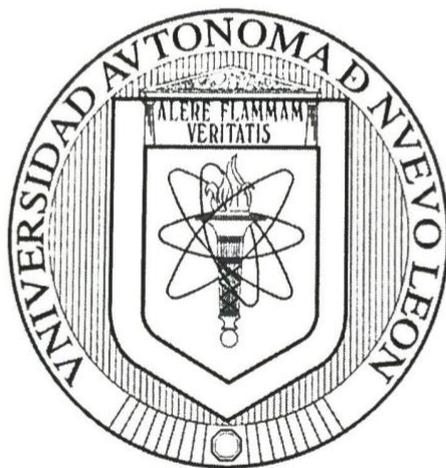


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



**ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE POLIFOSFATOS EN MICROALGAS  
NATIVAS FLOCULANTES DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, PARA EL  
DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA ALTERNATIVA PARA EL  
RECICLAJE DE FÓSFORO**

POR

Bióloga Arantxa Violeta López Vaquera

Vo.Bo.  
  
Dr. Juan Francisco  
Villarreal Chiu

Como requisito parcial para obtener el grado de:  
Maestría en Ciencias con Orientación en Microbiología Aplicada

**ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE POLIFOSFATOS EN MICROALGAS  
NATIVAS FLOCULANTES DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, PARA EL  
DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA ALTERNATIVA PARA EL  
RECICLAJE DE FÓSFORO**

---

**Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu**  
**Directo de Tesis**

---

**Dr. Ulrico Javier López Chuken**  
**Codirector de Tesis**

---

**Dra. Melissa Marlene Rodríguez Delgado**  
**Comité Tutorial**

---

**Dr. Edgar Allan Blanco Gámez**  
**Comité Tutorial**

---

**Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo**  
**Comité Tutorial**

## **Agradecimiento**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Facultad de Ciencias Químicas (FCQ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), por darme la oportunidad de realizar este proyecto.

Al Departamento de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil (UANL), por permitirme realizar la última parte experimental de este proyecto.

A mi asesor, el Dr. Juan Francisco Villarreal Chiu, por brindarme la oportunidad de desarrollar este tema y por sus consejos con el fin de mejorar este trabajo.

A mi co-asesor, el Dr. Ulrico López Chuken, por la orientación brindada durante el desarrollo del proyecto.

Al comité de tesis: conformado por la Dra. Melissa Rodríguez Delgado, Dr. Edgar Allan Blanco Gámez y la Dra. Alma Elizabeth Gómez Loredo, por su atención y apreciables consejos durante la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros y amigos, que de alguna u otra forma estuvieron al tanto de este proceso, y me dieron siempre su apoyo y amistad.

## **Dedicatoria**

**A mis padres**, por su apoyo incondicional, su amor y paciencia. Por estar siempre conmigo, por sus invaluable enseñanzas y por ser fuente de gran inspiración para mí.

**A mis hermanos**, Nahum y Romina, por su cariño, por estar siempre pendiente de mí, sus consejos y apoyo.

**A Antonio Ávila**, por estar conmigo en todo momento, darme palabras de apoyo e impulsarme a seguir adelante.

## Resumen

Bióloga Arantxa Violeta López Vaquera  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de Nuevo León.

### ESTUDIO DE LA ACUMULACIÓN DE POLIFOSFATOS EN MICROALGAS NATIVAS FLOCULANTES DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN, PARA EL DESARROLLO DE UNA TECNOLOGÍA ALTERNATIVA PARA EL RECICLAJE DE FÓSFORO

#### Área de estudio: Procesos microbiológicos

**Propósito y método de estudio:** Este proyecto tiene como objetivo investigar la capacidad de consorcios nativos de microalgas floculantes del Estado de Nuevo León para acumular polifosfatos de manera intracelular, a fin de desarrollar una tecnología alternativa para el reciclaje de fósforo. Consistió en la colecta de seis muestras de zonas urbanas del área metropolitana, para después evaluar su crecimiento en tres medios de cultivo; BBM, BG-11 y M8 durante 14 días a 27 °C. Posteriormente, se modificó el medio elegido para cultivar las microalgas en condiciones de ausencia de nitrógeno ( $\text{NaNO}_3$ ) y distintas concentraciones de fosfatos: (0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 y 3.05 g/L). Se seleccionaron las tres muestras que demostraron el mejor crecimiento y se les realizó una técnica de tinción para visualizar los gránulos de polifosfato. Por último, se llevó a cabo un experimento en muestras de efluente previamente caracterizado, determinando el porcentaje de fósforo removido.

**Conclusiones:** El medio BG-11, por su composición, promueve el mayor crecimiento de los consorcios de microalgas, a comparación de los medios BBM y M8. A pesar de ser autótrofos, las fuentes de carbono en el medio estimulan la obtención de biomasa. Tanto el P como el N, al ser nutrientes esenciales, en bajas concentraciones inhiben el crecimiento, pero debido a la capacidad de almacenamiento intracelular de estos nutrientes, las microalgas pueden crecer en su ausencia. La M6 demostró capacidad de crecer en condiciones de ausencia temporal tanto de N como P.

El método de tinción Neisser es un método rápido y sencillo que permite comprobar de manera visual la presencia de gránulos de polifosfato intracelulares en las microalgas, al teñirlos de un color morado oscuro.

La muestra M6 tiene capacidad de remover el fósforo del medio y almacenarlo intracelularmente, alcanzando eficiencias del 98.75% de remoción, bajo un fotoperíodo de 12:12 e intensidad lumínica de 5W.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
1.1 INTRODUCCIÓN .....	11
1.2 JUSTIFICACIÓN .....	14
<b>CAPÍTULO 2.....</b>	<b>15</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>18</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
3.1 HIPÓTESIS .....	18
3.2 OBJETIVOS GENERALES .....	18
3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>19</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>19</b>
4.1 RECOLECCIÓN DE MICROALGAS NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN.....	19
4.2 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MICROALGAS EN EL LABORATORIO. ....	20
4.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS NUTRICIONAL GENERADO POR LA LIMITACIÓN Y CO-LIMITACIÓN DE N Y P.....	20
4.4 EVALUAR LA CAPACIDAD BIOLÓGICA PARA ACUMULAR POLIFOSFATO DE MANERA INTRACELULAR POR LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS NATIVAS.....	21
4.5 PRUEBA CONCEPTUAL EN UNA MUESTRA DE AGUA RESIDUAL PREVIAMENTE CARACTERIZADA.....	22
4.6 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DEL P EN EL MEDIO POR LOS CONSORCIOS SELECCIONADOS.....	23
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	24
4.8 DISPOSICIÓN DE RESIDUOS GENERADOS .....	24
<b>CAPÍTULO 5.....</b>	<b>25</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
5.1 RECOLECCIÓN DE MICROALGAS NATIVAS DEL ESTADO DE NUEVO LEÓN.....	25
5.2 ACONDICIONAMIENTO DE LAS MICROALGAS EN EL LABORATORIO. ....	26
.....	29
5.3 EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS NUTRICIONAL GENERADO POR LA LIMITACIÓN Y CO-LIMITACIÓN DE N Y P.....	30
5.4 EVALUAR LA CAPACIDAD BIOLÓGICA PARA ACUMULAR POLIFOSFATO DE MANERA INTRACELULAR POR LOS CONSORCIOS DE MICROALGAS NATIVAS.....	31

5.5 PRUEBA CONCEPTUAL EN UNA MUESTRA DE AGUA RESIDUAL PREVIAMENTE CARACTERIZADA.....	32
5.6 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DEL P EN EL MEDIO POR LOS CONSORCIOS SELECCIONADOS.....	35
<b>CAPÍTULO 6.....</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>CAPÍTULO 7.....</b>	<b>40</b>
<b>PERSPECTIVAS Y APLICACIONES .....</b>	<b>40</b>
<b>CAPÍTULO 8.....</b>	<b>41</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>52</b>
COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....	52
<b>ANEXO II .....</b>	<b>54</b>
COMPOSICIÓN DE LOS REACTIVOS PARA LA TINCIÓN DE NEISSER .....	54
<b>ANEXO III .....</b>	<b>55</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Localidades de toma de muestra de las microalgas nativas .....	19
<b>Tabla 2.</b> Condiciones experimentales de co-limitación de N y P en los medios de cultivo para el crecimiento de los consorcios de microalgas nativas. ....	21
<b>Tabla 3.</b> Crecimiento observado de las muestras a los 14 días de experimentación. Donde; (-) indica que no se observó crecimiento, (+) poco crecimiento, y (++) mayor crecimiento. ....	27
<b>Tabla 4.</b> Porcentajes de disminución (%) del PO <sub>4</sub> para los dos consorcios utilizados, bajos distintas condiciones de intensidad lumínica y fotoperiodo. ....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de los sitios de muestreo y su ubicación en el área metropolitana. ....	25
<b>Figura 2.</b> Muestra representativa del crecimiento observado del consorcio presente en la muestra M4 en los tres medios de cultivo empleados: BBM, M8 y BG-11 .....	27
<b>Figura 1.</b> Microscopía representativa de muestras de microalgas (100x).....	29
<b>Figura 4.</b> Crecimiento observado en la M3 en ausencia de N y a distintas concentraciones de fosfato.....	31
<b>Figura 5.</b> Tinción Neisser positiva para la M3 (izquierda) y M6 (derecha).....	32
<b>Figura 6.</b> Medición de pH durante los 14 días de experimentación para el consorcio BR-UANL-01.....	33
<b>Figura 7.</b> Medición del pH del consorcio M6.....	33
<b>Figura 8.</b> Medición de conductividad del consorcio BR-UANL-01.....	34
<b>Figura 9.</b> Conductividad eléctrica del consorcio M6. ....	35
<b>Figura 10.</b> Medición de la salinidad del consorcio BR-UANL-01. ....	35
<b>Figura 11.</b> Medición de la salinidad del medio para el consorcio M6.....	35
<b>Figura 12.</b> Medición de la concentración de fósforo inorgánico en el medio (Consortio BR-UANL-01) .....	37
<b>Figura 13.</b> Medición de la concentración de fósforo inorgánico en el medio (Consortio M6).....	37
<b>Figura 14.</b> Tinción Neisser positiva para la M6 (100x) .....	38

## Abreviaciones y símbolos

P	Fósforo
N	Nitrógeno
K	Potasio
ATP	Adenosin trifosfato
Mt	Millones de toneladas
PoliP	Polifosfato
mg	Miligramos
L	Litro
mg.L <sup>-1</sup>	Miligramo por litro
mL	Mililitro
rpm	Revoluciones por minuto
μL	Microlitro
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Fosfato
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
Pi	Fósforo inorgánico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
μS	Microsiemens
μg	Microgramo
BS/L	Base seca por litro
W	Watts

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Introducción

El fósforo (P) es uno de los elementos más abundantes sobre la superficie terrestre; tiene especial importancia para la supervivencia de los seres vivos ya que forma parte de moléculas clave como: ácidos nucleicos, ATP y fosfolípidos. Además, también es esencial para la fertilidad de los suelos y el rendimiento de los cultivos. Es, junto al nitrógeno (N) y el potasio (K), un macronutriente limitante en el crecimiento de las plantas (Solovchenko et al., 2016) ya que juega un papel importante en el crecimiento celular y en la formación de frutos y semillas; y por ende, en el rendimiento de los cultivos (Cordell & White, 2014).

Debido a su importancia para el cultivo, el ser humano ha adicionado P al suelo desde el inicio de las prácticas agrícolas (Cordell & White, 2014), siendo común el uso de orina, excreta humana, estiércol, guano o huesos de aves (Sun et al., 2018). Sin embargo, a mediados del siglo pasado (1940), se generó una renovación de las prácticas y técnicas agrícolas gracias al uso de fertilizantes químicos, dando como resultado mayores rendimientos en los cultivos y posibilitando el crecimiento poblacional. A este periodo se le conoce como la Revolución Verde (Mayer et al., 2016).

