

BIODEGRADATION OF WASTEWATER POLLUTANTS BY ACTIVATED SLUDGE COIMMOBILIZED WITH *Scenedesmus obliquus*

BIODEGRADACIÓN DE CONTAMINANTES DE AGUAS RESIDUALES POR LODOS ACTIVADOS COINMOVILIZADO CON *Scenedesmus obliquus*

Alejandro Ruiz-Marin*, Yunuen Canedo-Lopez, Silvia del C. Campos-Garcia,
Mirna Y. Sabido-Perez, José del C. Zavala-Loria

Facultad de Química, Universidad Autónoma del Carmen. 24180. Avenida Concordia Esquina
Avenida 56 No. 4. Ciudad del Carmen, Campeche, México. (aruiz@pampano.unacar.mx).

ABSTRACT

Wastewater treatment plants produce large quantities of biomass (sludge) that require about one-third of the total investment and plant operation costs for their treatment. With microbial immobilization and coimmobilization with microalgae, it is possible to handle high cell concentration in the column reactor and increase its efficiency. The experimental design consisted in immobilized and coimmobilized *S. obliquus* with activated sludge in alginate beads cultured under continuous light or photoperiods (12 h/12 h) in artificial wastewater medium to evaluate the growth, nutrients and biochemical oxygen demand (BOD) removal. The results showed that the microalgae *S. obliquus* immobilized and coimmobilized in cultures under continuous light had higher growth rates (0.624 d^{-1} and 0.552 d^{-1}) than under photoperiods (0.456 d^{-1} and 0.312 d^{-1}). Also, a higher cell density ($4 \times 10^6 \text{ cells bead}^{-1}$ and $2.9 \times 10^6 \text{ cells bead}^{-1}$) was obtained under continuous light than under photoperiods ($2.0 \times 10^6 \text{ cells bead}^{-1}$ and $1.0 \times 10^6 \text{ cells bead}^{-1}$). The removal of nitrogen by *S. obliquus*, immobilized (92 %) and coimmobilized (60 %) under continuous light, was higher (40 %) than under photoperiods. Also, 43 % of BOD was removed by the coimmobilized system under continuous illumination. The coimmobilization system favored growth of algae and bacteria under continuous light, suggesting a possible exchange of gases (CO_2 and O_2): oxygen produced by microalgae and CO_2 by bacteria.

RESUMEN

Las plantas de tratamiento de aguas residuales producen grandes cantidades de biomasa (lodo) que requieren alrededor de un tercio de la inversión total y los costos de operación de la planta para su tratamiento. Con la inmovilización microbiana y la coimmobilización con microalgas, es posible manejar una concentración alta de células en el reactor de columna y aumentar su eficiencia. El diseño experimental consistió en inmovilizar y coimmobilizar *S. obliquus* con lodos activados en esferas de alginato cultivadas con luz continua o fotoperíodos (12 h/12 h) en un medio artificial de aguas residuales para evaluar el crecimiento, los nutrientes y la eliminación de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO). Los resultados mostraron que las microalgas *S. obliquus*, inmovilizadas y coimmobilizadas en cultivos bajo luz continua, registraron tasas de crecimiento más altas (0.624 d^{-1} y 0.552 d^{-1}) que bajo fotoperíodos (0.456 d^{-1} y 0.312 d^{-1}). Además, se obtuvo una densidad celular mayor ($4 \times 10^6 \text{ células esfera}^{-1}$ y $2.9 \times 10^6 \text{ células esfera}^{-1}$) con luz continua que con el fotoperíodo ($2.0 \times 10^6 \text{ células esfera}^{-1}$ y $1.0 \times 10^6 \text{ células esfera}^{-1}$). La eliminación de nitrógeno por *S. obliquus*, inmovilizado (92 %) y coimmobilizado (60 %) fue más alto (40 %) con luz continua que con el fotoperíodo. También, 43 % de la DBO se eliminó por el sistema coimmobilizado con iluminación continua. El sistema de coimmobilización favoreció el crecimiento de algas y bacterias con luz continua, lo que sugiere un posible intercambio de gases (CO_2 y O_2): el oxígeno producido por microalgas y CO_2 por bacterias.

*Author for correspondence ❖ Autor responsable.

Received: April, 2012. Approved: March, 2013.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 47: 429-441. 2013.

Palabras clave: lodo activado, coimmobilización, crecimiento, *Scenedesmus obliquus*, eliminación de nitrógeno y de materia orgánica.

Key words: activated sludge, coimmobilization, growth, *Scenedesmus obliquus*, nitrogen and organic matter removal.

INTRODUCTION

The aerobic treatment of domestic wastewater takes place in conventional activated sludge systems. However, this process is mainly focused on removing BOD (biochemical oxygen demand) and COD (chemical oxygen demand), but nitrogenous compounds and phosphate are insufficiently removed (Pipes and Zmuda, 1997; Nagadomi *et al.*, 2000). A high technology treatment process is therefore required to remove such compounds in the activated sludge process as nitrification and denitrification (Bitton, 1994).

Wastewater treatment plants also produce large amounts of sludge which must be separated from wastewater in the secondary clarifier and treatment to comply with Mexican environmental norms. To remove sludge from wastewater, technologies such as aerobic and anaerobic digestion, and centrifugation are used (Metcalf and Eddy, 2003). However, the drawback of these methods is that they consume about one-third of the total cost of investment and operation of the wastewater treatment plant (Martínez and Bustos, 2009). New and more efficient biotechnology for wastewater treatment to remove pollutants and control sludge production are needed. Immobilization of bacteria and microalgae has been studied, and they have several benefits over free cells for the treatment of domestic wastewater including increased conversion rate, lower growth rates, higher cell concentration, unnecessary cell separation, and elimination of washout possibility (Tam *et al.*, 1994; Ruiz-Marin *et al.*, 2010).

Cell immobilization technology are applied for mammal cells cultures (Uludag *et al.*, 2000), for production of hydrogen (Wu *et al.*, 2003) and compounds used commercially in the food industry (Kawaguti *et al.*, 2006). There are other studies with immobilized cells, such as in wastewater treatment to remove nutrients (N and P) with microalgae, phenol and hexavalent chromium (Bandhyopadhyay *et al.*, 2001; Humphries *et al.*, 2005; Ruiz-Marin *et al.*, 2010). However, there are fewer applications in wastewater treatment involving immobilization of mixed-culture systems and coimmobilized cultures.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento aeróbico de aguas residuales domésticas tiene lugar en los sistemas convencionales de lodos activados. Sin embargo, este proceso se centra principalmente en la eliminación de DBO (demanda bioquímica de oxígeno) y DQO (demanda química de oxígeno), pero los compuestos nitrogenados y el fosfato no se eliminan totalmente (Pipes y Zmuda, 1997; Nagadomi *et al.*, 2000). Por consiguiente, se requiere un tratamiento de alta tecnología para eliminar esos componentes en el proceso de lodos activados como la nitrificación y la desnitrificación (Bitton, 1994).

Las plantas de tratamiento de aguas residuales también producen cantidades grandes de lodo que debe ser separado de las aguas residuales en el decantador secundario y el tratamiento, para cumplir con las normas ambientales mexicanas. Para eliminar el lodo de aguas residuales se usan tecnologías como la digestión aeróbica y anaeróbica y la centrifugación (Metcalf y Eddy, 2003). Pero, el inconveniente de estos métodos es que consumen alrededor de un tercio del costo total de inversión y funcionamiento de la planta de tratamiento de aguas residuales (Martínez y Bustos, 2009). Se necesita biotecnología nueva y más eficiente en el tratamiento de aguas residuales para eliminar los contaminantes y controlar la producción de lodo. La inmovilización de las bacterias y microalgas se ha estudiado y tiene varios beneficios sobre las células libres para el tratamiento de aguas residuales domésticas, incluyendo una tasa mayor de conversión, tasas menores de crecimiento, concentración celular mayor, separación de células innecesarias, y eliminar la posibilidad de lavado celular (Tam *et al.*, 1994; Ruiz-Marín *et al.*, 2010).

