

## TRABAJOS ORIGINALES

Presentado: 27/06/2020  
Aceptado: 12/12/2020  
Publicado online: 25/02/2021  
Editor: Leonardo Romero

### Autores

**Alberto Oscanoa Huaynate\***  
aoscano@imarpe.gob.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-6048-5167>

**Miguel Cervantes Gallegos**  
mcervantes@imarpe.gob.pe  
<https://orcid.org/0000-0001-9775-3823>

**Leenin Flores Ramos**  
lflores@imarpe.gob.pe  
<https://orcid.org/0000-0002-6099-4321>

**Anthony Ruiz Soto**  
aruiz@imarpe.gob.pe  
<https://orcid.org/0000-0003-3865-3632>

### Correspondencia

#### \*Corresponding author

Instituto del Mar del Perú, Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura, Callao, Perú.

### Citación

Oscanoa Huaynate A, Cervantes Gallegos M, Flores Ramos L, Ruiz Soto A. 2021. Evaluación del potencial de *Desmodesmus asymmetricus* y *Chlorella vulgaris* para la remoción de nitratos y fosfatos de aguas residuales. Revista peruana de biología 28(1): e18082 (Febrero 2021). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v28i1.18082>

## Evaluación del potencial de *Desmodesmus asymmetricus* y *Chlorella vulgaris* para la remoción de nitratos y fosfatos de aguas residuales

### Potential assessment of *Desmodesmus asymmetricus* and *Chlorella vulgaris* for removal of nitrates and phosphates in wastewater

#### Resumen

En este estudio evaluamos las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Desmodesmus asymmetricus*, con el fin de determinar la proporción de microalgas que remueven la mayor concentración de nitrógeno y fósforo en aguas residuales de una planta de tratamiento. Se realizó un diseño de mezclas de las microalgas con el agua residual durante 9 días, con fotoperiodo 12:12 h, en un invernadero. Las mayores eficiencias de remoción de nitrógeno (principalmente  $\text{NO}_3^-$ -N y  $\text{NO}_2^-$ -N) y fósforo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) se observaron en los tratamientos con mayor proporción de *D. asymmetricus*, entre ellos sobresalió el tratamiento T3 (25% *C. vulgaris* / 75% *D. asymmetricus*) donde se removió el 100% de nitrógeno y 77.1% de fósforo. De igual manera con el oxígeno disuelto (OD), el T3 obtuvo el mejor resultado alcanzando una media de  $25.50 \pm 0.28$  mg/L. Finalmente, de acuerdo con el análisis del diseño de mezclas, se determinó que la mezcla óptima de microalgas que logra la mayor producción de OD y la mayor remoción, fue la proporción de 6% de *C. vulgaris* y 94% de *D. asymmetricus* en un tiempo de cultivo de 9 días. En conclusión, las microalgas demuestran su capacidad de biorremediación de aguas residuales domésticas.

#### Abstract

In this work, we evaluated the proportion *Chlorella vulgaris* and *Desmodesmus asymmetricus* microalgae, that removes the highest concentration of nitrogen and phosphorus in wastewater from a treatment plant. A mixture design was employed in this study, for 9 days, with 12:12 h photoperiod, in a greenhouse. The highest nitrogen removal efficiencies (mainly  $\text{NO}_3^-$ -N and  $\text{NO}_2^-$ -N) and phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) were observed in treatments with the highest proportion of *D. asymmetricus*, including T3 (25% *C. vulgaris* / 75% *D. asymmetricus*), where 100.0% nitrogen and 77.1% phosphorus were removed. Likewise, T3 obtained the best result of dissolved oxygen (DO), achieving average of  $25.50 \pm 0.28$  mg/L. Finally, according to the analysis of the mixture design, the optimal microalgae mixture was determined that achieves the highest DO production, and the highest removal was the proportion of 6% of *C. vulgaris* and 94% of *D. asymmetricus* in 9 days cultivation time. In conclusion, microalgae have shown their capacity for bioremediation of domestic wastewater, which is an alternative to consider.

#### Palabras claves:

Ficorremediación; tratamiento de aguas residuales; remoción; *Desmodesmus asymmetricus*; *Chlorella vulgaris*.

#### Keywords:

Phycorremediation; wastewater treatment; removal; *Desmodesmus asymmetricus*; *Chlorella vulgaris*.

## Introducción

Las aguas residuales proceden de diversas actividades humanas, como desechos urbanos y procesos industriales, y requieren una fiscalización ambiental y un adecuado manejo por parte de las entidades involucradas y de los investigadores, debido a que las descargas son vertidos a cuerpos de agua naturales, generando problemas de contaminación por el exceso de nutrientes, en algunos casos la eutrofización de los mismos, afectando los procesos naturales de purificación y la capacidad de asimilación de estos ecosistemas acuáticos (Aslan & Kapdan 2006, Rawat et al. 2011, Renuka et al. 2013, Gonçalves et al. 2016, Winkler & Straka 2019).

A fin de mejorar las características y la calidad de los efluentes a descargar, se desarrollaron las plantas de tratamiento con las siguientes etapas: Pretratamiento, donde se eliminan materias gruesas; tratamiento primario o físico, se realiza la remoción de los sólidos suspendidos; tratamiento secundario o biológico, donde se busca la reducción de materia orgánica, fue diseñado tomando como ejemplo el proceso biológico de la autodepuración que ocurre de manera natural, para que este proceso se haga efectiva y eficiente, deben de existir condiciones adecuadas, sin embargo, los efluentes aun contienen alta carga orgánica y microorganismos patógenos, haciendo necesario un tratamiento terciario que normalmente implica una cloración, proceso altamente costoso restringiendo su aplicación (Libhaber & Orozco-Jaramillo 2012, Tilley et al. 2014, Raouf et al. 2019, Herrera 2020).