Los fertilizantes a base de P se producen a partir de rocas de fosfato; un recurso no renovable, finito, cada vez más escaso y por lo tanto, costoso (Chowdhury et al., 2017). Cada año se extraen 230 millones de toneladas (Mt) de rocas de fosfatos, equivalente a 23 Mt de P; de las cuales, el 80% proviene de África y el oeste de Asia (IFA, 2019). Del total de P obtenido, el 90% se usa para la producción de fertilizantes y aditivos (Senthilkumar et al., 2014). Se calcula que solo una quinta parte llega al consumo humano, ya que es un proceso extremadamente ineficiente, en el que se dan pérdidas de P en todas las etapas del sistema; desde su extracción en minas, debido a la erosión del suelo, pérdidas de cosechas, así como en los alimentos perecederos y al poco porcentaje de retención metabólico (Cordell et al., 2011).

Las tendencias actuales indican que las reservas naturales de rocas de fosfato están siendo minadas más rápidamente que su velocidad de formación, la cual se da en la escala de tiempo geológica (Venkiteshwaran et al., 2018). Su limitado rango de distribución, así como la demanda -que incrementa 1.8% anualmente- han provocado una alza en los precios de fertilizantes y aditivos agrícolas (Venkiteshwaran et al., 2018). Además, existen países, principalmente en Europa y América Latina, que dependen por completo de la importación de fertilizantes para satisfacer las necesidades alimentarias de sus respectivas poblaciones.

La escasez de P podría traer problemas geopolíticos originados por la distribución geográfica de dicho recurso, siendo Marruecos el país que posee la mayor parte de rocas de fosfato (Scholz et al., 2013), seguido por China, Sudáfrica, Estados Unidos y Jordania (Solovchenko et al., 2016). De esta manera, el P se ha convertido hoy en día, indispensable para la seguridad alimentaria de la población mundial, la cual implica que se tenga la capacidad de asegurar que la comida sea accesible, nutritiva y que esté disponible para todos los seres humanos (Cordell & White, 2014; Chowdhury et al., 2017).

Paradójicamente, el P es un importante contaminante de sistemas ecosistemas acuáticos. La alta movilización debida a la actividad antropogénica ha provocado su sobre acumulación en ecosistemas de agua dulce y océanos, lo cuál ocasiona severos daños a la biodiversidad de los ecosistemas impactados. El uso extensivo de fertilizantes para la agricultura ha traído como consecuencia una mayor descarga de nutrientes como P y N, causando el fenómeno conocido como *eutrofización* (Qin et al., 2015; Venkiteshwaran et al., 2018). A este contraste entre escasez y acumulación, algunos autores han nombrado “la paradoja del fósforo” (Cordell & White, 2014).

Uno de los retos actuales a los que nos enfrentamos, es buscar alternativas que, por un lado, permitan la recuperación y reutilización de un recurso escaso como lo es el P, y por otro, disminuyan el impacto ecológico que tiene en sistemas acuáticos. Hoy en día, los métodos más efectivos para controlar la eutrofización son: remover el P de aguas residuales antes que estas lleguen a cuerpos de agua naturales, y mejorar las prácticas agrícolas para reducir la erosión de suelos (Cordell & White, 2014).

Se ha tomado interés en tecnologías acopladas a tratamiento de efluentes, que permitan remover componentes orgánicos e inorgánicos y que además posibiliten el recuperarlos de manera sustentable (Slompo et al., 2020). Para esto existen métodos para precipitar químicamente el fósforo presente en aguas residuales. Se realiza utilizando Al, Fe, o Ca. Sin embargo, el P precipitado no está disponible para ser usado por seres vivos y es común que se pierda en rellenos sanitarios (Solovchenko et al., 2016). Aunque estos métodos son conocidos y han sido ampliamente utilizados, presentan algunas desventajas, por ejemplo; los costos agregados por el uso de reactivos y equipos especializados (Villaseñor Camacho et al., 2018).

Otro método utilizado para la recuperación de P es la eliminación mejorada del fósforo biológico (EBPR por sus siglas en inglés), el cuál es un proceso que alterna entre condiciones anaerobias y aerobias. Se utilizan bacterias acumuladores de fósforo (PAOs, por sus siglas en inglés) (Yadav et al., 2016). Este método ha sido probado en experimentos de laboratorio con condiciones bien definidas, pero al aplicarlo en plantas de tratamiento de aguas, se observan fallos debido a la pérdida de los PAOs o su actividad biológica se ve reducida (Yang et al., 2018).

Una alternativa que se ha estudiado son las microalgas, organismos unicelulares y fotosintéticos. Estos microorganismos tienen la capacidad de asimilar macro y micronutrientes del medio en el que crecen, convirtiéndolo en biomasa (Slompo et al., 2020; Silva et al., 2019). Entre los principales puntos que se han evaluado, es la capacidad de almacenar fosfato inorgánico en forma de polifosfatos (poliP); es decir, polímeros lineales de tres a cientos de residuos de fosfatos (Martin & Van Mooy, 2013). El poliP tiene diversas funciones en la células; sirve como reservorio de fósforo, sustituto de ATP en el metabolismo de azúcares y como regulador de respuesta al estrés y deficiencias nutricionales (Nishikawa et al., 2006a).

La acumulación de polifosfatos en células de microalgas ocurre principalmente por dos mecanismos: en el primero, el P es asimilado para la síntesis de componentes celulares, por ejemplo, fosfolípidos. El segundo mecanismo es conocido como “luxury uptake”, ocurre cuando hay un exceso de P en el medio, y el alga lo toma y almacena como gránulos de polifosfatos inorgánicos (Schmidt et al., 2016). Se ha reportado que el

polifosfato acumulado en las microalgas puede representar hasta 2-3% de su peso seco (Solovchenko et al., 2016).

A diferencia de los lodos obtenidos en métodos fisicoquímicos de remoción de P, la biomasa de las microalgas representa un material valioso (Villaseñor Camacho et al., 2018), y no un desecho del que se deba disponer. La biomasa de las microalgas puede ser aprovechada para la obtención de lípidos, ácidos grasos, pigmentos, vitaminas, biocombustibles, biogás o como alimento (Odjadjare et al., 2017).

## **1.2 Justificación**

Las proyecciones indican que para el año 2050 la población mundial habrá sobrepasado los 9000 millones de personas y de seguir con las tendencias actuales de uso de P, sus reservas se verán reducidas importantemente, por lo que no se tendrá la capacidad de asegurar el acceso a los alimentos alrededor del mundo, creando una crisis alimentaria aún más grave de la ya existente. Es necesario encontrar alternativas eficientes que sean auxiliares en la retención y reciclaje del fósforo, ya que es indispensable para todas las formas de vida y no tiene sustituto. Las microalgas representan una opción viable debido a su capacidad de crecer en medios simples, a su metabolismo y a la acumulación de polifosfatos que presentan. Adicionalmente, el uso de microalgas utilizando aguas residuales con alto contenido de P, funciona como un tratamiento terciario para evitar la eutrofización de ecosistemas acuáticos y la pérdida de biodiversidad.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

La acumulación intracelular de fosfato en microalgas es un fenómeno ya conocido y estudiado desde hace décadas, principalmente en *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. (Azad & Borchardt, 1970). También se han estudiado los mecanismos por medio de los cuales se da la acumulación de polifosfatos, y los factores que afectan este proceso, como lo son el pH, luz, temperatura y nutrientes disponibles (Jansson, 1988; Powell et al., 2009; Cai et al., 2013; Schmidt et al., 2016; Gouveia et al., 2016). Sin embargo, en años recientes se ha retomado el interés en este grupo de seres vivos, ya que tienen el potencial de auxiliar con problemáticas actuales, tales como son la necesidad de encontrar métodos de remoción del exceso de nutrientes en aguas de desecho, su posible reutilización y la remediación de sitios eutrofizados.

Debido a que los tratamientos primarios y secundarios de aguas residuales generan efluentes con concentraciones significativas de fósforo y nitrógeno inorgánico, se ha propuesto el cultivo de microalgas como un tratamiento terciario para remover estos compuestos inorgánicos (Abdel-Raouf et al., 2012). De hecho, Silva et al. (2019) encontraron que *Chlorella sorokiniana* y *Chlorococcum* sp. eran capaces de remover el P del medio a una velocidad de 2.3-5.4 mg L<sup>-1</sup> al día. De manera similar, un estudio realizado por Slompo et al. (2020), demostraron la capacidad de remoción de nutrientes por parte de *C. sorokiniana*, la cual removió el 74% del P en una muestra de agua residual; además de reportar una disminución significativa de la presencia de *Escherichia coli*, demostrando así que, el uso de microalgas puede ser, además, un método eficaz y sustentable para el tratamiento terciario de efluentes, así como para inhibir la proliferación de bacterias patógenas.

Whitton et al. (2016) examinaron el impacto que tiene la variación de nutrientes en la absorción de fósforo y nitrógeno en las algas. Utilizaron células de *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella vulgaris* para pruebas con efluentes secundarios de aguas residuales urbanas, reportando que, al aumentar la concentración de fosfato con respecto al nitrógeno, resultaba en una mayor acumulación de P en ambas especies. En países como Suecia, se han realizado estudios utilizando mezclas de poblaciones de algas (*Monoraphidium*), bacterias y zooplancton, a distintas condiciones de luz, profundidad de cultivo,

temperatura y variaciones de temporadas. Los resultados indican que existe una correlación con el pH, y que cultivos menos profundos tienen una mayor eficiencia, así como que durante los meses de verano, la eficiencia en la remoción de fosfato era de hasta 80% (Larsdotter et al., 2010). Por otra parte, en Ecuador, utilizando microalgas nativas del país (*Chlorella* sp.) a escala laboratorio en dos condiciones distintas; agitación y aireación, se obtuvo que la eficiencia de remoción del P era de 67% y 20.4%, respectivamente (Benítez et al., 2019). Esto llevó a Villaseñor Camacho et al. (2018), a llevar a cabo un diseño de experimentos utilizando *C. vulgaris* a escala laboratorio y escala piloto empleando un medio de efluente sintético, concluyendo que dicha especie es capaz de remover efectivamente el fósforo, sin la necesidad de añadir carbono orgánico, y con un buen rendimiento de biomasa.

Por otra parte, se sabe que las microalgas pueden fungir como biofertilizantes para los cultivos, siendo comprobado que estos microorganismos mejoran la capacidad del suelo para retener agua, aumentan la cantidad de materia orgánica y favorecen al crecimiento de cultivos de maíz y trigo (Uysal et al., 2015). Esto ocurre dado que el fosfato acumulado por las microalgas actúa como un fertilizante de liberación moderada, tal y como lo demuestra un estudio realizado en la India utilizando *Chlorella* sp. y varias especies de cianobacterias (Mukherjee et al., 2015).

Esta información es de mucho interés para el sector agrícola, tal como lo demuestra la publicación de la FAO “*World fertilizer trends and outlook to 2022*” en el que dan a conocer datos relevantes sobre las tendencias mundiales de oferta y demanda de fertilizantes. En este estudio se menciona que la demanda de fertilizantes de base de P aumentará un 3.1% para el año 2021, y un 1.2% para el 2022 (FAO, 2019). Por otro lado, la Asociación Internacional de Fertilizantes (IFA, por sus siglas en inglés) prevé que la oferta de rocas fosfóricas aumente de 235 Mt en 2018 a 254 Mt para 2023 (IFA, 2019).