La tecnología de inmovilización de células se aplica para cultivos de células de mamíferos (Uludag *et al.*, 2000), para producción de hidrógeno (Wu *et al.*, 2003) y compuestos usados comercialmente en la industria alimentaria (Kawaguti *et al.*, 2006). Hay otros estudios con células inmovilizadas, como el tratamiento de aguas residuales para eliminar nutrientes (N y P) fenol y cromo hexavalente con microalgas (Bandhyopadhyay *et al.*, 2001; Humphries *et al.*, 2005; Ruiz-Marin *et al.*, 2010). Sin embargo, hay menos aplicaciones al tratamiento de aguas residuales que impliquen la inmovilización de sistemas mixtos de cultivos y de cultivos coinmovilizados.

Cell immobilization is an option for wastewater treatment. This technology provides the possibility of efficiently incorporating symbiotic bacteria (Travieso *et al.*, 1996; De Bashan *et al.*, 2002), with the likely advantage of reducing sludge production (Chena *et al.*, 2002). The interaction between two microorganisms is called coimmobilization and the associations in the same matrix can be positive with higher growth and thus better removal of pollutants. Bashan *et al.* (2002) report rapid growth and nitrogen and phosphorus removal capacity, as well as an increase in the pigment content of *Chlorella vulgaris* coimmobilized with *Azospirillum brasilense* in alginate (growth-promoting bacteria in plants) in cultures with artificial wastewater.

Not all associations tend to be positive, as reported by González *et al.* (2000) for *C. vulgaris* coimmobilization with *Phyllobacterium myrsinacearum*. However, coimmobilization of microorganisms is beneficial, stimulating production of extracellular materials such as alpha-amylase produced by *Bacillus subtilis* when coimmobilized with *Scenedesmus obliquus* (Chevalier and de la Noüe, 1988).

There is little information regarding the association of microalgae and activated sludge coimmobilized in alginate beads under autotrophic and heterotrophic pathway. The aim of this study was to determine whether the association between *S. obliquus* coimmobilized with activated sludge improved growth of both microorganisms and removal of nitrogen and organic material under autotrophic and heterotrophic pathways. In this study, both microorganisms were confined by coimmobilization in small alginate beads, a practical means of using microorganisms for environmental applications.

MATERIALS AND METHODS

Routine algal culture and acclimatization

The microalga used was *S. obliquus* isolated from a hypereutrophic soil. The microalga was obtained from the culture collection of the Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, Mexico, and cultured in artificial wastewater with the following composition (mg L⁻¹): NaCl, 7; CaCl₂, 4; MgSO₄·7H₂O, 2; KH₂PO₄, 15 and NH₄Cl, 115. These concentrations were used simulating the mean values of the

La inmovilización celular es una opción para el tratamiento de aguas residuales. Esta tecnología ofrece la posibilidad de incorporar eficientemente bacterias simbióticas (Travieso *et al.*, 1996; De Bashan *et al.*, 2002), con la ventaja de reducir la producción de lodo (Chena *et al.*, 2002.). La interacción entre dos microorganismos se denomina coimmobilización y las asociaciones en la misma matriz pueden ser positivas, con crecimiento mayor y, por tanto, mejor remoción de los contaminantes. Bashan *et al.* (2002) reportan un crecimiento rápido y la capacidad de eliminación de nitrógeno y fósforo, así como aumento del contenido de pigmento de *Chlorella vulgaris* coinmovilizada con *Azospirillum brasilense* en alginato (bacterias promotoras de crecimiento en plantas) en cultivos con aguas residuales artificiales.

No todas las asociaciones son positivas, según reporta González *et al.* (2000) para coinmovilización de *C. vulgaris* con *Phyllobacterium myrsinacearum*. Pero la coimmobilización de microorganismos es beneficiosa al estimular la producción de materiales extracelulares, como la alfa-amilasa producida por *Bacillus subtilis* cuando es coinmovilizada con *Scenedesmus obliquus* (Chevalier y de la Noüe, 1988).

Hay poca información sobre la asociación de microalgas y lodo activado coinmovilizados en esferas de alginato en vías autótrofas y heterótrofas. El objetivo de este estudio fue determinar si la asociación entre *S. obliquus* coinmovilizado con lodo activado favorece el crecimiento de ambos microorganismos y la eliminación de nitrógeno y materia orgánica bajo vías autótrofas y heterótrofas. En este estudio, ambos microorganismos fueron confinados, por coinmovilización a pequeñas esferas de alginato, un medio práctico de usar microorganismos para aplicaciones ambientales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de algas de rutina y aclimatación

La microalga usada fue *S. obliquus* aislada de un suelo hipereutrofico. La microalga se obtuvo de la colección de cultivos del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE), Baja California, México, y se cultivó en aguas residuales artificiales con la siguiente composición (mg L⁻¹): NaCl, 7; CaCl₂, 4; MgSO₄·7H₂O, 2; KH₂PO₄, 15 y NH₄Cl, 115. Estas concentraciones se usaron simulando valores medios del efluente secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales. Metales traza y vitaminas se agregaron

secondary effluent of a wastewater treatment plant. Trace metals and vitamins were added following guidelines for “f/2” medium preparation (Guillard and Ryther, 1962). During acclimatization at 25 ± 2 °C and light intensity of $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1 month), the microalgae were transferred to fresh artificial wastewater every 7 d.

The activated sludge was taken from the aerated reactor of the wastewater treatment plant, washed twice with saline solution (0.85 %) and separated by centrifugation at 2500 rpm. Sludge was cultured in medium as described by Nakashio *et al.* (1972), prepared with the following concentrations (mg L^{-1}): D-glucose, 100; KH_2HPO_4 , 15; K_2HPO_4 , 10; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 30; NH_4Cl , 17; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 56; CaCl_2 , 10 and peptone, 150. During acclimatization at 25 ± 2 °C and $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1 month), the activated sludge was transferred to fresh medium every 24 h.

Bead preparation

After acclimatization, microalgae and activated sludge were grown in three-liter polyethylene terephthalate (PET) photobioreactors (volume of operation 2.5 L). A volume of cell suspension of known concentration in each reactor was harvested for microalgae and activated sludge, as well as for immobilization and coimmobilization.

For immobilization, cells were harvested by centrifugation at 3500 rpm for 10 min. The activated sludge and microalgae cells were resuspended independently in 50 mL distilled water. The algal and activated sludge suspension was then mixed with a 4 % sodium-alginate solution in 1:1 volume ratio to obtain a mixture of 2 % algae-alginate suspension (Tam and Wong, 2000). The mixture was transferred to a 50 mL burette and drops were formed when titrated into a calcium chloride solution (2 %). This method produced approximately 6500 uniform algal beads of approximately 2.5 mm in diameter with an initial algal cell number of 300×10^3 cells bead⁻¹, and bacteria number was 200 CFU 100 bead⁻¹ for every 100 mL of the alginate mixture. Beads were kept 4 h at 25 ± 2 °C in the CaCl_2 solution for hardening, then rinsed with sterile saline solution (0.85 % NaCl) and subsequently with distilled water. A concentration of 2.6 beads mL⁻¹ of wastewater (equivalent to 1:25 bead:wastewater v/v) and an approximate volume of each bead 0.01538 mL was obtained after the immobilization.

A similar procedure was used for coimmobilization, with the difference that the concentrate of activated sludge and microalgae was mixed to form a 50 mL volume and then mixed with 50 mL of alginate (25 mL algal culture + 25 mL bacteria culture + 50 mL alginate). This procedure allowed retaining the same concentration of cells in all experiments.

siguiendo los lineamientos para la preparación del medio “f/2” (Guillard y Ryther, 1962). Durante la aclimatación a 25 ± 2 °C e intensidad de luz de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1 mes), las microalgas fueron transferidas a aguas residuales artificiales renovadas cada 7 d.

