

Dinámica temporal de las microalgas de un tratamiento terciario de aguas residuales urbanas a escala de laboratorio

MIGUEL ÁLVAREZ COBELAS* y TOMÁS GALLARDO**

* Instituto de la Grasa y sus Derivados (CSIC), Avda. Padre García Tejero, 4, E-41012 Sevilla.

** Departamento de Biología Vegetal I, Facultad de Biología, Universidad Complutense. E-28040 Madrid.

Resumen. En un agua procedente de un tratamiento biológico secundario con lodos activos se inoculó un cultivo mixto de *Chlorella saccharophila* y *Scenedesmus acutus* que creció en discontinuo en sendas cubetas a 25 °C y a 30 °C, respectivamente (iluminación 11 klux; fotoperiodo, 15/9), determinándose los siguientes parámetros: clorofila *a*, densidad óptica a 560 nm., número de células por especie, biomasa (peso seco y biovolúmenes), diversidad, producción primaria, respiración, capacidad fotosintética y tasas de sustitución específica. Además, para todo el proceso se realizaron correlaciones lineales con los factores químicos cuantificados en un trabajo anterior y se determinaron las constantes de crecimiento.

C. saccharophila fue desplazada por *Oscillatoria amphibia*, que apareció espontáneamente en los cultivos, debido a una mejor adaptación a la luz y a los nutrientes por parte de la segunda. Todos los procesos ocurrieron más rápidamente a 30 °C que a 25 °C como era de esperar. El fósforo y el carbono controlaron el crecimiento de las algas en esas condiciones. La producción primaria presentó máximos en los minutos posteriores al encendido de la luz.

Palabras clave: cultivo, aguas residuales, algas, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Oscillatoria*.

Abstract. A mixed culture of *Chlorella saccharophila* and *Scenedesmus acutus* was inoculated in urban water produced by activated sludge in a secondary treatment. Assays were undertaken in batch cultures ($T = 30\text{ °C}$ and 25 °C , light intensity = 11 klux, photoperiod = 15/9) and the following parameters were assessed: chlorophyll *a*, optical density at 560 nm., number of cells, biomass (biovolumes and dry weight), diversity, primary productivity, respiration, assimilation numbers and species turnover rates. In addition, some correlations were tried among chemical factors found in a previous paper and species growth rates were calculated.

C. saccharophila was outcompeted by *Oscillatoria amphibia* (that spontaneously appeared in the cultures) due to better light and nutrient adaptations of the second. All the phenomena proceeded faster at 30 °C than at 25 °C, as expected. Phosphorus and carbon controlled algal growth in such conditions. Primary productivity showed maximal values in the minutes that followed the light turning-on.

Key words: culture, urban water, algae, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Oscillatoria*.

INTRODUCCIÓN

Se ha recalcado en un trabajo anterior (VELASCO & al., 1986) la importancia y el interés del uso de las microalgas en el tratamiento terciario de la contaminación producida por aguas residuales. En esta publicación nos referiremos estrictamente a la dinámica temporal de las comunidades de algas que intervienen en dicho proceso a escala de laboratorio.

El estudio de la competencia entre especies de microalgas en el laboratorio no es nuevo (TILMAN, 1982), tanto para las marinas como para las dulceacuícolas, pero rara vez se ha realizado con taxones muy resistentes a la contaminación orgánica. Por otro lado, el número mayor de trabajos se ha llevado a cabo con diatomeas, resultando muy reducido el de experiencias con cianofíceas y clorofíceas (MUR & al., 1978; VINCENT & SILVESTER, 1979a, b).

El interés de éstas últimas procede del hecho de que, genéricamente hablando, constituye el final de la sucesión estival del fitoplancton en ecosistemas eutróficos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las especies empleadas en el cultivo mixto fueron: *Oscillatoria amphibia* Ag. (Cyanophyceae), *Chlorella saccharophila* (Krüger) Migula (Chlorophyceae), *Scenedesmus acutus* Meyen (Chlorophyceae).