A pesar de los antecedentes y el difícil panorama pronosticado para asegurar el abasto de un recurso tan esencial como lo es el fósforo para la seguridad alimentaria, en México no se han realizado estudios para encontrar alternativas que permitan recuperar y reutilizar este elemento, por lo que resulta importante realizar estudios acerca del uso de microorganismos capaces de acumular P, tal como se han realizado en otros lugares, pero utilizando microalgas floculantes nativas de la región a las que en dado momento, se les

pueda dar un uso dual para el reciclaje y remoción de P. Los antecedentes previamente mencionados han buscado utilizar los cultivos de microalgas ya sea para remoción de fosfatos, acumulación de biomasa o para tratamiento de aguas; en esta tesis se busca comparar y encontrar un consorcio de microalgas nativas del estado, que demuestre ser eficiente para la acumulación y retención de P y que sirva como auxiliar en la remediación de aguas con exceso de nutrientes, específicamente el fósforo.

## **CAPÍTULO 3**

### **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

Las microalgas floculantes nativas del Estado de Nuevo León son capaces de acumular polifosfatos de manera intracelular, por lo que representan una alternativa viable para el reciclaje de fósforo.

#### **3.2 Objetivos generales**

Investigar la capacidad de las microalgas floculantes nativas del Estado de Nuevo León para acumular polifosfatos de manera intracelular, a fin de desarrollar una tecnología alternativa para el reciclaje de fósforo.

#### **3.3 Objetivos específicos**

1. Recolección de microalgas nativas del Estado de Nuevo León.
2. Acondicionamiento de las microalgas en el laboratorio.
3. Evaluación del crecimiento de los consorcios de microalgas frente a condiciones de estrés nutricional generado por la limitación y co-limitación de N y P.
4. Evaluar la capacidad biológica para acumular polifosfato de manera intracelular por los consorcios de microalgas nativas.
5. Prueba conceptual en una muestra de agua residual previamente caracterizada.
6. Evaluación de la capacidad de remoción del P en el medio por los consorcios seleccionados.

## CAPÍTULO 4

### METODOLOGÍA

El siguiente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Innovación y Desarrollo Biotecnológico del Centro de Investigación en Biotecnología y Nanotecnología (CIByN), el cual forma parte de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL. Este laboratorio proporcionó los equipos y materiales utilizados para llevar a cabo este proyecto.

#### 4.1 Recolección de microalgas nativas del Estado de Nuevo León.

Para este estudio, se recolectaron seis muestras líquidas a partir de distintos cuerpos de agua de cuatro localidades urbanas del Estado de Nuevo León, México (Tabla 1) durante los meses de verano (junio-septiembre 2019). Las muestras fueron recolectadas en frascos de 50 mL y se transportaron en frío al laboratorio, donde se mantuvieron a 4 °C para su posterior uso en el proyecto.

**Tabla 1.** Localidades de toma de muestra de las microalgas nativas

Lugar	Muestras	Municipio	Coordenadas	Características observadas
Parque Fundidora	M1, M2	Monterrey	25.68° N, 100.28° O	Lago artificial, Agua estancada, Color verde oscuro
Parque Niños Héroes	M3	San Nicolás de los Garza	25.72° N, 100.31° O	Lago artificial, Agua estancada, Color verde oscuro
Parque Rufino Tamayo	M4, M5	San Pedro Garza García	25.65° N, 100.33° O	Arroyo, Color verde
Parque Ecológico La Estanzuela	M6	Monterrey	25.59° N, 100.25° O	Arroyo, Agua cristalina

## **4.2 Acondicionamiento de las microalgas en el laboratorio.**

A fin de acondicionar las microalgas contenidas en las muestras recolectadas para su uso en el laboratorio, se llevó a cabo una serie de experimentos empleando tres medios de cultivo genéricos para microalgas, siendo éstos: Bold's Basal (BBM), medio M8 y BG-11 (Anexo 1). Estos experimentos se llevaron a cabo inoculando 1 mL de las muestras recolectadas a 50 mL de los medios estériles contenidos en matraces de 250 mL. Todos los cultivos fueron incubados a 27 °C con agitación a 150 rpm y luz LED durante un periodo de 14 días.

De estos experimentos, se tomaron 400 µL de cada consorcio y se mezclaron con 600 µL de glicerol estéril al 50% en tubos Eppendorf y fueron congelados a -20 °C a fin de preservar los consorcios acondicionados para su posterior uso.

## **4.3 Evaluación del crecimiento de los consorcios de microalgas frente a condiciones de estrés nutricional generado por la limitación y co-limitación de N y P.**

Habiéndose determinado el medio de cultivo que resultó ser más apto para cada consorcio, se continuó con una evaluación del crecimiento de estos consorcios frente a condiciones de estrés nutricional generado por la limitación y co-limitación de los macronutrientes nitrógeno y fósforo. Es importante destacar que, para los experimentos llevados a cabo en este trabajo, todos los matraces fueron lavados con un detergente libre de fosfatos, seguido por un enjuague con ácido clorhídrico al 10%, y finalmente tres enjuagues con agua destilada para retirar cualquier residuo de fosfato presente en el material experimental (Nawar, F. 2016).

Para inducir un estrés nutricional generado por la limitación de nitrógeno, se modificó la composición del medio BG-11 (Anexo 1), eliminándose el  $\text{NaNO}_3$ , el cuál funge como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. De manera complementaria, se llevaron a cabo modificaciones en la concentración de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  del medio a fin de crear una co-limitación gradual de fósforo, tomándose como base la concentración inicial (3.05 g/L), resultando en concentraciones de: 0, 0.6, 1.2, 1.8, 2.4 y 3.05 g/L.

**Tabla 2.** Condiciones experimentales de co-limitación de N y P en los medios de cultivo para el crecimiento de los consorcios de microalgas nativas.

CONDICIÓN	Concentración de nitrógeno (mg/L)	Limitación de nitrógeno (%)	Concentración de fósforo (mg/L)	Limitación de fósforo (%)
1	0	100	0	100
2	0	100	0.6	80.4
3	0	100	1.2	60.6
4	0	100	1.8	44
5	0	100	2.4	21.3
6	0	100	3.05	0

#### **4.4 Evaluar la capacidad biológica para acumular polifosfato de manera intracelular por los consorcios de microalgas nativas**

De manera histórica, se ha empleado a la tinción Neisser como una técnica para la observación de gránulos intracelulares de polifosfatos, los cuales pueden ser visualizados a través de un microscopio óptico por la coloración negro-azulado que se genera.

La tinción Neisser consta de dos soluciones, conocidas como I y II (Anexo 2). A su vez, la solución I está compuesta por los reactivos A y B, los cuales tienen que ser almacenados por separado, y sólo se mezclan al momento de llevar a cabo la tinción. De esta manera, la tinción inicia mediante la colocación de la muestra en un portaobjetos, añadiéndosele la solución I y dejándose teñir por 30 segundos. Después se realiza cuidadosamente un lavado con agua destilada por 10 segundos. Una vez que se ha realizado el lavado, se añade la solución II, y se deja teñir por 1 minuto. Otra vez, se realiza un lavado con agua destilada, se seca el exceso con papel secante, y se coloca el cubreobjetos. Finalmente, se observa la muestra al microscopio óptico a través de un objetivo 100x.

Bajo este procedimiento, se llevó a cabo una tinción de Neisser sobre los consorcios de microalgas sometidos a condiciones de estrés nutricional generado por la limitación y co-limitación de N y P a fin de determinar su capacidad para acumular fósforo en forma de

polifosfatos, cuya forma química, le permite a las células emplearlos como reserva de este macronutriente hasta que se cuenten con condiciones de crecimiento adecuadas (Sanz-Luque et al., 2020)

#### **4.5 Prueba conceptual en una muestra de agua residual previamente caracterizada.**

##### **4.5.1 Reactivación y mantenimiento de los consorcios seleccionados**

Para realizar la prueba conceptual en agua residual se eligieron dos consorcios; el primero es la muestra M6, obtenida del Parque Ecológico La Estanzuela y que fue utilizada en los experimentos anteriores, siendo la que demostró mayor capacidad de crecer en condiciones de limitación de nutrientes. El otro consorcio seleccionado es el BR-UANL-01, obtenido del Laboratorio de Investigaciones en Ciencias Ambientales (LICA), de la Facultad de Ciencias Químicas, UANL.

Ambos consorcios fueron reactivados y mantenidos en solución nutritiva (ANEXO III), en recipientes transparentes con capacidad de 2 litros. Las condiciones de crecimiento fueron a temperatura ambiente, con un fotoperiodo de 12:12 (Luz:Oscuridad), aireación por medio de manguera conectada a una bomba.

##### **4.5.2 Peso seco y estandarización del inóculo.**

La determinación del inóculo fue realizada a partir del peso seco, para lo que se tomó 1 mL de cada uno de los consorcios. Las muestras se depositaron en recipientes de aluminio previamente llevados a peso constante por 48h a 70°C. Posteriormente, los recipientes que contenían la muestra se colocaron en estufa de convección y se dejaron secar a 70°C por 48h. El peso seco se realizó por triplicado, a partir de la diferencia del peso inicial del recipiente y el peso final (recipiente y biomasa).

Una vez conociendo el peso seco, se procedió a la estandarización del inóculo de ambos consorcios. Para esto se utilizó la metodología descrita por Beltrán-Rocha (2017), la cual consiste en, primero, calcular el peso seco y a partir de este ajustar e inocular biomasa húmeda a una concentración equivalente al 0.5% (peso seco por volumen), lo que equivale a 0.25 g (BS/L), en volumen de 500 ml.

### **4.5.3 Diseño experimental**

El montaje del experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Físico-Química del Departamento de Ingeniería Ambiental (Instituto de Ingeniería Civil, UANL). Los fotobiorreactores fueron colocados en duplicado, dentro de cajas de cartón, sobre una superficie cubierta por papel aluminio, con el fin de eficientizar la irradiación lumínica. Se utilizaron dos condiciones de fotoperiodo (24:0 y 12:12) y dos condiciones de potencia eléctrica (focos de 5W y 15W, ambos de luz cálida). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (27°C) durante los 14 días de experimentación. Para proporcionar CO<sub>2</sub> atmosférico y una agitación suave, se utilizaron mangueras de silicón, las cuales se conectaron a una bomba de acuario marca ELITE 802, suministrando 0.5 VVM (volumen de aire por volumen de líquido por minuto).

Previo al inóculo, y cada tercer día se monitorearon parámetros como el pH, conductividad, salinidad, ya que estos sirven como indicadores para evidenciar el crecimiento de las microalgas. Además, se realizó la medición de fósforo inorgánico en el medio, tanto en la muestra inicial, como en los días 7 y 14 (final) del experimento. Los parámetros de crecimiento se determinaron utilizando el medidor multiparámetro de la marca APERA Instruments (modelo PC60).

### **4.6 Evaluación de la capacidad de remoción del P en el medio por los consorcios seleccionados.**

Para evaluar la remoción de P, se midió el PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> inicial del efluente, al séptimo día y final en el medio, utilizando el kit de prueba para fósforo de la marca HACH (modelo PO-19), el cual está basado en colorimetría.

De acuerdo con las instrucciones del proveedor, el procedimiento consiste en tomar 20 mL de la muestra a analizar y añadirle el reactivo PhosVer 3. Después del tiempo de incubación de 5 minutos, la muestra se compara contra una muestra estándar, utilizando a su vez, un disco de color que proporciona el valor de la concentración dependiendo la escala. Para obtener la concentración en mg/L se divide el valor obtenido entre 50.

Esta metodología se realizó por duplicado en los ensayos experimentales de las muestras M6 y BR-UANL-01, que fueron utilizadas para realizar la prueba conceptual en agua tratada. Posteriormente, se procedió a realizar la tinción Neisser tal y como se describió con anterioridad, para verificar la presencia de los gránulos intracelulares de polifosfato.