El lodo activado fue tomado del reactor aireado de la planta de tratamiento de aguas residuales, se lavó dos veces con solución salina (0.85 %) y se separó por centrifugación a 2500 rpm. El lodo se cultivó en un medio, como lo explican Nakashio *et al.* (1972), preparado con las siguientes concentraciones (mg L^{-1}): D-glucosa, 100; KH_2HPO_4 , 15; K_2HPO_4 , 10; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 30; NH_4Cl , 17; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 56; CaCl_2 , 10 y peptona, 150. Durante la aclimatación a 25 ± 2 °C y $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1 mes), el lodo activado se transfirió a un medio nuevo cada 24 h.

Preparación de esferas

Después de la aclimatación, microalgas y lodo activado se cultivaron en fotobiorreactores de polietileno tereftalato (PET) (volumen de operación de 2.5 L) de 3 L. Se cosechó un volumen de suspensión de células de concentración conocida en cada reactor, para las microalgas y lodo activado, así como para la inmovilización y coimmobilización.

Para la inmovilización, se recogieron las células centrifugando a 3500 rpm por 10 min. El lodo activado y las células de microalgas se resuspendieron independientemente en 50 mL de agua destilada. La suspensión de algas y lodo activado se mezcló con una solución de alginato de sodio al 4 % en una relación en volumen 1:1 para obtener una mezcla de 2 % de suspensión de algas-alginate (Tam y Wong, 2000). La mezcla se transfirió a una bureta de 50 mL y se formaron gotas cuando fue titulada en una solución de cloruro de calcio (2 %). Este método produjo aproximadamente 6500 esferas uniformes de algas con diámetro aproximado de 2.5 mm, con un número inicial de células de algas de 300×10^3 células esferas⁻¹ y el número de bacterias fue 200 CFU 100 esferas⁻¹ por cada 100 mL de la mezcla de alginato. Las esferas se mantuvieron 4 h a 25 ± 2 °C en la solución de CaCl_2 para su endurecimiento, se enjuagaron con una solución salina estéril (NaCl a 0.85 %) y después con agua destilada. Después de la inmovilización, se obtuvo una concentración de 2.6 esferas mL⁻¹ de aguas residuales (equivalente a 1:25 esferas:aguas residuales v/v) y un volumen aproximado de cada esfera de 0.01538 mL.

Un procedimiento similar se usó para coimmobilización, pero la diferencia fue que el concentrado de lodo activado y microalgas se mezcló para formar un volumen de 50 mL, que se mezcló otra vez con 50 mL de alginato (25 mL cultivo de algas + 25 mL cultivo de bacterias + 50 mL alginato). Este procedimiento permitió conservar la misma concentración de células en todos los experimentos.

Experimental setup and procedure

Microalgae and activated sludge were immobilized and coimmobilized and then placed in polyethylene terephthalate (PET) reactors with culture medium (2.5 L) with composition (mg L^{-1}): 7 NaCl, 20 CaCl_2 , 2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 KH_2PO_4 , 120 NH_4Cl , 2 K_2HPO_4 , 4 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 D-glucose and 150 peptone.

The experiments consisted of triplicate cultures of reactors with immobilized microalgae under continuous light (LCM) or photoperiods of 12/12 h (LDM); reactors with immobilized activated sludge under continuous light (LCB) or photoperiods (LDB); reactors with microalgae and activated sludge coimmobilized under continuous light (LCC) or photoperiods (LDC). All treatments were maintained at 25 °C with light from cool white fluorescent lamps at an intensity of $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

All reactors with immobilized and coimmobilized cells were used under aerobic conditions. Dissolved oxygen concentration (OD) at 2.3 mg L^{-1} was maintained by supplying air at a rate of 10 mL min^{-1} . The supplied air also allowed the mixture within the reactors to maintain the beads distributed homogeneously. Water samples (150 mL) were collected from each reactor every 12 h for 96 h of treatment and analyzed for N-NH_4^+ and biochemical oxygen demand (BOD_5) following the technical guidelines of Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, AWWA, WEF, 1998).

After dissolving one bead in 5 mL of 0.25 M of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ solution (pH 7.0) in triplicate, the number of algal cells in the beads was counted using the Neubauer chamber (hemocytometer). To quantify bacteria, the Most Probable Number (CFU bead $^{-1}$) technique was applied, with a series of five tubes for analysis, using both probabilistic and confirmative tests (APHA, AWWA, WEF, 1998). The specific growth rate was calculated with the equation:

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{X_m}{X_o} \right)$$

Where X_m and X_o are the concentrations of biomass at the end and the beginning of a batch run, respectively, and t is the duration of the run.

Statistical analysis

The effects of immobilization and coimmobilization under two culture conditions of continuous light and cycles of light/darkness (12h/12h) on growth and on nitrogen and organic material (BOD) removal were analyzed by covariance (ANCOVA; $p \leq 0.05$) with Statistical Software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The Tukey test ($p \leq 0.05$) was applied when results showed significant differences.

Arreglo experimental y procedimiento

Microalgas y lodo activado se inmovilizaron, coinmovilizaron y se colocaron en reactores de polietileno tereftalato (PET) en un medio de cultivo (2.5 L) con la composición (mg L^{-1}): 7 NaCl, 20 CaCl_2 , 2 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 KH_2PO_4 , 120 NH_4Cl , 2 K_2HPO_4 , 4 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 D-glucosa y 150 peptona.

Los experimentos consistieron en cultivos por triplicado de los reactores con microalgas inmovilizadas con luz continua (LCM) o fotoperiodos de 12/12 h (LDM); reactores con lodo activado inmovilizadas con luz continua (LCB) o fotoperiodos (LDB); reactores con microalgas y lodo activado coinmovilizadas, con luz continua (LCC) o fotoperiodos (LDC). Todos los tratamientos se mantuvieron a 25 °C y luz de lámparas fluorescentes de luz blanca fría, con una intensidad de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Todos los reactores con células inmovilizadas y coinmovilizadas se usaron bajo condiciones aeróbicas. La concentración de oxígeno disuelto (OD) a 2.3 mg L^{-1} se mantuvo mediante el suministro de aire a una velocidad de 10 mL min^{-1} . El aire suministrado también permitió que la mezcla en los reactores mantuviera las esferas distribuidas homogéneamente. Se obtuvieron muestras de agua (150 mL) de cada reactor cada 12 h durante 96 h de tratamiento y se analizó N-NH_4^+ y la demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5), siguiendo las directrices técnicas de los métodos estándar para el examen del agua y las aguas residuales (APHA, AWWA, WEF, 1998).

Después de disolver una esfera en 5 mL de 0.25 M de la solución $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.0) por triplicado, se contó el número de células de algas en las esferas usando la cámara de Neubauer (hemocitómetro). Para cuantificar las bacterias, se aplicó la técnica del número más probable (CFU esfera $^{-1}$), con una serie de cinco tubos para el análisis, usando pruebas probabilísticas y confirmatorias (APHA, AWWA, WEF, 1998). La tasa de crecimiento específico se calculó con la ecuación:

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{X_m}{X_o} \right)$$

donde X_m y X_o son las concentraciones de biomasa al final y comienzo del procedimiento por lotes, respectivamente, y t es la duración del procedimiento.

Análisis estadístico

Los efectos de la inmovilización y la coinmovilización bajo dos condiciones de cultivo de la luz y los ciclos de luz/oscuridad (12h/12h) en el crecimiento y en la eliminación de nitrógeno y materia orgánica (DBO) se analizaron por covarianza (ANCOVA, $p \leq 0.05$) con Statistical Software (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EE.UU.). La prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) se usó cuando los resultados mostraron diferencias significativas.