Las dos últimas constituyeron el inóculo mixto; la primera apareció espontáneamente en los cultivos, quizá a partir de estados quiescentes en el agua residual. Las condiciones de cultivo y los métodos de análisis químico ya se han relatado en el trabajo precedente (VELASCO & al., 1986); sin embargo, nos gustaría señalar aquí el medio de cultivo ha sido el agua residual, lo cual es poco frecuente en estudios de esta índole.

Para las algas, se estimó el número de células mediante recuentos en microscopio invertido. A partir de dichas cifras, se averiguaron las tasas de crecimiento y los tiempos de duplicación, suponiendo una dinámica exponencial. También se estudió la concentración de clorofila *a*, por extracción en metanol en caliente y espectrofotometría (MARKER & al., 1980). La producción primaria y la respiración fueron seguidas mediante un electrodo de oxígeno YSI-57 con agitador incorporado, introducido en

un vaso de precipitado lleno de cultivo y tapado con una cubierta transparente, sumergido a su vez en el cultivo; las experiencias en fase luminosa eran precedidas de cinco minutos en la oscuridad para inhibir la fotorrespiración (HARRIS & PICCININ, 1977). La biomasa de las algas se calculó, además de mediante la clorofila *a*, por peso seco (residuo a 100 °C), biovolumenes y densidad óptica (colorimetría a 560 nm.). La fórmula de LEWIS (1978) sirvió para conocer la tasa de sustitución específica. Con los datos del número de individuos se halló la diversidad mediante la fórmula de Shannon-Weaver.

Por último, se realizaron algunas correlaciones lineales entre parámetros químicos y biológicos.

RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los datos que no se han incluido en las gráficas.

La biomasa total de las algas ofrece máximos variables según el indicador que se considere. Pero, para la clorofila *a*, los picos se tienen en el sexto día (30 °C) y en el noveno (25 °C) (fig. 1). Las correlaciones de la tabla 2 nos señalan que es la densidad óptica (datos, en VELASCO & al., 1986) la que se liga significativamente a mayor número de indicadores de biomasa. En cualquier caso, todas las cifras parecen ser mayores a menor temperatura.

La clorofila *a* de los cultivos se encuentra negativamente correlacionada con ortofosfatos, carbono inorgánico y amonio (tabla 2), y positivamente con los nitratos, lo cual podría sugerir que el amonio es la principal fuente nitrogenada para las especies de algas estudiadas. La cantidad de clorofila *a* por célula, aun mostrando pautas algo erráticas (tabla 1), apunta una tendencia decreciente con el tiempo.

Se aprecia una competencia (fig. 2) entre *C. saccharophila* y *O. amphibia*, en la cual acaba dominando la cianofícea a pesar de la superioridad del alga verde en los momentos iniciales. Dicho dominio es más patente a 30°C que a 25°C (tabla 3), ya que la tasa de crecimiento de *O. amphibia* es mayor a la temperatura más alta. *S. acutus* sin embargo, a pesar de presentar una capacidad reproductora superior a *C. saccharophila* no consigue aproximarse a las otras algas. La cianofícea presenta correlaciones significativas con el ortofosfato y el carbono inorgánico, mientras que *S. saccharophila* no (tabla 3).

El florecimiento de *O. amphibia* en las experiencias se refleja en la tasa de sustitución específica (fig. 3) y en la diversidad (tabla 1), aunque no de la misma manera. Los cultivos acusan la entrada masiva de dicho taxón (días 3°, 30° C y 4°, 25° C, respectivamente), produciéndose un aumento sucesivo de diversidad, que hacia el final declina por efecto de la dominancia debida a la cianofícea.

TABLA 1. Parámetros biológicos no incluidos en las figuras.

