

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**MICROALGAS NATIVAS PARA LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES EN AGUA
RESIDUAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGRICOLAS**

PRESENTA:

SANJUANA CECILIA GALICIA CAMPOS

GENERAL ESCOBEDO, N.L.

SEPTIEMBRE DE 2024

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE AGRONOMÍA



MICROALGAS NATIVAS PARA LA REMOCIÓN DE NUTRIENTES EN AGUA RESIDUAL

TESIS

**QUE PARA OBTENER GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS AGRICOLAS**

**PRESENTA:
SANJUANA CECILIA GALICIA CAMPOS**

GENERAL ESCOBEDO, N.L.

SEPTIEMBRE de 2024

**ESTA TESIS FUE REVISADA Y APROBADA POR EL
COMITÉ PARTICULAR COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
COMITÉ PARTICULAR**



**Dr. Sergio Manuel Salcedo Martínez
Asesor Principal**



**Dr. Celestino García Gómez
Co-Director**



**Dr. Emilio Olivares Sáenz
Asesor Auxiliar**



**Dr. Marco Antonio Alvarado Vázquez
Asesor Auxiliar**



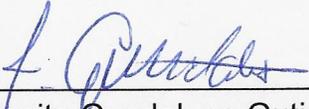
**Dra. Alejandra Rocha Estrada
Asesor Auxiliar**

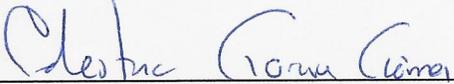


**Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Subdirectora de Estudios de Posgrado**

ESTA TESIS FUE APROBADA EN FORMATO, POR EL COMITÉ DE POSGRADO,
ATENDIENDO A EL ARTÍCULO 123, DEL REGLAMENTO GENERAL DEL
SISTEMA DE POSGRADO DE LA UANL.

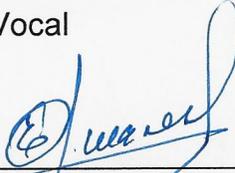
COMITÉ DE POSGRADO

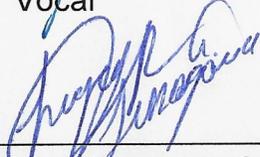

Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez Soto
Presidenta


Dr. Celestino García Gómez
Secretario


Dra. Lidia Rosaura Salas Cruz
Vocal


Ph.D. Rigoberto Eustacio Vázquez Alvarado
Vocal


Ph.D. Emilio Olivares Sáenz
Vocal


Dra. Sughey Ramona Sinagawa García
Vocal


Dr. Guillermo Niño Medina
Vocal

DEDICATORIA

A mi niña hermosa Luna Camila.

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

-Buda Siddharta Gautama

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Autónoma de Nuevo León, a la Facultad de Agronomía y a la Facultad de Ciencias Biológicas por permitirme cursar satisfactoriamente mis estudios de posgrado.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Sergio Salcedo, Dr. Celestino García, Dr. Emilio Olivares, Marco Alvarado y Alejandra Rocha por formar parte del Comité de Tesis, así como por sus valiosas sugerencias e interés, en la revisión del presente trabajo. Así como a la Dra. Juanita Guadalupe Gutiérrez, por su apoyo e interés en la culminación de este proceso.

Al personal del Laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Suelos, Aguas y Plantas, en especial a la Bióloga Arely Irasema Ruiz García por brindarme todas las facilidades necesarias para concluir este trabajo.

INDICE DE CONTENIDO

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	6
1.1 Objetivo General	6
1.1.1 Objetivos Específicos.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
2.1 Tratamiento de Agua Residual.....	6
2.2 Aguas Residuales	8
2.3 Tratamiento de Agua Residual México	9
2.4 Nitrógeno y fósforo en el agua residual.....	12
2.5 Microalgas para tratamiento de agua.....	14
2.5.1 Remoción de Nutrientes	14
2.5.2 Formas químicas en las que las microalgas aprovechan el nitrógeno y fósforo	16
2.5.3 Fotobiorreactores.....	18
2.6 Proceso de tratamiento de aguas residuales utilizando microalgas.....	20
2.6.1 Usos e importancia de las microalgas	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Área de trabajo	22
3.2 Aislamiento y cultivo de microalgas	23
3.3 Identificación taxonómica.....	25
3.4 Conteo Celular	25
3.5 Determinación de Sólidos y Biomasa ₆₈₀	25
3.6 Caracterización de la luz.....	27
3.7 Fotobiorreactor.....	27
.....	Error! Bookmark not defined.

3.8	Análisis de componentes principales	29
3.9	Determinación de productor de biomasa y tasa específica de crecimiento 29	
3.10	Eficiencia de remoción de nutrientes	30
3.11	Descripción de los ensayos	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Identificación de cepas.....	31
4.2	Selección de Cepas	37
4.3	Caracterización de la luz (Lámparas).....	38
4.4	Ensayo 1, Crecimiento y Remoción de Nutrientes.....	38
4.5	Ensayo 2, Crecimiento y Remoción de Nutrientes.....	40
4.5.1	Crecimiento celular	40
4.5.2	Efectos del pH y remoción de ortofosfato y amonio.....	41
	44
4.5.3	Análisis de Componentes principales	45
4.6	Ensayo 3, agua de la laguna de oxidación, clarificada y clorada, <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Asterococcus limneticus</i>	49
4.6.1	Crecimiento celular	50
5	CONCLUSIONES	56
6	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	59

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Sistemas de tratamiento de aguas residuales en Nuevo León.	11
Cuadro 2. Composición y método de preparación del Medio Bristol.	23
Cuadro 3. Absorción – Regresión Lineal para peso seco.....	26
Cuadro 4. Características de las cepas aisladas e identificadas. Donde, mayor número de células alto (3), intermedio (2) y bajo (1). Flocula, alto (3), intermedio (2) y bajo (1). Dominante, alto (3), intermedio (2) y bajo (1).	37
Cuadro 5. Intensidad de la luz	38
Cuadro 6. Matriz de correlaciones.....	46
Cuadro 7. Matriz de componente ^a	47
Cuadro 8. Matriz de componente rotado ^a	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de toma de muestra de agua residual en laguna de oxidación localizada en Marín, N.L.....	22
Figura 2. Tubos y matraces inoculados con muestra filtrada.....	24
Figura 3. Area de cultivo: campana de flujo laminar, microplaca, micropipeta, mechero, cajas de Petri.....	24
Figura 4. Regresión Lineal entre concentracion (peso seco (g)) y absorbancia (680nm).....	26
Figura 5. Fotobiorreactor plano vertical.....	27
Figura 6. Sistema de remoción de nutrientes, 10 fotobiorreactores, bombas lámparas en estante asilado.....	28
Figura 7. Asterococcus limneticus y Chlorella vulgaris en sistema de remoción..	29
Figura 8. Chlorella vulgaris, fotografia en microscopio (objetivo 100 X).....	32
Figura 9. Chlorella colonialis, fotografia en microscopio (objetivo 100 X).....	33
Figura 10. Asterococcus limneticus, fotografia en microscopio (objetivo 100 X) ..	34
Figura 11. Mesotaenium, fotografia en microscopio (objetivo 100 X).....	35
Figura 12. Synechococcus, fotografia en microscopio (objetivo 100 X).....	36
Figura 13. Coccomyxa, fotografia en microscopio (objetivo 100 X).....	37
Figura 14. Asterococcus limneticus Crecimiento y Remoción de ortofosfato y amonio.....	39
Figura 15. Chlorella vulgaris. Crecimiento y Remoción de ortofosfato y amonio..	40
Figura 16. Asterococcus limneticus. Crecimiento de biomasa en g L ⁻¹ y Remoción de ortofosfato y amonio.....	42
Figura 17. Asterococcus limneticus, Crecimiento en Células por mililitro y Remoción de ortofosfato y amonio.....	42
Figura 18. Asterococcus limneticus, Crecimiento y cambios de pH.....	43
Figura 19. Chlorella vulgaris, Crecimiento de biomasa en g L ⁻¹ y Remoción de ortofosfato y amonio.....	43
Figura 20. Chlorella vulgaris, Crecimiento en Células por mililitro y Remoción de ortofosfato y amonio.....	44
Figura 21. Chlorella vulgaris. Crecimiento y cambios de pH.....	44
Figura 22. Eficiencia de remoción de nutrientes por C. vulgaris y A. limneticus durante los 20 días del ensayo.....	45
Figura 23. Formación de componentes.....	48
Figura 24. Gráfico de sedimentación, componentes principales.....	49
Figura 25. Chlorella vulgaris, Crecimiento de biomasa en g L ⁻¹ y comparativa de remoción de ortofosfato y amonio en 10 días de ensayo.....	50
Figura 26. Chlorella vulgaris, Crecimiento de biomasa en g L ⁻¹ y remoción de amonio en 10 días de ensayo.....	51
Figura 27. Chlorella vulgaris, Crecimiento de biomasa en g L ⁻¹ y remoción de ortofosfato en 10 días de ensayo.....	51
Figura 28. Chlorella vulgaris. Crecimiento y cambios de pH en 10 días de ensayo.....	52

Figura 29. Asterococcus limneticus, Crecimiento de biomasa en g L-1 y comparativa de remoción de ortofosfato y amonio en 10 días de ensayo.	52
Figura 30. Asterococcus limneticus, Crecimiento de biomasa en g L-1 y remoción de ortofosfato en 10 días de ensayo.	53
Figura 31. Asterococcus limneticus, Crecimiento de biomasa en g L-1 y remoción de amonio en 10 días de ensayo.	53
Figura 32. Asterococcus limneticus Crecimiento y cambios de pH en 10 días de ensayo.....	54
Figura 33. Comparativa de eficiencia de remoción de ortofosfato por C. vulgaris y A. limneticus.	54
Figura 34. Comparativa de eficiencia de remoción de amonio por C. vulgaris y A. limneticus.	55

RESUMEN

Las actividades antropogénicas que destacan porque han generado mayor contaminación en sistemas de agua son la producción agrícola, la industria y la urbanización. Entre los nutrientes de mayor interés debido a sus efectos nocivos en dichos sistemas se encuentran el fósforo y el nitrógeno; que producen el fenómeno conocido como eutrofización, el cual puede poner en riesgo la salud humana, la biodiversidad y la sostenibilidad de los ecosistemas. Por lo tanto, estos sistemas requieren de algún tratamiento para eliminar o disminuir los nutrientes a concentraciones aceptables antes de la descarga.

En la actualidad la utilización de fotobiorreactores con microalgas presenta una alternativa económicamente viable a los métodos aeróbicos convencionales para el tratamiento de aguas residuales.

En esta investigación se aislaron seis cepas de microalgas de muestras de aguas residuales de Marín, Nuevo León, identificadas como *Chlorella vulgaris*, *Asterococcus limneticus*, *Chlorella colonialis*, *Mesotaenium sp.*, *Synechococcus sp.* y *Coccomyxa sp.* De ellas se seleccionaron y cultivaron en un fotobiorreactor con medio Bristol modificado para dos ensayos enfocados en él estudio del crecimiento y remoción de nutrientes; mientras que en un tercer ensayo se empleó agua residual de la laguna de oxidación previamente clorada, como medio de crecimiento y para remoción de nutrientes las cepas de *C. vulgaris* y *A. limneticus*, dichas cepas fueron seleccionadas debido a su capacidad de floculación, dominancia y rápido crecimiento.

En el ensayo uno se registraron el crecimiento celular de las cepas y la remoción de PO_4^{3-} y NH_4^+ durante 20 días, de esta manera *A. limneticus* presentó un crecimiento promedio de 1.05×10^{16} células mL^{-1} con promedios finales de remoción de 89.1% y 88.3% para PO_4^{3-} y NH_4^+ respectivamente y *Chlorella vulgaris* presentó un promedio de 4.73×10^6 células mL^{-1} con una remoción promedio final de 16 % para PO_4^{3-} y 90% para NH_4^+ .

En el ensayo dos, se registraron el crecimiento celular de las cepas, producción de biomasa y la remoción de PO_4^{3-} y NH_4^+ durante 20 días donde, *Chlorella vulgaris* presentó un crecimiento promedio final de 7.50×10^6 células mL^{-1} y 0.51 g l^{-1} de biomasa con una remoción promedio final de 61% para PO_4^{3-} y 100% para NH_4^+ , mientras que *Asterococcus limneticus* presentó un crecimiento promedio final de 8.64×10^6 células mL^{-1} y 0.69 g l^{-1} de biomasa y una remoción final de 82% para PO_4^{3-} y 94% para NH_4^+ .

En el ensayo tres *Asterococcus limneticus* alcanzó una densidad promedio final de 8.64×10^6 células mL^{-1} y 0.69 g l^{-1} de Biomasa con una remoción promedio final de 82% para PO_4^{3-} y 94% para NH_4^+ , mientras que *Chlorella vulgaris* obtuvo 7.50×10^6 células mL^{-1} y 0.51 g l^{-1} de biomasa con una remoción promedio final de 61% para PO_4^{3-} y 100% para NH_4^+ .

ABSTRACT

Agricultural, industrial, and urban activities are major sources of contamination in aquatic systems, with phosphorus and nitrogen being critical nutrients that promote eutrophication. This research explores the use of photobioreactors with microalgae as an economical alternative for treating wastewater loaded with these nutrients.

Six strains of microalgae were isolated from wastewater in Marín, Nuevo León, identifying *Chlorella vulgaris* and *Asterococcus limneticus* for their flocculation ability and rapid growth. In 20-day trials, cell growth and removal of PO_4^{3-} and NH_4^+ were evaluated. *Asterococcus limneticus* showed an average growth of 1.05×10^6 cells mL^{-1} with final removal rates of 89.1% for PO_4^{3-} and 88.3% for NH_4^+ , while *Chlorella vulgaris* reached 4.73×10^6 cells mL^{-1} with removal rates of 16% and 90%, respectively.

Further studies evaluated growth, biomass production, and nutrient removal. *Chlorella vulgaris* showed an average growth of 7.50×10^6 cells mL^{-1} and 0.51 g L^{-1} of biomass, with final removal rates of 61% for PO_4^{3-} and 100% for NH_4^+ . *Asterococcus limneticus* reached 8.64×10^6 cells mL^{-1} and 0.69 g L^{-1} of biomass, with removal rates of 82% and 94%, respectively.

This study highlights the importance of microalgae, particularly *Asterococcus limneticus* and *Chlorella vulgaris*, as effective agents for treating nutrient-laden wastewater, emphasizing their growth capacity and key contaminant removal. These results underscore the viability of photobioreactors to improve water quality and mitigate the impacts of eutrophication in aquatic ecosystems.

INTRODUCCIÓN

La constante necesidad de recursos por el aumento de la población humana ha causado un impacto considerable y constante en los diversos ecosistemas que conforman el planeta Tierra. En años recientes, se ha descubierto que el mal manejo de los recursos naturales tiene un fuerte impacto negativo no solo en la economía si no en un indicador más importante para el desarrollo humano, el de la salud. (Bergougui y Mansoob Murshed, 2023). Por lo que el manejo sostenible de los recursos naturales es fundamental para evitar problemas como la escasez de agua, la degradación de los suelos o la baja productividad agrícola y ganadera, así como el planteamiento de estrategias de tratamiento o remediación son necesarias para resolverlos (Anantha et al., 2021). En este sentido, los recursos presentes en la atmósfera, el suelo y el agua, resultan sensibles a la explotación y la contaminación. La atmósfera de nuestro planeta, se ve afectada por contaminantes primarios como los óxidos de azufre, carbono y nitrógeno, los cuales, después de reacciones químicas y fotoquímicas se transforman en contaminantes secundarios (como H₂SO₄, O₃, CH₄ o peroxiacetilnitrato), además estudios recientes exponen la presencia de contaminantes emergentes derivados de sustancias perfluoroalquiladas, tensoactivos, productos de cuidado personal, compuestos farmacéuticos y drogas lícitas e ilícitas, que tienen efectos negativos en personas, animales y plantas (Barroso et al., 2019). Considerando que las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) se han incrementado en los últimos años y han sido asociadas a graves impactos negativos en el ambiente, como incremento del efecto invernadero y la acidificación del océano (Romero-Freire et al., 2024), es importante buscar alternativas para reducir la concentración de este y una de ellas es su aprovechamiento.

Por otro lado, el suelo, que aporta materiales que son básicos para el sostenimiento y desarrollo del ser humano, se ve afectado por la urbanización e industrialización, la alta demanda de alimentos y la agricultura, lo que resulta por un lado en la acumulación de metales pesados y por otro, en la degradación ecológica masiva, generando zonas muertas alrededor del mundo, eutrofización, infertilidad y, en consecuencia, pérdida de biodiversidad (Correll, 1998; Liu et al., 2022)

Al igual que la contaminación de la atmósfera y el suelo, la contaminación del agua es considerada un problema mundial desde la perspectiva social. La calidad del agua se ve afectada por el desarrollo urbano, la agricultura y la industria que aportan grandes cantidades de fosfato y amonio (Florescu et al. 2010), además de otros tipos de contaminantes que tienen efectos nocivos sobre el agua, por ejemplo, los contaminantes del tipo stock que incluyen a los químicos sintéticos, plásticos no biodegradables, y metales pesados que tienen la característica de acumularse con el paso del tiempo, incrementándose a la par sus efectos nocivos sobre la calidad del agua; similar es el caso de contaminantes como el dióxido de carbono, que tiene efectos nocivos cuando aumenta su cantidad en el agua (Anon 2012.)

Problemas como la eutrofización, que es consecuencia de altas cantidades de fósforo y nitrógeno en ríos y lagos, generan efectos adversos en los ecosistemas como son los florecimientos algales (“algal blooms” en inglés) que son crecimientos abruptos del fitoplancton en aguas continentales o marinas comúnmente asociados con el deterioro de la calidad del agua y en el caso de, mareas rojas, con la muerte de organismos acuáticos (Fink et al., 2018).

Derivado de lo antes mencionado y siguiendo los objetivos del desarrollo sustentable impuesto por la Organización de las Naciones Unidas, en su objetivo número seis, donde menciona que se debe garantizar la disponibilidad de agua y su gestión sostenible, así como el saneamiento para todos; las investigaciones científicas han buscado maneras de remediar los ecosistemas contaminados, algunas de ellas están enfocadas en la remediación de aguas con altas cantidades de nitrógeno y amonio, ya que hasta el 2012, el tratamiento convencional de aguas residuales que realiza la remoción de contaminantes orgánicos, amonio y ortofosfato, deriva en aguas que permanecen con altos niveles de estos compuestos (Boonchai et al., 2012).

En las últimas décadas se han propuesto y desarrollado métodos innovadores para la remoción de estos compuestos, entre ellos las microalgas verdes. Las microalgas, son organismos unicelulares fotosintéticos, responsables de la mitad de la producción mundial anual de O₂, tienen una estructura simple y altos niveles de producción en términos de biomasa (Ashokkumar et al., 2014) ya que son capaces de asimilar CO₂ atmosférico y con la luz lo transforman en biomasa. Además de estos dos, otros factores importantes para su desarrollo son el pH, la alcalinidad, la densidad celular y la presencia de otros microorganismos (Richmond & Hu, 2013) (Markou y Georgakakis, 2011). Al igual que las cantidades adecuadas de macronutrientes como carbono, fósforo, nitrógeno, magnesio, calcio, sulfuro y micronutrientes como zinc, hierro, magnesio y cobre, entre otros (Morais et al., 2022; Procházková et al., 2014; Richmond & Hu, 2013)

Dichas características las vuelven una opción atractiva, viable y sustentable para la producción de comida y combustible (Schoepp et al., 2014), así como para su uso en el tratamiento de aguas residuales con altas cantidades de fósforo y amonio.

Algunos de los compuestos químicos que se extraen de las microalgas dependen del proceso fotosintético. Por lo tanto, la producción de estos compuestos naturales requiere de tecnología nueva e innovadora, como los sistemas cerrados de producción intensiva, en donde se pueden controlar parámetros físicos y químicos y garantizar la alta calidad de los productos (Carlozzi, 2008). Se sabe además que adicionar aire atmosférico enriquecido con CO₂ puede ayudar a promover la división celular. Por lo que en los últimos años se ha investigado la manera de utilizar microalgas para la eliminación de este gas atmosférico utilizándolo como nutrientes, en cultivos en reactores tubulares, planos, de bolsas, en sistemas batch, tanto a nivel laboratorio como al aire libre. los fotobiorreactores los mayormente utilizados en los laboratorios.

Un fotobiorreactor es un recipiente que contiene medio de cultivo formulado a base de sales minerales e incorpora algún tipo de fuente de luz para proporcionar energía fotónica para que la fotosíntesis se realice, por lo que un recipiente transparente podría considerarse como un fotobiorreactor, pero el término es comúnmente utilizado para describir un sistema cerrado, en el que el cultivo de microalgas no interactúa con el ambiente, evitando contaminación con otros microorganismos y pérdida de CO₂, además permite controlar la temperatura y su aireación. A estos sistemas cerrados se les debe agregar un medio de cultivo que garantice el óptimo crecimiento de las microalgas o que se cumplan los objetivos del ensayo (Chisti, 2008; Pulz, 2001).

Los fotobiorreactores cerrados pueden ser construidos o desarrollados con diferentes formas dependiendo de las necesidades de la investigación o proceso de producción, encontrando así, formas tubulares, planos, bolsas, sigmoidal, etc., uno de los más utilizados son los planos verticales ya que necesitan menos espacio y sufren menor pérdida de agua por evaporación. Por otro lado, su construcción puede resultar costosa, debido a los materiales que se utilizan como el vidrio, PVC, plexiglás, madera, cableado, iluminación, sensores, etc. (Pulz, 2001).

Es importante señalar que la eficiencia de los tratamientos de aguas residuales ricas en fosfatos y amonio con microalgas normalmente decrece a bajas temperaturas. Se ha observado que usando un microcosmos simbiótico formado por *Ch. sorokiniana* y *R. basilensis*, la eficiencia de remoción se puede duplicar cuando la temperatura aumenta desde los 25 a los 30° C (Muñoz y Guieysse, 2006).

Por lo anterior la presente investigación propone la construcción y caracterización de un fotobiorreactor a nivel laboratorio para la producción de microalgas nativas aisladas de Marín, N.L., utilizando medio Bristol modificado y agua residual tratada, como fuente de nutrientes; con el objetivo de reducir el amonio (NH₄⁺) y ortofosfato (PO₄³⁻) de dicha composición.

HIPÓTESIS

Las microalgas aisladas de aguas residuales de lagunas de oxidación son capaces de asimilar nutrientes como el fósforo y el amonio, generando así biomasa a diferentes tasas de producción.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

Aislar microalgas de agua residual de una laguna de oxidación que recibe los efluentes municipales del área urbana de Marín, N.L. para evaluar la remoción de ortofosfato y amonio, así como la producción de biomasa en un fotobiorreactor plano vertical.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Aislar microalgas de efluentes municipales de Marín, N.L.
- Construir y caracterizar fotobiorreactores del tipo plano vertical.
- Determinar la cantidad de Biomasa producida en el fotobiorreactor.
- Calcular los porcentajes de remoción de amonio y fosfato.
- Determinación las tasas de producción.