#### **4.7 Análisis estadístico**

Los resultados se evaluaron por medio de un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA). En los casos que se presentaron diferencias significativas, se llevó a cabo una comparación múltiple de medias por el método de Tukey ( $\alpha= 0.05$ ), utilizando el programa estadístico GraphPad Prism 9.

#### **4.8 Disposición de residuos generados**

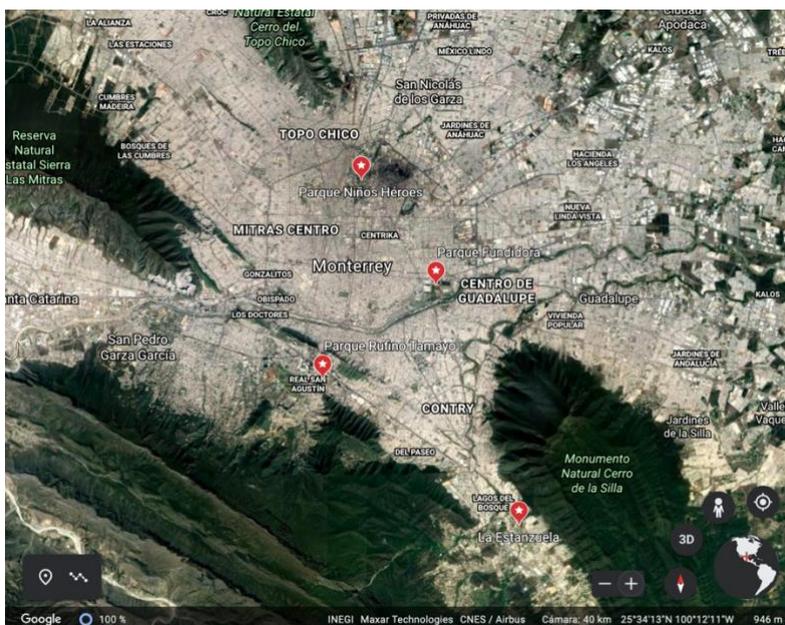
Los residuos generados durante el proyecto se clasificaron de acuerdo con el documento de procedimientos para clasificación de residuos peligrosos PR-CLB-SRR/000 de la Facultad de Ciencias Químicas establecido por el Departamento de Manejo y Control de Residuos de la institución.

## CAPÍTULO 5

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1 Recolección de microalgas nativas del Estado de Nuevo León.

Para este proyecto se recolectaron seis muestras líquidas de cuatro localidades urbanas del área metropolitana de Monterrey, en el estado de Nuevo León. De éstas localidades, dos correspondieron a arroyos naturales, siendo el Arroyo San Agustín, localizado en el Parque Rufino Tamayo ( $25^{\circ} 38' 42''$  N;  $100^{\circ} 19' 31''$  O) y en el Parque La Estanzuela ( $25^{\circ} 36' 08''$  N;  $100^{\circ} 15' 30''$  O), mientras que las restantes correspondieron a lagos artificiales localizados en los parques Fundidora ( $25^{\circ}41'01''$  N;  $100^{\circ}17'17''$  O) y Niños Héroes ( $25^{\circ}43'02''$  N;  $100^{\circ}18'40''$  O).



**Figura 1.** Mapa de los sitios de muestreo y su ubicación en el área metropolitana.

La selección de estos sitios de muestreo se llevó a cabo debido a que estudios importantes, como los de Arora et al. (2018), han demostrado que los cuerpos de agua no potable estancada localizados dentro de las zonas urbanas, se encuentran frecuentemente contaminados por desechos orgánicos, residuos farmacéuticos, detergentes, metales pesados y otros productos de origen xenobiótico. A pesar de esto, llegan a servir como hábitat para una gran variedad de microorganismos (Chiandet & Xenopoulos, 2016; Minelgaite et al., 2020). Además, estos micro ecosistemas pueden llegar a ser tan diversos

y dinámicos como los lagos naturales, con la excepción de que pueden presentar un mayor potencial biológico para la remoción de contaminantes (Minelgaite et al., 2020).

De acuerdo a la clasificación de estanques y lagos urbanos propuesta por Hassall (2014), las dos localidades artificiales de este proyecto corresponden al tipo ornamental, caracterizado por tamaño mediano a grande, hipertróficos y con alta afluencia.

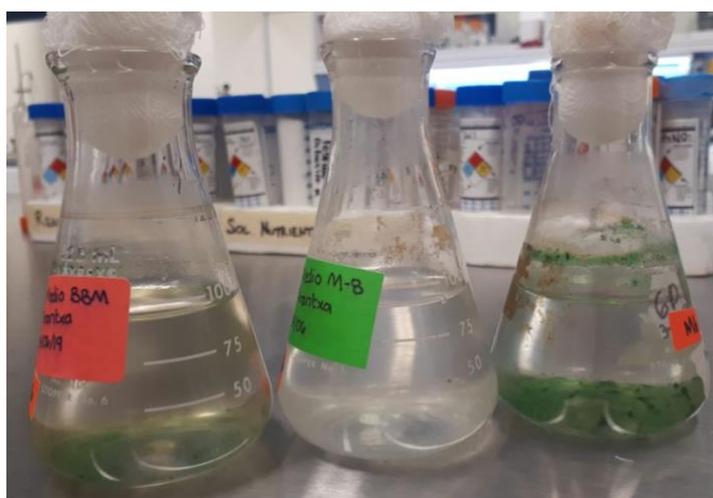
## **5.2 Acondicionamiento de las microalgas en el laboratorio.**

Las 6 muestras de microalgas recolectadas fueron sometidas a un proceso de acondicionamiento para el crecimiento de sus biomásas en el laboratorio. Esto se llevó a cabo mediante su cultivo en tres medios de cultivo ampliamente conocidos para el crecimiento de microalgas: Bold's Basal Medium (BBM), medio M8 y BG-11. Las muestras resultantes fueron incubadas durante 14 días a temperatura ambiente con el fin de determinar cuál de los medios permitía el mejor desarrollo del cultivo.

Interesantemente, desde el séptimo día de experimentación, el medio de cultivo BG-11 permitió el mejor crecimiento de los consorcios, a tal grado que, al cabo de los 14 días de crecimiento, la biomasa formada en los medios BG-11 superó en gran medida aquellas presentadas para los medios BBM, y M8 (*Tabla 3*). Cabe destacar que debido a que los consorcios de microalgas tienden a formar aglomerados muy densos que son difíciles de disociar, dificultando el uso de métodos tradicionales para estimar la densidad celular, como conteos celulares, determinación de clorofila y densidad óptica el crecimiento microalgal, la densidad celular fue juzgada de manera visual (Wang et al., 2015). Otro de los impedimentos intrínsecos que existen para la cuantificación de la biomasa microalgal, es la existencia de múltiples especies, donde la precisión de los resultados suele ser variable, principalmente debido al volumen celular para cada especie presente, siendo complicado por las especies no esféricas (Shriwastav et al., 2015).

**Tabla 3.** Crecimiento observado de las muestras a los 14 días de experimentación. Donde; (-) indica que no se observó crecimiento, (+) poco crecimiento, y (++) mayor crecimiento.

	<b>BBM</b>	<b>M8</b>	<b>BG-11</b>
<b>M1</b>	+	-	++
<b>M2</b>	-	-	++
<b>M3</b>	+	-	++
<b>M4</b>	+	-	++
<b>M5</b>	++	-	++
<b>M6</b>	+	-	++



**Figura 2.** Muestra representativa del crecimiento observado del consorcio presente en la muestra M4 en los tres medios de cultivo empleados: BBM, M8 y BG-11

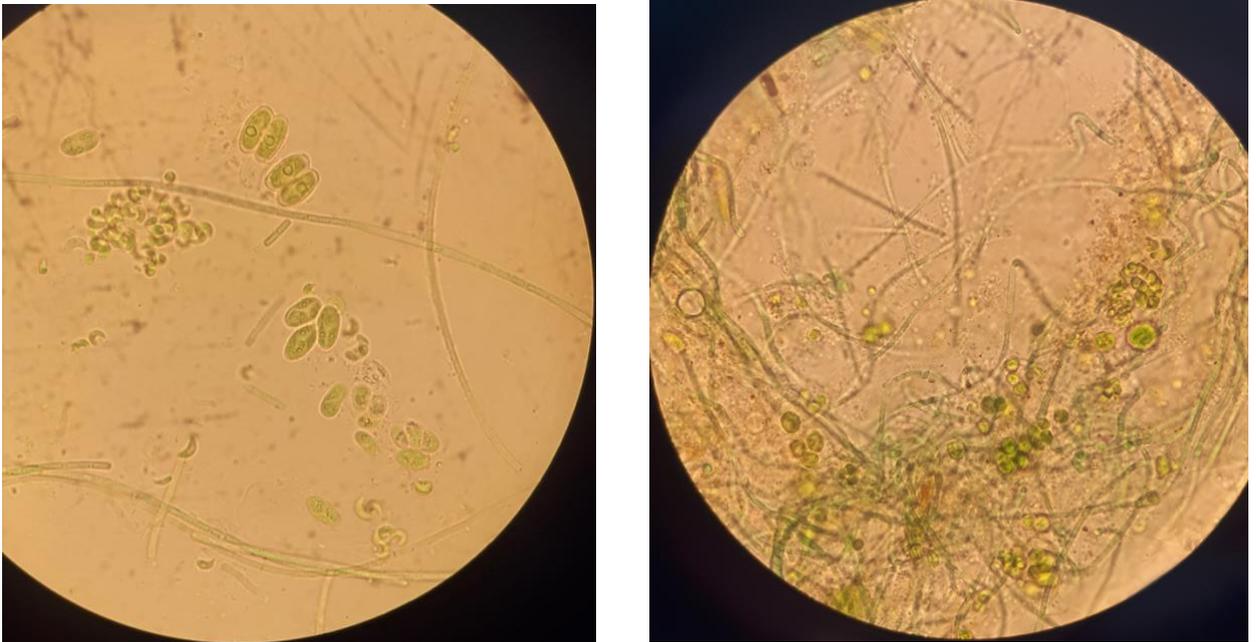
No obstante, nuestros resultados del acondicionamiento concuerdan con los estudios ecológicos de Bajwa *et al.* (2017), quienes reportaron que el medio BG-11 permitió una mayor producción de biomasa en consorcios nativos de microalgas provenientes de la India. Esto puede ser debido a que el crecimiento de las microalgas depende en gran magnitud de la biodisponibilidad de varios macronutrientes esenciales, tales como el nitrógeno, fósforo y hierro. Aunque los tres medios utilizados en este estudio contienen

estos macronutrientes, es de destacar que el medio BG-11 posee una menor concentración de N y P, (variando la concentración de  $\text{NaNO}_3$  de 10 g/L para el medio BMM, 3 g/L en el medio M8 y 1.5 g/L para el medio BG-11, así como variando la concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  de 10 g/L para el medio BMM, 7.4 g/L para el medio M8 y 3.7 g/L para el medio BG-11). Ilavarasi et al. (2011), reportaron que, aunque el  $\text{PO}_4^{3-}$  juega un papel importante en las microalgas de agua dulce al promover las reacciones de la fase oscura de la fotosíntesis, lo cual conlleva a una mayor obtención de biomasa, un exceso de N y P, pueden ser perjudiciales para el crecimiento celular. Además de lo anterior, cabe destacar que el medio BG-11 es el único que presenta una forma biodisponible de hierro, macronutriente indispensable en la producción de clorofila y en las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis; por lo que es indispensable para el crecimiento de las microalgas. Las deficiencias de Fe provocan demora en el crecimiento y muerte celular, por lo que su presencia en concentraciones adecuadas tiene un efecto directo y proporcional sobre la productividad (Hasegawa et al., 2018). El Fe puede ser añadido por medio de diversos compuestos; entre los más comunes están  $\text{FeCl}_3$ , sulfato o citrato de amonio férrico y Fe-EDTA. De acuerdo a la composición de los medios aquí utilizados, el medio BG-11 contiene sulfato de amonio férrico (0.6 g/L), el medio M8 contiene Fe-EDTA (1 g/L) y el medio BBM no contiene una fuente de Fe. Esto pudo haber provocado que las microalgas crecieran mejor en el medio BG-11. De acuerdo con Rizwan et al. (2017), el sulfato de amonio férrico resulta en una densidad final mayor de biomasa, a comparación de los otros dos compuestos. Esto se debe a la baja solubilidad del Fe, por lo que es necesario que se encuentre unido a agentes quelantes (Teresa Mata et al., 2013), para, de esta manera, facilitar su asimilación por parte de las microalgas.