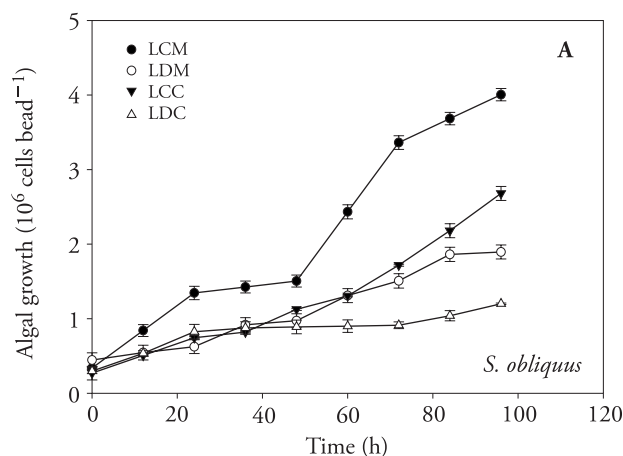
RESULTS AND DISCUSSION

Algal growth and bacteria

The growth of immobilized and coimmobilized *S. obliquus* showed a typical growth curve (Figure 1A). The acclimatization phase did not occur; growth was recorded immediately after the addition of beads in the culture medium, suggesting that the microalgae adapted quickly to immobilization. This contrasts results of other studies, which report a prolonged acclimatization phase (Chevalier and De La Noüe, 1985; Lau *et al.*, 1997).

The specific growth rates (μ) for immobilized and coimmobilized *S. obliquus* cells showed significant differences (ANCOVA, $p \leq 0.032$). A higher algal rate (μ) in immobilized culture (LCM: 0.624 d^{-1}) was obtained in reactors with continuous illumination with respect to coimmobilized culture (LCC: 0.552 d^{-1}).

The Tukey test showed that, under conditions of photoperiods μ of *S. obliquus* in LDM and LDC, there were no significant differences ($p > 0.053$), but, because of the effect of the photoperiod, μ was lower (0.456 d^{-1} and 0.312 d^{-1}) than under continuous illumination (Table 1). However, μ for all treatments was higher than those reported by Jiménez-Pérez *et al.* (2004) and Ruiz-Marín *et al.* (2010) for immobilized *S. obliquus* (0.264 d^{-1} and 0.110 d^{-1}) under continuous illumination.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento de algas y bacterias

El crecimiento de *S. obliquus* inmovilizadas y coimmobilizadas mostró una típica curva de crecimiento (Figura 1A). La fase de aclimatación no se produjo; el crecimiento se registró inmediatamente después de la adición de las esferas en el medio de cultivo, lo que sugiere que las microalgas se adaptaron rápidamente a la inmovilización. Esto contrasta con los resultados de otros estudios que reportan una fase de aclimatación prolongada (Chevalier y de la Noüe, 1985; Lau *et al.*, 1997).

Las tasas de crecimiento específico (μ) para las células inmovilizadas y coimmobilizadas de *S. obliquus* mostraron diferencias significativas (ANCOVA, $p \leq 0.032$). En los reactores con iluminación continua se obtuvo mayor frecuencia de algas (μ) en los cultivos inmovilizados (LCM: 0.624 d^{-1}) en relación a los coimmobilizados (LCC: 0.552 d^{-1}).

La prueba de Tukey reveló que, con fotoperíodo μ de *S. obliquus* bajo LDM y LDC no tuvo diferencias significativas ($p > 0.053$), pero debido al efecto del fotoperíodo, μ fueron menores (0.456 d^{-1} y 0.312 d^{-1}) que bajo iluminación continua (Cuadro 1). Sin embargo, μ de todos los tratamientos fue superior a lo reportado por Jiménez-Pérez *et al.* (2004) y Ruiz-Marín *et al.* (2010) para *S. obliquus* inmovilizadas (0.264 d^{-1} y 0.110 d^{-1}) y con iluminación continua.

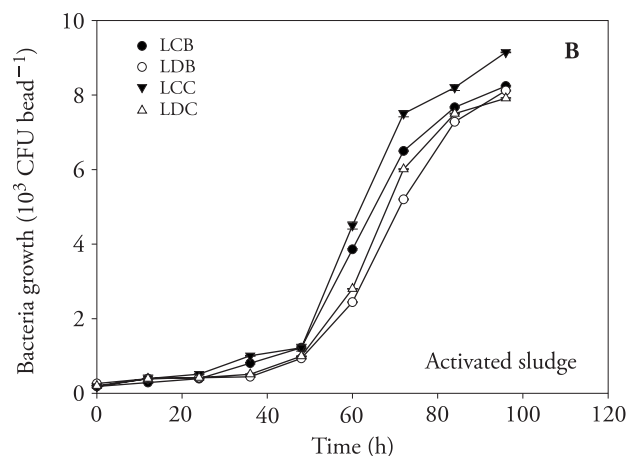


Figure 1. Growth of *S. obliquus* (A) in activated sludge (B), immobilized and coimmobilized (Bars=standard deviation).

Figura 1. El crecimiento de *S. obliquus* (A) en lodo activado (B), inmovilizadas y coimmobilizadas (Barras=desviación estándar).

Table 1. Specific growth rate (μ) in immobilized and coimmobilized systems for *S. obliquus* and bacteria activated sludge.

Cuadro 1. Tasa de crecimiento específico (μ) en los sistemas inmovilizados y coinmovilizados de *S. obliquus* y lodos activados con bacterias.

Treatment	Specific growth rate (d^{-1})	
	<i>S. obliquus</i>	Bacteria (activated sludge)
Immobilization		
Continuous light	0.624 ^a	1.041 ^a
Photoperiods (12/12h)	0.456 ^b	0.864 ^b
Coimmobilization		
Continuous light	0.552 ^a	0.768 ^b
Photoperiods (12/12h)	0.312 ^b	0.864 ^b

Means followed by different letters are significantly different (Tukey; $p \leq 0.05$) ❖ Medias con letras diferentes son estadísticamente diferentes (Tukey; $p \leq 0.05$).

Cell density of immobilized *S. obliquus* (LCM) was higher in reactors with continuous light and a maximum concentration of 4×10^6 cells bead⁻¹ compared to reactors with coimmobilized cells (LCC) of 2.9×10^6 cells bead⁻¹. Under photoperiod, algal cell concentration was lower for both systems, with 2.0×10^6 cells bead⁻¹ and 1.0×10^6 cells bead⁻¹ (Figure 1A), suggesting that the microalga has greater capacity for growth when exposed to continuous light. Although growth was low in those reactors with photoperiod, it appeared to have been uninterrupted; therefore, other factors may have contributed to increase cell density.

The increase in the number of bacteria (activated sludge) in immobilized and coimmobilized cultures showed significant differences between treatments (ANCOVA; $p = 0.395$). The Tukey test confirmed that bacterial growth in treatment LCC was significantly different ($p = 0.019$) with respect to other treatments, suggesting that bacteria coimmobilized with *S. obliquus* under continuous light (Figure 1B) had a higher cell growth (400 CFU bead⁻¹ to 9100 CFU bead⁻¹) than treatments LCB, LDB and LDC (400 CFU bead⁻¹ to 8000 CFU bead⁻¹).

According to specific growth rates (Table 1), the number of bacteria rapidly increased with respect to *S. obliquus*, suggesting that during the

La densidad de células de *S. obliquus* inmovilizadas (LCM) fue mayor en los reactores con luz continua y se obtuvo una concentración máxima de 4×10^6 células esfera⁻¹, comparado con los reactores con células coinmovilizadas (LCC) de 2.9×10^6 células esfera⁻¹. Con fotoperíodos, la concentración de células de algas fue menor para ambos sistemas, con 2.0×10^6 células esfera⁻¹ y 1.0×10^6 células esfera⁻¹ (Figura 1A), sugiriendo que la microalga tiene mayor capacidad de crecimiento cuando se expone a luz continua. Aunque el crecimiento fue bajo en los reactores con fotoperiodo, parece haber sido ininterrumpido; por tanto, otros factores pueden haber contribuido a aumentar la densidad celular.