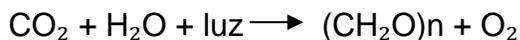
REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Tratamiento de Agua Residual

El tratamiento de agua residual se lleva a cabo en 3 etapas conocidas como primaria, secundaria y terciaria, implementando procedimientos físicos, químicos y biológicos. Durante el tratamiento primario se elimina lo que precipita o asienta fácilmente, mientras que el tratamiento secundario implica procesos físicos y biológicos que degradan la materia orgánica presente en las aguas residuales, la cual se oxida y origina efluentes ricos en nitrato y ortofosfato que dan lugar a la eutrofización y a largo plazo problemas ambientales (Rambabu et al., 2021). Por su parte el tratamiento terciario es un proceso progresivo que busca reducir los

nitratos, fosfatos y materia orgánica, para generar efluentes limpios que puedan ser descargados en cuerpos de agua (Mohamed, 2008).

Las algas verdes, son utilizadas para reducir efluentes con nitratos y fosfatos, ya que son un vasto grupo de organismos fotosintéticos, distribuidos en la biosfera, que crecen bajo una amplia variedad de condiciones desde acuática (agua dulce a salinidad extrema) hasta terrestre. Las de organización más simple, tienen la capacidad de realizar fotosíntesis en una sola célula, por lo que son fáciles de utilizar para la producción de biomasa y la efectiva generación de metabolitos, en un corto periodo de tiempo comparado con las plantas. Sus principales componentes son un núcleo bien definido, pared celular, pirenoide, estigma, flagelos, cloroplasto con clorofila y otros pigmentos y una región densa que contiene gránulos de almidón en su superficie. La reproducción es generalmente por división binaria, con tiempos de duplicación de 8 a 24 horas (o más). La reproducción sexual ocurre por isogamia, heterogamia u oogamia dependiendo del grupo taxonómico y puede aumentar el número de células si es seguida por esporulación o producir cigosporas, clamidosporas u otro tipo de esporas resistentes. Se estima que existen cerca de 1, 000,000 de especies de algas (Richmond & Hu, 2013), pero los registros más actuales suman 50,589 especies, de las cuales 6851 son verdes (Guiry, 2024). Durante el proceso de la fotosíntesis, las microalgas fijan el CO₂ para transformarlo en azúcar, usando luz y agua como energía y fuente de electrones, respectivamente:



Se sabe que la fijación del CO₂ está influenciada por la temperatura, que si es muy alta la atmósfera puede contener NO_x y SO_x que pueden afectar la fijación del mismo, el cual se encuentra a 390 ppm en un nivel atmosférico normal. Otro parámetro importante para la fotosíntesis es el pH, que no debe decrecer de 7 ni sobrepasar de 9. Por otro lado, una óptima intensidad de luz es necesaria para la fijación de CO₂ y producción de biomasa, la cual puede variar entre 30 a 45 W/m² (140-210 μE m⁻²s⁻¹)(Kumar et al., 2011) por ejemplo Khalili et al., (2015). reporta que para *Chlorella* sp y *Scenedesmus* sp, la cantidad de luz adecuada es de 200 μE m⁻²s⁻¹.

Y finalmente dos de los nutrientes más importantes para el óptimo crecimiento de las microalgas son el nitrógeno y el fósforo, presentes en el agua. Por lo que al momento de cultivar microalgas tanto a nivel laboratorio como al aire libre, hay cinco parámetros muy importantes: luz, pH, temperatura, suplementación de dióxido de carbono y concentración de nutrientes (Chen et al., 2015).

2.2 Aguas Residuales

Las aguas residuales se definen, según la Ley de Aguas Nacionales de México, como “aguas de composición variada provenientes de las descargas de usos público urbano, doméstico, industrial, comercial, de servicios, agrícola, pecuario, de las plantas de tratamiento y en general, de cualquier uso, así como la mezcla de ellas” (DOF 24-03-2016). Estas aguas reciben contaminantes de diferentes fuentes de emisión, así como en diferentes cantidades lo cual dependerá del estilo de vida, tipo de tecnologías y tipo de producción que posea la zona emisora (Gray, 2004). Lo que la vuelve una compleja combinación de materiales orgánicos e inorgánicos y compuestos artificiales. Donde podremos encontrar, microorganismos, materiales orgánicos biodegradables, materiales orgánicos como detergentes, pesticidas, aceites, grasas, fenoles, solventes, colorantes, nutrientes como nitrógeno, fósforo y amonio, metales como Ni, Pb, Hg, Cd, Cr y Cu, materiales inorgánicos como ácidos y bases (Henze et al., 1997).

Las aguas residuales generadas por la actividad humana son recolectadas diariamente por el sistema de alcantarillado que lo conduce a la planta de tratamiento de aguas residuales o al punto de disposición final (Rojas, 2002). Dichos sistemas de recolección pueden o no contar con plantas de tratamiento, por lo que en países en desarrollo donde comúnmente no se cuenta con ellas, las aguas residuales se descargan directamente al medio natural, donde gracias a las propias condiciones del cuerpo receptor puede generarse una autodepuración, a través de procesos químicos y biológicos, siendo este un proceso limitado, donde no se puede degradar la materia orgánica en exceso. Es por esto por lo que los medios naturales se ven afectados por la contaminación que ocasiona desequilibrio ecológico, impacto ambiental y a la salud (Noyola et al., 2013).

Por lo tanto, en la planeación de un sistema de tratamiento de aguas residuales se deben considerar los recursos económicos, disponibilidad de herramientas técnicas y profesionistas, así como las características del agua, las cuales dependerán del caudal, el tipo de contaminantes y su concentración, así como los criterios de descarga del efluente tratado y si ira a un cuerpo receptor o si esta agua tendrá otro uso (Noyola et al., 2013). Además, considerando que el objetivo del tratamiento incluye la remoción de nutrientes, la demanda bioquímica de oxígeno, solidos suspendidos, nutrientes y coliformes, es importante también considerar el impacto social y económico que produce la instalación de una planta de tratamiento (Abdelraouf, 2012) y de esta manera proteger la Salud Pública y el Medio Ambiente. En conclusión, al liberar las aguas en un cuerpo natural como mares, ríos o lagos, es necesario realizar un tratamiento para evitar enfermedades causadas por microorganismos patógenos en personas que entren en contacto con esas aguas, así como para proteger el equilibrio ecológico y la conservación de la fauna y flora presentes en el cuerpo receptor (Noyola et al., 2013). Por lo que el tratamiento se divide en diferentes fases que permiten lograr estos objetivos, la primera es conocida como tratamiento preliminar donde se eliminan materiales sólidos grandes

que puedan obstruir las siguientes fases del tratamiento, seguido por el tratamiento primario donde pasan a tanques de sedimentación, ahí se eliminan los sólidos sedimentables por gravedad, posteriormente en el tratamiento secundario el objetivo es reducir la demanda bioquímica de oxígeno, realizado por una población mixta de bacterias heterótrofas que usan la materia orgánica para su crecimiento, estos organismos se mantienen en suspensión mediante la agitación mecánica o mezcla de aire por difusores, posteriormente en el tratamiento terciario el objetivo es la eliminación de iones orgánicos, lo que puede lograrse biológica o químicamente (Abdel-raouf, 2012; Christenson and Sims, 2011; Gray, 2004; Kott et al., 1974).

2.3 Tratamiento de Agua Residual México

En México desde el año 2000 el tratamiento de aguas residuales ha sido tema prioritario, logrando aumentar el porcentaje de agua residual tratada de un 26 a un 36% en los últimos años (De La Peña et al., 2013), ya que si no son tratados los contaminantes en dichas aguas pueden implicar un riesgo para la salud, el ambiente e integridad de los ecosistemas. En nuestro país la Comisión Nacional del Agua es la autoridad responsable de este recurso, quien ha reportado que en el 2012 la cobertura de alcantarillado alcanzaba un 90.5% lo cual significa que el agua captada por estas alcantarillas es la que recibe tratamiento y representa aproximadamente un 47.5% de las aguas captadas (Peña et al., 2013; CONAGUA, 2014). Por esto, en México, la secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales formuló el programa sectorial de medio ambiente y recursos naturales, donde plantea la planeación hídrica con el objetivo de revertir los problemas ambientales del país, aunado al marco normativo que se encarga de regular las descargas de aguas residuales a los cuerpos receptores a través de las siguientes normas:

Norma Oficial Mexicana NOM-001-Semarnat-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas o bienes nacionales (DOF, 1997). Norma Oficial Mexicana NOM-002-Semarnat-1996, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en la descarga de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal (DOF, 1998). Norma Oficial Mexicana NOM-003-Semarnat-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios públicos (DOF, 1998). Norma Oficial Mexicana NOM-004-Semarnat-2001, que establece las especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes en lodos y biosólidos para su aprovechamiento y disposición final (DOF, 2003). Publicada el 15 de agosto de 2003 (DOF, 1998; DOF 2020).

El artículo 115 constitucional menciona que los municipios se encargan de prestar servicio de agua potable y saneamiento a la población, pero se carece de

capacidades técnicas y de gestión; en México la descarga de aguas residuales de origen urbano proviene de viviendas, edificios públicos y de la escorrentía urbana que se colecta en el drenaje, la cual ha aumentado en los últimos años debido al aumento de población y la economía (Jiménez *et al.*, 2010) al punto que este evento actualiza la NOM-001-SEMARNAT-1996, renovando aspectos técnicos que ya no cumplía y la NOM-001-SEMARNAT-2021, menciona que deben ser modificados los límites permisibles de las descargas de las aguas residuales en los cuerpos receptores donde los principales contaminantes son el nitrógeno y fósforo, compuestos orgánicos, bacterias coliformes fecales, materia orgánica, entre muchos otros. En el 2019 en México, los centros urbanos descargaron aproximadamente $250.48 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ de aguas residuales. Los estados con mayor descarga de aguas municipales fueron el estado de México, Ciudad de México, Veracruz, Nuevo León y Michoacán (CONAGUA, 2014; CONAGUA,2021).

En el país los procesos de tratamiento de aguas residuales municipales incluyen lodos activados, discos biológicos, filtros biológicos lagunas de estabilización, lagunas aireadas, filtros biológicos, primario, primario avanzado, reactor anaerobio de flujo ascendente (R.A.F.A.), reactor enzimático, tanque Imhoff y tanque séptico. A través de dichos sistemas, cada año se tratan 145,341.0 l/s (CONAGUA, 2011; CONAGUA,2021).

En el año 2012 se tenían registradas en el inventario nacional de plantas municipales de potabilización y de tratamiento de aguas residuales 2342 plantas en operación, con una capacidad de tratamiento de $140.14 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$; el caudal tratado en ese año fue de $99.75 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$, es decir, el 71% de la capacidad instalada y para diciembre del 2021 se registraron 2872 plantas en operación con una capacidad de 145,341.0 l/s lo que se traduce en un importante incremento en la cobertura nacional de tratamiento de aguas de aguas residuales (CONAGUA, 2013;CONAGUA,2021). Desde el 2012 y hasta el 2021 el agua residual municipal de nuestro país ha recibido tratamiento secundario, principalmente a través de lodos activados en un 14 % y lagunas de estabilización en un 55.4%, estos tratamientos tienen una eficiencia de entre 80 y 90% de remoción de DBO5 (CONAGUA, 2014, CONAGUA, 2021). En Nuevo León se construyó en 1878 el primer sistema de agua entubada en Monterrey, el cual iba desde una acequia llamada de Las Quintas, al pie del Cerro del Obispado, hasta una fuente instalada en la plaza principal, donde la gente podía abastecerse de agua. Es hasta principios del siglo pasado, cuando se inicia la construcción de un moderno sistema de agua potable y drenaje sanitario, planeado para dar servicio a una población de 200 mil habitantes. En 1906, se constituye la Compañía de Agua y Drenaje de Monterrey (The Monterrey Water Works and Sewer Company, Limited) con sede en Toronto, Canadá. Desde entonces el estado de Nuevo León se ha ido adaptando a las necesidades de la población, resolviendo así problemas de abastecimiento y tratamiento. Actualmente, se cuentan 56 plantas municipales de tratamiento de aguas residuales en operación, con una capacidad instalada de 161,62 l/s, tratando un caudal de 12,387.5 l/s. los procesos utilizados en Nuevo León son los filtros biológicos, lagunas de estabilización y lodos activados

(CONAGUA,2021). En el área metropolitana de monterrey bajo la supervisión de Servicios de Agua y Drenaje de Monterrey, se tienen en operación tres plantas de tratamiento de aguas residuales, Dulces Nombres (5,000 l/s), Norte (2,500 l/s) y Noreste (500 l/s). Con el Proyecto Monterrey V, las plantas fueron ampliadas a 7,500, 3,000 y 1,875 L/s respectivamente (Santa Rosa no se amplió), quedando actualmente la capacidad instalada en 12,575 l/s, además el programa de saneamiento se encuentra implementado también en los municipios del área foránea, a través de 50 Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales, que actualmente están en Operación, de los cuales 33 son Plantas de Tratamiento y 17 Lagunas de Estabilización y están ubicadas en las cabeceras municipales y poblados importantes según la siguiente relación:

Cuadro 1. Sistemas de tratamiento de aguas residuales en Nuevo León.

PROCESO	SISTEMA	GASTO, L s ⁻¹	
		Diseño	jun-18
Lodos activados	PTAR Allende	150.00	81.61
Lodos activados	PTAR Cadereyta	250.00	141.15
Lodos activados	PTAR Cadereyta2	140.00	74.95
Lodos activados	PTAR García	175.00	108.01
Lodos activados	PTAR Pesquería	25.00	16.65
Lodos activados	PTAR Pesquería 2	140.00	60.99
Lodos activados	PTAR Santiago	200.00	156.24
Lodos activados	PTAR Salinas Victoria	40.00	16.82
Lodos activados	PTAR San Antonio Allende	2.00	0.04
Lodos activados	PTAR San Miguel Interpuerto	50.00	29.59
Lodos activados	PTAR San Juan	5.00	1.91
Lodos activados	PTAR Terán	25.00	9.68
Lodos activados	PTAR Calles	5.00	0.98
Lodos activados	PTAR Montemorelos	75.00	72.52
Lodos activados	PTAR Linares	200.00	173.37
Lodos activados	PTAR China	28.00	9.59
Lodos activados	PTAR Montemorelos 2	140.00	48.89
Lodos activados	PTAR EL Fraile	5.00	0.21
Lodos activados	PTAR Anáhuac	50.00	36.63
Lodos activados	PTAR Abasolo	5.00	2.19
Lodos activados	PTAR Bustamante	10.00	6.55
Lodos activados	PTAR Colombia	10.00	1.63
Lodos activados	PTAR Higueras	5.00	3.88
Lodos activados	PTAR Mina	5.00	7.41
Lodos activados	PTAR Paras	5.00	1.48
Lodos activados	PTAR Sabinas	150.00	75.34
Lodos activados	PTAR Vallecillo	5.00	0.78
Lodos activados	PTAR Zuazua	350.00	169.63
Lodos activados	PTAR Arramberri	5.00	2.08
Lodos activados	PTAR Galeana	15.00	10.41

Lodos activados	PTAR Iturbide	5.00	2.18
Lodos activados	PTAR La Ascencion	5.00	1.59
Lodos activados	PTAR Mier y Noriega	5.00	1.99
Lodos activados	PTAR Zaragoza	2.00	2.08
Laguna oxidación	Laguna Agualeguas	15.00	2.87
Laguna oxidación	Laguna Lampazos	15.00	2.00
Laguna oxidación	Laguna Cerralvo	25.00	21.70
Laguna oxidación	Laguna M. Ocampo	10.00	2.77
Laguna oxidación	Laguna Dr. Gonzalez	25.00	6.13
Laguna oxidación	Laguna Hualahuises	15.00	10.00
Laguna oxidación	Laguna Hidalgo	15.00	17.13
Laguna oxidación	Laguna El Carmen	20.00	16.67
Laguna oxidación	Laguna Cienega de Flores	25.00	6.47
Laguna oxidación	Laguna Marin	25.00	7.80
Laguna oxidación	Laguna Los Ramones	10.00	3.23
Laguna oxidación	Laguna Los Herrera	15.00	3.83
Laguna oxidación	Laguna Atongo	15.00	1.00
Laguna oxidación	Laguna Gral. Bravo	15.00	2.77
Laguna oxidación	Laguna Treviño	10.00	1.93
Laguna oxidación	Laguna Villaldama	15.00	2.83
Laguna oxidación	Laguna Dr. Arroyo	25.00	11.09
	TOTAL	2,582.00	1,449.26

Aunque en México el agua recibe tratamiento, las plantas no son eficaces ni eficientes a través del país, sobre todo en la aplicación de sistemas terciarios que garanticen la eliminación de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo que, al estar presentes en altas concentraciones en los caudales arrojados a los ríos, pueden provocar eutrofización que provoca daños a la salud humana y a los ecosistemas.

2.4 Nitrógeno y fósforo en el agua residual

La contaminación del agua es un problema mundial que aumenta día a día a la par con la demanda de este recurso, uno de los contaminantes que se encuentran comúnmente en las aguas residuales municipales, industriales, agrícolas, etc. es el nitrógeno, que es perjudicial para la salud y el ambiente.

Se puede encontrar al nitrógeno en tres formas predominantes en las aguas residuales, como 1- nitrógeno orgánico, que incluye aminas, aminoácidos y proteínas entre otros, también como 2- amoniacal ($\text{NH}_3 \leftrightarrow \text{NH}_4^+$) proveniente de la descomposición del nitrógeno orgánico, como amoniaco que depende del pH, el cual puede generar malos olores o como amonio que es soluble en agua y finalmente 3- Nitrato (NO_3^-), que es la forma del nitrógeno oxidada por completo,

pasando de amonio a nitrato (Bradley *et al.*, 2010). Esta forma puede convertirse a nitrito en el cuerpo humano, causando metahemoglobinemia en adultos y en menores el síndrome del bebé azul. En México los límites permisibles son: nitratos, 10.00 mgL^{-1} , nitritos 0.05 mgL^{-1} y nitrógeno amoniacal 0.50 mgL^{-1} (DOF, 1994).

La remoción de nitrógeno de las aguas residuales se realiza por lo general mediante procesos biológicos en los que bacterias autotróficas nitrificantes y heterótrofas desnitrificantes en condiciones aerobias y anaerobias respectivamente completan el proceso donde el amonio y el nitrato son oxidados y gradualmente convertidos en nitrógeno elemental (N_2), que al ser un gas se libera al ambiente, desapareciendo así del agua (Crites y Tchobanoglous, 1998; Huang *et al.*, 2017).

Esto sucede gracias a la actividad microbiológica de los géneros *Nitrosomonas* y *Nitrosococcus* (encargadas de convertir amonio a nitrito) y de *Nitrobacter* y *Nitrospira*, especies como *Pseudomonas pneumoniae*, *Acinetobacter junii*, entre otras (se encargan de convertir nitrito a nitrato) (Crites y Tchobanoglous, 1998; Zhang *et al.*, 2011). La desventaja de este proceso biológico es que las aguas residuales tienen diferentes características físicas y químicas, lo que lo vuelve complejo de desarrollar, el crecimiento de los microorganismos nitrificantes depende del oxígeno, que resulta tóxico para los microorganismos desnitrificantes, mientras que la materia orgánica afecta el crecimiento de los nitrificantes, pero es importante para los desnitrificantes, por lo que las condiciones ideales para el proceso son poco probables (Kim *et al.*, 2006; Rittmann y McCarty, 2001). Esto implica el desarrollo de otras tecnologías capaces de eliminar este contaminante.

Junto con el nitrógeno, el fósforo, forma parte de los elementos que producen eutrofización; ya que se encuentra en las aguas residuales municipales por el uso de detergentes o como parte de excreciones humanas. El fósforo se encuentra principalmente en la litosfera y es elemental en los procesos biológicos, ya que no puede ser sustituido por otro elemento y es importante en procesos bioquímicos y fisiológicos, así que es un elemento esencial para la vida (Beuckels *et al.*, 2015). El fósforo se absorbe por las plantas en su forma inorgánica (PO_4^{3-}) mientras que las algas lo pueden hidrolizar a su forma orgánica y consumirlo, por lo que su presencia en exceso en cuerpos de agua estimula el crecimiento de estos organismos, lo que genera eutrofización, por lo que es importante retirarlo de manera eficiente de los cuerpos de agua.

Es común que el proceso para remover el fósforo sea por precipitación química con sales de aluminio o hierro para formar aluminio o fosfato férrico (Larsdotter, 2006a); también se utilizan superficies cargadas positivamente, como la caliza, zeolita, etc. (Henze *et al.*, 2008). Además de estos procesos químicos, se utilizan medios biológicos, como los lodos activados, donde las bacterias acumulan el fósforo por los cambios en las condiciones aerobias y anaerobias, de manera que cuando el ambiente es anaeróbico, el fosforo almacenado que utilizan las bacterias como fuente de energía para tomar sustrato y así es liberado, por otro lado en condiciones anaeróbicas el fosforo previamente liberado es captado por las células, de esta manera logrando así una absorción neta de este nutriente (Bitton, 2011).

La medición del fósforo total incluye distintos compuestos como diversos ortofosfatos, polifosfatos y fósforo orgánico. La determinación se hace convirtiendo todos ellos en ortofosfato (PO_4^{3-}) cuya concentración es la que se determina por análisis químico (Correll, 1998).

2.5 Microalgas para tratamiento de agua

2.5.1 Remoción de Nutrientes

Como se mencionó anteriormente los lodos activados son los mayormente usados en nuestro país para la remoción de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno, de las aguas residuales. Siendo estos procesos poco eficientes debido a las condiciones fisicoquímicas necesarias para que se lleven a cabo con remociones significativas, por lo que los efluentes secundarios siguen siendo ricos en dichos nutrientes. La literatura menciona que un efluente secundario doméstico contiene $5\text{--}30 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrógeno total y $0.2\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$ de fósforo total (Wang et al., 2017), lo que puede causar el enriquecimiento de nutrientes y la eutrofización en los cuerpos receptores (Petala et al., 2009). Por lo tanto, la eliminación avanzada de nitrógeno y fósforo del efluente secundario se está convirtiendo en una prioridad importante en el tratamiento de aguas; a continuación, se describe el tratamiento de estos nutrientes. La eliminación de nutrientes en las plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas modernas generalmente incluye la etapa biológica secundaria, y se logra mediante procesos bien conocidos como la nitrificación, desnitrificación y eliminación biológica de fósforo (Ekama, 2015), llamados en conjunto remoción biológica de nutrientes (RBN). La nitrificación se implementa de manera práctica y exitosa en la etapa aeróbica de la mayoría de los tratamientos biológicos clásicos, pero la desnitrificación y la eliminación de fósforo no pueden considerarse en el diseño de la planta (plantas con tecnologías limitadas) o pueden no funcionar correctamente en las plantas modernas debido a los costos de operación o la falta de materia orgánica prehidrolizada fácilmente biodegradable en las aguas residuales, lo cual es un requisito importante (Zeng et al., 2015). Por lo tanto, es habitual que la eliminación de nitrógeno y fósforo no sea satisfactoria, ocasionando así impactos ambientales adversos.

