Houses in The Netherlands, Denmark and France. *Livestock Production Science*, Vol.58, 213-224 pp.
- Pérez R. 2006. Granjas Porcinas y Medio Ambiente. Contaminación del agua en la Piedad, Michoacán. Universidad Nacional Autónoma de México. Plaza y Valdés, S.A. de C.V. Instituto Nacional de Ecología -Semarnat.
- Ponette-González, A. y Fry, M. 2010. Pig pandemic: industrial hog farming in eastern Mexico. *Land Use Policy*, 27(4), 1107-1110. Prescott, G. W. (1984). How to know the freshwater algae. WC Brown.
- Rawiwan B., Gyu T., Da R. y Chung Y. 2012. Microalgae Photobioreactor for Nitrogen and Phosphorus. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 2, No. 6.
- Rittmann, B. E. y McCarty, P.L. 2001. *Environmental biotechnology: principles and applications*. Boston, McGraw-Hill. Print.
- Robinson B., Dobson P., Christy P. y Hayes S. 1996. Spatial and seasonal distributions of *Naegleria fowleri* in Australian water supplies. 7th International Conference on Small Free-living Amoebae, 7–12 January, Women's and Children's Hospital, Adelaide.
- Scialabba, N. 1994. Los residuos del ganado y el medio ambiente, documento preparado para el Taller internacional de residuos periurbanos del ganado en China, CCEICR, Beijing, del 19 al 22 de septiembre, FAO, Roma. Sagarpa (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) (2000 y 2001), Informe de Labores.
- SECOFI (Secretaría de Comercio y Fomento Industrial). 2001. NMX-AA-029-SCFI-2001. Análisis de aguas-determinación de fósforo total en aguas natural, residuales y residuales tratadas método de prueba. Dirección General de Normas. 16pp.
- Sime, I. 2004. The freshwater algal flora of the British Isles: An identification guide to freshwater and terrestrial algae, edited by David M. John, Brian A. Whitton and Alan J. Brook. Cambridge University Press, Cambridge, 2002, 702pp. ISBN 0-521-77051-3. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 14(1), 105-105.

- Smith G. 1950. Freshwater algae of the United States. Mc Graw Hill Publications in the Botanical Sciences. NY. USA.
- Steinfeld H., Gerber P., Wassenaar T., Castel V., Rosales M. y de Haan C. 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Stockner, J., Rydin, E. y Hyenstrand, P. 2000. Cultural oligotrophication: causes and consequences for fisheries resources. Fisheries, 25(5), 7-14.
- Su, Y., Mennerich, A. y Urban, B. (2012). Synergistic cooperation between wastewater-born algae and activated sludge for wastewater treatment: influence of algae and sludge inoculation ratios. Bioresource technology, 105, 67-73.
- Taiganides, P., Pérez R., Girón E. 1996. "Manual para el manejo y control de aguas residuales y excretas porcinas en México". Instituto de Investigaciones Económicas. UNAM. México.
- Tiffany L. y Britton M. 1952. The algae of Illinois. The University of Chicago Press.
- Trusts C. y Hopkins J. 2008. Putting meat on the table: Industrial farm animal production in America. Washington: DC.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency). 2004. Risk Assessment Evaluation for Concentrated Animal Feeding Operations.
- Viquez J. 2013. Alternativa eficiente para remover nitrógeno de aguas residuales en granjas porcinas. Informa 63:36.
- Wang C., Yu X., Lv H. y Yang J. 2012. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the Green alga *Chlorella* sp. Xiamen, China. Journal of Environmental Biology ISSN: 0254-8708.
- Westholm, L. 2006. Substrates for phosphorus removal—Potential benefits for on-site wastewater treatment. Water Res., 40(1): 23-36.
- Wher J. y Sheath R. 2003. Freshwater algae of North America. Academic Press, NY. USA.
- Whitford L. y Schumacher G. 1984. A manual of freshwater algae. Sparks Press. Raleigh, NC. USA.
- Wilkie, A. y Mulbry, W. 2002. Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. Bioresource Technology, 84(1), 81-91.