El aumento del número de bacterias (lodo activado) en cultivos inmovilizados y coinmovilizados mostró diferencias significativas entre los tratamientos (ANCOVA, $p = 0.395$). La prueba de Tukey confirmó que el crecimiento bacteriano en el tratamiento LCC fue significativamente diferente ($p = 0.019$) con respecto a otros tratamientos, lo que sugiere que las bacterias coinmovilizadas con *S. obliquus* bajo luz continua (Figura 1B) tuvieron crecimiento celular mayor (de 400 UFC esfera⁻¹ a 9100 CFU esfera⁻¹) que los tratamientos LCB, LDB y LDC (de 400 CFU esfera⁻¹ a 8000 CFU esfera⁻¹).

De acuerdo con las tasas de crecimiento específicos (Cuadro 1), el número de bacterias aumentó rápidamente con respecto a *S. obliquus*, lo que sugiere que el contenido de oxígeno durante la fase exponencial era suficiente para sostener el crecimiento bacteriano. La coinmovilización bajo luz continua fue beneficiosa para las bacterias ya que el número de colonias aumentó. Hay resultados similares para *S. obliquus* coinmovilizadas con *B. subtilis* con un aumento en el número de bacterias por un factor de alrededor de 500 y el número de algas sólo por cinco durante el experimento (48 h) (Chevalier y de la Noüe, 1988).

En el presente estudio, el oxígeno fue un factor importante para el crecimiento bacteriano en los sistemas coinmovilizados. Es decir, las células situadas en el centro de la esfera pueden tener grandes limitaciones en términos de sustrato y oxígeno, lo que implica crecimiento mayor en la superficie (Hill y Khan, 2008). Sin embargo, las bacterias coinmovilizadas no presentaron estas limitaciones. Es probable que el oxígeno producido por las microalgas se haya distribuido dentro de la esfera y haya mantenido los

exponential phase oxygen content was sufficient to sustain bacterial growth. Coimmobilization under continuous light was beneficial for the bacteria since the number of colonies increased. There are similar results for *S. obliquus* coimmobilized with *B. subtilis* with an increase in the number of bacteria by a factor of about 500 and the number of algae only by five during the experiment (48 h) (Chevalier and de la Noüe, 1988).

In the present study oxygen was an important factor for bacterial growth in coimmobilized systems. That is, the cells located in the center of the bead may have major limitations in terms of substrate and oxygen, implying greater growth on the surface (Hill and Khan, 2008). However, coimmobilized bacteria did not exhibit these limitations. It is likely that oxygen produced by the microalgae was distributed within the bead and maintained the levels necessary to sustain growth and degradation of organic matter.

Light cycles in microalgae cultures can affect photosynthetic activity and growth rate (Jacob-López *et al.*, 2009). In the present study, both immobilized and coimmobilized systems had higher growth rates (Table 1) under continuous light than under photoperiods. According to Shih-Hsin *et al.* (2010) a higher growth rate (1.190 d^{-1}) can be obtained for *S. obliquus* under continuous illumination than under photoperiods of 14:10 h (0.911 d^{-1}) and 10:14 h (0.773 d^{-1}). Given the culture conditions for microalgae in this study, growth rates were higher than those from studies for *S. obliquus* immobilized in alginate: 0.110 d^{-1} and 0.157 d^{-1} (Ruiz-Marín *et al.*, 2010) and 0.264 d^{-1} (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004). This suggests that it is possible to cultivate the microalga, both immobilized and coimmobilized, in systems outdoors during different seasons.

Although microalga can change its metabolism from autotrophic to heterotrophic and can utilize inorganic and organic carbon (Mandal and Mallick, 2011), results from the present study indicated that this was not possible. To achieve this, the alga needs time to adapt to such conditions in order to change its metabolism to heterotrophic.

Results from this study show that the coimmobilization system favored growth of both organisms under continuous light, suggesting a possible exchange of CO_2 and O_2 , as reported by Chevalier and de la Noüe (1988) for *Scenedesmus* sp. coimmobilized with *B. subtilis*.

niveles necesarios para sostener el crecimiento y la degradación de la materia orgánica.

Los ciclos de luz en cultivos de microalgas pueden afectar la actividad fotosintética y la tasa de crecimiento (Jacob-López *et al.*, 2009). En el presente estudio ambos sistemas tuvieron tasas de crecimiento mayores (Cuadro 1) con luz continua que con fotoperiodo. Según Shih Hsin *et al.* (2010), se puede obtener una tasa de crecimiento más alta (1.190 d^{-1}) para *S. obliquus* bajo iluminación continua que con fotoperiodos de 14:10 h (0.911 d^{-1}) y 10:14 h (0.773 d^{-1}). Dadas las condiciones de cultivo para microalgas en este estudio, las tasas de crecimiento fueron mayores que las de *S. obliquus* inmovilizadas en alginato: 0.110 d^{-1} y 0.157 d^{-1} (Ruiz-Marín *et al.*, 2010) y 0.264 d^{-1} (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004). Esto sugiere que es posible cultivar la microalga inmovilizada y coinmovilizada, en sistemas al aire libre durante estaciones diferentes.

Aunque las microalgas pueden cambiar su metabolismo de autótrofas a heterótrofas y pueden utilizar carbono inorgánico u orgánico (Mandal y Mallick, 2011), los resultados del presente estudio indican que esto no fue posible. Para lograrlo, las microalgas necesitan tiempo para adaptarse a esas condiciones con el fin de cambiar su metabolismo a heterótrofo.

Resultados de este estudio muestran que el sistema de coinmovilización favoreció el crecimiento de ambos organismos con luz continua, lo que sugiere un posible intercambio de CO_2 y O_2 , según lo reportan Chevalier y de la Noüe (1988) para *Scenedesmus* sp. coinmovilizadas con *B. subtilis*.

Consumo de nitrógeno y materia orgánica

La mayoría de los estudios del uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales se basan en el uso de monocultivos para eliminar ciertos nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo; sólo unos pocos estudios reportan el uso de cultivos de algas mixtas para el tratamiento de aguas residuales (Gantar *et al.*, 1991). Un área de interés es estudiar sistemas inmovilizados para eliminación de nutrientes ya que estos sistemas incorporan dos microorganismos en la misma matriz (coinmovilización). Esta tecnología puede aumentar la biomasa y mejorar la eliminación de nutrientes en las aguas residuales. González y Bashan (2000) reportan un crecimiento significativo y

Consumption of nitrogen and organic matter

Most of the studies about using microalgae for wastewater treatment are based on the use of monoculture to remove specific nutrients, mainly nitrogen and phosphate; only a few studies report using mixed algal cultures for wastewater treatment (Gantar *et al.*, 1991). One area of interest is to study immobilized systems for nutrient removal since these systems incorporate two microorganisms in the same matrix (coimmobilization). This technology can increase in biomass and improve nutrient removal in wastewater. González and Bashan (2000) report significant growth and higher pigment content in *C. vulgaris* when coimmobilized with *A. brasilense*. In addition, coimmobilization achieved greater removal of ammonia (100 %) than immobilized monoculture cells (35 %). Chevalier and de la Noüe (1988) coimmobilized the microalga *S. obliquus* with the bacterium *B. subtilis*, and conclude that the coimmobilization system favored bacterial and algal growth and high production of alpha-amylase.

Wastewater contains a variety of nutrients and a single strain cannot simultaneously remove all of them. In activated sludge and pond stabilization processes, a complex mixture of microorganisms is found, and their proportions vary with composition of wastewater and treatment stage. The association of these populations of bacteria and photosynthetic organisms occurs to some extent with the exchange of nutrients and gases (oxygen and CO₂); therefore, it is possible to select a good combination of organisms for simultaneous removal of nutrients from the wastewater. However, because not all associations are positive, it is important to assess the relationship between the two microorganisms in coimmobilized systems (González *et al.*, 2000).