Debido a este problema, actualmente existen diferentes sistemas terciarios para la eliminación de nitrato y fosfato en los efluentes secundarios. Algunos de ellos se basan en fundamentos fisicoquímicos, pero se asocian con costos significativos debido al consumo de reactivos químicos. Una alternativa a tales métodos fisicoquímicos puede ser la eliminación de nutrientes biológicos utilizando microalgas y fotobiorreactores. Actualmente, existe mucha información en la literatura científica sobre el uso de microalgas para la eliminación de nitrógeno y fósforo en aguas residuales (Cai et al., 2013). Se puede lograr a través de un proceso fotosintético autótrofo capaz de tratar un efluente secundario sin materia orgánica biodegradable.

Un ejemplo de este tratamiento es la implementación del metabolismo que utilizan las microalgas para asimilar y transformar compuestos para la generación de biomasa integrando nutrientes como el nitrógeno y fósforo en sus biomoléculas para la síntesis de fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos, siendo así organismos capaces de remediar aguas residuales al retirar una alta cantidad de nutrientes en los efluentes secundarios.

Las microalgas también se pueden usar en procesos mixotróficos, una combinación de tratamiento biológico heterotrófico y autótrofo en el que las bacterias y las microalgas eliminan simultáneamente el carbono orgánico, el dióxido de carbono de la respiración heterotrófica, el nitrógeno y el fósforo (Zeng et al., 2015). Además de la captura de nutrientes, fotosintética autótrofa, los procesos que utilizan microalgas para la remoción de nutrientes han sido ampliamente utilizados para la eliminación de dióxido de carbono en los gases de combustión de escape y para la producción de biomasa de microalgas debido a sus múltiples usos. A diferencia de los lodos activados de las plantas de tratamiento de aguas residuales, la biomasa de microalgas se considera una materia prima valiosa en lugar de un residuo biológico, ya que dicha biomasa puede utilizarse para la producción de aceites o como fertilizante después de someterlas a distintos procesos (Villaseñor Camacho et al., 2018).

Las microalgas más comúnmente utilizadas son del género *Chlorella*, con especies como *Chlorella vulgaris*, *Chlorella variabilis*, *Chlorella sorokiniana*, también destacan otras especies como *Scenedesmus abundans*, *Scenedesmus obliquus* y *Spirulina subsalsa*.

En 2021 Tran y colaboradores cultivaron *Chlorella variabilis* en agua residual doméstica usando diferentes tipos de biorreactores cerrados y reactores abiertos, donde la mayor concentración de biomasa se presentó en el reactor abierto con 1.72 gL^{-1} y entre 1.52 y 1.67 gL^{-1} en los reactores cerrados con una tasa de crecimiento de 0.22 a $0.32/$ día para los fotobiorreactores cerrados y $0.34/$ día en el abierto; durante los 14-17 días de ensayo, se removieron entre el 74 y 97% de nitrógeno y 89 a 99% de fósforo, por lo que consideran que esta especie puede ser efectivamente utilizada para remplazar a los lodos activados en las tecnologías para el tratamiento de agua residual doméstica.

Por otro lado Leite y colaboradores en 2019 cultivaron *Chlorella sorokiniana* en una mezcla de aguas residuales que incluían aguas domésticas y aguas porcícolas, en tres fotobiorreactores planos, durante cuatro semanas se monitoreo la remoción de ortofosfato y amonio, obteniendo resultados de remoción entre los 46 a 56% para ortofosfato y un 100% para amonio.

Otra alga frecuentemente utilizada en los procesos de remoción de nutrientes, también perteneciente al género *Chlorella*, es *Chlorella vulgairs*, que fue cultivada en un medio sintético con cantidades de nitrógeno y fósforo similares a las que se encuentran en efluentes secundarios, y enriquecido con CO_2 en un rango desde la cantidad encontrada en el aire atmosférico hasta 10% (v/v), teniendo como resultado que la concentración ptima de CO_2 para el crecimiento de esta alga es $5.35 \pm 0.34\%$ (v/v), con remoción de nutrientes cercana al 100% (Gonçalves et al., 2016). Al igual que Leite, Arias y sus colaboradores en 2018, registraron una

remoción total de amonio, utilizando un cultivo de *Scenedesmus* sp. en un fotobiorreactor cerrado de 30 litros con agua residual proveniente de un efluente secundario. Por otro lado, Hernández *et al.* (2010), evaluaron la capacidad para remover amonio y ortofosfato utilizando cultivos de *Chlorella vulgaris* y *Spirulina subsalsa*, dichas algas fueron inoculadas en agua residual artificial con concentraciones iniciales de 10 mgL^{-1} de NH_4^+ y 5 mgL^{-1} de PO_4^{3-} , para un ensayo con concentraciones bajas y otro con concentraciones iniciales altas de 25 mgL^{-1} de NH_4^+ y 10 mgL^{-1} de PO_4^{3-} , dichos cultivos se colocaron en soportes de lufa y polietileno con el objetivo de mantenerlas inmovilizadas, además se realizaron cultivos libres y mixtos (con las dos cepas de algas), teniendo como resultado que los cultivos inmovilizados tuvieron un mayor porcentaje de remoción con 50% para NH_4^+ y un 74% para PO_4^{3-} , mientras que los cultivos mixtos lo presentaron en el ensayo con las altas concentraciones con 68% para NH_4^+ y 76% de PO_4^{3-} , el ensayo que presentó mayor remoción fue el cultivo mixto inmovilizado con una remoción de nutrientes para NH_4^+ de 70 a 99.9% y de PO_4^{3-} del 72.1 al 89.9%, respectivamente; demostrando así la capacidad de dichas algas para la remoción de nutrientes y que el uso de soportes resulta no solo beneficioso para el consumo de nutrientes sino que también para la realización de cosecha de biomasa algal, haciendo así más económico y eficiente dicho proceso.

Resultados similares a los anteriormente señalados obtuvieron Su y colaboradores en 2012 cuando cultivaron tres especies de algas verdes, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus rubescens* con eficiencias de remoción de nitrógeno y fósforo del 99% a los 7, 4 y 6 días para nitrógeno y 4, 2 y 3 para fósforo respectivamente, con una producción de biomasa entre los $6 \text{ g/m}^2/\text{día}$.

2.5.2 Formas químicas en las que las microalgas aprovechan el nitrógeno y fósforo

Las microalgas son microorganismos de diversos tamaños y formas, normalmente acuáticas y unicelulares, que habitan zonas acuáticas con un amplio rango de variables medioambientales, como agua dulce, agua salada y aguas residuales, que a través de la fotosíntesis al utilizar luz y dióxido de carbono se multiplican y generan biomasa (Maizatul *et al.*, 2017; Yaakob *et al.*, 2021). Algunos de los factores clave para el crecimiento de las microalgas son la disponibilidad de luz, salinidad, temperatura y la cantidad, calidad de nutrientes y pH ya que los ambientes ácidos pueden afectar la absorción (Abinandan y Shanthakumar, 2015), entre ellos el nitrógeno y el fósforo. El fósforo es considerado un nutriente significativo para el crecimiento de las microalgas, tan es así que al no encontrarse en suficiente cantidad puede limitar el crecimiento microalgal, por lo que se requiere un aproximado de 0.03-0.06% en un medio para favorecer el crecimiento, siendo así el crecimiento directamente proporcional al consumo de fósforo en cualquiera

de sus formas (Procházková et al., 2014), además también juega un rol importante para la producción de componentes celulares como fosfolípidos, DNA, RNA, ATP, lípidos, ácidos grasos y para procesos metabólicos como la transferencia de energía y fotosíntesis (Wu et al., 2017). La manera en la que las algas pueden tomar el fósforo es en la forma de polifosfato u ortofosfato, molécula con un átomo de fósforo rodeado por cuatro átomos de oxígeno, esto ocurre cuando el fósforo orgánico disponible, es hidrolizado a PO_4^{3-} por la enzima extracelular alcalina fosfatasa (Correll, 1988). Es importante mencionar que se ha observado que las microalgas realizan una actividad conocida en inglés como “luxury consumption” o consumo en bonanza donde hay una alta eficiencia de absorción de fosfato inorgánico de entre un 70 a 90% en aguas residuales (Mulbry et al., 2008).

Al igual que el fósforo, el nitrógeno juega un papel importante para el crecimiento de las microalgas, lo usan en la producción de proteínas, lípidos y síntesis de carbohidratos, siendo así el segundo nutriente con mayor importancia después del carbono, representando hasta el 10% de la biomasa, por lo que se considera a las microalgas organismos que logran una mayor eliminación de nitrógeno de las aguas residuales (Yodsuwan et al., 2017). Por lo que tiene un papel muy significativo en el crecimiento de la microalga, ya que una escasa cantidad de nitrógeno en el medio puede disminuir la producción de biomasa, pero aumentar la producción de lípidos debido al estrés provocado en el microorganismo (Yodsuwan et al., 2017). La forma en que las microalgas asimilan el nitrógeno es el nitrato, nitrito, urea y amonio, siendo el amonio el mayormente utilizado por su disponibilidad, sin embargo, en altas concentraciones, por encima de 20 mgL^{-1} puede ser tóxico para las células, por lo que el nitrato (NO_3^-) es más comúnmente usado en los medios de cultivo (Yodsuwan et al., 2017; Procházková et al., 2014). Por otro lado, el aumento del pH en los cultivos de algas produce que el nitrógeno pueda ser también volatilizado además de consumido. Al igual que con el fósforo las microalgas realizan el proceso de consumo en bonanza donde asimilan grandes cantidades de nitrógeno, que será utilizado posteriormente cuando sea requerido (Larsdotter, 2006).

Finalmente, tanto el fósforo como el nitrógeno son nutrientes clave para el crecimiento y desarrollo de las microalgas, favoreciéndolo o limitándolo según el efluente o medio de cultivo, gracias a esto dichos organismos han sido utilizados en las últimas décadas como opción para la remoción de nutrientes, tan es así que en Borowitzka & Moheimani (2013) estableció que en la interacción de microalga fósforo y nitrógeno con una concentración de 30:1 favorece la eliminación de fósforo, mientras que una proporción de 5:1 la eliminación de nitrógeno.

2.5.3 Fotobiorreactores

Una de las ventajas de utilizar reactores para el cultivo de microalgas y remoción de nutrientes es que hay una amplia gama de diseños, los cuales se pueden adaptar a las necesidades de la especie, el tipo de remoción y biomasa que se busque obtener, entre ellos se encuentran los estanques de producción elevada (“High rate algal pond”). Estos sistemas son adaptables y proporcionan un enfoque particularmente rentable al tiempo que son competitivos en costos para el tratamiento de residuos. Los sistemas de HRAP incorporan muchas mejoras en estanques de tratamiento de aguas residuales convencionales. Requieren un área de tierra similar o menor, eliminación de lodos, producen poco olor y son capaces de proporcionar consistentemente un mayor grado de eliminación de nutrientes y desinfección (Park et al., 2011). Además, los sistemas HRAP son mucho más fáciles de operar y más económicos que los sistemas de tratamiento mecánico y tienen los beneficios colaterales de mejorar la producción de algas para uso benéfico (alimento o biocombustible), recuperar nutrientes de aguas residuales para uso como fertilizantes y compensar las emisiones de gases de efecto invernadero. Los sistemas HRAP son un desarrollo avanzado de sistemas integrados por estanques de aguas residuales (AIWPS) que fueron desarrollados por Oswald y colaboradores en la Universidad de California en Berkeley desde fines de la década de 1950 (Craggs et al., 2014). El potencial de producción de biomasa en el tratamiento de aguas residuales en un HRAP es mayor en términos de rendimiento, composición elemental / química y mayor valor calórico y la fase acuosa tiene un gran potencial para ser utilizada como fuente de amoníaco para el cultivo adicional de algas y el residuo sólido podría usarse como fuente de combustible de proceso (Mehrabadi, et al 2016).

Fotobiorreactor cerrado: Un PBR se puede caracterizar como un recipiente de cultivo cerrado con iluminación diseñado para la producción controlada de biomasa. PBR se refiere a sistemas cerrados que están cerrados al ambiente sin intercambio directo de gases y contaminantes con el medio ambiente. Evalúan la capacidad para remover amonio (NH_4^+) y ortofosfato (PO_4^{3-}) por cultivos libres e inmovilizados de microalgas, a partir de agua residual (De-Bashan et al., 2004).

Planos con burbujeo “flat airlift”: El reactor de panel plano tiene forma cuboidal con una trayectoria de luz mínima. Puede estar hecho de materiales transparentes como vidrio, plexiglás y policarbonato. Se caracteriza por una alta relación área superficial / volumen y sistemas de desconexión de gas abiertos. La agitación se proporciona burbujeando aire desde un lado a través del tubo perforado o girándolo mecánicamente a través del motor. Algunos trabajos aplicados especialmente al estudio de biorreactores de elevación de aire mostraron los beneficios de este tipo de reactor en comparación con los convencionales (baja disipación de energía, circulación de fluido controlada, buena distribución de luz, calor efectivo y disipación de luz, etc.) En un air lift se podría obtener una buena

mezcla en el biorreactor de elevación de aire sin causar demasiada fuerza de corte en la fase líquida, lo que podría inhibir el crecimiento de las algas. Además, el patrón de circulación bien definido resulta en una mejor utilización de la luz, particularmente para el sistema con alta densidad de células (Azlina et al., 2015).

Estos reactores pueden ser relativamente grandes (0.19 m de diámetro de columna, 2 m de altura, 0.06 m³ de volumen de trabajo) con una columna exterior de inyección de aire, para el levantamiento del aire (un cilindro dividido y un dispositivo de puente aéreo con tubo de aspiración) para el cultivo en lote alimentado monoséptico de la microalga *Phaeodactylum tricornutum*. Los fotobiorreactores produjeron perfiles de biomasa similares en función del tiempo y la concentración final de biomasa (~4 kg m⁻³). La tasa máxima específica de crecimiento observada dentro de un período iluminado diario en la fase de crecimiento exponencial tuvo un valor de 0.08 h⁻¹ en el tercer día de cultivo. Debido a las pérdidas nocturnas de biomasa, la tasa de crecimiento específica promediada durante los 4 días de la fase exponencial fue 0.021 h⁻¹ para los tres reactores (Slegers et al., 2011). La biomasa en los reactores de columnas verticales no presentó fotoinhibición en condiciones (promedio fotosintéticamente activo promediado valor de irradiancia de 1150 ± 52 E m⁻² s⁻¹) que se sabe que causan la fotoinhibición en reactores de bucle horizontal convencionales de tubo delgado. Debido a la buena transferencia de masa gas-líquido, la concentración de oxígeno disuelto en los reactores en la fotosíntesis máxima permaneció <120% de saturación de aire; por lo tanto, no se produjo la inhibición de oxígeno de la fotosíntesis y la fotooxidación de la biomasa, mientras que la acumulación de carbohidratos por la biomasa se favoreció durante el crecimiento lineal limitado a la luz. Por otro lado, una intensidad de luz decreciente causó más de cinco veces el aumento de carotenoides celulares, pero las clorofilas aumentaron solo alrededor de 2,5 veces durante el transcurso del cultivo. En la fase estacionaria, hasta un 2% de la biomasa fue clorofila y los carotenoides constituyeron hasta 0.5% del peso seco de la biomasa (Sánchez Mirón et al., 2002).

Otro sistema en el que se utilizan las microalgas para la remoción de nutrientes es conocido como reactor rotativo de microalgas, que consiste en un cilindro provisto con una superficie de crecimiento parcialmente sumergida en aguas residuales. El cilindro se gira para exponer alternativamente la superficie de crecimiento a las aguas residuales y el aire. En el estudio realizado por Christenson y Sims, se diseñó, construyó y probó un nuevo reactor rotativo de biopelícula de algas (RABR) a escala laboratorio (8 L), medio (535 L) y piloto (8,000 L). El RABR fue diseñado para operar en las condiciones fotoautótrofas del tratamiento de aguas residuales terciarias abiertas, produciendo biofilms de cultivos mixtos compuestos por algas y bacterias. Por lo que consideraron las condiciones del sustrato óptimas para el crecimiento microalgal. El RABR logró una reducción de nutrientes efectiva, con tasas de eliminación promedio de 2.1 y 14.1 gm⁻² día⁻¹ para el fósforo total

disuelto y el nitrógeno total disuelto, respectivamente. A la par desarrollaron una técnica eficiente de recolección de biomasa para obtener el producto concentrado para su posterior procesamiento en la producción de biocombustibles y bioproductos (Christenson & Sims, 2011).

2.6 Proceso de tratamiento de aguas residuales utilizando microalgas

El agua es un recurso de alto valor ya que se utiliza en gran cantidad de procesos antropogénicos, es por esto que los sistemas de tratamiento de agua residuales son importantes para su reúso, conservar el ciclo del agua, disminuir la contaminación de los cuerpos receptores, proteger la salud humana y en general mantener los ecosistemas; en consecuencia se sigue investigando e innovando con nuevos modelos más eficientes, entre ellos se encuentra la utilización de microalgas, como un proceso terciario, que además de asimilar gran cantidad de nutrientes derivados de diferentes efluentes (aguas domésticas, ganaderas, porcícolas e industriales) ayuda a la eliminación de minerales tóxicos como plomo, cadmio, mercurio, escandio, estaño, arsénico y bromo, y puede otorgar un producto utilizable, como biomasa, lípidos, etc. En los tratamientos de agua convencionales, durante el tratamiento secundario de aguas residuales se utilizan lodos activados para eliminar materia orgánica, mientras que en el terciario se busca eliminar fosfatos, nitrógeno, amonio y urea, nutrientes importantes de retirar para evitar la eutrofización de los cuerpos receptores empleando radiación ultravioleta con dosificación de hipoclorito sódico. Enseguida, por lo que los altos costos de energía aplicando el tratamiento terciario asociado a la necesidad de aireación y fuentes de carbono, lo vuelve problemático, poco eficiente y cuatro veces más costoso que el tratamiento primario (Abdel-raouf, 2012b., Morais et al., 2022). Es por lo que el uso de microalgas como tratamiento terciario resulta una alternativa sustentable, con baja emisión de gases de efecto invernadero, fomentar el reúso ya que después del tratamiento las aguas pueden utilizarse para riego disminuyendo así el impacto ambiental. Además, la utilización de fotobiorreactores garantiza una eficiente producción de biomasa, con un costo beneficio positivo (Richmond & Hu, 2013.), donde pueden utilizarse gran variedad de diseños dependiendo de los requerimientos de producción de biomasa y remoción de nutrientes. Los fotobiorreactores más utilizados son los llamados “raceway pond” en inglés que son reactores abiertos donde el agua está en movimiento constante, suelen tener bajos costos de operación y ser fáciles de emplear.

2.6.1 Usos e importancia de las microalgas

La biomasa de microalgas se considera una materia prima valiosa en lugar de un residuo biológico (Villaseñor Camacho et al., 2018). Las microalgas han sido consideradas como materia prima para la producción de biocombustibles como el biodiesel, bioetanol, metano y biohidrógeno (Chisti, 2008). Los biocombustibles más comunes son el biodiesel y bioetanol que pueden sustituir al diésel y a la gasolina respectivamente. Son principalmente producidos a partir de biomasa o fuentes de energía renovables, contribuyendo a emisiones más bajas de combustión que los combustibles fósiles por salida de potencia equivalente (Christenson & Sims, 2011a). Además, estudios recientes que implican el análisis del ciclo de vida microalgal, han indicado que el uso de agua residual como fuente de agua y nutrientes para el cultivo de éstas podría contribuir de manera importante en el decremento del costo de producción de microlagas. Dentro de este contexto, se han propuesto sistemas con doble propósito, es decir, tratamiento de aguas residuales y producción de biomasa microalgal como una de las principales estrategias para la producción de biodiesel a un costo competitivo (Olguin, 2012).

A la fecha solo algunos géneros de microalgas como, *Arthrospira*, *Haematococcus*, *Chlorella*, y *Dunaliella* han sido cultivados de forma económicamente viable, debido a sus características en cuanto a contenido proteico, acumulación de lípidos y producción de pigmentos (Rosenberg et al., 2008). Por otro lado, géneros como *Nannochloropsis*, *Scenedesmus* y *Porphyridium* han sido sugeridos como candidatos potenciales para la generación de bio-productos o bio-combustibles (Arad y Levy-Ontman, 2010). En 2014, Olguín y colaboradores reportan un porcentaje lipídico del 22.4 % en la microlaga *Neochloris oleoabundans*, que fue cultivada en un fotobiorreactor plano con agua residual proveniente de una granja porcina disuelta en un 7.4 %.

Por lo tanto, las microalgas tienen la capacidad de asimilar gran cantidad de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno, que suelen ser difíciles de eliminar de los efluentes tratados en procesos primarios y secundarios, por lo que es importante identificar, aislar y determinar sus capacidades de remoción para su posterior utilización en un posible tratamiento terciario que disminuya las cantidades de estos elementos para su posterior reúso o liberación a cuerpos naturales sin ocasionar repercusiones negativas a los ecosistemas con procesos como la eutrofización, además la biomasa microalgal generada tiene la capacidad de utilizarse como fertilizante, para la producción de lípidos, entre otros, otorgando así un valor agregado al tratamiento de agua residual.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Área de trabajo

Las muestras de agua residual fueron colectadas del desagüe de agua residual del municipio de Marín, N.L. (Fig. 1). Se utilizaron seis frascos de boca angosta autoclavable fabricado en copolímero de polipropileno de un litro. Con un tipo de muestreo puntual.

La experimentación se llevó a cabo en el laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Suelos Aguas y Plantas de la Facultad de Agronomía y en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL.



Figura 1. Área de toma de muestra de agua residual en laguna de oxidación localizada en Marín, N.L

El primero de Julio del 2016, se acudió al municipio de Marín, Nuevo León (Fig.1), donde una laguna de oxidación recibe las aguas domésticas para su tratamiento, de ahí se tomaron seis litros de muestra de agua residual de manera puntual, se tomaron datos de temperatura y pH, registrándose 29°C y 9 respectivamente. Posteriormente los 6 litros de muestra fueron trasladados al laboratorio de Remediación Ambiental y Análisis de Suelos Aguas y Plantas de la Facultad de Agronomía UANL donde mediante el método de reflujo abierto se determinó una DQO de 505 mgL⁻¹ y se registraron 40 mg mL⁻¹ de PO₄³⁻ y 35 mg mL⁻¹ NH₄⁺.

3.2 Aislamiento y cultivo de microalgas

Las muestras de agua residual fueron filtradas en un ambiente estéril dentro de una campana de flujo laminar.

En una campana de flujo laminar se colocó una bomba de vacío, donde se utilizaron dos filtros, uno de 0.7 μm y uno de 1.5 μm , en cada uno se vertieron 100 ml de agua residual. Las microalgas quedaron retenidas en los filtros, los cuales se limpiaron con agua destilada que fue colocada en un matraz con medio Bristol (Cuadro 2), mientras que el filtro fue colocado en una caja Petri con medio Bristol y agar.

Cuadro 2. Composición y método de preparación del Medio Bristol.