Parámetro:	Día:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N.º cels.	30° C	937,0	902,0	2359,0	4034,0	4932,4	6492,5	5481,8	6786,9	8355,3	13628,3
(N/cc)×10 ³	25° C	1309,0	1146,8	1570,8	2223,6	3438,2	3216,9	4119,6	4943,3	4599,3	6067,3
Cl a/N	30° C	0,96	0,68	0,32	0,20	0,27	0,27	0,32	0,16	0,18	0,06
(pgr/cel)	25° C	0,38	0,71	0,76	0,62	0,41	0,47	0,47	0,41	0,52	0,36
Biomasa	30° C	9,38	9,85	22,01	35,98	45,28	58,76	49,95	60,24	72,39	114,97
(mg/l)	25° C	14,81	11,59	16,47	20,51	32,43	33,45	39,30	48,44	44,27	57,73
Peso seco	30° C	82	—	96	110	—	—	—	132	120	88
(mg/l)	25° C	93	—	96	120	—	—	—	189	253	205
Diversidad	30° C	0,66	0,66	1,13	0,92	1,07	0,95	0,97	0,79	0,50	0,25
(bits/cel)	25° C	0,84	0,84	0,57	1,02	1,11	1,25	1,19	1,20	1,10	0,95
Prod. bruta	30° C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(mg O ₂ /l/h)	25° C	3,42	4,02	4,92	6,26	6,90	7,04	5,30	—	—	—
Prod. neta	30° C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(mg O ₂ /l/h)	25° C	2,78	4,26	5,36	5,32	6,56	8,38	7,30	—	—	—
Respiración	30° C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(mg O ₂ /l/h)	25° C	2,94	3,58	4,42	5,54	6,40	6,40	4,86	—	—	—
Cap. fotos.	30° C	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
(mg O ₂ /mg Cl a./h.)	25° C	2,56	4,00	5,14	4,80	5,84	7,60	6,66	—	—	—
	30° C	0,48	0,44	0,50	0,72	0,50	0,64	0,44	—	—	—
	25° C	0,22	0,26	0,42	0,52	0,72	0,78	0,64	—	—	—
	30° C	6,02	6,50	6,39	7,49	5,01	3,88	2,94	—	—	—
	25° C	5,58	5,22	4,64	3,85	4,60	5,46	3,72	—	—	—

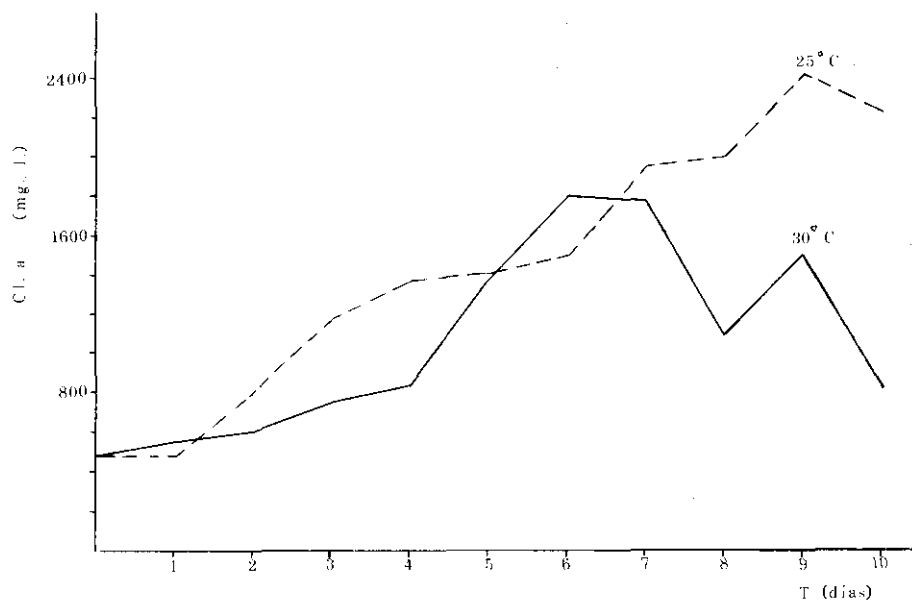


Fig. 1. Evolución de la clorofila *a* (mg/l) con el tiempo (días). Línea continua: 30° C; línea discontinua: 25° C.