In the present study, nitrogen removal showed significant differences among treatments (ANCOVA, $p=0.002$). Half of the nitrogen was removed in treatments LDM, LCB and LDB but there were no significant differences (Tukey, $p=0.32$). The most efficient removal (from 30 mg L⁻¹ to 2.8 mg L⁻¹; 92 %) was obtained with immobilized *S. obliquus* (LCM) after 100 h of treatment (Figure 2A). Also, reactors with coimmobilized cells (LCC) eliminated more nitrogen (60 %) and continuous light (from 22.9 mg L⁻¹ to 9.0 mg L⁻¹) compared with that

contenido mayor de pigmento en *C. vulgaris* cuando son coinmovilizadas con *A. brasilense*. Además, con coinmovilización se eliminó más amoníaco (100 %) que con células inmovilizadas de monocultivos (35 %). Chevalier y de la Noüe (1988) coinmovilizaron la microalga *S. obliquus* con la bacteria *B. subtilis*, y concluyen que el sistema de coinmovilización favoreció un crecimiento de bacterias y algas y una producción alta de alfa-amilasa.

Las aguas residuales contienen varios nutrientes y una sola cepa no puede eliminarlos todos. En procesos de lodos activados y de estabilización de estanques se encuentra una mezcla compleja de microorganismos, y sus proporciones varían con la composición de las aguas residuales y la etapa de tratamiento. La asociación de estas poblaciones de bacterias y organismos fotosintéticos se produce en cierta medida con el intercambio de nutrientes y gases (oxígeno y CO₂); por tanto, es posible seleccionar una combinación adecuada de organismos para eliminar simultáneamente los nutrientes de las aguas residuales. Sin embargo, como no todas las asociaciones son positivas, es necesario evaluar la relación entre los dos microorganismos en sistemas coinmovilizados (González *et al.*, 2000).

En el presente estudio, la eliminación de nitrógeno mostró diferencias significativas entre tratamientos (ANCOVA, $p=0.002$). La mitad del nitrógeno se eliminó en los tratamientos LDM, LCB y LDB, pero sin diferencias significativas (Tukey, $p=0.32$). La eliminación más eficiente (de 30 mg L⁻¹ a 2.8 mg L⁻¹; 92%) se obtuvo con *S. obliquus* (LCM) inmovilizadas después de 100 h de tratamiento (Figura 2A). Además, los reactores con células coinmovilizadas (LCC) eliminaron más nitrógeno (60 %) y luz continua (de 22.9 mg L⁻¹ a 9.0 mg L⁻¹), comparado con lo eliminado en reactores (32.4 %) con fotoperíodos (LDC) (de 22.0 mg L⁻¹ a 14.8 mg L⁻¹) después de 100 h de tratamiento (Figura 2B).

Se eliminó más nitrógeno con tratamientos de luz continua, similar a los resultados reportados por Chevalier y de la Noüe (1985) para *S. obliquus* inmovilizadas en carragenano (100 % NH₄⁺ eliminado). Además, Travieso *et al.* (1996), aunque con otras especies de microalga inmovilizadas (*C. vulgaris*), reportan 80 % de eliminación en aguas residuales urbanas, y Lau *et al.* (1997) 95 % de NH₄⁺ eliminado por *C. vulgaris* inmovilizado con alginato y cultivado en aguas residuales artificiales.

eliminated in reactors (32.4 %) under photoperiods (LDC) (from 22.0 mg L⁻¹ to 14.8 mg L⁻¹) after 100 h of treatment (Figure 2B).

More nitrogen was removed with continuous light treatments, similar to results reported by Chevalier and de la Noüe (1985) for *S. obliquus* immobilized in carrageenan (100 % NH₄⁺ removed). Moreover, Travieso *et al.* (1996), though with other species of immobilized microalga (*C. vulgaris*), report an 80 % removal in urban wastewater, and Lau *et al.* (1997) 95 % of NH₄⁺ removed by alginate-immobilized *C. vulgaris* cultivated in artificial wastewater.

It is likely that the relatively low nitrogen removal in LCC reactors compared to immobilized cells can be attributed to the contribution of nitrogen as a result of organic matter degradation. This can be observed (Figure 2B) after an increase in nitrogen during the first 48 h and subsequent decline. The relationship between nitrogen input and consumption by both microorganisms occurs in coimmobilized systems under continuous light (Figure 2B); whereas with photoperiods, a decline of algal activity occurs with a subsequent drop in the consumption of nitrogen. This suggests that the heterotrophic activity in the dark phase provides nitrogen to the culture medium, which is then consumed by the microalgae, a phenomenon that occurs in systems of wastewater treatment and pond stabilization (Munoz and Guieysse, 2006).

The consumption of organic matter (BOD) supports the fact that immobilized bacteria can

Es probable que la eliminación de nitrógeno relativamente baja en los reactores de LCC, comparado con células inmovilizadas, se pueda atribuir a la contribución de nitrógeno como resultado de la degradación de materia orgánica. Esto se puede observar (Figura 2B) después del aumento de nitrógeno durante las primeras 48 h y descenso posterior. La relación entre la entrada de nitrógeno y el consumo por ambos microorganismos ocurre en sistemas coinmovilizados con luz continua (Figura 2B); mientras que con fotoperíodos disminuye la actividad de las algas, con una posterior reducción en el consumo de nitrógeno. Esto sugiere que la actividad heterotrófica en la fase de oscuridad proporciona nitrógeno al medio del cultivo, que luego lo consumen las microalgas, un fenómeno que ocurre en sistemas de tratamiento de aguas residuales y lagunas de estabilización (Muñoz y Guieysse, 2006).

El consumo de materia orgánica (DBO) es compatible con el hecho de que las bacterias inmovilizadas pueden consumir este sustrato y proporcionar nitrógeno al medio (Figura 3). La eliminación de 22 % de DBO (de 98 mg L⁻¹ a 76.7 mg L⁻¹) y 25 % (de 98 mg L⁻¹ a 73.0 mg L⁻¹) para LCB y LDB, el sistema de bacterias inmovilizadas fue menor a la observada en el LCC de coinmovilizadas (43 %) (de 97.9 mg L⁻¹ a 54.2 mg L⁻¹). Mandal y Mallick (2011) sugieren que los cultivos libres de *S. obliquus* pueden utilizar materia orgánica en condiciones mixotróficas, como *Chlorella sorokiniana* y *Chlorella vulgaris* (Lee *et al.*, 1996; Ogbonna *et al.*,

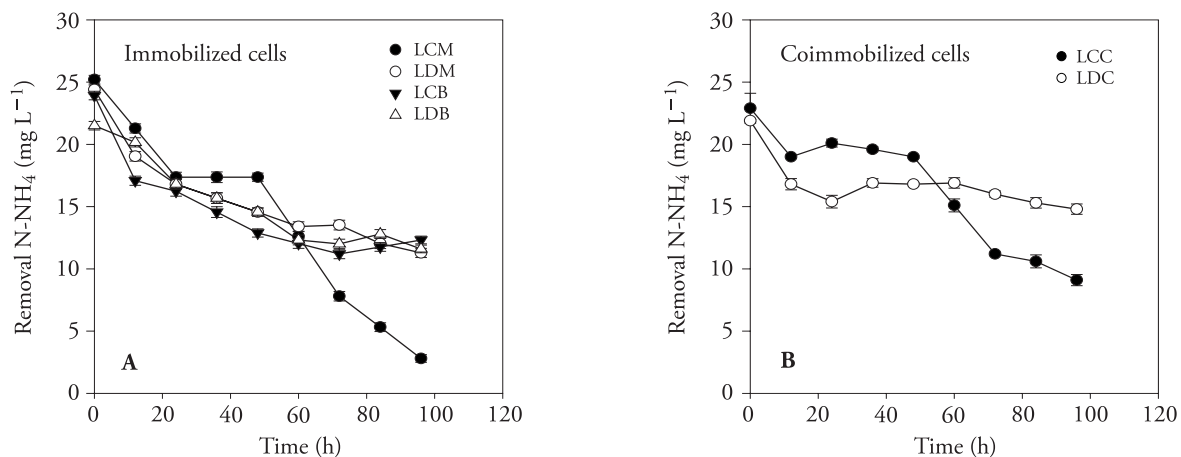


Figure 2. Average content of ammonium removed from artificial wastewater for immobilized (A) and coimmobilized cells (B) (Bars=standard deviation).