Medio Bristol	
* Soluciones Patrones de Macronutrientes.	
Nitrato de Sodio.....	10 g
Cloruro de Calcio Dihidratado.....	1 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado....	3 g
Fosfato de Potasio, dibásico.....	7 g
Fosfato de Potasio, monobásico.....	3 g
Cloruro de Sodio.....	1 g
Método de preparación stock:	
1) Disolver cada una de las sales en 400 ml de agua destilada o desmineralizada.	
2) Almacenar las 6 soluciones en frascos color ámbar y en refrigeración.	
Método preparación:	
1) A 900 ml de agua destilada agregar, 10 ml de cada una de las soluciones de Macronutrientes.	
2) Esterilizar durante 15 minutos a 15 libras de presión (121 °C).	
Composición final:	
Nitrato de Sodio.....	2.94 mM
Cloruro de Calcio Dihidratado.....	0.17 mM
Sulfato de Magnesio Heptahidratado....	0.3 mM
Fosfato de Potasio, dibásico.....	0.43 mM
Fosfato de Potasio, monobásico.....	1.29 mM
Cloruro de Sodio.....	0.43 mM

Algunas semanas después o cuando se pudo identificar la formación de biomasa o crecimiento de las microalgas, se procedió a observar los microorganismos al microscopio para su identificación taxonómica a través de manuales guía.

Las cepas se aislaron mediante diluciones en microplaca e inoculación en tubos de 8 ml y matraces Erlenmeyer de 500 ml con medio Bristol (Cuadro 2), a los cuales se les agregó antifúngico (Benomyl – $40 \mu\text{g ml}^{-1}$) y antibiótico (Ampicilina– $500 \mu\text{g ml}^{-1}$, Cefotaxima - $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) (Fig. 3). Para la iluminación se utilizaron lámparas fluorescentes a $400 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y bombeo constante de aire estéril a $2800 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, sin agitación, a una temperatura de $24 \text{ }^\circ\text{C}$.

A los tubos de 8 ml se les agregó 1 ml de muestra filtrada y 5 ml de medio Bristol; mientras que a los matraces se les agregó 50 ml de muestra y 300 ml de medio Bristol (Fig. 2).



Figura 2. Tubos y matraces inoculados con muestra filtrada.



Figura 3. Area de cultivo: campana de flujo laminar, microplaca, micropipeta, mechero, cajas de Petri.

3.3 Identificación taxonómica

Las algas fueron identificadas mediante su morfología y características anatómicas. De acuerdo con las técnicas de laboratorio, descritos por Sime (2003). Entre otras fuentes se utilizaron las claves especializadas para género de Bourrelly (1966, 1968, 1979); Smith (1950) y Wher y Sheath (2003) y para especie los trabajos de Tiffany y Britton (1952), Ortega (1984), Whitford y Schumacher (1984) y por Whitton y Brook y Jhon (2011).

3.4 Conteo Celular

Mediante un hematocitómetro (Marienfeld) de 0.1mm^3 en el Área = $0.2\text{mm} \times 0.2\text{mm} = 0.04\text{mm}^2$ y volumen = $0.04\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 4 \times 10^{-3}\text{mm}^3 = 4 \times 10^{-6}\text{ml}$, se procedió a contar la cantidad de células por cepa aislada, bajo el microscopio óptico.

3.5 Determinación de Sólidos y Biomasa₆₈₀

En cuanto a la medición de biomasa, se utilizó el fotómetro (Thermo Scientific, modelo Evolution 201), para medir la densidad óptica a 680 nm (DO_{680}) cada tres días a partir del día cero en el ensayo. Una relación lineal entre DO (Para obtener la curva de calibración se realizaron diluciones correspondientes a 0.1 a 1 absorbancia a una longitud de 680nm en triplicado, Fig. 4) y peso seco (de cada cepa, se tomaron muestras de cultivos de dos semanas, las diluciones fueron colocadas en crisoles previamente pesados a 105°C durante 24 h para la determinación de peso seco (g L^{-1}) ver el Cuadro 3, se siguió el procedimiento estándar descrito en APHA (2005) y determinado mediante las Ecs.1 y 2:

$$\text{Peso seco } C. vulgaris (\text{g L}^{-1}) = 0.9237\text{DO}_{680} - 0.1334, R^2 = 0.9488 \quad (1)$$

$$\text{Peso seco } A. limneticus (\text{g L}^{-1}) = 0.5721\text{DO}_{680} - 0.0362, R^2 = 0.9717 \quad (2)$$

Cuadro 3. Absorción – Regresión Lineal para peso seco

Concentración	Absorbancia	X	y
	X		Promedio g L ⁻¹
0.57	1		
0.6	1		
0.57	1	1	0.58
0.4	0.8		
0.4	0.8		
0.41	0.8	0.8	0.40333333
0.25	0.6		
0.31	0.6		
0.25	0.6	0.6	0.27
0.15	0.4		
0.17	0.4		
0.17	0.4	0.4	0.16333333
0.11	0.2		
0.07	0.2		
0.07	0.2	0.2	0.08333333
0.06	0.1		
0.06	0.1		
0.05	0.1	0.1	0.05666667

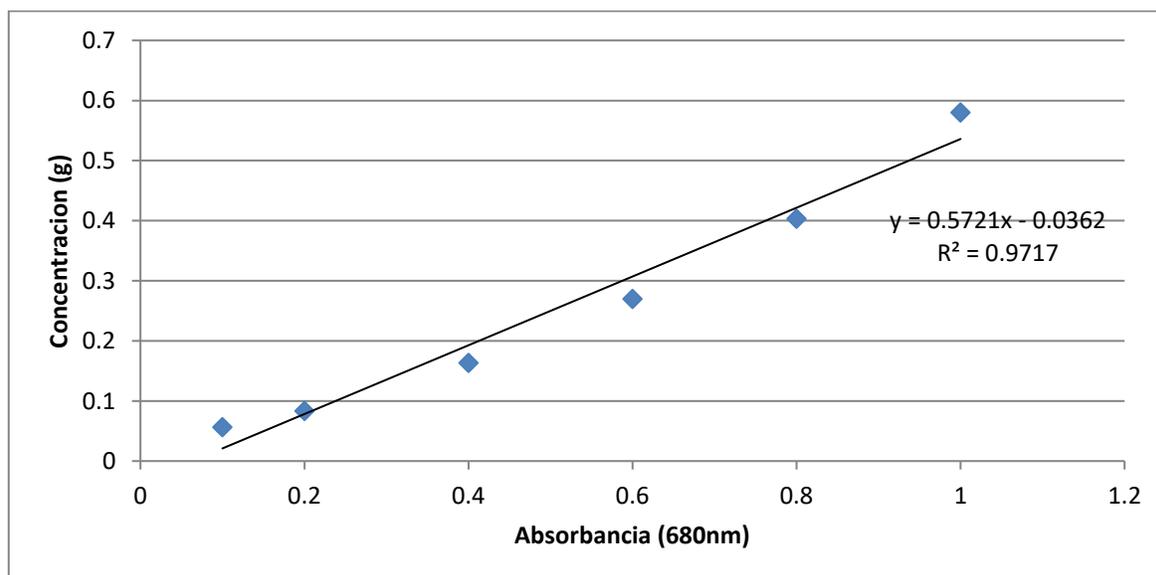


Figura 4. Regresión Lineal entre concentración (peso seco (g)) y absorbancia (680nm)

3.6 Caracterización de la luz

Como fuente de iluminación se emplearon lámparas LED t8 de 60 watts, ajustando una intensidad para el crecimiento de $200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ la cual fue caracterizada mediante un espectroradiómetro, modelo ps-300, marca apogee, eu.

3.7 Fotobiorreactor

Los fotobiorreactores donde se realizaron los experimentos (Fig. 5) tienen un largo de 14.5 cm, un alto de 12.5 cm y ancho de 4.5 cm, construidos con plexiglass con una capacidad máxima de 600 mL.

El sistema de remediación y producción de biomasa consiste en 10 fotobiorreactores, iluminados con cuatro lámparas LED ($200 \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) y una bomba para cada reactor con un flujo de aire de 1.8 L min^{-1} . Las bombas están conectadas a un envase de vidrio con 400 mL de agua destilada estéril, donde el aire se saturará para pasar así por un filtro millex de $0.2 \mu\text{m}$ conectado a un difusor tubular de plexiglass, mediante una manguera de silicón, dicho difusor se colocó al fondo del reactor para de esta manera obtener agitación y abastecimiento de CO_2 . Los fotobiorreactores están colocados dentro de un estante aislado con una cubierta de plástico a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. De esta manera se constituyó el sistema de remoción (Fig. 6), para asimilación de nutrientes y producción de biomasa.

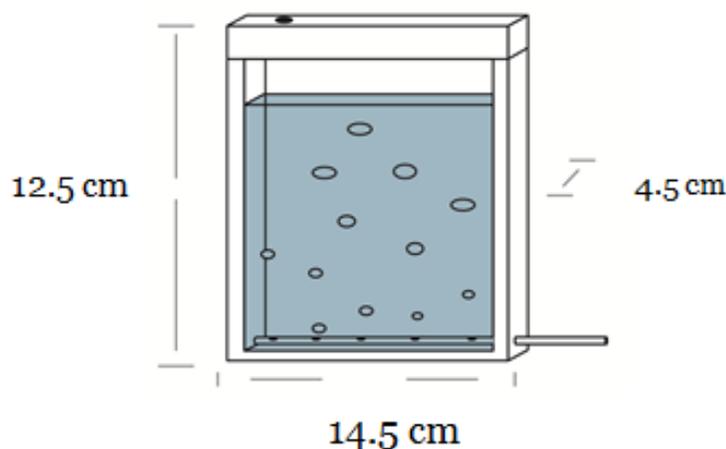


Figura 5. Fotobiorreactor plano vertical.



Figura 6. Sistema de remoción de nutrientes, 10 fotobiorreactores, bombas lámparas en estante asilado.

En el sistema de remoción se realizaron 3 ensayos, donde en los primeros dos se utilizaron las cepas *Asterococcus limneticus* y *Chlorella vulgaris*, de las cuales se inocularon un 10.1 mL y 9.8 mL respectivamente para obtener 1, 000,000 de células por mililitro en 300 mL de medio bristol modificado, con concentraciones de 20 mg L⁻¹ de ortofosfato y amonio (Fig. 7). Durante veinte días se realizó el conteo de células, se obtuvo peso seco y la determinación del consumo de ortofosfato y amonio realizado por las células inoculadas en los reactores. Para el tercer ensayo se utilizaron cuatro reactores que fueron inoculados con 3x10⁶ células ml⁻¹ de la cepa *Chlorella vulgaris* y otros cuatro con *Asterococcus limneticus*, a un medio de 350 ml de agua proveniente de la laguna de oxidación, la misma de donde se aislaron las cepas microalgales, localizada en Marín, N.L., dicho medio fue previamente clarificado y clorado quedando con cantidades iniciales de 10 mg L⁻¹ de PO₄³⁻ y 64 mg L⁻¹ para NH₄⁺. El ensayo duro un total de diez días, donde se tomó muestra cada dos días para contar número de células, medición de DO₆₈₀, pH y concentraciones de PO₄³⁻ y NH₄⁺.



Figura 7. *Asterococcus limneticus* y *Chlorella vulgaris* en sistema de remoción.

3.8 Análisis de componentes principales

Se utilizó el programa SPSS versión 24, para realizar un análisis de componentes principales, para la reducción de dimensionalidad entre las variables.

3.9 Determinación de productor de biomasa y tasa específica de crecimiento

La productividad máxima de biomasa (P_{max} , $g L^{-1} d^{-1}$) fue calculada mediante la Ec. (3), donde X_t fue la concentración de la biomasa ($g L^{-1}$) al final del periodo de cultivo (t_x) y X_0 la concentración de biomasa inicial ($g L^{-1}$) at t_0 (día), de acuerdo con (Anjos et al., 2013):

$$P_{max} = \frac{(X_t - X_0)}{(t_x - t_0)} \quad (3)$$

La tasa de crecimiento específica (μ_{max} , $día^{-1}$) se calculó mediante la Ec. (4) de acuerdo con (Abreu et al., 2012):

$$\mu_{\max} = \frac{(\ln N_2 - \ln N_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (4)$$

Donde N_1 y N_2 fueron la concentración de células al inicio (t_1) y al final (t_2) de la fase exponencial, respectivamente.

3.10 Eficiencia de remoción de nutrientes

La eficiencia de remoción de nutrientes (%) se calculó mediante la Ec. 5:

$$E = \frac{S_0 - S_t}{S_0} * 100 \quad (5)$$

Donde S_0 es la concentración inicial del nutriente (mg L^{-1}) y S_t la concentración final al terminar el ensayo.

3.11 Descripción de los ensayos

Para el ensayo uno y dos, ocho reactores fueron inoculados con las cepas aisladas seleccionadas conteniendo 300 mL y 350 mL respectivamente, de medio Bristol modificado con concentraciones iniciales de PO_4^{3-} y NH_4^+ de 30 mg L^{-1} . Los ensayos duraron un total de 20 días, donde cada 4 días se tomó una muestra para contar la cantidad de células y medir las concentraciones de PO_4^{3-} y NH_4^+ mediante espectrofotometría. Para el ensayo tres cuatro reactores fueron inoculados con 3×10^6 células ml^{-1} de la cepa *Chlorella vulgaris* y otros cuatro con *Asterococcus limneticus*, se agregó a los reactores 350 ml de agua proveniente de la laguna de oxidación, la misma de donde se aislaron las cepas microalgales, localizada en Marín, N.L., la cual fue previamente clarificada y clorada quedando con cantidades iniciales de 10 mg L^{-1} de PO_4^{3-} y 64 mg L^{-1} para NH_4^+ . El ensayo duro un total de diez días, donde se tomó muestra cada dos días para contar número de células, medición de DO_{680} , pH y concentraciones de PO_4^{3-} y NH_4 .

4 RESULTADOS

4.1 Identificación de cepas

A partir de los filtrados realizados al agua residual municipal, proveniente de una laguna de oxidación localizada en Marín, N.L., se identificaron tres especies y tres géneros de microalgas.

Chlorella vulgaris (Fig. 8), con células que van de 1.5 a 13.3 μm de ancho, con forma esférica o casi esférica, cloroplastos en forma de copa, pirenoide esférico a ampliamente elipsoide, usualmente rodeado por 2 a 4 granos de almidón; autoesporas esféricas, 2, 4 o 8 (-16) por esporangio, liberado por una ruptura en la pared en 2 a 4 partes. Probablemente cosmopolita, asociada con superficies de agua, mayormente frecuente en agua moderadamente contaminada.

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia: Chlorellaceae

Género: **Chlorella** Beijerinck 1890

Especie: **C. vulgaris** Beijerinck 1890

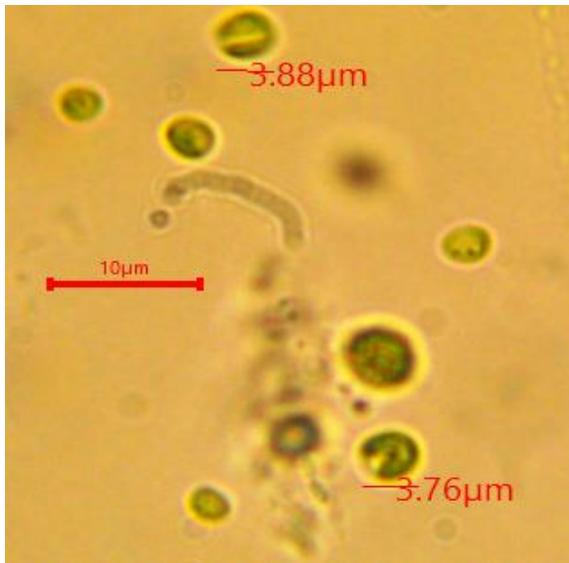


Figura 8. *Chlorella vulgaris*, fotografía en microscopio (objetivo 100 X).

Chlorella colonialis (Fig. 9), células coloniales, planctónica, rodeada por mucílago. Colonia con 4 a 32 células, diámetro de las colonias de 25 a 35 μm . Células adultas en general elipsoides, de ovales a elongadas, 5.5-8.5 x 4-5 μm , conectadas por mucílago. Células jóvenes ovales a ovoides, 3-4.5 x 2.5-3.5 μm . Un solo cloroplasto parietal en forma de copa o platillo, con pirenoide de elipsoide a esférico, cubierto por dos granos de almidón. Reproducción por autoesporas. Probablemente cosmopolita.

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia: Chlorellaceae

Género: ***Chlorella*** Beijerinck 1890

Especie: ***C. colonialis*** C. Bock, Krienitz y Pröschold 2011



Figura 9. *Chlorella colonialis*, fotografía en microscopio (objetivo 100 X).

Asterococcus limneticus (Fig. 10), células esféricas a subesféricas de 10 a 25 μm, envueltas en mucílago, solitarias o en grupos de cuatro, ocho o 16 células en mucílago, formando pequeñas colonias de 50 a 125 μm de largo. Cloroplasto denso en forma de estrella con brazos expandidos en la periferia celular, con pirenoide central. Reproducción asexual con formación de 2 a 8 células hijas o por zoosporas. Probablemente cosmopolitas, usualmente en estanques y lagos.

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Clase: Chlorophyceae

Orden: Chlamydomonadales

Familia: Palmellopsidaceae

Género: ***Asterococcus*** Scherffel 1908

Especie: ***A. limneticus*** G.M.Smith 1918

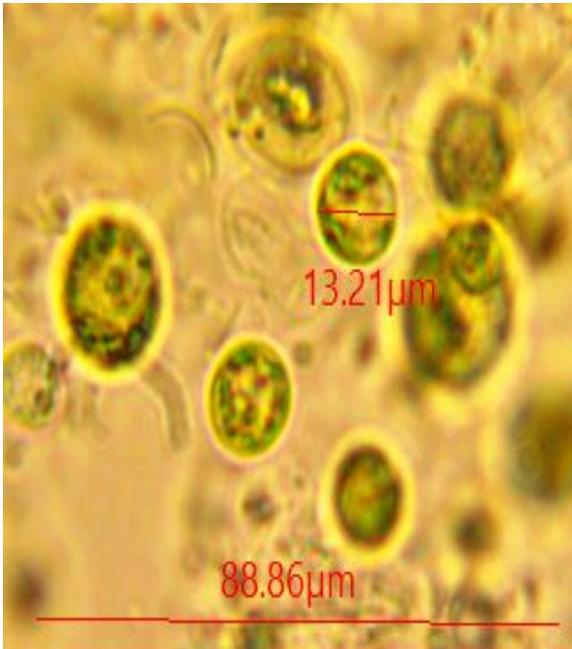


Figura 10. *Asterococcus limneticus*, fotografía en microscopio (objetivo 100 X).

Mesotaenium Nägeli 1894

Células, corto-cilíndricas o elipsoides, típicamente, con un cloroplasto único simple, en forma de listón aplanado o un plato axial, ligeramente en forma de copa, que en la mayoría de las especies contiene un único pirenóide bastante obvio. Frecuentemente, coloniales mucilaginosas. Son cosmopolitas, acuáticas, aéreas y subaéreas (Fig. 11).

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Clase: Chlorophyceae

Orden: Zygnematales

Familia: Mesotaeniaceae

Género: ***Mesotaenium*** Nägeli 1894



Figura 11. *Mesotaenium*, fotografía en microscopio (objetivo 100 X).

Synechococcus Nägeli 1894

Las células simples o agrupadas en colonias micro o macroscópicas, mayormente libres de mucilago conspicuo, células ovales alargadas o cilíndricas, las células se dividen transversalmente en generaciones sucesivas, dando células hijas similares, pero ocasionalmente asimétricas (Fig. 12).

Clasificación:

Superreino: Procariota

Reino: Eubacteria

Subreino: Negibacteria

Phylum: Cyanobacteria

Clase: Cyanophyceae

Subclase: Synechococcophycidae

Orden: Synechococcales

Familia: Synechococcaceae

Género: ***Synechococcus*** Nägeli 1894

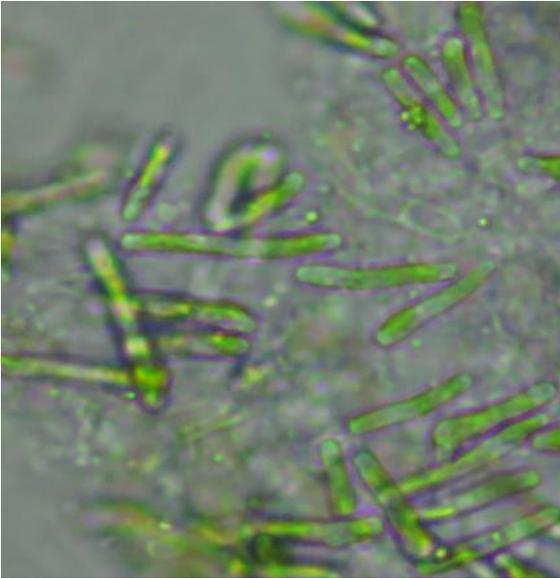


Figura 12. *Synechococcus*, fotografía en microscopio (objetivo 100 X).

Coccomyxa Schimidle 1901

Células cilíndricas, elongadas-ovoides o elipsoides, algunas veces asimétricas, paredes delgadas, solitarias o agrupadas dentro de un envoltorio mucilaginoso, con o sin estriaciones concéntricas rodeando los grupos de células; cloroplasto parietal, en forma de platos y con posición lateral, pirenoides ausentes, reproducción asexual por autoesporas en número de 2-4 o hasta 8 en cada esporangio. Probablemente cosmopolita; masa mucilaginosa microscópica o macroscópica, en hábitats terrestres y acuáticos, raramente flotando libres y también como ficobiontes liquénicos (Fig. 13).

Clasificación:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Chlorophyta

Phylum: Chlorophyta

Subphylum: Chlorophytina

Clase: Chlorophyceae

Orden: Zygnematales

Familia: Mesotaeniaceae

Género: ***Coccomyxa*** Schimidle 1901

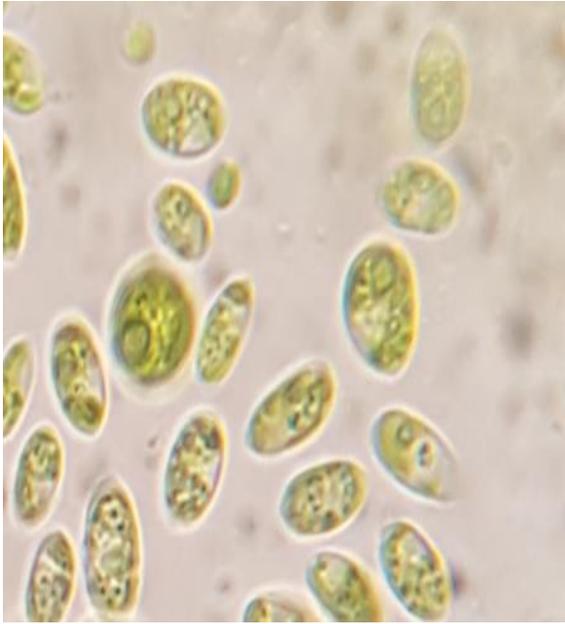


Figura 13. Coccomyxa, fotografía en microscopio (objetivo 100 X).