Además de los dos elementos antes mencionados, las microalgas también requieren de micronutrientes como K, Mg, Ca, S, Fe, Cu, Mn y Zn para su crecimiento. Estos elementos son añadidos al medio en forma de sales (Ilavarasi et al., 2011). El Mg es vital para la producción de clorofila, y por ende para la producción de biomasa. Es generalmente añadido en forma de  $\text{MgSO}_4$ ; en este experimento, los tres medios probados contenían dicho compuesto como fuente de Mg.

Otro punto para destacar es la presencia de compuestos que sirvan como fuente de carbono. De los medios utilizados, solo el medio BG-11 contiene  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  como fuente de carbono. De acuerdo con los resultados obtenidos por Idenyi et al (2016), dicho

compuesto tiene un efecto directo sobre la concentración celular; de igual manera, Ghada et al. (2016) reportan que el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  es responsable de un aumento en la productividad de biomasa. Esto sugeriría que existen microalgas mixotróficas en el consorcio que emplean carbono inorgánico para su desarrollo. A pesar de ser definidas comúnmente como organismos eucariotas fotosintéticos (Perez-García & Bashan, 2015), se ha reportado que las microalgas de agua dulce pueden crecer en condiciones mixotróficas; es decir, que el microorganismo asimila, simultáneamente,  $\text{CO}_2$  y carbón orgánico para su crecimiento (Subashchandrabose et al., 2013). Esto da a las microalgas flexibilidad, y cierta ventaja sobre otros microorganismos estrictamente heterótrofos o fotótrofos (Chen et al., 2011). Entre las microalgas que han demostrado capacidad de crecimiento bajo condiciones de mixotrofismo, se encuentran especies de los géneros *Spirulina* sp. (Chojnacka & Noworyta, 2004), *Chlorella* sp. (Mitra et al., 2012), *Haematococcus* sp. (Kobayashi et al., 1992), *Chlamydomonas* sp. (Mondal et al., 2016) y *Scenedesmus* sp. (Bhatnagar et al., 2011). Adicionalmente, se ha reportado que este tipo de crecimiento resulta en un incremento en biomasa, a comparación de cultivos autótrofos (Bhatnagar et al., 2011; Chojnacka & Noworyta, 2004).



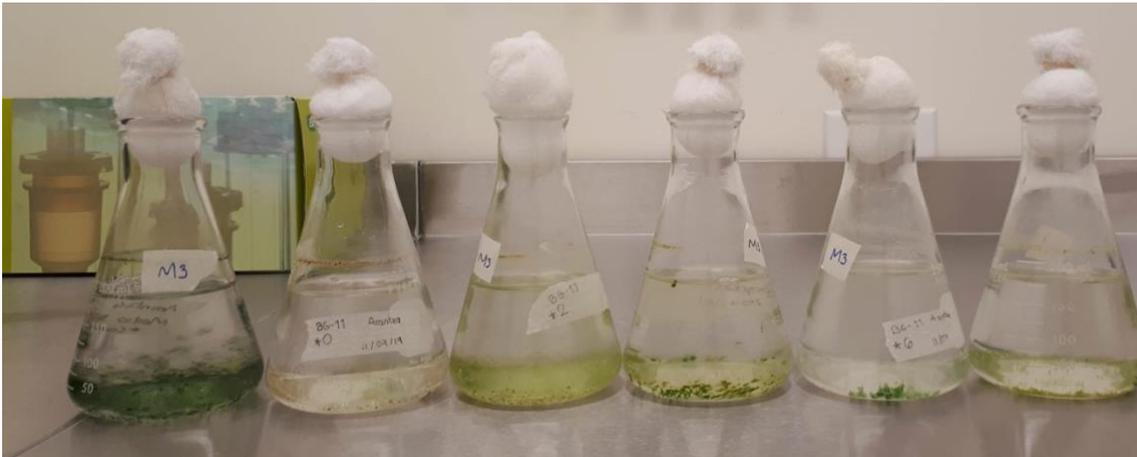
**Figura 1.** Microscopía representativa de muestras de microalgas (100x).

### **5.3 Evaluación del crecimiento de los consorcios de microalgas frente a condiciones de estrés nutricional generado por la limitación y co-limitación de N y P.**

Una vez seleccionado el medio de cultivo que permitiera el mejor desarrollo de los consorcios microalgales, se evaluó la capacidad de crecimiento de los consorcios frente a condiciones de estrés nutricional generado por la limitación y co-limitación de nitrógeno y fósforo, esto dado a que se sabe que las condiciones de estrés nutricional promueven la acumulación de macronutrientes importantes en las microalgas (Nishikawa et al., 2006b; Zarrinmehr et al., 2020). De esta manera, se sabe que las microalgas son capaces de almacenar N inorgánico intracelularmente cuando existe una ausencia de éste mismo elemento en el medio, permitiéndoles la capacidad de continuar multiplicándose aún en posteriores condiciones de ausencia de N. Esto representa un factor clave para asegurar su supervivencia (Paes et al., 2016). Así mismo ocurre con el P.

De acuerdo con Beuckels et al. (2015) la concentración de P en la biomasa, está influenciada no solo por la concentración de P en el medio, sino también por la de N; mientras que la concentración de N en la biomasa es independiente a la concentración de P en el medio. El P es tomado del medio por medio de distintos mecanismos, incluyendo adsorción en la superficie celular, asimilación o precipitación química (Pham & Bui, 2020; Tang et al., 2018).

Para este experimento, todos los consorcios fueron sometidos por triplicado, a una limitación total de N, y una co-limitación gradual de P producida por un suministro a diferentes concentraciones de  $PO_4^{3-}$ . Sin embargo, solamente las muestras M3, M4 y M6 presentaron un crecimiento visible bajo las condiciones de estudio (Figura 4). Para las muestras M3 y M4 el mayor crecimiento se observó a concentraciones de 3.05 g/L de fosfatos en el medio (correspondiente a una limitación nutricional exclusiva por la ausencia de N), mientras que para la muestra M6 se observó un crecimiento considerable en las 6 condiciones de experimentación. Este resultado sugiere que el consorcio de microalgas presente en esta muestra es capaz de utilizar al máximo el fósforo biodisponible para la producción de biomasa. En cambio, los consorcios presentes en las muestras M3 y M4, al no presentar un crecimiento abundante frente a condiciones de co-limitación, sugiere que el P podría estarse acumulando para producir biomasa cuando las condiciones nutricionales sean más favorables.

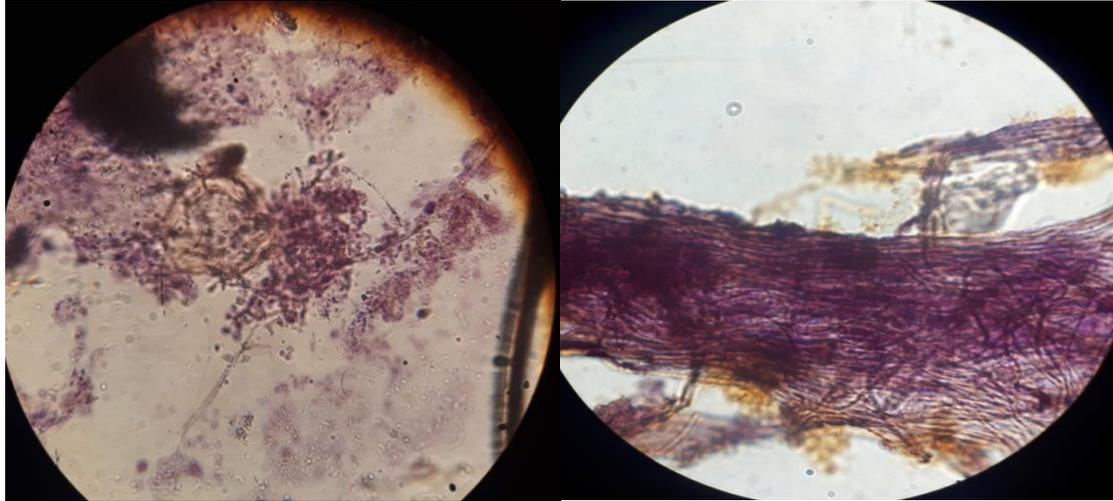


**Figura 4.** Crecimiento observado en la M3 en ausencia de N y a distintas concentraciones de fosfato

#### **5.4 Evaluar la capacidad biológica para acumular polifosfato de manera intracelular por los consorcios de microalgas nativas**

Para determinar la capacidad de los consorcios estudiados para acumular polifosfato de manera intracelular debido a la co-limitación nutricional de N y P, se llevó a cabo una tinción específica que es capaz de reaccionar con los gránulos de éste biopolímero, llamada tinción Neisser (Serafim et al., 2002). Este es un método sencillo y rápido para visualizar por microscopía óptica la presencia de estos cuerpos intracelulares (Loosdrecht et al., 2016). El azul de metileno utilizado en esta tinción es altamente afín a los gránulos aniónicos presentes en la molécula, tornándolos de un color azul o púrpura oscuro (Crocetti et al., 2000; Serafim et al., 2002).

De esta forma, se sometieron a tinción las muestras de todos los consorcios sometidas a la limitación o co-limitación de N y P. Bajo el criterio de Eikelboom (2000), todas las muestras de los ensayos M3, M4 y M6 resultaron positivas a la presencia de polifosfatos, siendo éstas las muestras que presentan una coloración morada/azul oscura bajo el microscopio (Figura 6). Por otra parte, las muestras que no presentaron crecimiento durante la fase de experimentación dieron negativo a la tinción, observándose solo un color ligeramente amarillo o café claro.



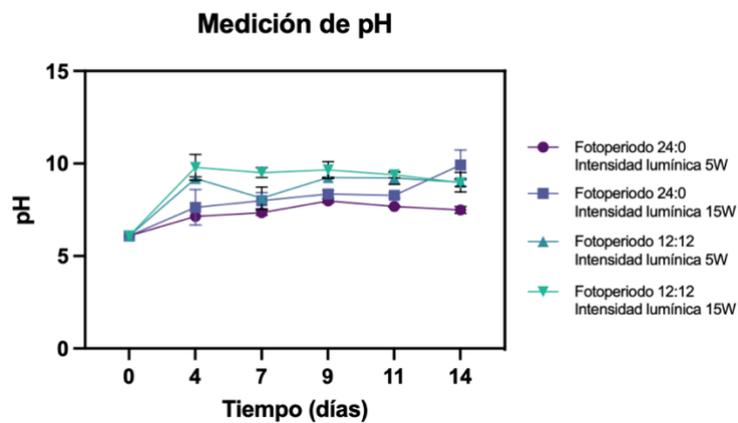
**Figura 5.** Tinción Neisser positiva para la M3 (izquierda) y M6 (derecha).