Figura 2. Contenido promedio de amonio eliminado de aguas residuales artificiales para células inmovilizadas (A) y células coinmovilizadas (B) (Barras=desviación estándar).

consume this substrate and provide nitrogen to the medium (Figure 3). The removal of 22 % BOD (from 98 mg L⁻¹ to 76.7 mg L⁻¹) and 25 % (from 98 to 73.0 mg L⁻¹) for LCB and LDB, obtained in the immobilized-bacteria system was lower than that observed in the coimmobilized LCC (43 %) (from 97.9 mg L⁻¹ to 54.2 mg L⁻¹). Mandal and Mallick (2011) suggest that free cultures of *S. obliquus* can use organic matter in mixotrophic conditions, as *Chlorella sorokiniana* and *Chlorella vulgaris* (Lee *et al.*, 1996; Ogonna *et al.*, 2000, Liang *et al.*, 2009). Similarly, Shih-Hsin *et al.* (2010) conclude that in free culture of *S. obliquus* under light/dark cycles it is possible to achieve high cell growth, compared with growth under continuous illumination reported by de Morais and Costa (2007) and Mandal and Mallick (2009). The authors conclude that the microalga *S. obliquus* is capable of growing in urban wastewater and can be cultivated in the open in different seasons.

Although some experiments show that *S. obliquus* can change its metabolism from autotrophic to heterotrophic, results from the present study showed that the immobilized microalga did not respond in the same way; but it might be possible with a longer acclimatization period.

The high BOD removal (from 98 to 54 mg L⁻¹; 45 %) in coimmobilized cell reactors under light continuous suggests a positive association with possible exchange of oxygen produced by the microalgae through their photosynthetic activity and

2000, Liang *et al.*, 2009). Asimismo, Shih-Hsin *et al.* (2010) concluyen que en el cultivo libre de *S. obliquus* bajo ciclos de luz/oscuridad, es posible lograr un crecimiento alto de células, comparado con el crecimiento bajo iluminación continua reportado por de Morais y Costa (2007) y Mandal y Mallick (2009). Los autores concluyen que la microalga *S. obliquus* puede crecer en aguas residuales urbanas y se puede cultivar al aire libre en diferentes estaciones.

Aunque algunos estudios muestran que *S. obliquus* puede cambiar su metabolismo de autótrofo a heterótrofo, los resultados del presente estudio revelaron que esta microalga inmovilizada no respondió de la misma manera, pero puede ser posible con un período de aclimatación más largo.

La eliminación alta de DBO (de 98 mg L⁻¹ a 54 mg L⁻¹; 45 %) en reactores de células coinmovilizadas y luz continua sugiere una asociación positiva con un posible intercambio de oxígeno producido por las microalgas a través de su actividad fotosintética y la contribución de CO₂ de gas por bacterias (Chevalier y la Noüe, 1988). Por tanto, en términos de economía y eficiencia, el tratamiento de aguas residuales con microalgas y lodos activados en sistemas coinmovilizados es una opción para la eliminación simultánea de nitrógeno y materia orgánica con un sólo tratamiento. Además, el suministro de oxígeno en reactores de digestión aeróbica se puede reducir porque las microalgas producen oxígeno; entonces, pueden mantener la actividad heterótrofa de las bacterias.

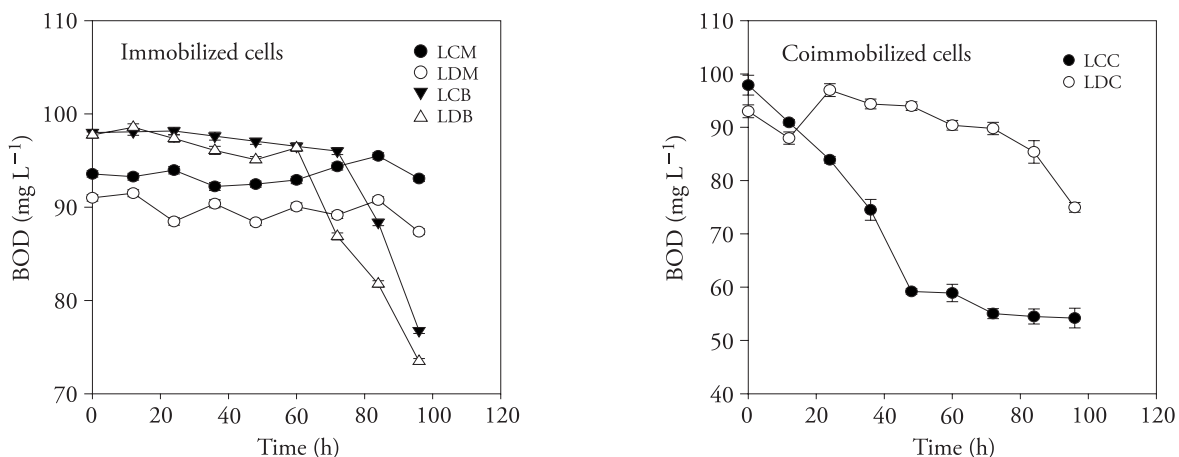


Figure 3. Average concentration of BOD (mg L⁻¹) removed by immobilized and coimmobilized cells from artificial wastewater (Bars=standard deviation).

Figura 3. Concentración promedio de DBO (mg L⁻¹) eliminado por las células inmovilizadas y coinmovilizadas de aguas residuales artificiales (Barras=desviación estándar).

contribution of CO₂-gas by bacteria (Chevalier and the Noüe, 1988). Therefore, in terms of economy and efficiency, the treatment of wastewater by microalgae and activated sludge in coimmobilized systems is an option for simultaneous removal of nitrogen and organic matter with a single treatment. Furthermore, the supply of oxygen in aerobic digestion reactors can be reduced because microalgae produce oxygen, thereby maintain the heterotrophic activity of bacteria.

CONCLUSIONS

Bacteria and microalgae were not affected in their growth capacity because of the immobilization and coimmobilization in sodium alginate. The cycles of light/darkness reduce the growth capacity of *S. obliquus*, as well as nitrogen and BOD removal. No organic carbon was used in the immobilized and coimmobilized systems; thus, microalgae showed no ability to use organic carbon in cultures with continuous illumination and photoperiods.

The positive association between the two microorganisms (coimmobilization) simultaneously removed significant amounts of nitrogen and BOD in reactors with continuous illumination. An exchange of CO₂ may occur due to the activated sludge in the respiration processes with the subsequent supply of nitrogen during the degradation of organic matter, while the microalgae makes use of this nutrient and supplies photosynthetic O₂ within the bead and to the culture medium.

Wastewater treatment by microalgae and activated sludge in coimmobilized systems can be an option for the simultaneous removal of nitrogen and organic matter in a single stage of treatment, saving in the supply of oxygen for reactors of aerobic digestion. Further study is required to determine the compatibility of organisms in a single matrix and to explore the possibility of achieving simultaneous nutrient removal in wastewater, using the urban effluents of treatment plants to grow microalgae and obtain high value products through autotrophic and heterotrophic pathways.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to express our gratitude to UNACAR, Mexico, for funding this study.

CONCLUSIONES

Bacterias y microalgas no fueron afectados en su capacidad de crecimiento por la inmovilización y coimmobilización en alginato de sodio. Los ciclos de luz/oscuridad reducen la capacidad de crecimiento de *S. obliquus*, así como la eliminación de nitrógeno y DBO. No se eliminó carbono orgánico en los sistemas inmovilizados y coimmobilizados; por tanto, las microalgas no pudieron usar carbono orgánico en cultivos con iluminación continua y fotoperíodos.