4.2 Selección de Cepas

Para seleccionar las cepas que se utilizarían en los ensayos se realizó una tabla con características que son relevantes en el cultivo de algas (Floculación, Dominante, número de células) donde sólo las cepas de *Asterococcus limneticus*, *Chlorella colonialis* y *Chlorella vulgaris* cumplen con los requisitos del estudio y la información obtenida se encuentra en el siguiente cuadro.

Cuadro 4. Características de las cepas aisladas e identificadas. Donde, mayor número de células alto (3), intermedio (2) y bajo (1). Flocula, alto (3), intermedio (2) y bajo (1). Dominante, alto (3), intermedio (2) y bajo (1).

Cepas	#células (matraz de 500 ml a los 15 días de cultivo)	Flocula	Dominante	Sumatoria
<i>Asterococcus limneticus</i>	2 (5.8×10^4 cels ml ⁻¹)	2	2	6
<i>Chlorella colonialis</i>	1 (2.4×10^4 cels ml ⁻¹)	3	1	5
<i>Chlorella vulgaris</i>	3 (1.2×10^6 cels ml ⁻¹)	1	3	7

4.3 Caracterización de la luz (Lámparas)

Las lámparas LED t8 de 60 watts, utilizadas fueron caracterizadas mediante un espectralradiómetro, modelo ps-300, marca apogee, eu, donde se detectó que la luz azul y la roja son los que poseen mayor energía, ajustándose así a los puntos de máxima tasa fotosintética y de absorción que corresponden con estas dos zonas del espectro (Cuadro 5).

Cuadro 5. Intensidad de la luz

Espectro	INTENSIDAD ($\mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$)
Violeta	31.23
Azul	24.32
Verde	80.17
Amarillo	25.57
Naranja	29.47
Rojo	11.8
Total	202.56

4.4 Ensayo 1, Crecimiento y Remoción de Nutrientes

Al final de los veinte días de ensayo se registró para *Asterococcus limneticus* un crecimiento promedio de 1.05×10^{16} células mL^{-1} presentando promedios finales de remoción de 89.1% y 88.3% para PO_4^{3-} y NH_4^+ respectivamente. Por otro lado, *Chlorella vulgaris* presentó un promedio de 4.73×10^6 células mL^{-1} con una remoción promedio final de 16 % para PO_4^{3-} y 90% para NH_4^+ . En las gráficas que se presentan a continuación (Figuras 14 y 15) se puede observar el crecimiento celular desarrollado durante veinte días de ensayo, así como la remoción de PO_4^{3-} y NH_4^+ presentes en el medio modificado realizada por cada una de las cepas.

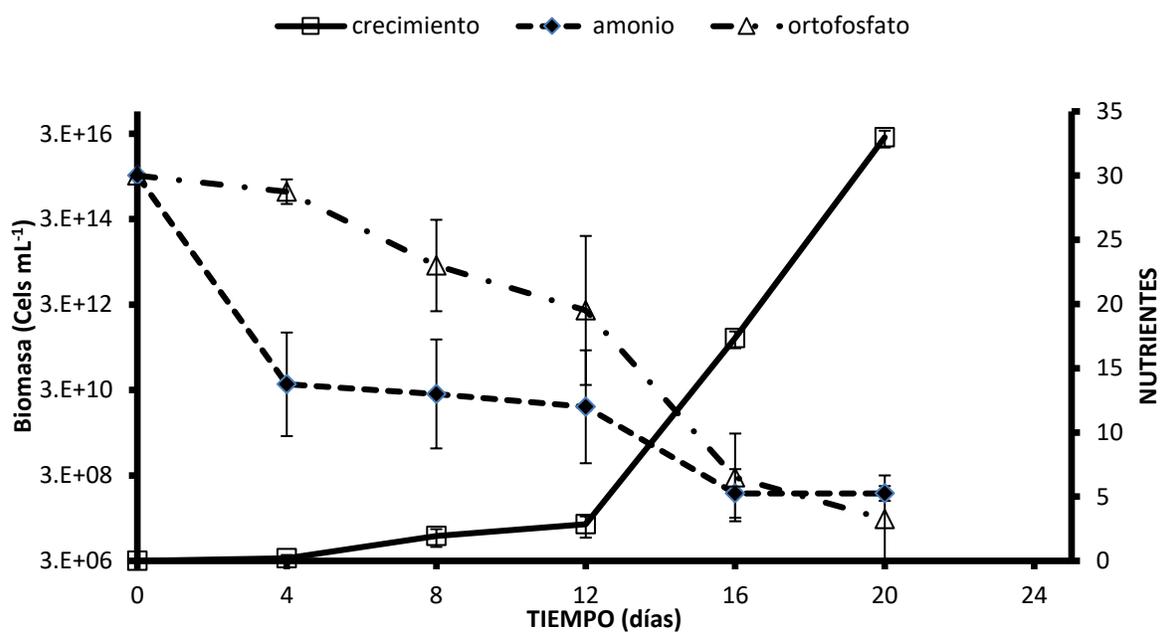


Figura 14. *Asterococcus limneticus* Crecimiento y Remoción de ortofosfato y amonio.

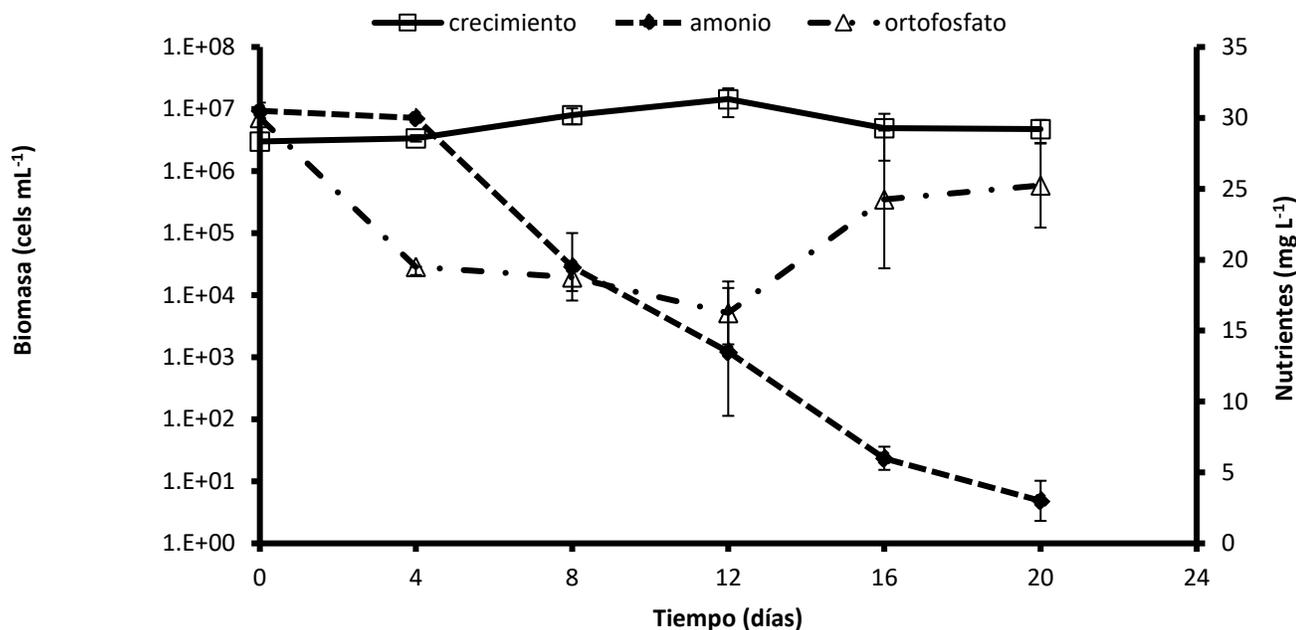


Figura 15. *Chlorella vulgaris*. Crecimiento y Remoción de ortofosfato y amonio.

Se observa en las cinéticas de crecimiento de ambas microalgas una eficiente remoción de nitrógeno y fósforo, aunque con comportamientos de consumo de nutrientes diferentes en cada de las cepas.

Chlorella vulgaris aprovecha más rápido el ortofosfato y la cinética de crecimiento se logra apreciar en los 20 días de ensayo mientras que *Asterococcus limneticus* solo llega a la fase exponencial aprovechando primero el amonio y posteriormente el ortofosfato, por lo que se debe prolongar el experimento. Debido a estas diferencias al utilizarlas en conjunto se puede esperar que se complementen en un sistema de remoción.

4.5 Ensayo 2, Crecimiento y Remoción de Nutrientes

4.5.1 Crecimiento celular

Debido a las observaciones realizadas en el ensayo uno, y ensayos experimentales posteriores se concluyó que la burbuja utilizada en el difusor de plexiglás debería ser menor, Wang y colaboradores en 2022 mencionan que disminuir la velocidad del aire ascendente aumenta la floculación de las algas y aumento en la producción de biomasa. Por lo que en el ensayo dos se disminuyó el

tamaño de la burbuja de aire ascendente que ingresaba en el reactor, de esta manera se registró que durante los 20 días del ensayo *Chlorella vulgaris* presentó un promedio final de 7.50×10^6 células ml^{-1} y 0.51 g l^{-1} de biomasa, mientras que para *Asterococcus limneticus*, fue de 8.64×10^6 células ml^{-1} y 0.69 g l^{-1} de biomasa. Se sabe que el crecimiento microalgal o producción de biomasa, depende de distintos factores ambientales, donde algunos de los más importantes son, la luz, temperatura, pH, condiciones iniciales de nutrientes, etc., en nuestro ensayo, se comenzó con altos niveles de nutrientes, lo pudo provocar que *Chlorella vulgaris* tomara más tiempo en adaptarse al medio y comenzó su fase exponencial después que *Asterococcus limneticus*, que comenzó su fase exponencial en los primeros cuatro días, por otro lado, Radmann, Reinehr, & Costa (2007), mencionan que para clorofitas se han encontrado niveles de biomasa entre 0.3 y 0.5 g l^{-1} , lo que coincide con nuestros resultados, resaltando la capacidad de nuestras cepas de adaptarse y crecer en presencia de altos niveles de amonio (30 mg l^{-1}), que para algunas especies de microalgas puede resultar tóxico (Larsdotter, 2006).

4.5.2 Efectos del pH y remoción de ortofosfato y amonio

Asterococcus limneticus presentó una remoción final de 82% para PO_4^{3-} y 94% para NH_4^+ (Fig. 16), en cuanto al pH (Fig. 17), que inicio en un 6.5, presentó un decaimiento, finalizando al día 20 con 4.58, mientras que *Chlorella vulgaris* logró una remoción (Fig. 18) promedio final de 61% para PO_4^{3-} y 100% para NH_4^+ , es común observar la preferencia de las clorofitas por el consumo de amonio, ya que no representa alta pérdida de energía como la utilizada en nitritos y nitratos que requieren la intervención de enzimas para reducirlos (Sunda et al. 2005), además Larsdotter (2006) menciona que las microalgas verdes pueden tomar en exceso el nitrógeno presente en el ambiente para utilizarlo posteriormente si es requerido para llevar a cabo un proceso metabólico, este tipo de consumo es conocido como consumo en bonanza o descrito en inglés como “luxury consumption”.

Por otro lado, al igual que *Chlorella vulgaris* (Fig. 19), en los reactores con *Asterococcus limneticus*, el pH presentó un decaimiento (Fig. 17), comenzando en 6.5 y finalizando con un pH de 4.58, Mayer et al. (1997) y Silva y colaboradores (2012), mencionan que en cultivos tipo batch es común observar un decaimiento del pH, esto debido al desbalance anión/catión que ocurre en la célula, lo cual concuerda con lo observado en nuestro ensayo.

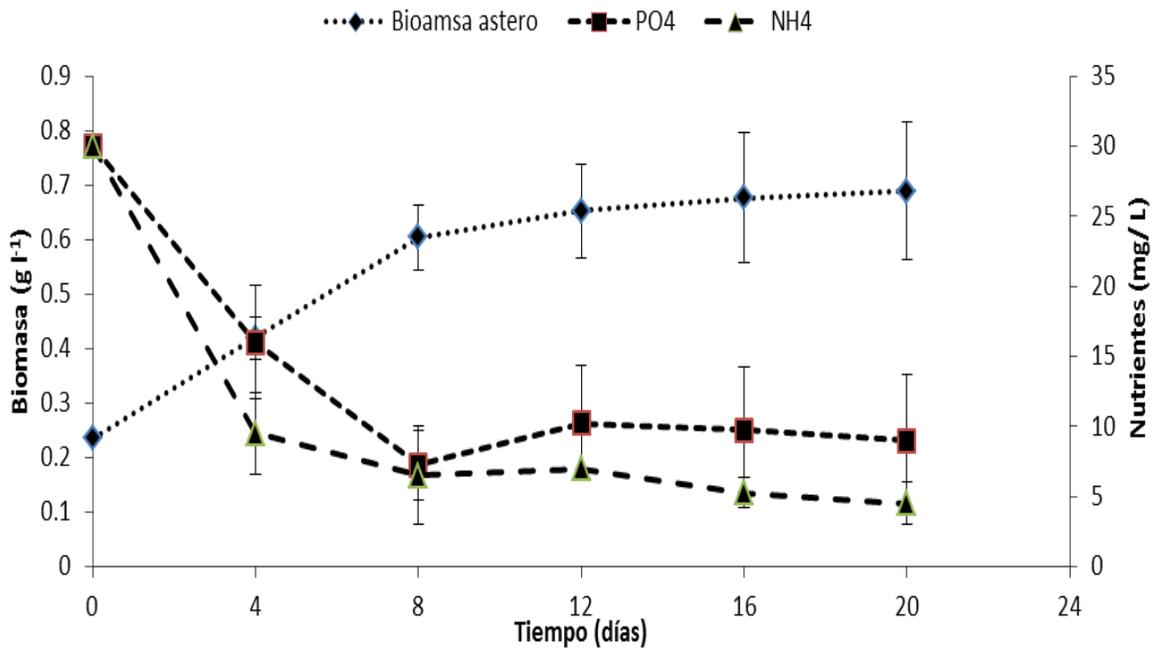


Figura 16. *Asterococcus limneticus*. Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y Remoción de ortofosfato y amonio.

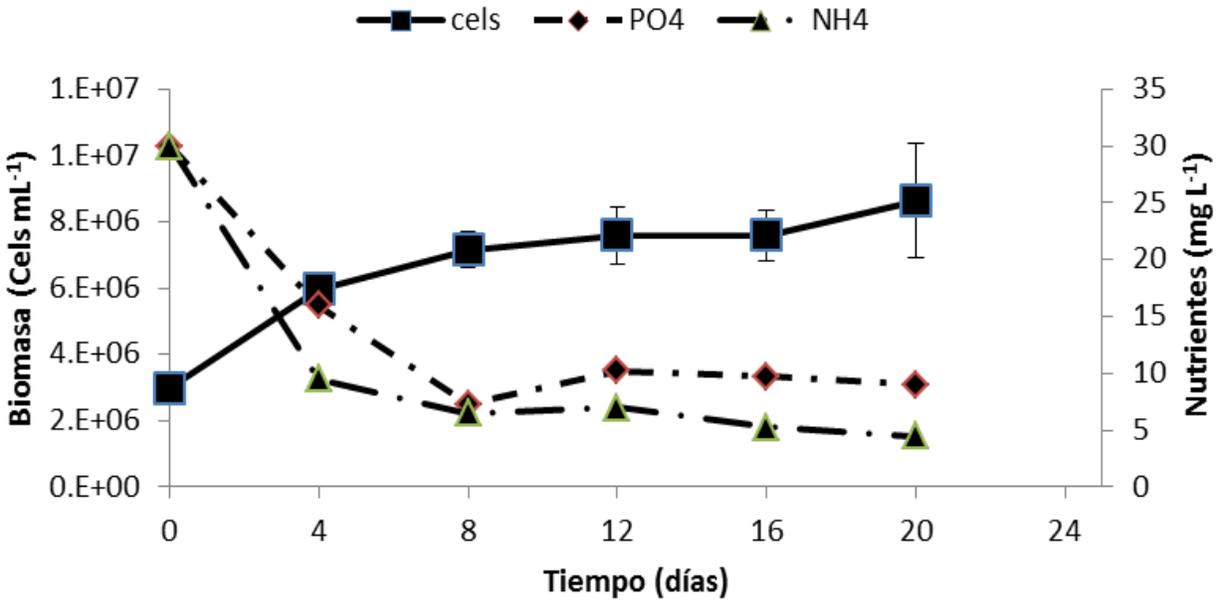


Figura 17. *Asterococcus limneticus*, Crecimiento en Células por mililitro y Remoción de ortofosfato y amonio.

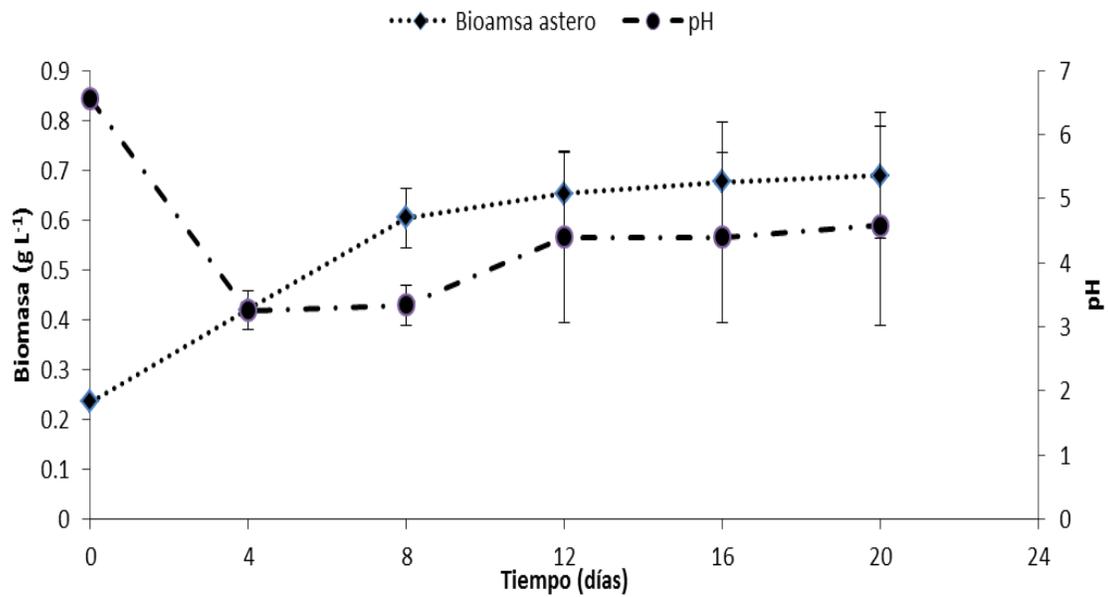


Figura 18. *Asterococcus limneticus*, Crecimiento y cambios de pH.

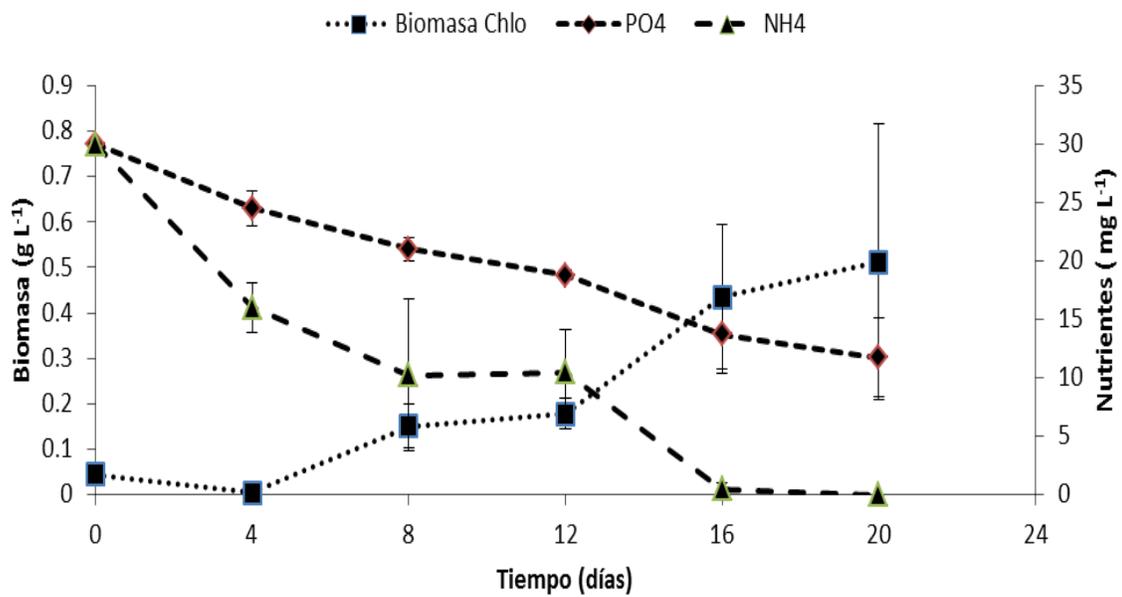


Figura 19. *Chlorella vulgaris*, Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y Remoción de ortofosfato y amonio.

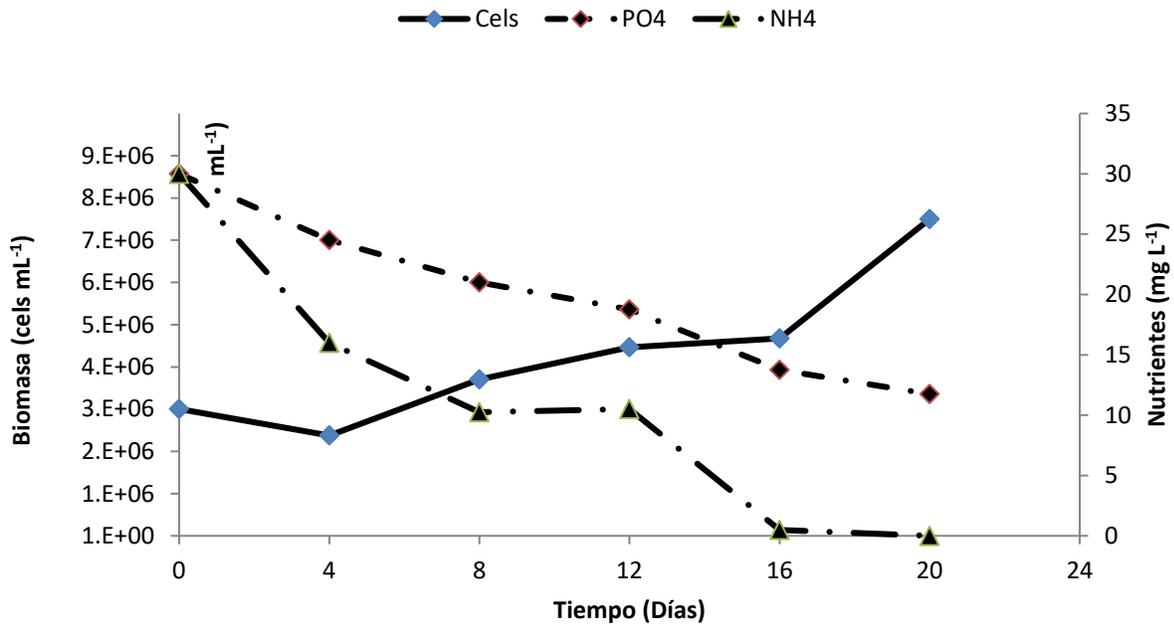


Figura 20. *Chlorella vulgaris*, Crecimiento en Células por mililitro y Remoción de ortofosfato y amonio.