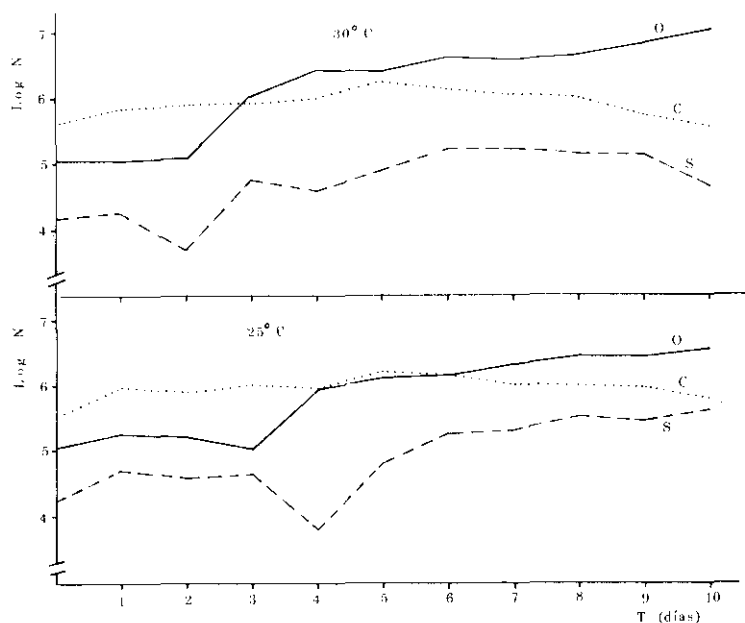


Fig. 2. Evolución del número de células (\log_{10}) en relación al tiempo (días). O = *Oscillatoria amphibia*, C = *Chlorella saccharophila*, S = *Scenedesmus acutus*.

TABLA 2. Correlaciones lineales entre diversos parámetros. * = significativa $P < 0,05$; (ns) = no significativas.

	30° C	25° C
Cl. a-Biomasa	0,51 (ns)	0,92*
Cl. a-D.O.	0,94*	0,91*
Cl. a-Peso seco	0,04 (ns)	0,94*
Biomasa-Peso seco	0,26 (ns)	0,88*
Peso seco-D.O.	0,96*	0,93*
Biomasa-D.O.	0,44 (ns)	0,86*
Cl. a- PO_4^{3-}	-0,71*	-0,91*
Cl. a-C. inorgánico	-0,78*	-0,97*
Cl. a- NH_4^+	-0,74*	-0,89*
Cl. a- NO_3^-	0,66*	0,66*
PO_4^{3-} - <i>Chlorella</i>	-0,49 (ns)	-0,52 (ns)
PO_4^{3-} - <i>Oscillatoria</i>	-0,62*	-0,84*
C. inorgánico- <i>Chlorella</i>	-0,40 (ns)	-0,43 (ns)
C. inorgánico- <i>Oscillatoria</i>	-0,75*	-0,90*

La producción primaria es mayor a 25° C que a 30° C, aunque los máximos se alcancen antes a esta última temperatura. En cuanto a la respiración, el fenómeno es similar, pero no tan claro (tabla 1). El seguimiento de la fotosíntesis en periodos de cinco minutos (fig. 4) muestra, en general, los picos de producción de oxígeno inmediatamente después del encendido de la luz.

TABLA 3. Tasas de crecimiento, r (día⁻¹) y tiempos de duplicación, t (horas).

	30° C		25° C	
	r	t	r	t
<i>Oscillatoria amphibia</i>	0,206	35	0,162	44
<i>Chlorella saccharophila</i>	0,119	60	0,115	62
<i>Scenedesmus acutus</i>	0,133	54	0,140	51

DISCUSIÓN

El desplazamiento de *C. saccharophila* por *O. amphibia* es un proceso que merece ciertas consideraciones. Contrariamente a estudios anteriores, aquí se han comparado un taxón planctónico (la clorofícea) y uno bentónico (la cianofícea). Esta última forma comunidades casi monoespecíficas de algas durante la primavera y el verano en arroyos muy contaminados por sustancias orgánicas. *C. saccharophila* tendría la necesidad de moverse en la columna vertical, de modo pasivo, para evitar la fotoinhibición (HARRIS, 1978), mientras que *O. amphibia*, adaptada a vivir en ecosistemas someros, no; teniendo en cuenta que se han empleado condicio-