La asociación positiva entre los dos microorganismos (coimmobilización) eliminó simultáneamente grandes cantidades de nitrógeno y DBO en los reactores con iluminación continua. Puede haber un intercambio de CO₂ debido al lodo activado en los procesos de respiración con el posterior suministro de nitrógeno durante la degradación de la materia orgánica, mientras las microalgas usan este nutriente y suministran fotosintéticos O₂ dentro de la esfera y al medio de cultivo.

El tratamiento de aguas residuales con microalgas y lodos activados en los sistemas de coimmobilizados puede ser una opción para la eliminación simultánea de materia orgánica y nitrógeno en una sola etapa de tratamiento, con un ahorro en el suministro de oxígeno para los reactores de digestión aeróbica. Más estudios se requieren para determinar la compatibilidad de los organismos en una sola matriz y explorar la posibilidad de lograr simultáneamente la eliminación de nutrientes en aguas residuales, y usar aguas residuales urbanas de plantas de tratamiento para cultivar microalgas y obtener productos de alto valor a través de vías autótrofas y heterótrofas.

—Fin de la versión en Español—



LITERATURA CITADA

- APHA, AWWA, WEF. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington, D.C. American Public Health Association 20th Ed. 1220 p.
- Bandhyopadhyay, K., D. Das, P. Bhattacharyya, and B.R. Maiti. 2001. Reaction engineering studies on biodegradation of phenol by *Pseudomonas putida* MTCC 1194 immobilized on calcium alginate. *Biochem. Eng. J.* 8: 179-186.
- Bitton, G. 1994. Activated sludge process. *In*: Mitchell, R. (ed). *Wastewater Microbiology, Pathogens and Parasites in Domestic Wastewater*. John Wiley and Sons Inc. New York. pp: 147-166

- Chena, K. C., C. Y. Chena., J. W. Penga, and J. Y. Houngh. 2002. Real-time control of an immobilized-cell reactor for wastewater treatment using ORP. *Water Res.* 36: 230-238.
- Chevalier, P., and J. de la Noüe. 1985. Wastewater nutrient removal with microalgae immobilized in carrageenan. *Enzyme Microbiol. Technol.* 7: 621-624.
- Chevalier, P., and J. de la Noüe. 1988. Behavior of algae and bacteria coimmobilized in carrageenan in a fluidized bed. *Enzyme Microbiol. Technol.* 10: 19-23.
- De Bashan, L. E., M. Moreno, J. P. Hernández, and Y. Bashan. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* 36: 2941-2948.
- de Morais, M. G., and J. A. V. Costa. 2007. Biofixation of carbon dioxide by *Spirulina* sp. and *Scenedesmus obliquus* cultivated in a three-stage serial tubular photobioreactor. *J. Biotechnol.* 129(3): 439-445.
- Gantar, M., Z. Obrecht, and B. Dalmacija. 1991. Nutrient removal and algae succession during the growth of *Spirulina platensis* and *Scenedesmus quadricauda* on swine wastewater. *Biores. Technol.* 36: 167-171.
- Gonzalez, B. L. E., K. L. Vladimir, J. P. Hernández, J. J. Bustillos, and Y. Bashan. 2000. Changes in the metabolism of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized in alginate with the nitrogen-fixing *Phyllobacterium myrsinacearum*. *Can. J. Microbiol.* 46: 653-659.
- Gonzalez, L. E., and Y. Bashan. 2000. Increased growth of the microalgae *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and culture in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1527-1531.
- Guillar, R. L. L., and J. H. Ryther. 1962. Studies on marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula Confervacea* (Cleve). *Gran.-Can. J. Microbiol.* 8: 229-239.
- Hill, C. B., and E. Khan. 2008. A comparative study of immobilized nitrifying and co-immobilized nitrifying and denitrifying bacteria for ammonia removal from sludge digester supernatant. *Water Air Soil Poll.* 195:23-33.
- Humphries, A. C., K. P. Nott, L. D. Hall, and L. E. Macaskie. 2005. Reduction of Cr(VI) by immobilized cells of *Desulfovibrio vulgaris* NCIMB 8303 and *Microbacterium* sp. NCIMB 13776. *Biotechnol. Bioeng.* 90(5): 597-605.
- Jacob-Lopes, E., C. H. G. Scoparo, L. M. C. F. Lacerda, and T. T. Franco. 2009. Effect of light cycles (night/day) on CO₂ fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chem. Eng. Process.* 48(1): 306-310.
- Jimenez-Perez, M. V., P. Sanchez-Castillo., O. Romera., D. Fernandez-Moreno, and C. Perez-Martinez. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microbiol. Technol.* 34: 392-398.
- Kawaguti, H. Y., E. Manrich, and H. H. Sato. 2006. Production of isomaltulose using *Erwinia* sp. D12 cells: culture medium optimization and cell immobilization in alginate. *Biochem. Eng. J.* 29: 270-277.
- Lau, P. S., N. F. Y. Tam, and Y. S. Wong. 1997. Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environ. Technol.* 18: 945-951.
- Lee, Y. K., S. Y. Ding, C. H. Hoe, and C. S. Low. 1996. Mixotrophic growth of *Chlorella sorokiniana* in outdoor enclosed photobioreactor. *J. Appl. Phycol.* 8: 163-169.
- Liang, Y., N. Sarkany, and Y. Cui. 2009. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. *Biotechnol. Lett.* 31: 1043-1049.
- Mandal, M., and N. Mallick. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 281-291.
- Mandal, S., and N. Mallick. 2011. Waste utilization and biodiesel production by the green microalga *Scenedesmus obliquus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(1): 374-377.
- Martinez, A. D. S., and Y. T. Bustos. 2009. Biodegradation of wastewater pollutants by activated sludge encapsulated inside calcium-alginate beads in a tubular packed bed reactor. *Biodegradation* 20: 709-715.
- Metcalf & Eddy, Inc. 2003. *Wastewater Engineering: Treatment Disposal and Reuse* (4th ed). New York: McGraw-Hill. 1819 p.
- Munoz, R., and B. Guieysse. 2002. Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants. *Water Res.* 40: 2799-2815.
- Nagadomi, H., T. Kitamura, M. Watanabe, and K. Sasaki. 2000. Simultaneous removal of chemical oxygen demand (COD), phosphate, nitrate and H₂S in the synthetic sewage wastewater using porous ceramic immobilized photosynthetic bacteria. *Biotechnol. Lett.* 22: 1369-1374.
- Nakashio, M. 1972. *Wastewater Treatment by Activated Sludge Method*. 2nd ed. Kyoto: Kouseishya-Kouseikaku. pp: 188-203
- Ogbonna, J. C., H. Yoshizawa, and H. Tanaka. 2000. Treatment of high strength organic wastewater by a mixed culture of photosynthetic microorganisms. *J. Appl. Phycol.* 12: 277-284.
- Pipes, W. O., and J. T. Zmuda. 1997. Assessing the efficiency of wastewater treatment. In: Hurst. C. J (ed). *Manual of Environmental Microbiology*. Washington DC: ASM. pp: 231-242.
- Ruiz-Marin, A., L. G. Mendoza-Espinosa, and T. Stephenson. 2010. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresources Technol.* 101: 58-64.
- Shin-Hsin, H., C. Wen-Ming, and C. Jo-Shu. 2010. *Scenedesmus obliquus* CNW-N as a potential candidate for CO₂ mitigation and biodiesel production. *Bioresources Technol.* 101: 8725-8730.
- Tam, N. F. Y., P. S. Lau, and Y. S. Wong. 1994. Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Sci. Technol.* 30: 369-374.
- Tam, N. F. Y., and Y. S. Wong. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollut.* 107 (1): 145-151.
- Travieso, L., F. Benitez, P. Weiland, E. Sánchez., R. Dupeyón, and A. R. Domínguez. 1996. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments. *Bioresources Technol.* 55: 181-186.
- Uludag, H., P. de Vos, and P. A. Tresco. 2000. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 42: 29-64.