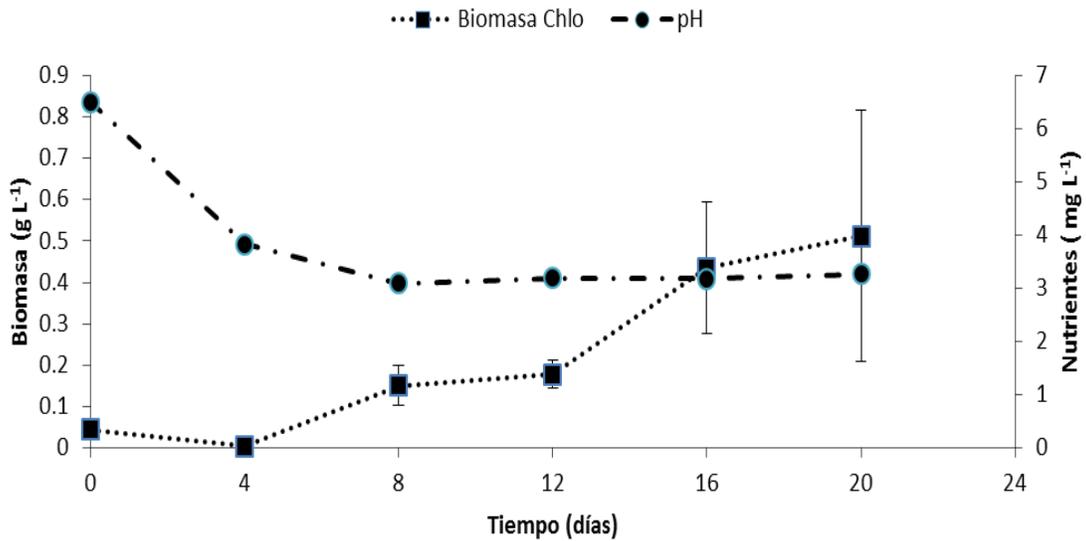


Figura 21. *Chlorella vulgaris*. Crecimiento y cambios de pH.

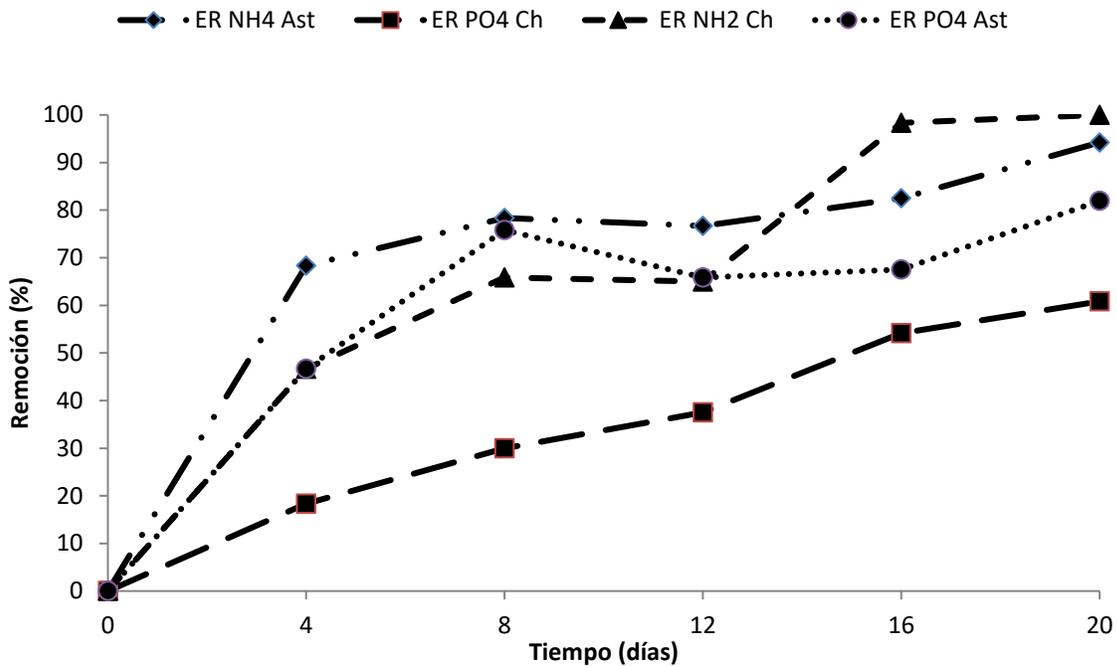


Figura 22. Eficiencia de remoción de nutrientes por *C. vulgaris* y *A. limneticus* durante los 20 días del ensayo.

4.5.3 Análisis de Componentes principales

Para observar las aportaciones de información de las variables que se tomaron durante el ensayo, se realizó un análisis de componentes principales, donde primero se realizó una tabla de comunalidades, para determinar si el modelo es capaz de explicar cada una de las variables, donde todas las variables excepto temperatura, se explica en un 69% y las demás se encuentran por encima del 87%, lo que indica que las variables están bien explicadas por el modelo.

En la tabla de matriz de componentes (Cuadro 5) Se observa que las variables células, DO680, g/L, DO550, PO₄³⁻, NH₄⁺ y Temperatura, están relacionadas en mayor medida con el primer componente, mientras que pH queda en la segunda.

Cuadro 6. Matriz de correlaciones.

Correlación	células	DO680	g/L	DO550	PO ₄	NH ₄	pH
Células	1.000	.913	.921	.100	-.866	-.657	-.157
DO680	.913	1.000	.970	.148	-.830	-.528	-.002
g/L	.921	.970	1.000	.127	-.852	-.604	-.074
DO550	.100	.148	.127	1.000	-.191	-.056	-.057
PO ₄	-.866	-.830	-.852	-.191	1.000	.804	.408
NH ₄	-.657	-.528	-.604	-.056	.804	1.000	.661
pH	-.157	-.002	-.074	-.057	.408	.661	1.000

Para identificar de forma más precisa los componentes, se realizó una rotación varimax, donde se observó que hay relación en un segundo componente entre pH y NH₄⁺. La formación de los componentes explica (Fig. 21) el crecimiento influenciado por los nutrientes y la temperatura, por otro lado, la relación pH y amonio es correspondiente al decaimiento del pH en el ensayo, comenzando en 6.5 y finalizando con un pH de 4.58 esto debido al desbalance anión/catión que ocurre en la célula y al consumo de bicarbonatos al ser el amonio la fuente de nitrógeno.

En cuanto a la agrupación de número de células y DO680, g/L, DO550, sugiere que la aportación de las variables es la misma, por lo que en este ensayo podemos observar que cualquiera de estas mediciones es efectiva para mostrar el crecimiento microalgal.

Cuadro 7. Matriz de componente^a

	Componente	
	1	2
g/L	.955	.172
DO680	.950	.290
células	.949	
PO4	-.940	.215
NH4	-.740	.608
DO550	.188	
pH	-.272	.865

Método de extracción: análisis de componentes principales.

a. 2 componentes extraídos.

Cuadro 8. Matriz de componente rotado^a

	Componente	
	1	2
DO680	.985	-.125
g/L	.942	-.235
Células	.892	-.331
Tratamiento AST1 CH2	-.800	-.335
PO4	-.769	.582
DO550	.195	
pH	.107	.901
NH4	-.426	.858

Método de extracción: análisis de componentes principales.

Método de rotación: Varimax con normalización Kaiser.^a

a. La rotación ha convergido en 3 iteraciones.

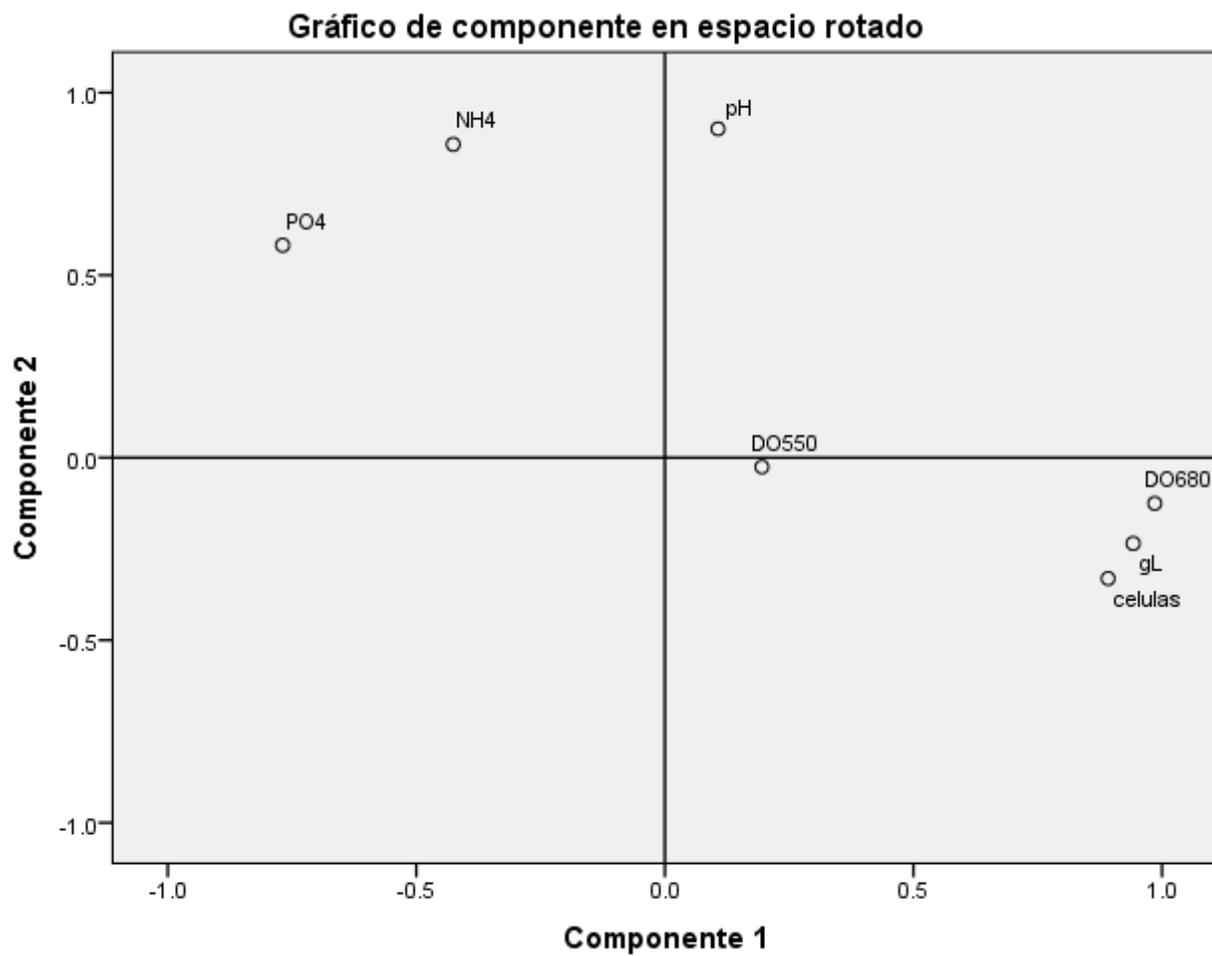


Figura 23. Formación de componentes.

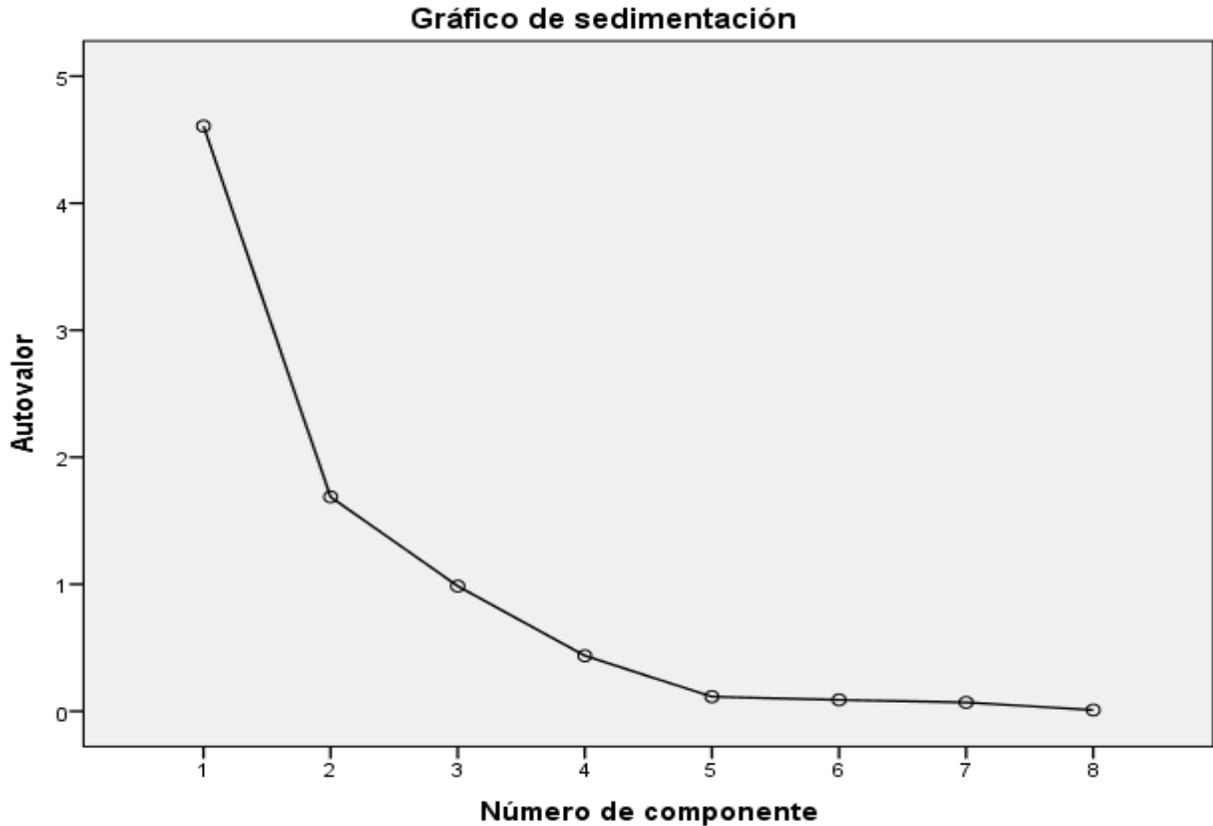


Figura 24. Gráfico de sedimentación, componentes principales.

4.6 Ensayo 3, agua de la laguna de oxidación, clarificada y clorada, *Chlorella vulgaris* y *Asterococcus limneticus*

Al igual que en el ensayo uno, cuatro reactores fueron inoculados con 3×10^6 células ml^{-1} de la cepa *Chlorella vulgaris* y otros cuatro con *Asterococcus limneticus*, se agregó a los 350 ml de agua proveniente de la laguna de oxidación, la misma de donde se aislaron las cepas microalgales, localizada en Marín, N.L., la cual fue previamente clarificada y clorada quedando con cantidades iniciales de 10 mg L^{-1} de PO_4^{3-} y 64 mg L^{-1} para NH_4^+ . El ensayo duró un total de diez días, donde se tomó muestra cada dos días para contar número de células, medición de DO_{680} , pH y concentraciones de PO_4^{3-} y NH_4 .

4.6.1 Crecimiento celular

Durante los ensayos en el crecimiento celular registrado durante diez días *Chlorella vulgaris* presento un promedio final de 7.50×10^6 células ml^{-1} y 0.51 g l^{-1} de biomasa, mientras que para *Asterococcus limneticus*, de 8.64×10^6 células ml^{-1} y 0.69 g l^{-1} de biomasa, se sabe que el crecimiento microalgal o producción de biomasa, depende de distintos factores ambientales, donde algunos de los más importantes son, la luz, temperatura, pH, condiciones iniciales de nutrientes, etc, en nuestro ensayo, se comenzó con altos niveles de nutrientes, lo que pudo provocar que *Chlorella vulgaris* tomara más tiempo en adaptarse al medio y comenzó su fase exponencial después que *Asterococcus limneticus*, que comenzó su fase exponencial en los primeros cuatro días, por otro lado, Radmann et al., 2007 mencionan que para clorofitas se han encontrado niveles de biomasa entre 0.3 y 0.5 g l^{-1} , lo que coincide con nuestros resultados, resaltando la capacidad de nuestras cepas de adaptarse y crecer en presencia de altos niveles de amonio 30 mg l^{-1} , que para algunas especies de microalgas puede resultar toxico (Larsdotter, 2006b).

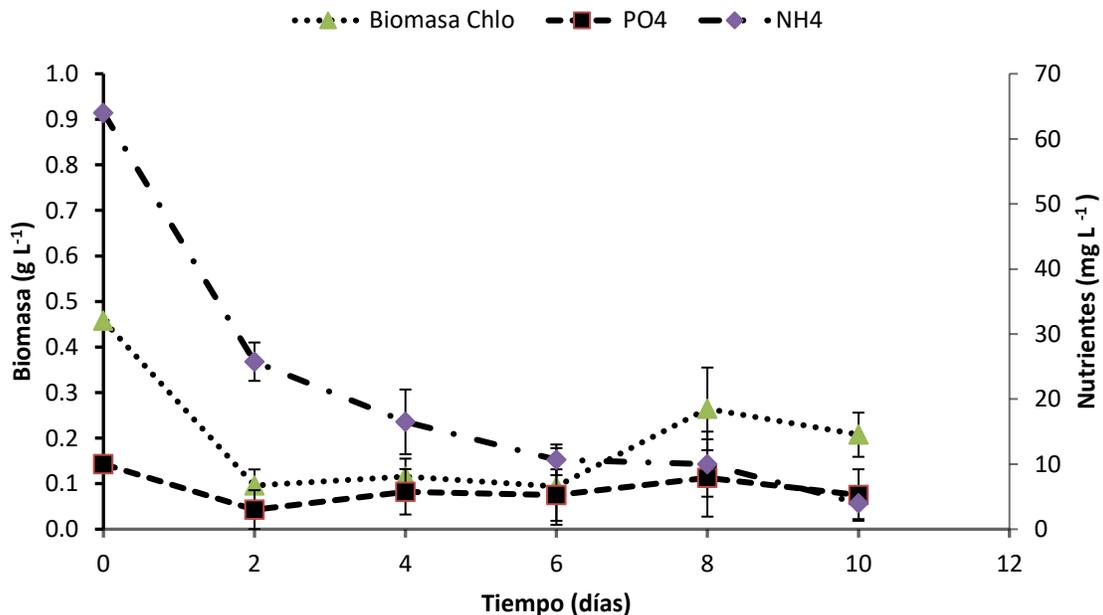


Figura 25. *Chlorella vulgaris*, Crecimiento de biomasa en g L^{-1} y comparativa de remoción de ortofosfato y amonio en 10 días de ensayo.

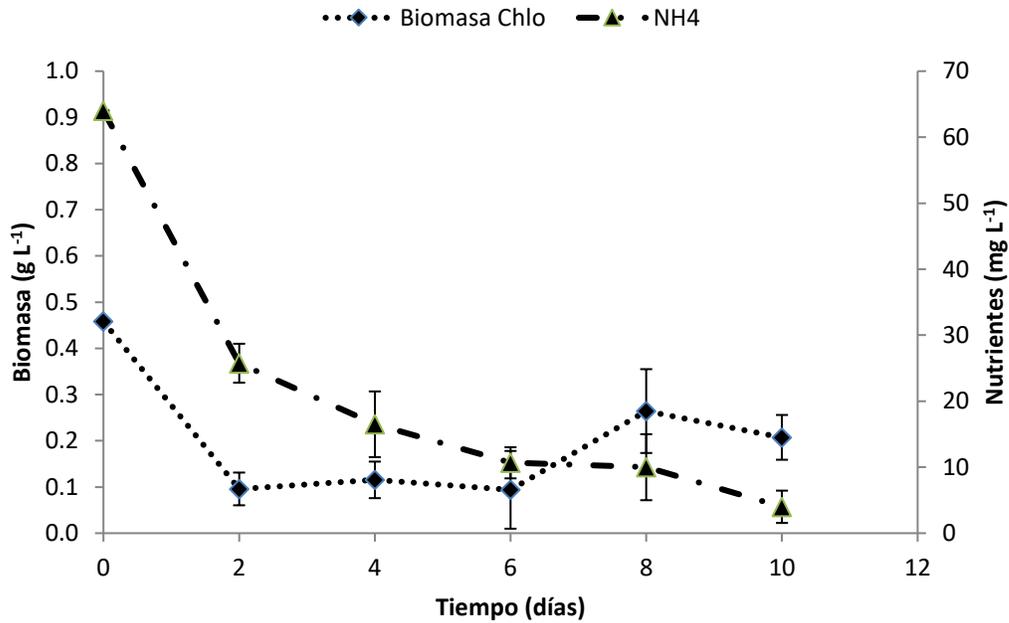


Figura 26. *Chlorella vulgaris*, Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y remoción de amonio en 10 días de ensayo.

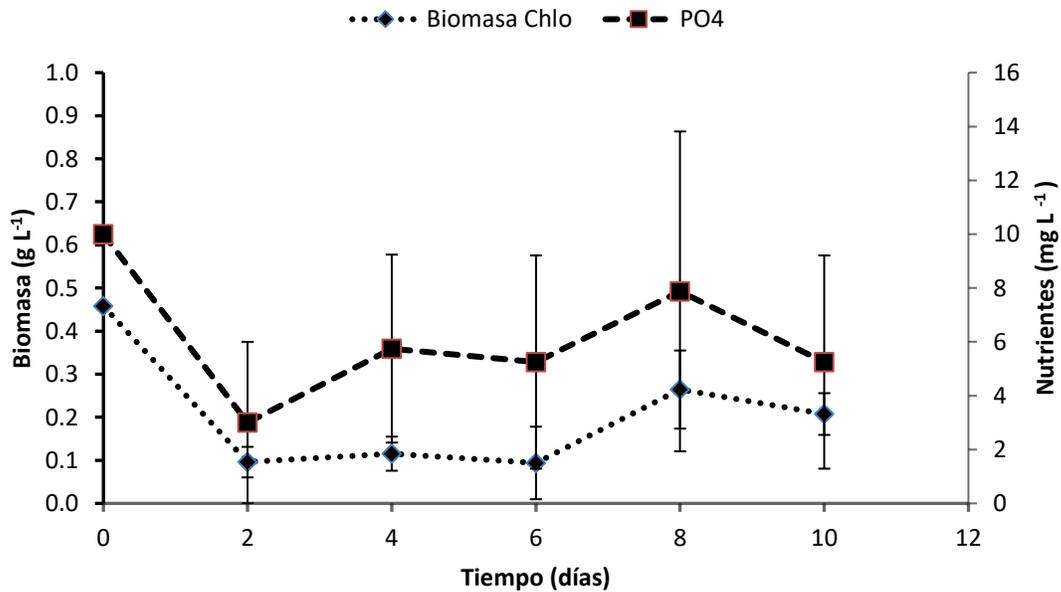


Figura 27. *Chlorella vulgaris*, Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y remoción de ortofosfato en 10 días de ensayo.