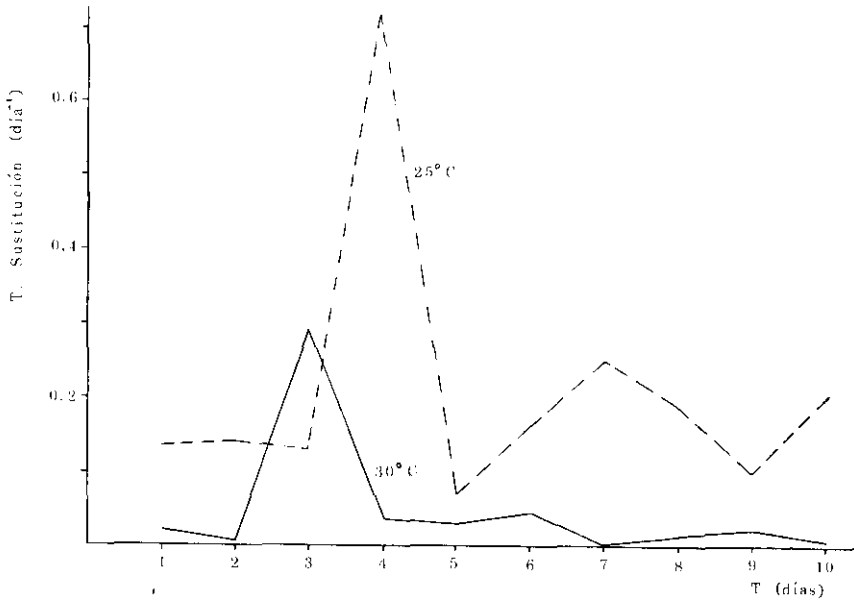


Fig. 3. Tasas de sustitución específica (día^{-1}) en relación al tiempo (días). Línea continua: 30°C ; línea discontinua: 25°C .

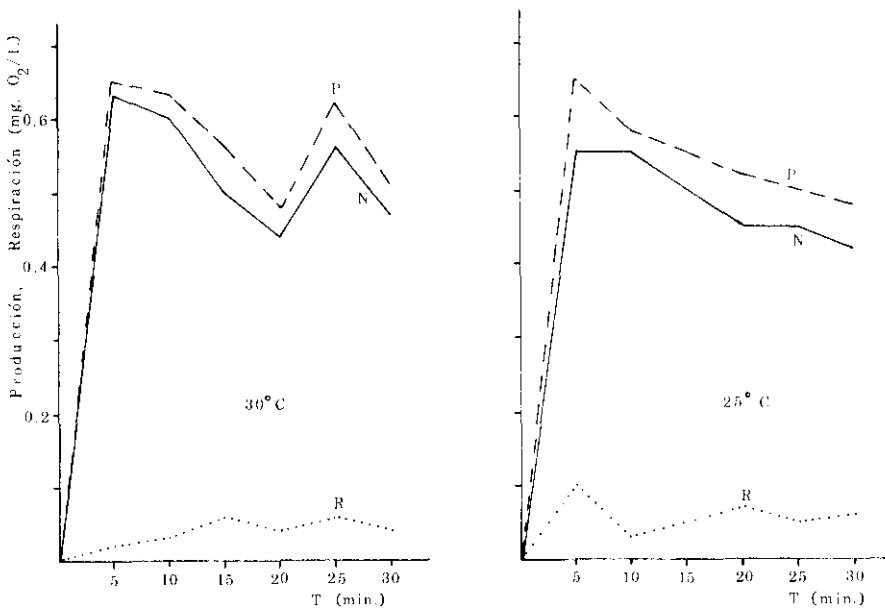


Fig. 4. Producción primaria ($\text{mg O}_2/\text{l}$) frente al tiempo (minutos) de un día representativo. Las flechas señalan el comienzo de la fase luminosa para la producción. P = producción bruta; N = producción neta; R = respiración.