### **5.5 Adaptación de los consorcios seleccionados a una muestra de agua residual previamente caracterizada.**

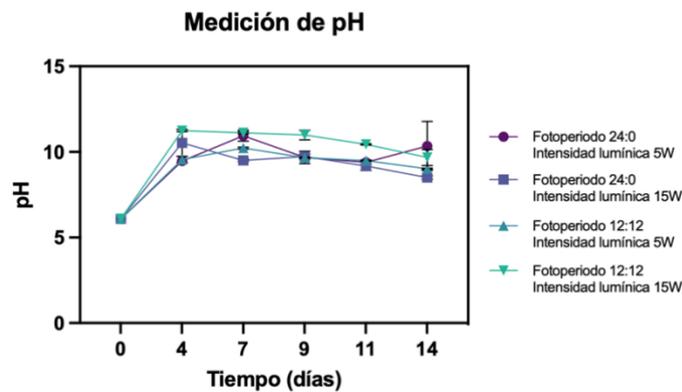
Después de evaluar la capacidad de los consorcios microalgales para recuperar fosfato en forma de polifosfato intracelular, se seleccionó al consorcio M6 para evaluar su capacidad para recuperar fosfato a partir de una muestra real de agua residual. Esto dado que el consorcio M6 demostró una alta capacidad para crecer adecuadamente en condiciones de limitación de nutrientes y ser capaz de formar gránulos de polifosfato. Como control positivo del proceso, se empleó el consorcio denominado BR-UANL-01, proporcionado por el Laboratorio de Investigación en Ciencias Ambientales (LICA) de la Facultad de Ciencias Químicas, el cual ha sido empleado previamente en un proceso de pulimiento de efluentes (Beltrán-Rocha, 2017).

Ambos consorcios fueron sometidos a dos condiciones de fotoperiodo (12:12 y 24:0) e intensidad lumínica (5 W y 15 W) con el fin de evaluar si dichas condiciones tenían un efecto sobre la recuperación del fósforo y la producción de biomasa. Cabe destacar que, a partir de la primera medición, se observó un incremento en el pH del medio de todos los fotobiorreactores, indicando el crecimiento adecuado de los consorcios de microalgas. Esto es dado que, el pH determina la disponibilidad y solubilidad de los nutrientes y del CO<sub>2</sub> (Qiu et al., 2017). Para ambos consorcios, se obtuvieron valores de pH más altos en los tratamientos de 15 W, sugiriendo que éstas condiciones favorecen su crecimiento

(Figuras 6 y 7). A manera general, se sabe que a medida que aumenta la biomasa de las microalgas, incrementa el pH debido al consumo de carbonos inorgánicos, así como la producción de  $\text{HCO}_3^-$  durante el proceso de fotosíntesis (Beltrán-Rocha, 2014). Esto es un parámetro crítico a evaluar en el cultivo de microalgas en aguas residuales, entre otras cosas, debido a que confiere la característica de servir como control biológico al inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos (Bartley et al., 2014).



**Figura 6.** Medición de pH durante los 14 días de experimentación para el consorcio BR-UANL-01.



**Figura 7.** Medición del pH del consorcio M6.

Así mismo, se midieron la conductividad eléctrica y la salinidad del medio de los cultivos, dado que son parámetros críticos para evaluar el crecimiento de las microalgas. En ambos consorcios se observó una gradual disminución de estos parámetros a medida que incrementaba la biomasa. Esto se considera favorable debido a que su disminución se genera como producto del consumo de los macronutrientes, micronutrientes y sales minerales del medio (Mostafa et al., 2012). Para esta prueba, el valor inicial de la

conductividad eléctrica del efluente era de 1445  $\mu\text{S}$ , disminuyendo hasta valores entre 1000 y 1100  $\mu\text{S}$  para el consorcio M6 y entre 1000 y 1200  $\mu\text{S}$  al día 14 para el consorcio BR-UANL-01 (Figuras 8 y 9). En tanto que, a la salinidad, se observó una disminución del valor inicial de 0.74 mg/L, hasta valores entre 0.5 y 0.54 mg/L para todos los tratamientos (Figura 10 y 11).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos de pH, conductividad eléctrica, y salinidad, se puede confirmar que el aumento de la biomasa de ambos consorcios ocurrió de manera favorable bajo los criterios experimentales propuestos. Sin embargo, es importante destacar que, aunque no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos, se observó un crecimiento mejor para el consorcio M6 bajo condiciones de una intensidad lumínica de 5W y fotoperiodos de 24:0. Por el contrario, para el consorcio BR-UANL-01, se observó un mayor crecimiento de biomasa en los cultivos sometidos a una intensidad lumínica mayor (15W) y fotoperiodos de 12:12.

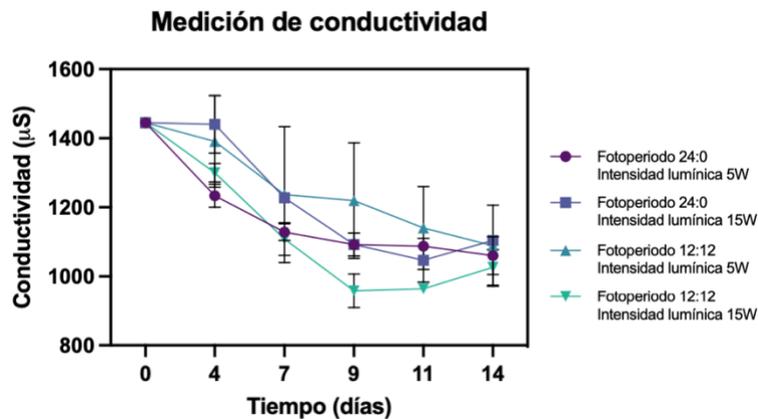


Figura 8. Medición de conductividad del consorcio BR-UANL-01.

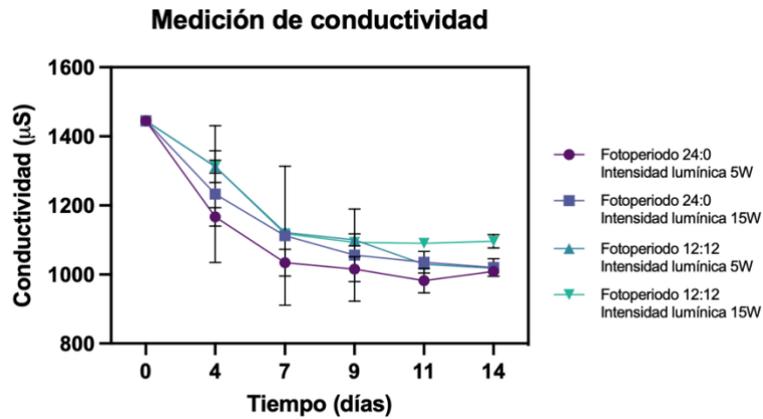


Figura 9. Conductividad eléctrica del consorcio M6.

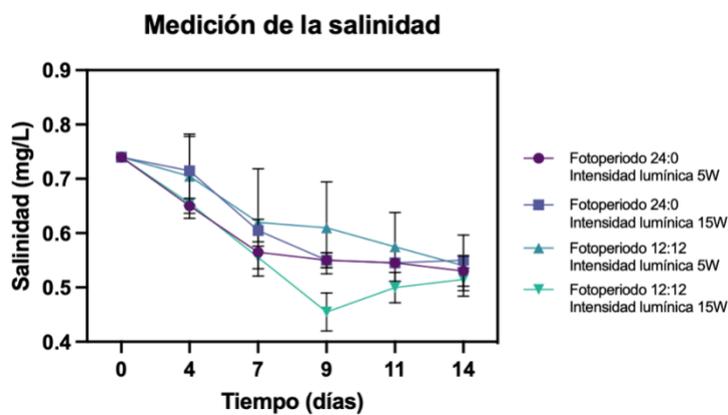


Figura 10. Medición de la salinidad del consorcio BR-UANL-01.

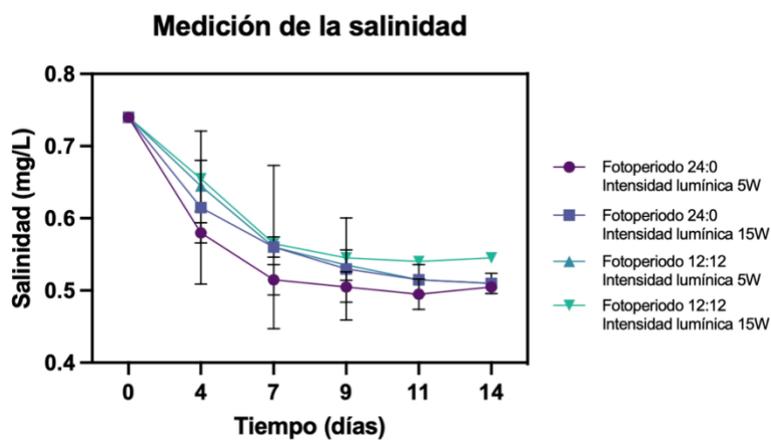


Figura 11. Medición de la salinidad del medio para el consorcio M6.

5.6 Prueba conceptual para evaluar la capacidad de remoción del P por los consorcios seleccionados en una muestra de agua residual previamente caracterizada.

Con el fin de evaluar la capacidad de remoción de fósforo inorgánico de los consorcios seleccionados en una muestra de agua residual real, se llevó a cabo un cultivo de los consorcios M6 y BR-UANL-01 bajo las condiciones de operación establecidas en los experimentos anteriores. De esta manera, se llevó a cabo la cuantificación del fosfato inorgánico presente en el agua residual durante su tratamiento a los días 0, 1, 7 y 14. De esta manera, se estableció que la concentración inicial de  $\text{PO}_4^{3-}$  en el efluente era de 8 mg/L, lo que sugiere que a pesar de ser un agua residual tratada, ésta no cumplía con la norma NOM-001- SEMARNAT-1996, que establece una concentración máxima permisible  $< 2$  mg/L. Cabe destacar que esto representa un riesgo natural para la eutrofización de los cuerpos de agua receptores, ya que esto suele ocurrir a concentraciones menores a 0.1 mg/L. (U.S. EPA, 1986).

Como control negativo de experimentación, se utilizó una muestra de agua tratada sin inóculo a fin de demostrar que la disminución en la concentración de fósforo inorgánico se debía directamente al crecimiento de las microalgas y no por la presencia de otros agentes. En dicho control, se observó que la concentración de fosfato inorgánico permaneció constante durante los 14 días de estudio. Por otra parte, analizando los consorcios, se puede apreciar que la mayor concentración de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue consumida durante la primera semana de crecimiento (*Figura 12 y 13*), coincidiendo con los días donde se presentó el mayor incremento de biomasa. Las concentraciones finales de fosfato al cabo de 14 días de tratamiento fueron de entre 0.1 y 0.4 mg/L, demostrándose que ambos consorcios lograron una remoción de  $\text{PO}_4^{3-}$  igual o mayor al 95%. De entre estos resultados, destacan los obtenidos por el consorcio M6, que bajo las condiciones de 15W de intensidad luminosa y fotoperiodos de 24:0, así como bajo las condiciones de intensidad lumínica de 5W y fotoperiodos 12:12, se lograron porcentajes de remoción de 98.75% (*Tabla 4*). Estos porcentajes son superiores con los reportados en estudios similares. Por ejemplo, Delgadillo-Mirquez et al., (2016) obtuvieron eficiencias de remoción de alrededor del 90% en un consorcio de microalgas, cuando la temperatura se mantenía cercana a los 25°C y con fotoperiodos de 12:12. Lavrinovičs et al., (2021) obtuvieron eficiencias de remoción de P del 98% utilizando cultivos puros de *Chlorella vulgaris* y *Botryococcus braunii*.