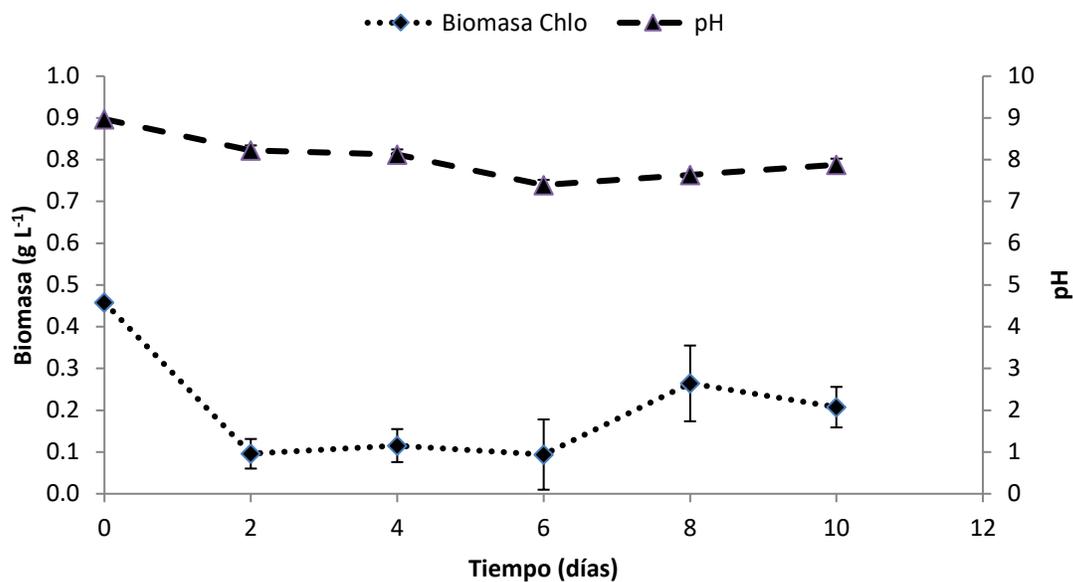


Figura 28. *Chlorella vulgaris*. Crecimiento y cambios de pH en 10 días de ensayo.

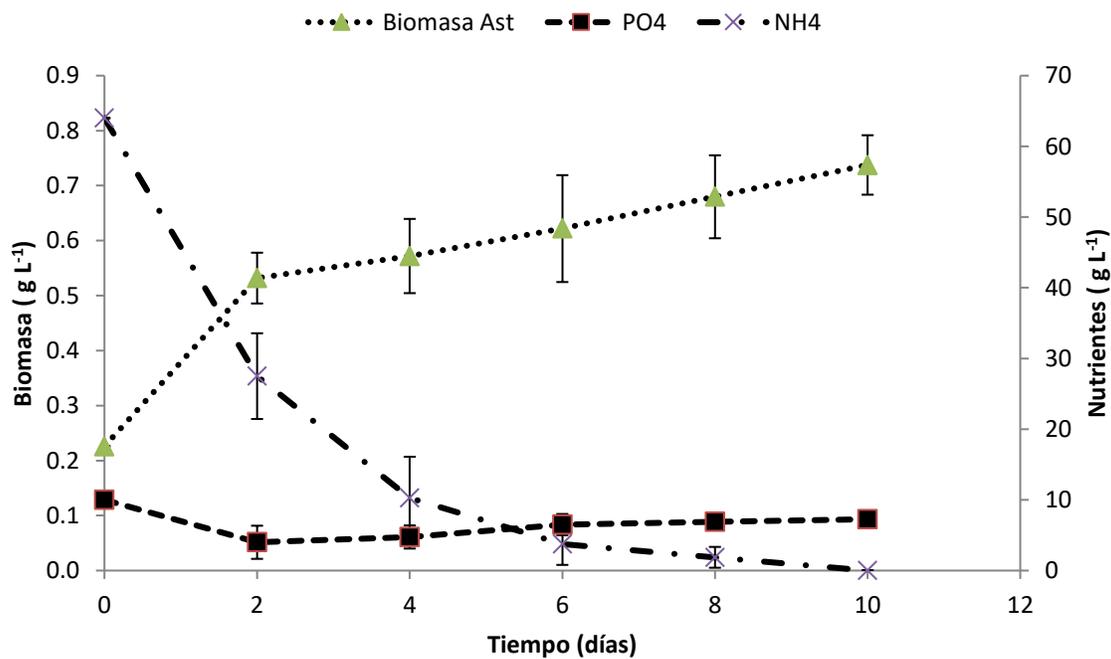


Figura 29. *Asterococcus limneticus*, Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y comparativa de remoción de ortofosfato y amonio en 10 días de ensayo.

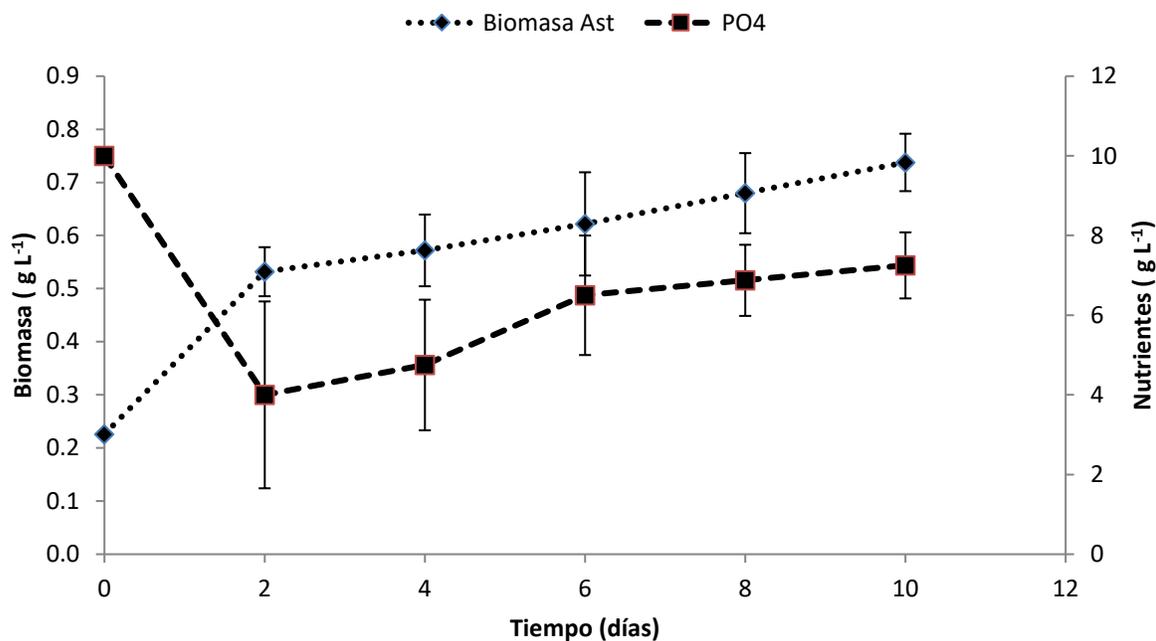


Figura 30. *Asterococcus limneticus*, Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y remoción de ortofosfato en 10 días de ensayo.

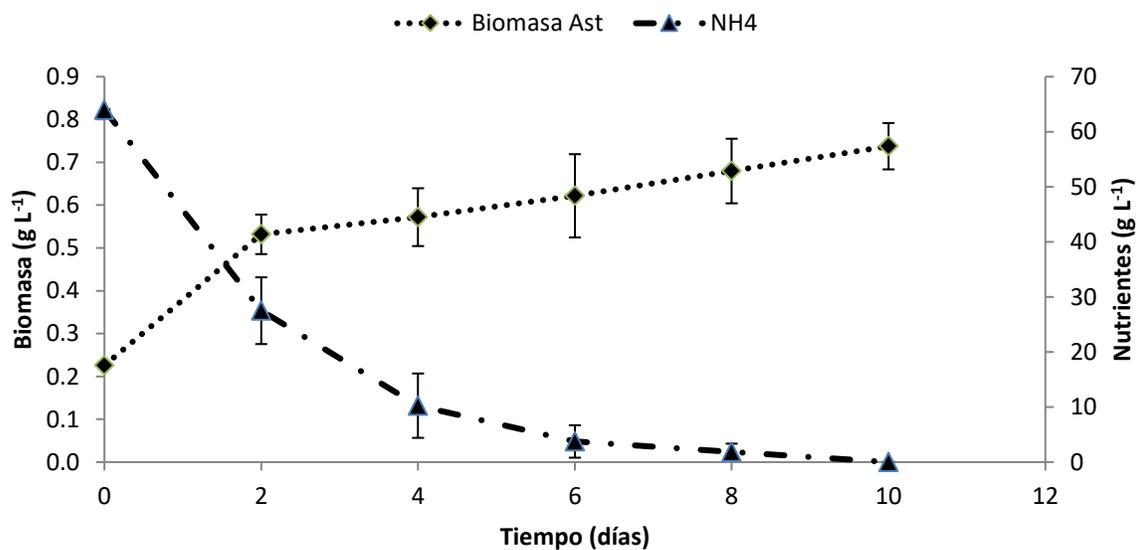


Figura 31. *Asterococcus limneticus*, Crecimiento de biomasa en g L⁻¹ y remoción de amonio en 10 días de ensayo.

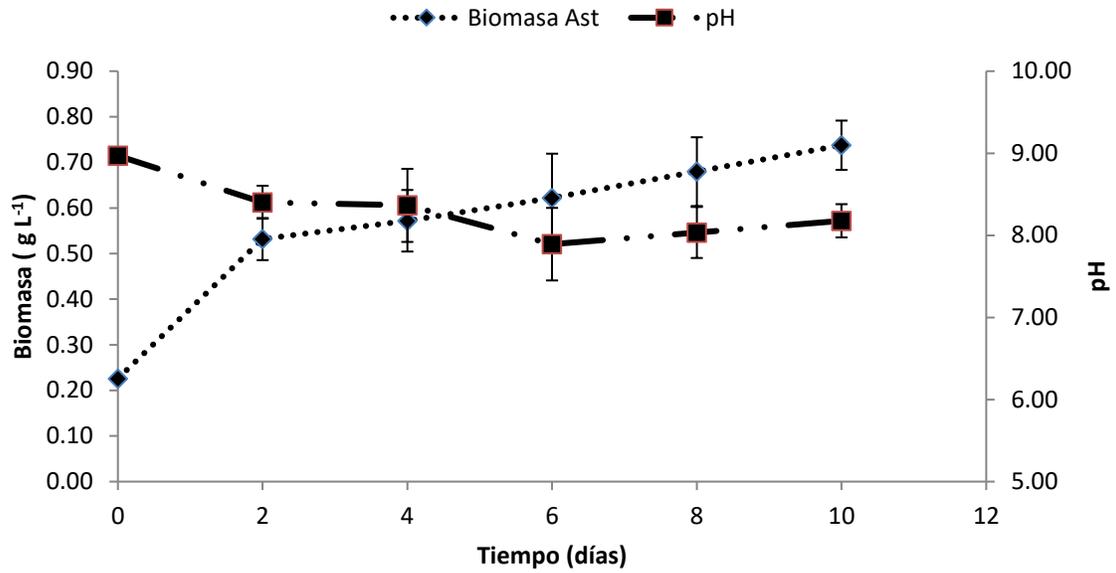


Figura 32. *Asterococcus limneticus* Crecimiento y cambios de pH en 10 días de ensayo.

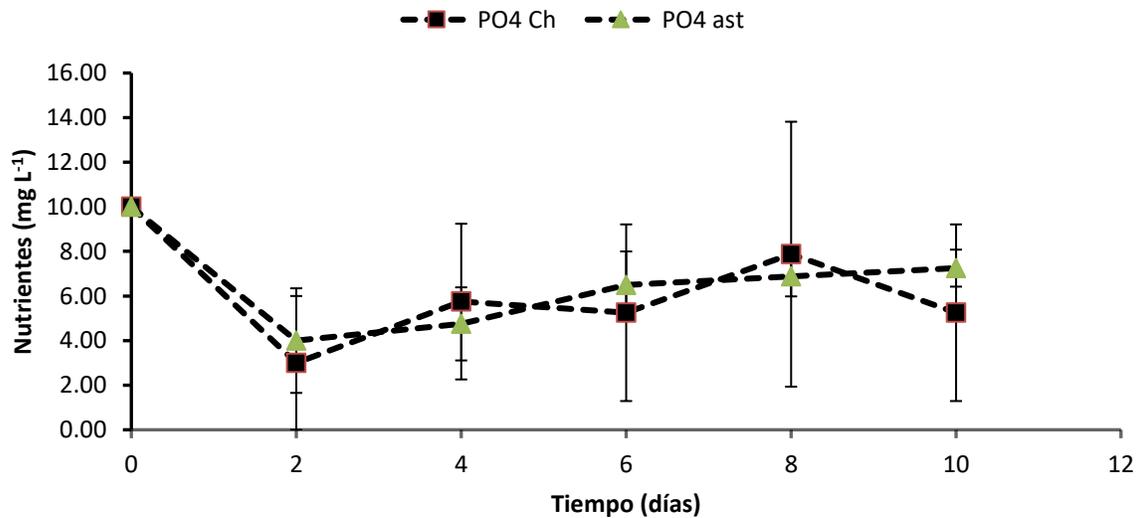


Figura 33. Comparativa de eficiencia de remoción de ortofosfato por *C. vulgaris* y *A. limneticus*.

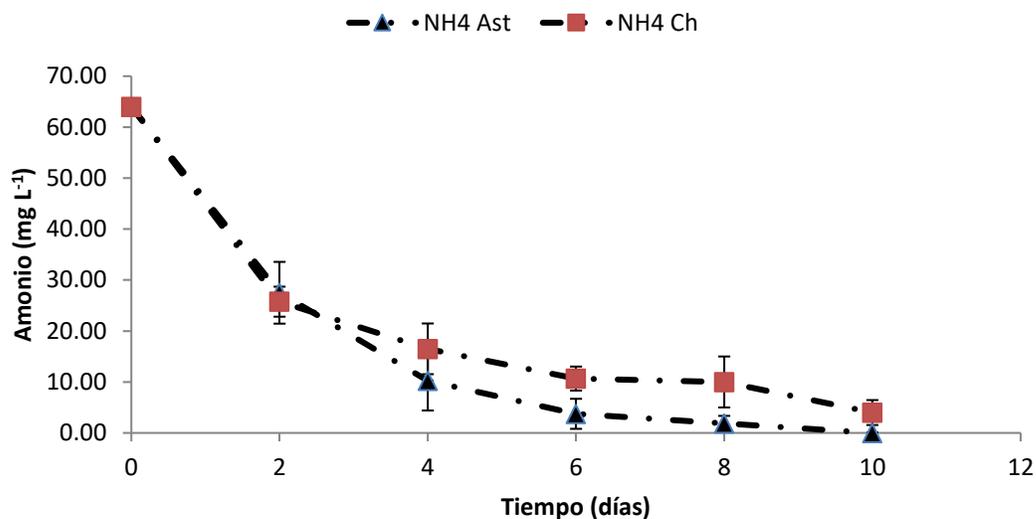


Figura 34. Comparativa de eficiencia de remoción de amonio por *C. vulgaris* y *A. limneticus*.

Por otro lado, Wang et al. (2013) detectan que los nutrientes son un factor limitante para el crecimiento inicial, principalmente la cantidad de amonio, que, entre menos concentración inicial, favorece al crecimiento microalgal. Posteriormente comenzó la fase exponencial, donde se calculó una tasa específica de crecimiento de 0.1 d^{-1} , finalizando con una biomasa de 0.51 g L^{-1} y una producción máxima de 0.045 g L^{-1} . Esta producción se aprecia baja y se podría relacionar con el impacto inhibitorio provocado por la disminución del pH, debido a la acumulación de CO_2 en el reactor, lo cual es un fenómeno común en reactores cerrados y se acentúa durante las horas de oscuridad, explicándose por la transferencia de masa de este hacia ácido carbónico y de allí al ion bicarbonato y protones. Apoyando lo anterior, se ha reportado que rangos de CO_2 entre los 0.03 a 5% registran valores de pH entre 7 y 7.5 lo cual puede incrementar la tasa específica de crecimiento (Alketife *et al.*, 2017).

Respecto a la relación 1.8:1 de N:P registrada, (Znad et al., 2018), reportan relaciones de 4.6:1 y 2.1:1, mientras que (Pidou et al., 2016), de 2:1 con el alga *Microcystis aeruginosa*, ante esto, Reynolds (1999), menciona que la relación de Redfield, no aplica cuando se utilizan microalgas en reactores para tratamiento de agua, ya que las relaciones N:P pueden variar significativamente, de entre 1:1, 4:1, 10:1 hasta 400:1 mientras que las tasas de consumo reportadas han variado de acuerdo a la composición del tipo de cultivo y las concentraciones iniciales de nutrientes. De modo que lo que parece ser un comportamiento anómalo, puede ser el resultado de la cepa en particular y la concentración inicial de nutrientes utilizada. Cabe mencionar que la eliminación de P se asocia con la eliminación de N a través de sus respectivos roles en el metabolismo celular (Loladze & Elser, 2011). En las microalgas, el N se integra principalmente en proteínas que, a su vez, se vinculan

con la producción de ribosomas y ARN ribosomal. La captación de P está asociada predominantemente con el almacenamiento en el ARN ribosomal, de manera que la función observada entre la concentración de fosfato y la tasa de captación requiere suficiente N para asegurar que no haya restricción de la síntesis de proteínas (Beuckels et al., 2015b). En tales casos, la tasa de captación también se relaciona con la capacidad de las microalgas para almacenar el fosfato disponible a través de la vía consumo en bonanza, donde la polifosfato se acumula dentro de la célula, formando gránulos (Wang et al., 2010). Se ha encontrado que hasta un 3.16% de P puede almacenarse en las células de las microalgas (Powell et al., 2008). Esta explicación es compartida por autores como (Silva-Benavides & Torzillo, 2012), quienes mencionan que debido a que durante su experimentación el pH nunca rebasó las 8.5 unidades, es decir el valor de pH en el que se produce la precipitación del fosfato, es posible que éste se eliminara principalmente por captación activa en lugar de precipitarse como sales de fosfato insolubles. Sin embargo, los fenómenos de biosorción tanto por la superficie celular como por la superficie del recipiente de cultivo no pueden ser descartados.

5 CONCLUSIONES

A partir de agua residual municipal se pueden aislar cepas de microalgas con características que las vuelven candidatas para la remoción de PO_4^{3-} y N-NH_4^+ . En esta investigación las microalgas con mejores características, debido a su número de células, capacidad para flocular y dominancia fueron: *Chlorella vulgaris* y *Asterococcus limneticus*. Estas características, son importantes si se pretende colocar las cepas en un reactor, ya que mayor cantidad de células significa buena producción de biomasa; mientras que la capacidad de flocular hace que se vuelva más sencillo cosecharlas del sistema.

Para lograr las condiciones necesarias de operación de un sistema de remoción de nutrientes con microalgas, es necesario tener las condiciones adecuadas para su crecimiento axénico; por lo que se requiere de materiales y tecnologías disponibles, pruebas y tiempo que garanticen resultados confiables al realizar los experimentos.

Durante el desarrollo de los experimentos y ensayos de ajuste previos, se observaron factores relevantes en el funcionamiento de los fotobiorreactores, como lo son, la disposición y emisión de luz, donde se debe considerar que la luz azul y roja poseen mayor energía, que en nuestro estudio representaban el 24.32 y 11.8 de intensidad respectivamente de los $202.56 \mu\text{mol fotones m}^{-2}\text{s}^{-1}$ emitidos por las lámparas utilizadas, por lo que para futuros experimentos se recomienda cantidades mayores de estas intensidades de luz.

De igual manera otros factores como los filtros de aire, que evitan la contaminación, los difusores que moderan la velocidad de aireación y tamaño de la burbuja que pueden afectar la disposición de CO_2 para las cepas, así como el pH y

las concentraciones de nutrientes iniciales que pueden ser factores limitantes en el crecimiento microalgal. Por lo que, al realizar los ensayos aquí descritos, estos factores fueron ajustados logrando así obtener una biomasa competitiva comparada con el crecimiento registrado por otros investigadores y remociones de nutrientes entre 80 y 100%.

Aunado a esto el análisis de componentes principales muestra que el crecimiento de las microalgas está mayormente influenciado por la temperatura del sistema y nutrientes, describiendo que uno es efecto del otro, al disminuir los nutrientes presentes en el medio, la biomasa aumenta y que el consumo de amonio tiene efecto en el decaimiento del pH debido al consumo de bicarbonatos al ser el amonio la fuente de nitrógeno. Por otro lado, también determina que cuantificar la biomasa, ya sea mediante hematocitómetro, densidad óptica a 680 nm o a través del peso seco es igual de efectiva, por lo que es posible utilizar cualquiera de estos tres métodos de manera confiable.

Las especies de microalgas utilizadas mostraron en sus curvas de crecimiento y remoción de nutrientes que son capaces de asimilarlos, pero se comportan de diferente manera al consumir el nitrógeno y fósforo, tanto en crecimiento como remoción.

La cepa *Asterococcus limneticus* presentó el mayor crecimiento de biomasa con un promedio final de 1.05×10^{16} células mL⁻¹ ante *Chlorella vulgaris* que obtuvo 4.73×10^6 células mL⁻¹.

Asterococcus limneticus presentó una remoción promedio final de 89% para PO₄³⁻ y 88% para NH₄⁺, mientras que *Chlorella vulgaris* obtuvo una remoción promedio final de 16 % para PO₄³⁻ y 90% para NH₄⁺, por lo que *A. limneticus* mostró una mejor remoción de los nutrientes durante los 20 días de ensayo.

Chlorella vulgaris aprovecha más rápido el ortofosfato y la cinética de crecimiento se logra apreciar en los 20 días de ensayo mientras que *Asterococcus limneticus* solo llega a la fase exponencial aprovechando primero el amonio y posteriormente el ortofosfato, por lo que se sugiere experimentos con mayor cantidad de días.

En resumen, *Asterococcus limneticus* presenta dos etapas, la primera de crecimiento hasta los 8 días, donde se presenta la mayor remoción de nutrientes (82% PO₄ y 94% NH₄) y una segunda de equilibrio tanto en crecimiento como remoción, mientras que *Chlorella vulgaris* presentó un crecimiento constante a partir del día cuatro y los nutrientes una continua disminución durante el periodo de evaluación.

En el caso específico del presente estudio, es posible mencionar que su habilidad para remover estos nutrientes fue dependiente de la cepa. Debido a estas diferencias, al utilizarlas en conjunto se puede esperar que se complementen en un sistema de remoción.