nes luminosas fotoinhibidas ($11 \text{ klux} = 200 \mu\text{E.m}^2.\text{seg}^{-1}$, HARRIS, 1978) para el plancton, la cianofícea tendría ventaja. Por otro lado, parece que una y otra presentan distintas respuestas fotorrespiratorias: mientras en el cultivo mixto se aprecian caídas en la fotosíntesis tras los primeros minutos (fig. 4), en cultivos casi puros de *O. amphibia* (datos inéditos) dichas disminuciones no se observan; de modo que esta última tendría características de planta C_4 y *C. saccharophila* de C_3 (TOLBERT, 1974), según los valores bajos o elevados de la excreción de carbono en la luz, la pequeña excreción aumentaría la producción y la ventaja adaptativa, por tanto, de la cianofícea en iguales condiciones. Se sabe también que muchas algas azules poseen fosfatasa alcalina (HEATH & COOKE, 1975), la cual les permite metabolizar polifosfatos cuando desaparece el ortofosfato; éste fenómeno podría ser otro elemento desfavorable para *C. saccharophila*. Además, VINCENT & SILVESTER (1979b) señalan que existen toxinas excretadas por cianofíceas que inhiben el crecimiento de *C. saccharophila*. Todos estos factores podrían explicar la dominancia de *O. amphibia*, que se refleja no sólo en el mayor número de células sino en la superior tasa de crecimiento (tabla 3). Sin embargo, nuestros datos no nos permiten saber qué factor o factores desencadenan el florecimiento de la cianofícea.

El crecimiento de los cultivos persiste aun cuando algunos de los nutrientes (C y P) casi se han agotado. Este fenómeno se debe a que son más importantes para el crecimiento los contenidos celulares de un nutriente que su concentración ambiental (RHEE, 1980), de modo que una reserva nutritiva adecuada mantiene a un cultivo en crecimiento no habiendo dichas sustancias en el ambiente; las ingestiones «suntuarias» (luxury uptake) están bien documentadas en la literatura desde KETCHUM (1939) y son inversamente proporcionales a la cantidad intracelular del nutriente (BROWN & HARRIS, 1978, para el fósforo). La relación entre las tasas de crecimiento y los contenidos internos de los nutrientes es lineal (DROOP, 1973) por lo cual se hace más necesario estimar éstas que la concentración en el medio. Se sabe, por otra parte, que la escasez de fósforo en el agua estimula la ingestión de carbono (LEAN & PICK, 1981); esto explicaría los abruptos descensos en el carbono inorgánico que suceden al agotamiento del fósforo en los cultivos (datos no publicados y tablas 1 y 2 de VELASCO & al., 1986).

La limitación inicial para la nutrición es la del carbono, seguida en el tiempo por la del fósforo; es bien conocida la inexistencia de limitaciones nutritivas múltiples (RHEE, 1978; AHLGREN, 1980). Respecto al uso del nitrógeno, no es fácil averiguar cuál es la forma preferida por las algas; la nitrificación disminuyó a partir de los días 7° (30°C) y 8° (25°C), aumentando concomitantemente el amonio, pero ignoramos si dicho fenómeno se debe a la muerte de las bacterias nitrificantes por el burbujeo de la aireación (NAMBIAR & BOKIL, 1981) o al consumo de las algas; y lo mismo

puede decirse del amonio: ¿desaparece por nitrificación o lo ingieren las algas?

Como se esperaba por ser un fenómeno bien conocido, todos los procesos se aceleran a mayor temperatura, con lo cual (al no haber entrada de materia) los procesos de crecimiento terminan antes a 30° C que a 25° C. Por otro lado, las correlaciones significativas son mayores a menor temperatura, quizá porque ésta sea óptima para estas algas.