Dado que no se observó diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos, esto nos posibilita el optar por las condiciones que resultan en un menor gasto energético, y por ende, costos de operación menores, siendo éstos de fotoperiodos de 12:12 y una intensidad lumínica de 5W.

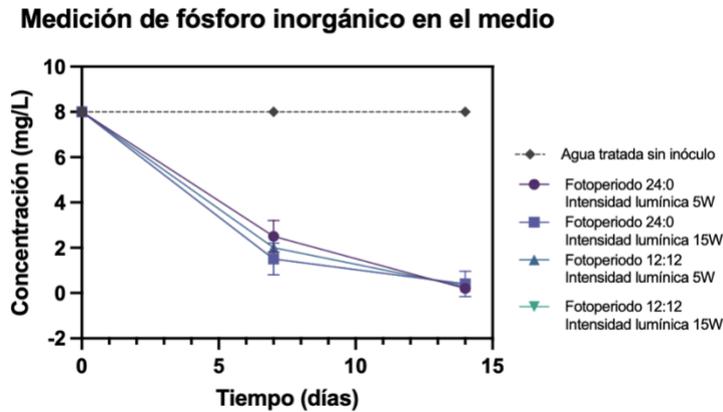


Figura 12. Medición de la concentración de fósforo inorgánico en el medio (Consortio BR-UANL-01)

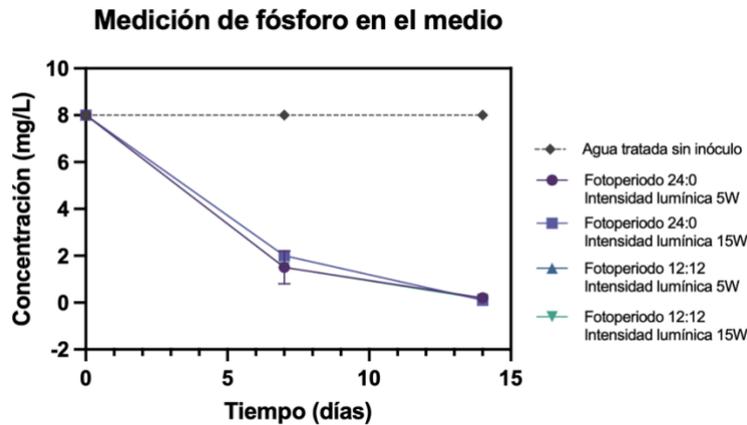
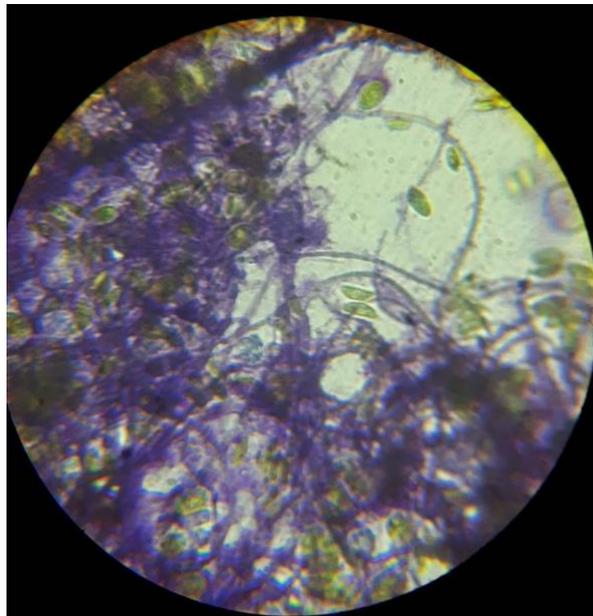


Figura 13. Medición de la concentración de fósforo inorgánico en el medio (Consortio M6).

	Fotoperiodo	Intensidad Lumínica (W)	po <sub>4</sub> inicial (mg/L)	Po <sub>4</sub> final (mg/L)	Porcentaje de disminución (%)
Consortio BR-UANL-01	24:0	5	8	0.2	97.5
		15	8	0.4	95
	12:12	5	8	0.3	96.25
		15	8	0.4	95
Consortio M6	24:0	5	8	0.2	97.5
		15	8	0.1	98.75
	12:12	5	8	0.1	98.75
		15	8	0.15	98.125

Tabla 4. Porcentajes de disminución (%) del PO<sub>4</sub> para los dos consorcios utilizados, bajos distintas condiciones de intensidad lumínica y fotoperiodo.

Finalmente, se llevó a cabo una Tinción de Neisser para determinar si el fosfato removido durante el proceso había sido acumulado intracelularmente por las microalgas en forma de polifosfato. De tal manera que, siguiendo el criterio de Eikelboom (2000), el consorcio M6 resultó positivo a la presencia de polifosfatos (*Figura 14*). Así, la presencia de una coloración oscura de tono morado o azul indica la presencia de polifosfato de manera intracelular en la biomasa procedente de las muestras experimentales.



**Figura 14.** Tinción Neisser positiva para la M6 (100x)

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados experimentales obtenidos se concluye que el medio BG-11 promueve el mayor crecimiento de los consorcios de microalgas nativos del Estado de Nuevo León. Esto debido a su composición, que cuenta con la presencia de elementos traza,  $K_2HPO_4$  como fuente de fósforo, y la presencia de una fuente adicional de carbono. Los consorcios de microalgas presentaron una capacidad mixotrófica, lo que permitió que la adición de una fuente inorgánica de carbono al medio de cultivo estimulara una mayor obtención de biomasa.

El fósforo, al ser un nutriente esencial para el correcto desarrollo de los seres vivos, demostró que en bajas concentraciones impide el crecimiento de las microalgas. Además, la ausencia de nitrógeno en el medio generó condiciones de estrés para los consorcios. Sin embargo, gracias a su capacidad de almacenamiento intracelular de reservorios de P y N, las microalgas presentes en los consorcios aislados pudieron crecer de manera moderada, lo cual constituye una característica clave para su supervivencia en ambientes donde existe gran fluctuación de nutrientes. De los consorcios obtenidos, solo el consorcio denominado M6 demostró la capacidad de crecer en condiciones de ausencia de N y P. Por otra parte, los consorcios M3 y M4 fueron capaces de crecer en ausencia de N, pero con el 100% de suplementación de P.

Al ser evaluado bajo condiciones de operación real con una muestra de agua residual tratada, el consorcio M6 tuvo la capacidad de remover el  $PO_4^{3-}$  con una eficiencia de hasta 98.7% después de 14 días de experimentación. Este proceso resulta ser de muy bajo coste energético y de operación, ya que requiere condiciones de operación de intensidad lumínica de 5W y fotoperiodos de 12:12, focos de 5W. Esto podría resultar muy atractivo para su escalamiento en plantas tratadoras de agua. Además, los efluentes pueden ser utilizados de manera directa sin necesidad de añadir componentes adicionales. De esta manera, se genera una propuesta que permita lograr un tratamiento terciario que reduzca la eutrofización de los cuerpos de agua receptores, además de permitir la recuperación de un elemento muy importante y cada vez más escaso como lo es el fósforo.

## **CAPÍTULO 7**

### **PERSPECTIVAS Y APLICACIONES**

La problemática dada por la escasez de fósforo que se prevee a futuro y el riesgo que esta representa para la seguridad alimentaria de la población mundial, así como los problemas ambientales provocados por la descarga de efluentes con exceso de nutrientes implican que debemos buscar alternativas viables y aplicables, con el fin de buscar una bioeconomía circular, donde los procesos no resulten en desechos de los cuales se debe disponer.

Debido a su metabolismo y características, las microalgas tienen gran potencial para llevar a cabo procesos de tratamiento de efluentes, y además, posibilitan el uso de la biomasa con distintos fines y en distintas áreas; como biofertilizantes y aditivos para mejorar las condiciones de suelos, como alimento para ganado, e incluso para la obtención de productos de valor agregado. Sin embargo, para que esto sea posible a gran escala, es necesario primero resolver algunos obstáculos inherentes al cultivo de las microalgas, tales como son obtener una producción de biomasa rentable y encontrar métodos que faciliten la recuperación de la misma.

## CAPÍTULO 8

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *19*(3), 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Arora, N., Patel, A., Pruthi, P. A., Poluri, K. M., & Pruthi, V. (2018). Utilization of stagnant non-potable pond water for cultivating oleaginous microalga *Chlorella minutissima* for biodiesel production. *Renewable Energy*, *126*, 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.03.033>
- Azad, H. S., & Borchardt, J. A. (1970). Variations in phosphorus uptake by algae. *Environmental Science & Technology*, *4*(9), 737-743. <https://doi.org/10.1021/es60044a008>
- Bartley, M. L., Boeing, W. J., Dungan, B. N., Holguin, F. O., & Schaub, T. (2014). PH effects on growth and lipid accumulation of the biofuel microalgae *Nannochloropsis salina* and invading organisms. *Journal of Applied Phycology*, *26*(3), 1431-1437. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0177-2>
- Beltrán-Rocha, J. C. (2014). *Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de Nuevo León, México cultivadas en un nuevo fotobiorreactor* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Nuevo León.

- Beltrán-Rocha, J. C. (2017). *Estudio del acondicionamiento y semi-purificación de microalgas nativas para la inducción de floculación, producción de biomasa y pulimiento de efluentes municipales*. [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015). Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment. *Water Research*, 77, 98-106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>
- Bhatnagar, A., Chinnasamy, S., Singh, M., & Das, K. C. (2011). Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters. *Applied Energy*, 88(10), 3425-3431. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.064>
- Cai, T., Park, S. Y., & Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19, 360-369. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2012.11.030>
- Chen, C.-Y., Yeh, K.-L., Aisyah, R., Lee, D.-J., & Chang, J.-S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresource Technology*, 102(1), 71-81. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>
- Chiandret, A. S., & Xenopoulos, M. A. (2016). Landscape and morphometric controls on water quality in stormwater management ponds. *Urban Ecosystems*, 19(4), 1645-1663. <https://doi.org/10.1007/s11252-016-0559-8>

- Chojnacka, K., & Noworyta, A. (2004). Evaluation of *Spirulina* sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, *34*(5), 461-465.  
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.12.002>
- Chowdhury, R. B., Moore, G. A., Weatherley, A. J., & Arora, M. (2017). Key sustainability challenges for the global phosphorus resource, their implications for global food security, and options for mitigation. *Journal of Cleaner Production*, *140*, 945-963.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.07.012>
- Cordell, D., Rosemarin, A., Schröder, J. J., & Smit, A. L. (2011). Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere*, *84*(6), 747-758.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.032>
- Cordell, D., & White, S. (2014). Life's Bottleneck: Sustaining the World's Phosphorus for a Food Secure Future. *Annual Review of Environment and Resources*, *39*(1), 161-188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>
- Crocetti, G. R., Hugenholtz, P., Bond, P. L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., & Blackall, L. L. (2000). Identification of Polyphosphate-Accumulating Organisms and Design of 16S rRNA-Directed Probes for Their Detection and Quantitation. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(3), 1175-1182. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.3.1175-1182.2000>

- Eikelboom, D. H. (2000). *Process control of activated sludge plants by microscopic investigation* (1. engl. ed) [Verschiedene Materialien]. IWA Publ.
- FAO. (2019). *World fertilizer trends and outlook to 2022*.  
<http://www.fao.org/publications/card/en/c/CA6746EN/>
- Ghada, A.-E.-S., Lamiaa, H., & Ebtsam, M. (2016). Comparison of Different Media Formulations and the Optimal Growing Conditions on growth, morphology and chlorophyll content of green alga, *Chlorella vulgaris*. *Journal of American Science*, 12(6).  
<https://doi.org/10.7537/marsjas12061611>
- Gouveia, L., Graça, S., Sousa, C., Ambrosano, L., Ribeiro, B., Botrel, E. P., Neto, P. C., Ferreira, A. F., & Silva, C. M. (2016). Microalgae biomass production using wastewater: Treatment and costs. *Algal Research*, 16, 167-176.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.03.010>
- Hasegawa, H., Nozawa, A., Papry, R. I., Maki, T., Miki, O., & Rahman, M. A. (2018). Effect of biodegradable chelating ligands on Fe uptake in and growth of marine microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2215-2225. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1462-x>
- Hassall, C. (2014). The ecology and biodiversity of urban ponds: Ecology and biodiversity of urban ponds. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 1(2), 187-206. <https://doi.org/10.1002/wat2.1014>