Los resultados observados sugieren que las especies de microalgas aisladas de lagunas de oxidación representan una posible opción en la remoción de amonio y ortofosfato de aguas residuales municipales y generación de biomasa. Además,

debemos mencionar que son capaces de crecer en altas concentraciones de amonio y que el estrés generado por la baja cantidad de nutrientes y pH las vuelven candidatas para la generación de productos como aceites.

6 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdel-raouf, N. (2012). *Microalgae and wastewater treatment*. Saudi Journal of Biological Sciences, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abinandan, S., & Shanthakumar, S. (2015). *Challenges and opportunities in application of microalgae (Chlorophyta) for wastewater treatment : A review*. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 52, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.086>
- Abreu, A. P., Fernandes, B., Vicente, A. A., Teixeira, J., & Dragone, G. (2012). *Mixotrophic cultivation of Chlorella vulgaris using industrial dairy waste as organic carbon source*. Bioresource Technology, 118, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.055>
- Alketife, A. M., Judd, S., & Znad, H. (2017). *Synergistic effects and optimization of nitrogen and phosphorus concentrations on the growth and nutrient uptake of a freshwater Chlorella vulgaris*. Environmental technology, 38(1), 94-102.
- Anantha, K. H., Garg, K. K., Moses, D. S., Patil, M. D., Sawargaonkar, G. L., Kamdi, P. J., Malve, S., Sudi, R., Raju, K. V., & Wani, S. P. (2021). *Impact of natural resource management interventions on water resources and environmental services in different agroecological regions of India*. Groundwater for Sustainable Development, 13. <https://doi.org/10.1016/j.gsd.2021.100574>
- Anjos, M., Fernandes, B. D., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Dragone, G. (2013). *Optimization of CO₂bio-mitigation by Chlorella vulgaris*. Bioresource Technology, 139, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032> PHA/AWWA/WEF. 2005. Andrew D Eaton; American Public Health Association.; American Water Works Association.; Water Environment Federation; Standard Methods for the examination of water and wastewaters, 21th edition, American Public Health Association, Washington. Arad, S.M., Levy-Ontman, O., 2010. *Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects*. Current Opinions in Biotechnol. 21 (3), 358–364.
- Arias, D. M., Solé-Bundó, M., Garfí, M., Ferrer, I., García, J., & Uggetti, E. (2018). *Integrating microalgae tertiary treatment into activated sludge systems for energy and nutrients recovery from wastewater*. Bioresource Technology, 247, 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.123>
- Ashley, K., Cordell, D., & Mavinic, D. (2011). *A brief history of phosphorus: From the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse*. Chemosphere, 84(6), 737-746.
- Ashokkumar, V., Agila, E., Salam, Z., Ponraj, M., Din, M. F. M., & Ani, F. N. (2014). *A study on large scale cultivation of Microcystis aeruginosa under open raceway pond*

- at semi-continuous mode for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 172, 186–193. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.100>
- Azlina, W., Ab, W., Ghani, K., Rebitanim, N. Z., Amran, M., Salleh, M., & Alias, A. B. (2015). *Progress in Clean Energy, Volume 1*, 683–693. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16709-1>
- Barroso, P. J., Santos, J. L., Martín, J., Aparicio, I., & Alonso, E. (2019). *Emerging contaminants in the atmosphere: Analysis, occurrence and future challenges*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(2), 104–171. <https://doi.org/10.1080/10643389.2018.1540761>
- Bergougui, B., & Mansoob Murshed, S. (2023). *Aggregate and disaggregate impact of natural resources on sustainable development: New evidence from the latest institutional data*. *Environmental and Sustainability Indicators*, 20, 2665–9727. <https://doi.org/10.1016/j.indic.2023.100302>
- Beuckels, A., Smolders, E., & Muylaert, K. (2015a). *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>
- Bitton, G. (2011). *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons.
- Boonchai, R., Seo, G. T., Park, D. R., & Seong, C. Y. (2012). *Microalgae Photobioreactor for Nitrogen and Phosphorus Removal from Wastewater of Sewage Treatment Plant*. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 2(6), 407–410. <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2012.V2.143>
- Borowitzka, M. A., & Moheimani (2013.) *Algae for Biofuels and Energy-Springer Netherlands*. 2013
- Bourrelly, P. (1966) *Les Algues d'eau douce. Tome I: Les algues vertes*. Editions N. Boubéé & Cie, Paris.
- Bourrelly, P. (1968) *Les Algues d'eau douce. Tome II: Les algues jaunes et brunes*. Editions N. Boubéé & Cie, Paris. 438p.
- Bourrelly, P. (1970) *Les Algues d'eau douce. Tome III: Eugléniens, Péridiniens, Algues rouges et Algues bleues*. Editions N. Boubéé & Cie, Paris.
- Bradley P., Sanderson M., Nejstgaard J. & Sazhin A. (2010) *Nitrogen uptake by phytoplankton and bacteria during an induced Phaeocystis pouchetii bloom, measured using size fractionation and flow cytometric sorting*. *Aquat Microb Ecol* 61:89-104. <https://doi.org/10.3354/ame01414>
- 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>

- Carlozzi, P. (2008). *Closed Photobioreactor Assessments to Grow, Intensively, Light Dependent Microorganisms: A Twenty-Year Italian Outdoor Investigation*. The Open Biotechnology Journal, 2(1), 63–72. <https://doi.org/10.2174/1874070700802010063>
- Chen, G., Zhao, L., & Qi, Y. (2015). *Enhancing the productivity of microalgae cultivated in wastewater toward biofuel production: A critical review*. Applied Energy, 137, 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.10.032>
- Chisti, Y. (2008). *Biodiesel from microalgae beats bioethanol*. Trends in Biotechnology, 26(3), 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.12.002>
- Christenson, L., & Sims, R. (2011b). *Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels, and bioproducts*. Biotechnology Advances, 29(6), 686–702. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.015>
- Comisión Nacional del Agua CONAGUA (2011). *Atlas del agua de México 2011*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales México, D. F.
- CONAGUA (2014). *Estadísticas del Agua en México edición 2014*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales México, D. F.
- CONAGUA (2021). *Inventario Nacional de Plantas Municipales de Potabilización y de Tratamiento de Aguas Residuales en Operación*. Diciembre 2021. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Ciudad de México
- Correll, D. L. (1998). *The Role of Phosphorus in the Eutrophication of Receiving Waters: A Review*. Journal of Environment Quality, 27(2), 261. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x>
- Craggs, R., Park, J., Heubeck, S., & Sutherland, D. (2014). *High rate algal pond systems for low- energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production*. New Zealand Journal of Botany, 37–41. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.861855>
- Crites, R., & Tchobanoglous, G. (1998). *Small and Decentralized Waste Water Management System* (pp. 169-239). San Francisco, CA: WCB/McGraw Hill.
- De La Peña, M. E., Ducci, J., & Zamora, V. (2013). *Tratamiento de aguas residuales en México*. Banco Interamericano de Desarrollo, 42. <https://doi.org/IDB-TN-521>
- De-Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Morey, T., & Bashan, Y. (2004). *Microalgae growth-promoting bacteria as “helpers” for microalgae: A novel approach for removing ammonium and phosphorus from municipal wastewater*. Water Research, 38(2), 466–474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2003.09.022>
- De Souza Leite, L., Hoffmann, M. T., & Daniel, L. A. (2019). *Microalgae cultivation for municipal and piggery wastewater treatment in Brazil*. Journal Of Water Process Engineering, 31, 100821. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2019.100821>

- Diario Oficial de la Federación NOM-001-Semarnat-1996 recuperado de:
<https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1994.pdf>
- Diario Oficial de la Federación DOF (1997). NOM-001-Semarnat-1996 recuperado de:
<https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3290/1/nom-001-semarnat-1996.pdf>
- DOF (1998). NOM-002-Semarnat-1996 recuperado de:
<https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3295/1/nom-002-semarnat-1996.pdf>
- DOF (1998). NOM-003-Semarnat-1997 recuperado de:
<https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/3297/1/nom-003-semarnat-1997.pdf>
- DOF (2003). NOM-004-Semarnat-2001 recuperado de:
https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=691939&fecha=15/08/2003#gsc.tab=0
- DOF (2016). NOM-190-SSA-1999 recuperado de:
https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5430933&fecha=24%2F03%2F2016#gsc.tab=0
- Ekama, G. A. (2015). *Recent developments in biological nutrient removal*. Water SA, 41(4), 515–524. <https://doi.org/10.4314/wsa.v41i4.11> Environmental & Natural Resource Economics 9th Edition.
- Fink, G., Alcamo, J., Flörke, M., & Reder, K. (2018). *Phosphorus Loadings to the World's Largest Lakes: Sources and Trends*. Global Biogeochemical Cycles, 32(4), 617–634. <https://doi.org/10.1002/2017GB005858>
- Florescu, D., Ionete, R. E., Sandru, C., Iordache, A., & Culea, M. (2010). *The influence of pollution monitoring parameters in characterizing the surface water quality from romania southern area*. Rom. Journ. Phys., Vol. 56, Nos. 7–8, P. 1001–1010, Bucharest.
- Gonçalves, A. L., Rodrigues, C. M., Pires, J. C. M., & Simões, M. (2016). *The effect of increasing CO2 concentrations on its capture, biomass production and wastewater bioremediation by microalgae and cyanobacteria*. Algal Research, 14, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.008>
- Gray, N. (2004). *Biology of Wastewater Treatment*. Imperial College Press. Dublin. ISBN: 1-86094-332-2
- Guiry M. D. (2024). *How many species of algae are there? A reprise*. Four kingdoms, 14 phyla, 63 classes and still growing. Journal of phycology, 60(2), 214–228. <https://doi.org/10.1111/jpy.13431>
- Hernandez Reyes, B. M. (2010). *Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas*. D.F. Especialidad de Biotecnología, UAM-I. Pp. 4.

- Henze, M., Aspregren, H., la Cour Jansen, J., Nielsen, P. H., & Lee, N. (2002). *Effect of solids retention time and wastewater characteristics on biological phosphorus removal*. *Water science and technology*, 45(6), 137-144.
- Henze, M., Harremoes P., La Cour Jansen J. & E. Arvin. (2001) *Wastewater Treatment Biological and Chemical Processes*," 3rd Edition, Springer, Berlin.
- Henze, M., Harremoes, P., Arvin, E., & la Cour Jansen, J. (1997). *Wastewater treatment. Biological and chemical processes*; 2 ed Edition, Springer, Berlin
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C., Ekama, G. A., & Brdjanovic, D. (Eds.). (2008). *Biological wastewater treatment*. IWA publishing.
- Huang, F., Pan, L., Lv, N., & Tang, X. (2017). *Characterization of novel Bacillus strain N31 from mariculture water capable of halophilic heterotrophic nitrification–aerobic denitrification*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124(5), 564–571. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2017.06.008>
- Jiménez, B., Mara, D., Carr, R., & Brissaud, F. (2010). *Wastewater treatment for pathogen removal and nutrient conservation: suitable systems for use in developing countries*. *Wastewater Irrigation and Health. Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries*,149-169.
- John, D.M., Whitton, B.A. & Brook, A.J. *The Freshwater Algal Flora of the British Isles: An Identification Guide to Freshwater and Terrestrial Algae*. Second Edition. Cambridge University Press. United Kingdom.869p, Index. ISBN 978-0-521-19375-7.
- Khalili, A., Najafpour, G. D., Amini, G., & Samkhaniyani, F. (2015). *Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae Chlorella vulgaris*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 20(2), 284–290. <https://doi.org/10.1007/s12257-013-0845-8>
- Kim, D. J., Lee, D. I., & Keller, J. (2006). *Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by Fish*. *Bioresource Technology*, 97(3), 459–468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.032>
- Kott, Y., Roze, N., Sperber, S., & Betzer, N. (1974). *Bacteriophages as viral pollution indicators*. *Water Research* 8 (3): 165-171. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(74\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(74)90039-6)
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., Nayak, B., Lindblad, P., & Das, D. (2011). *Development of suitable photobioreactors for CO2 sequestration addressing global warming using green algae and cyanobacteria*. *Bioresource technology*, 102(8), 4945–4953. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.01.054>

- Larsdotter, K. (2006a). *Wastewater treatment with microalgae – a literature review*. *Vatten*, 62, 31–38.
- Larsdotter, K. (2006b). *Wastewater treatment with microalgae – a literature review*. *Vatten*, 62, 31–38.
- Liu, J., Feng, Y., Zhang, Y., Liang, N., Wu, H., & Liu, F. (2022). *Allometric releases of nitrogen and phosphorus from sediments mediated by bacteria determines water eutrophication in coastal river basins of Bohai Bay*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113426>
- Loladze, I., & Elser, J. J. (2011). *The origins of the Redfield nitrogen-to-phosphorus ratio are in a homeostatic protein-to-rRNA ratio*. *Ecology Letters*, 14(3), 244–250. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01577.x>
- Maizatul, A. Y., Radin Mohamed, R. M. S., Al-Gheethi, A. A., & Hashim, M. K. A. (2017). An overview of the utilisation of microalgae biomass derived from nutrient recycling of wet market wastewater and slaughterhouse wastewater. En *International Aquatic Research*, 9(3), Pp. 177–193. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s40071-017-0168-z>
- Markou, G. and Georgakakis, D. (2011) *Cultivation of Filamentous Cyanobacteria (Bluegreen Algae) in Agro-Industrial Wastes and Wastewaters: A Review*. *Applied Energy*, 88, 3389-3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>
- Mayer, P., Cuhel, R., & Nyholm, N. (1997). *A simple in vitro fluorescence method for biomass measurements in algal growth inhibition tests*. *Water Research*, 31(10), 2525-2531.
- Mehrabadi, A., Craggs, R., & Farid, M. M. (2016). *Biodiesel production potential of wastewater treatment high rate algal pond biomass*. *Bioresource Technology*, 221, 222-233.
- Mohamed, Z. A. (2008). *Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in Chlorella vulgaris and Scenedesmus quadricauda and their possible significance in the aquatic ecosystem*. *Ecotoxicology*, 17(6), 504–516. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0204-2>
- Morais, E. G. de, Amaro Marques, J. C., Cerqueira, P. R., Dimas, C., Sousa, V. S., Gomes, N., Ribau Teixeira, M., Nunes, L. M., Varela, J., & Barreira, L. (2022). *Tertiary urban wastewater treatment with microalgae natural consortia in novel pilot photobioreactors*. *Journal of Cleaner Production*, 378. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.134521>
- Mulbry, W., Kondrad, S., Pizarro, C., & Kebede-Westhead, E. (2008). *Treatment of dairy manure effluent using freshwater algae: Algal productivity and recovery of manure nutrients using pilot-scale algal turf scrubbers*. *Bioresource Technology*, 99(17), 8137–8142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.073>

- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). *Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. *Water Research*, 40(15), 2799–2815. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Noyola, A., Morgan-Sagastume, J.M. & Guereca, L.P. (2013). *Selección de Tecnologías para el Tratamiento de Aguas Residuales Municipales: Guía de Apoyo para Ciudades Pequeñas y Medianas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Ingeniería. 127 p. ISBN: 978-607-02-4822-1
- Olguin, E. J. (2012). *Dual purpose microalgae-bacteria-based systems that treat wastewater and produce biodiesel and chemical products within a Biorefinery*. *Biotechnology Advances*, 30(5), 1031–1046. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.05.001>
- Ortega, M.M. (1984). *Catálogo de algas continentales recientes de México*. Coordinación de la Investigación Científica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 565p.
- Park, J. B. K., Craggs, R. J., & Shilton, A. N. (2011). *Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production*. *Bioresource technology*, 102(1), 35-42.
- Peña, M. E. D. La, Ducci, J., & Zamora, V. (2013). *Tratamiento de aguas residuales en México*. Nota Técnica #IDB-TN-521, 42. <https://doi.org/IDB-TN-521>
- Petala, M., Kokokiris, L., Samaras, P., Papadopoulos, A., & Zouboulis, A. (2009). *Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents*. *Water Research*, 43(20), 5063–5074. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.08.043>
- 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.
- Powell, N., Shilton, A. N., Pratt, S., Chisti, Y., Brown, N., Pratt, S., Powell, N., Shilton, A. N., Pratt, S., & Chisti, Y. (2008). *Factors Influencing Luxury Uptake of Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilization Ponds*. *Environmental Science & Technology*, 42, 5958–5962. <https://doi.org/10.1021/es703118s>
- Prescott, G.W. *How to Know the Freshwater Algae*. WM. C. Brown Company Publishers. Dubuque. ISBN 0-697-04859-4.
- Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V., & Brányik, T. (2014). *Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae*. *Journal of applied phycology*, 26, 1359-1377.

- Pulz, O. (2001). *Photobioreactors: Production systems for phototrophic microorganisms*. Applied Microbiology and Biotechnology, 57(3), 287–293. <https://doi.org/10.1007/s002530100702>
- Radmann, E. M., Reinehr, C. O., & Costa, J. A. V. (2007). *Optimization of the repeated batch cultivation of microalga Spirulina platensis in open raceway ponds*. Aquaculture, 265(1–4), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.02.001>
- Rambabu, K., Thanigaivelan, A., Bharath, G., Sivarajasekar, N., Banat, F., & Show, P. L. (2021). *Biosorption potential of Phoenix dactylifera coir wastes for toxic hexavalent chromium sequestration*. Chemosphere, 268. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128809>
- Reynolds, C. S., (1999). Non-determinism to Probability, or N:P in the community ecology of phytoplankton. *Archiv für Hydrobiologie*, 146: 23–35.
- Richmond, A., & Hu, Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*.
- Rittmann, B.E. and McCarty, P.L. (2001) *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill Education, New York.
- Rojas, R. (2002). *Curso Internacional “Gestión integral de tratamiento de aguas residuales” 25 al 27 de setiembre de 2002 Conferencia Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales*.
- Romero-Freire, A., De Marchi, L., Freitas, R., Velo, A., Babarro, J. M. F., & Cobelo-García, A. (2024). *Ocean acidification impact on the uptake of trace elements by mussels and their biochemical effects*. Aquatic Toxicology, 269. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106882>
- Rosenberg J., Oyler G., Wilkinson L., Betenbaugh M. (2008). *A green light for engineered algae: redirecting metabolism to fuel a biotechnology revolution*. Current Opinions in Biotechnology, 19:430–436
- Sánchez Mirón, A., Cerón García, M. C., García Camacho, F., Molina Grima, E., & Chisti, Y. (2002). *Growth and biochemical characterization of microalgal biomass produced in bubble column and airlift photobioreactors: Studies in fed-batch culture*. Enzyme and Microbial Technology, 31(7), 1015–1023. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00229-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00229-6)
- Schoepp, N. G., Stewart, R. L., Sun, V., Quigley, A. J., Mendola, D., Mayfield, S. P., & Burkart, M. D. (2014). *System and method for research-scale outdoor production of microalgae and cyanobacteria*. Bioresource Technology, 166, 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.046>
- Silva-Benavides, A. M., & Torzillo, G. (2012). *Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga Chlorella vulgaris and cyanobacterium*

- Planktothrix isothrix* grown as monoalgal and as co-cultures. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 267–276. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9675-2>
- Slegers, P. M., Wijffels, R. H., van Straten, G., & Van Boxtel, A. J. B. (2011). *Design scenarios for flat panel photobioreactors*. *Applied energy*, 88(10), 3342-3353.
- Smith, G.M. (1950). *The Freshwater Algae of the United States*. McGraw-Hill Book Company. Second Edition. New York. 719p. ISBN 07-058809-0.
- Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2012). *Comparison of nutrient removal capacity and biomass settleability of four high-potential microalgal species*. *Bioresource Technology*, 124, 157–162. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.08.037>
- Sunda, W. G., Shertzer, K. W., & Hardison, D. R. (2009). *Ammonium uptake and growth models in marine diatoms: Monod and Droop revisited*. *Marine Ecology Progress Series*, 386, 29-41.
- Tiffany, L.H. & Britton, M.E. (1952). *The Algae of Illinois*. The University of Chicago Press. Chicago. 407p.
- Tran, D. T., Van Do, T. C., Nguyen, Q. T., & Le, T. G. (2021). *Simultaneous removal of pollutants and high value biomaterials production by Chlorella variabilis TH03 from domestic wastewater*. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 23(1), 3–17. <https://doi.org/10.1007/s10098-020-01810-5>
- Villaseñor Camacho, J., Fernández Marchante, C. M., & Rodríguez Romero, L. (2018). *Analysis of a photobioreactor scaling up for tertiary wastewater treatment: denitrification, phosphorus removal, and microalgae production*. *Environmental Science and Pollution Research*. Vol. Y pp. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2890-5>
- Wang, C., Yu, X., Lv, H., & Yang, J. (2013). *Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater by the green alga Chlorella sp.* *Journal of Environmental Biology ISSN:*, 34(April), 421–425. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.101>
- Wang, J. H., Zhang, T. Y., Dao, G. H., Xu, X. Q., Wang, X. X., & Hu, H. Y. (2017). *Microalgae-based advanced municipal wastewater treatment for reuse in water bodies*. *Applied microbiology and biotechnology*, 101, 2659-2675.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). *Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wang, Q., Yang, Y., Shen, Q., Chen, X., Li, F., Wang, J., Zhang, Z., Lei, Z., Yuan, T., & Shimizu, K. (2022). *Energy saving and rapid establishment of granular microalgae system from tiny microalgae cells: Effect of decrease in upflow air velocity under*

- intermittent aeration condition*. *Bioresource Technology*, 363(127860), 127860. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127860>
- Wehr, J.D., Sheath, R.G., & Kocielek, J.P. (2002). *Freshwater Algae of North America*. Academic Press. New York. 936p. ISBN-10- 0127415505.
- Whitford, L.A., & Schumacher, G.J. (1984). *Manual of Freshwater Algae*. Revised Edition. Sparks Pr. Inc. ISBN-10-091682201X
- Wu, N., Dong, X., Liu, Y., Wang, C., Baattrup-Pedersen, A., & Riis, T. (2017). *Using river microalgae as indicators for freshwater biomonitoring: Review of published research and future directions*. *Ecological Indicators*, 81(May), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.066>
- YaYaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). *Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview*. *Cells*, 10(2), 393.
- Yaakob, M. A., Mohamed, R. M. S. R., Al-Gheethi, A., Aswathnarayana Gokare, R., & Ambati, R. R. (2021). *Influence of nitrogen and phosphorus on microalgal growth, biomass, lipid, and fatty acid production: an overview*. *Cells*, 10(2), 393.
- Yodsuwan, N., Sawayama, S., & Sirisansaneeyakul, S. (2017). *Effect of nitrogen concentration on growth, lipid production and fatty acid profiles of the marine diatom Phaeodactylum tricornutum*. *Agriculture and Natural Resources*, 51(3), 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2017.02.004>
- Zeng, X., Guo, X., Su, G., Danquah, M. K., Zhang, S., Lu, Y., Sun, Y., & Lin, L. (2015). *Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 1385–1392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.033>
- Zhang, J., Wu, P., Hao, B., & Yu, Z. (2011). *Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium Pseudomonas stutzeri YZN-001*. *Bioresource Technology*, 102(21), 9866–9869. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.118>
- Znad, H., Al Ketife, A. M. D., Judd, S., AlMomani, F., & Vuthaluru, H. B. (2018). *Bioremediation and nutrient removal from wastewater by Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 110(September 2016), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2017.10.008>