Las tasas de crecimiento son menores a las observadas por VINCENT & SILVESTER (1979a) para algas aisladas de agua residual, pero debe tenerse en cuenta que dichos autores trabajaban con medios sintéticos, más equilibrados en nutrientes.

Los puntos de vista esbozados anteriormente y las observaciones realizadas ligan, a nuestro juicio, los procesos que ocurren en el ambiente que rodea a las algas con los que tienen lugar en el interior de las células. La diferencia entre una aproximación y otra es cada vez menor en el estudio de las algas microscópicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLGREN, G. 1980. Effects on algal growth rates by multiple nutrient limitation. *Arch. Hydrobiol.* 89: 43-53.
- BROWN, E. J. & R. F. HARRIS. 1978. Kinetics of algal transient phosphate uptake and the cell quota concept. *Limnol. Oceanogr.* 23: 35-40.
- DROOP, M. R. 1973. Some thoughts on nutrient limitation in algae. *J. Phycol.* 9: 264-272.
- HARRIS, G. P. 1978. Photosynthesis, productivity and growth: the physiological ecology of phytoplankton. *Ergeb. Limnologie* 10: 1-171.
- HARRIS, G. P. & B. B. PICCININ. 1977. Photosynthesis by natural phytoplankton populations. *Arch. Hydrobiol.* 80: 405-457.
- HEATH, R. T. & G. D. COOKE. 1975. The significance of alkaline phosphatase in an eutrophic lake. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 19: 959-965.
- KETCHUM, B. H. 1939. The absorption of phosphate and nitrate by illuminated cultures of *Nitzschia closterium*. *Am. J. Bot.* 26: 339-407.
- LEAN, D. R. S. & F. R. PICK. 1981. Photosynthetic response of lake plankton to nutrient enrichment: a test for nutrient limitation. *Limnol. Oceanogr.* 26: 1001-1019.
- LEWIS, W. M. 1978. Analysis of succession in a tropical phytoplankton community and a new measure of succession rate. *Am. Nat.* 112: 401-414.
- MARKER, A. F. H., E. A. NUSCH, H. RAI & B. RIEMANN. 1980. The measurement of photosynthetic pigments in freshwaters and standardization of methods: conclusions and recommendations. *Ergeb. Limnologie* 14: 91-106.
- MUR, J. T., H. J. GONS & L. van LIERE. 1978. Competition of the green alga *Scenedesmus* and the blue-green *Oscillatoria*. *Mitt. Int. Ver. Limnol.* 21: 473-479.
- NAMBIAR, K. R. & S. D. BOKIL. 1981. Luxury uptake of nitrogen in flocculating algal-bacterial system. *Water Research* 15: 667-669.
- RHEE, G. Y. 1978. Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition and nitrate uptake. *Limnol. Oceanogr.* 23: 10-25.

- RHEE, G. Y. 1980. Continuous culture in phytoplankton ecology. *In: Advances in Aquatic Microbiology* 2: 151-203. Academic Press. N. Y.
- TILMAN, D. 1982. *Resource competition and community structure*. Princeton Univ. Press. Princeton.
- TOLBERT, N. E. 1974. Photorespiration. *In: W. D. P. STEWART (Ed.) Algal Physiology and Biochemistry* 474-504. Blackwell. Oxford.
- VELASCO, J. L., J. M. COLMENAREJO, M. ALVAREZ, A. BUSTOS & F. PARRA. 1986. Impacto ambiental de los vertidos de aguas residuales urbanas, I. Depuración integral con recuperación de nutrientes mediante tratamiento terciario fotosintético con microalgas. *Química e Industria* 32: 475-478.
- VINCENT, W. F. & W. B. SILVESTER. 1979a. Growth of blue-green algae in the Manukau (New Zealand) oxidation ponds. I. Growth potential of oxidation pond water and comparative optima for blue-green and green algal growth. *Water Research* 13: 711-716.
- VINCENT, W. F. & W. B. SILVESTER. 1979b. *Ibid.* II. Experimental studies on algal interaction. *Water Research* 13: 717-723.