- IFA. (2019, junio). *Fertilizer outlook 2019-2023*. IFA Annual Conference, Montreal, Canada.
- Jansson, M. (1988). Phosphate uptake and utilization by bacteria and algae. *Hydrobiologia*, 170(1), 177-189. <https://doi.org/10.1007/BF00024904>
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Yamaguchi, K., Nishio, N., & Nagai, S. (1992). Growth and astaxanthin formation of *Haematococcus pluvialis* in heterotrophic and mixotrophic conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(1), 17-20. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90261-R](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90261-R)
- Larsdotter, K., la Cour Jansen, J., & Dalhammar, G. (2010). Phosphorus removal from wastewater by microalgae in Sweden – a year-round perspective. *Environmental Technology*, 31(2), 117-123. <https://doi.org/10.1080/09593330903382815>
- Loosdrecht, M. C. M. van, Nielsen, P. H., Lopez-Vazquez, C. M., & Brdjanovic, D. (Eds.). (2016). *Experimental methods in wastewater treatment*. IWA Publishing.
- Martin, P., & Van Mooy, B. A. S. (2013). Fluorometric Quantification of Polyphosphate in Environmental Plankton Samples: Extraction Protocols, Matrix Effects, and Nucleic Acid Interference. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 273-281. <https://doi.org/10.1128/AEM.02592-12>
- Mayer, B. K., Baker, L. A., Boyer, T. H., Drechsel, P., Gifford, M., Hanjra, M. A., Parameswaran, P., Stoltzfus, J., Westerhoff, P., & Rittmann, B. E. (2016).

- Total Value of Phosphorus Recovery. *Environmental Science & Technology*, 50(13), 6606-6620. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01239>
- Minelgaite, G., Frost, P. C., Xenopoulos, M. A., Stephansen, D. A., Fejerskov, M. L., & Vollertsen, J. (2020). Planktonic algae abundance and diversity are similar in urban stormwater ponds of different geographic locations and natural shallow lakes. *Urban Ecosystems*, 23(4), 841-850. <https://doi.org/10.1007/s11252-020-00967-7>
- Mitra, D., van Leeuwen, J. (Hans), & Lamsal, B. (2012). Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 1(1), 40-48. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2012.03.002>
- Mondal, M., Ghosh, A., Sharma, A. S., Tiwari, O. N., Gayen, K., Mandal, M. K., & Halder, G. N. (2016). Mixotrophic cultivation of *Chlorella* sp. BTA 9031 and *Chlamydomonas* sp. BTA 9032 isolated from coal field using various carbon sources for biodiesel production. *Energy Conversion and Management*, 124, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2016.07.033>
- Mostafa, S. S. M., Shalaby, E. A., & Mahmoud, G. I. (2012). Cultivating Microalgae in Domestic Wastewater for Biodiesel Production. *Notulae Scientia Biologicae*, 4(1), 56-65. <https://doi.org/10.15835/nsb417298>
- Mukherjee, C., Chowdhury, R., & Ray, K. (2015). Phosphorus Recycling from an Unexplored Source by Polyphosphate Accumulating Microalgae and

Cyanobacteria—A Step to Phosphorus Security in Agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01421>

Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M., & Tominaga, N. (2006a). Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. *Plant Science*, 170(2), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.025>

Nishikawa, K., Machida, H., Yamakoshi, Y., Ohtomo, R., Saito, K., Saito, M., & Tominaga, N. (2006b). Polyphosphate metabolism in an acidophilic alga *Chlamydomonas acidophila* KT-1 (Chlorophyta) under phosphate stress. *Plant Science*, 170(2), 307-313. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.08.025>

Paes, C., Faria, G., Tinoco, N., & Castro, D. (2016). Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. And *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), 275-292.

Perez-Garcia, O., & Bashan, Y. (2015). Microalgal Heterotrophic and Mixotrophic Culturing for Bio-refining: From Metabolic Routes to Techno-economics. En A. Prokop, R. K. Bajpai, & M. E. Zappi (Eds.), *Algal Biorefineries* (pp. 61-131). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20200-6_3)

- Pham, T.-L., & Bui, M. H. (2020). Removal of Nutrients from Fertilizer Plant Wastewater Using *Scenedesmus* sp.: Formation of Biofloculation and Enhancement of Removal Efficiency. *Journal of Chemistry*, 2020, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/8094272>
- Powell, N., Shilton, A., Chisti, Y., & Pratt, S. (2009). Towards a luxury uptake process via microalgae – Defining the polyphosphate dynamics. *Water Research*, 43(17), 4207-4213. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.06.011>
- Qin, C., Liu, H., Liu, L., Smith, S., Sedlak, D. L., & Gu, A. Z. (2015). Bioavailability and characterization of dissolved organic nitrogen and dissolved organic phosphorus in wastewater effluents. *Science of The Total Environment*, 511, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.11.005>
- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A., & Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192-199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Sanz-Luque, E., Bhaya, D., & Grossman, A. R. (2020). Polyphosphate: A Multifunctional Metabolite in Cyanobacteria and Algae. *Frontiers in Plant Science*, 11, 938. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00938>
- Schmidt, J. J., Gagnon, G. A., & Jamieson, R. C. (2016). Microalgae growth and phosphorus uptake in wastewater under simulated cold region conditions. *Ecological Engineering*, 95, 588-593. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.114>

- Scholz, R. W., Ulrich, A. E., Eilittä, M., & Roy, A. (2013). Sustainable use of phosphorus: A finite resource. *Science of The Total Environment*, 461-462, 799-803. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.043>
- Senthilkumar, K., Mollier, A., Delmas, M., Pellerin, S., & Nesme, T. (2014). Phosphorus recovery and recycling from waste: An appraisal based on a French case study. *Resources, Conservation and Recycling*, 87, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2014.03.005>
- Serafim, L. S., Lemos, P. C., Levantesi, C., Tandoi, V., Santos, H., & Reis, M. A. M. (2002). Methods for detection and visualization of intracellular polymers stored by polyphosphate-accumulating microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 51(1), 1-18. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(02\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(02)00056-8)
- Shriwastav, A., Mohamed, J., Bose, P., & Shekhar, M. (2015). Deconvoluting algal and bacterial biomass concentrations in algal-bacterial suspensions. *Journal of Applied Phycology*, 27(1), 211-222. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0302-x>
- Solovchenko, A., Verschoor, A. M., Jablonowski, N. D., & Nedbal, L. (2016). Phosphorus from wastewater to crops: An alternative path involving microalgae. *Biotechnology Advances*, 34(5), 550-564. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.01.002>
- Subashchandrabose, S. R., Ramakrishnan, B., Megharaj, M., Venkateswarlu, K., & Naidu, R. (2013). Mixotrophic cyanobacteria and microalgae as distinctive

- biological agents for organic pollutant degradation. *Environment International*, 51, 59-72. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.10.007>
- Sun, D., Hale, L., Kar, G., Soolanayakanahally, R., & Adl, S. (2018). Phosphorus recovery and reuse by pyrolysis: Applications for agriculture and environment. *Chemosphere*, 194, 682-691. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.035>
- Tang, C.-C., Tian, Y., Liang, H., Zuo, W., Wang, Z.-W., Zhang, J., & He, Z.-W. (2018). Enhanced nitrogen and phosphorus removal from domestic wastewater via algae-assisted sequencing batch biofilm reactor. *Bioresource Technology*, 250, 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.028>
- U.S. EPA. (1986). *Quality Criteria for Water* (440/5-86-001; Office of Water Regulations and Standards). United States Environmental Protection Agency.
- Uysal, O., Uysal, F. O., & Ekinici, K. (2015). Evaluation of Microalgae as Microbial Fertilizer. *European Journal of Sustainable Development*, 4(2). <https://doi.org/10.14207/ejsd.2015.v4n2p77>
- Venkiteshwaran, K., McNamara, P. J., & Mayer, B. K. (2018). Meta-analysis of non-reactive phosphorus in water, wastewater, and sludge, and strategies to convert it for enhanced phosphorus removal and recovery. *Science of The Total Environment*, 644, 661-674. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.369>

- Wang, C., Wu, X., Tian, C., Li, Q., Tian, Y., Feng, B., & Xiao, B. (2015). A quantitative protocol for rapid analysis of cell density and size distribution of pelagic and benthic *Microcystis* colonies by FlowCAM. *Journal of Applied Phycology*, 27(2), 711-720. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0352-0>
- Whitton, R., Le Mével, A., Pidou, M., Ometto, F., Villa, R., & Jefferson, B. (2016). Influence of microalgal N and P composition on wastewater nutrient remediation. *Water Research*, 91, 371-378. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.12.054>
- Yadav, D., Pruthi, V., & Kumar, P. (2016). Enhanced biological phosphorus removal in aerated stirred tank reactor using aerobic bacterial consortium. *Journal of Water Process Engineering*, 13, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.08.005>
- Yang, G., Wang, D., Yang, Q., Zhao, J., Liu, Y., Wang, Q., Zeng, G., Li, X., & Li, H. (2018). Effect of acetate to glycerol ratio on enhanced biological phosphorus removal. *Chemosphere*, 196, 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.167>
- Zarrinmehr, M. J., Farhadian, O., Heyrati, F. P., Keramat, J., Koutra, E., Kornaros, M., & Daneshvar, E. (2020). Effect of nitrogen concentration on the growth rate and biochemical composition of the microalga, *Isochrysis galbana*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(2), 153-158. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2019.11.003>

## ANEXO I

### Composición de los medios de cultivo

#### Composición del medio BG-11

Compuesto	g/L
Na <sub>2</sub> EDTA	0.1
Sulfato de amonio férrico	0.6
Ácido cítrico	0.6
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	3.6
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	7.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.05
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0.074
CoCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.05
NaMoO <sub>4</sub> -2H <sub>2</sub> O	0.39
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.02
NaNO <sub>3</sub>	1.5

#### Composición del medio M8

Compuesto	g/L
NaNO <sub>3</sub>	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7.4
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	1.3
Fe-EDTA	1
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	4
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> -18H <sub>2</sub> O	0.03
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	0.12
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	0.001
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.03

Composición del medio BBM

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
NaNO <sub>3</sub>	10
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	3
NaCl	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	1
ZnSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	0.8
MnCl <sub>2</sub> -4H <sub>2</sub> O	0.14
MoO <sub>3</sub>	0.7
CuSO <sub>4</sub> -5H <sub>2</sub> O	1.5
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0.5

## ANEXO II

### Composición de los reactivos para la tinción de Neisser

*Composición del reactivo A para tinción Neisser*

<b>Reactivo A</b>	
Azul de metileno	0.2 g
Etanol al 95%	10 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Agua destilada	100 mL

*Composición del Reactivo B para tinción Neisser*

<b>Reactivo B</b>	
Cristal violeta al 10% en etanol 95%	3.3 mL
Etanol al 95%	6.7 mL
Agua destilada	100 mL

### ANEXO III

**Composición de la Solución nutritiva para la reactivación y mantenimiento de microalgas.**

<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>
KNO <sub>3</sub>	101.11
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	27.22
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	98.6
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	295.18
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.81
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.08
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0.019
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1.38
Na <sub>2</sub> EDTA	1.83