En la actualidad, el tratamiento terciario convencional de aguas residuales enfrenta el reto de disminuir dichos excesos, por este motivo las recientes investigaciones están orientadas en la búsqueda de innovación tecnológica efectivas y de bajo costo (Gonzales-Fernandez & Muñoz 2018). Diferentes investigaciones, especialmente los enfocados en tratamientos biológicos, han propuesto la fitorremediación, es decir la utilización de microalgas, porque los componentes presentes en las aguas residuales son favorables para su desarrollo (Maity 2014, Yonjun 2016, Khanna et al. 2019). Las microalgas, son una excelente opción, debido a su fácil capacidad de adaptación, resistencia y utilización de nitritos y fosfatos como fuentes de alimentación, además, la posibilidad de utilizar la biomasa microalgal como matriz en energías renovables, así como también generar biocompuestos de alto valor agregado (Khatoon & Pal 2015, Khan et al. 2018, Khanna et al. 2019).

Para la fitorremediación se ha planteado la utilización de cultivos mono-específicos o consorcios, conociéndose en la actualidad un determinado número de especies de microalgas aptas para la biorremediación, con ventajas importantes principalmente en la reducción de nutrientes lo que mejora la calidad del efluente (Abdel-Raouf 2012, Arbib et al. 2014, Uggetti et al. 2018). En algunas investigaciones se redujo el 100% de las concentraciones de nutrientes, estos valores dependen de la especie empleada y las características del agua residual (Markou & Georgakakis 2011, Acien et al. 2016, Mujtaba & Lee 2017, Acien et al. 2018, Liu et al. 2019). Se han

reportado algunas microalgas clorofitas como opciones viables para la fitorremediación, entre los géneros se encuentran *Scenedesmus*, *Chlorella*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamidomonas* (Martínez et al. 2000, Hernández et al. 2006, Park et al., 2010, Wang et al. 2010) y algunas cianofitas como *Arthrospira* (Lodi et al. 2003, Olgún et al. 2003, Hernandez-Perez & Labbé 2014).

En nuestro país, existen escasos registros sobre la utilización de las microalgas para la recuperación de aguas residuales descargadas al sistema de alcantarillado o vertidas a un cuerpo de agua con valores de nutrientes permisibles. En tal sentido, en este estudio evaluamos las cepas microalgales *Chlorella vulgaris* y *Desmodesmus asymmetricus*, con el fin de determinar la proporción que remueve la mayor concentración de nitrógeno y fósforo, a fin de proponer el cultivo de microalgas como una alternativa para el tratamiento de aguas residuales.

## Material y métodos

**Cultivo inicial de microalgas.-** Las microalgas evaluadas fueron *Desmodesmus asymmetricus* código IMP-BG-249 y *Chlorella vulgaris* código IMP-BG-020, proporcionadas en volumen de 250 mL por el Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos del IMARPE, con densidades celulares de  $4.80 \pm 0.59$  y  $5.60 \pm 0.14$  ( $\times 10^6$  cel/mL), respectivamente. Se continuó el escalonamiento a 500 mL, 1 L y 7 L, con intervalos de 5 días en el Laboratorio de Alimento Vivo del IMARPE. Se utilizó el medio de cultivo CHU (Creswell, 1993) en una concentración de 1 mL/L y en el cultivo de 7 L se utilizó el Nutriente foliar líquido Bayfoland® en una concentración de 0.28 mL/L. Los cultivos permanecieron a pH  $7.5 \pm 0.5$ , temperatura  $20.0 \pm 1.5$  °C, aireación constante e iluminación constante en el rango de 1500 – 2500 Lux. Luego, los cultivos en la fase exponencial fueron trasladados al laboratorio de Invernadero y Sala de procesos del IMARPE, para los ensayos de biorremediación.

**Muestra de agua residual.-** La muestra del efluente fue proporcionada por la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR) - La Taboada, Callao, Lima (-11.995590354126339, -77.13342190490293), el 16 de agosto de 2018. Se colectó 50 L in situ, en el canal de salida de la misma, en ese punto se obtuvo el efluente del tratamiento preliminar avanzado de la PTAR, el cual se le retuvo todos los sólidos mayores a 1 mm, arenas y grasas.

Previo al experimento, el efluente fue colocado en reposo y oscuridad por un intervalo de 7 días, a una temperatura de 18 °C, generando anaerobiosis y sedimentación, con esas condiciones se evitó la proliferación de organismos fotoautótrofos, se logró la sedimentación de los quistes de protozoos y huevos de helmintos (principales depredadores de las microalgas) y también un decaimiento en la concentración de bacterias.

**Optimización de la proporción de las microalgas *D. asymmetricus* y *C. vulgaris*.-** Se aplicó el diseño de mezclas con el software estadístico Minitab 17. Se realizó un diseño de mezclas de vértices extremos con dos componentes por triplicado y aleatorizado. Como variable res-

puesta se evaluó la remoción de los nitratos y fosfatos del agua residual (Tabla 1) y como control el agua residual sin microalgas (C1). La aireación en los tratamientos, se realizó de manera mecánica (agitación horizontal) 3 veces al día (8, 12 y 16 horas), la experimentación fue realizado por 9 días con fotoperiodo 12:12 h, bajo condiciones de un invernadero. Se evaluó el análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

**Monitoreo de parámetros abióticos.-** La medición de los parámetros abióticos se realizó durante 8 días, 3 veces al día (8, 12 y 16 horas), con un Multiparámetro portátil Multi 350i/SET WTW, el pH y la Temperatura (°C) se midió con un electrodo combinado SenTix™ 41, mientras, el Oxígeno Disuelto (OD) (mg/L) y la salinidad (ppm) con un sensor combinado de conductividad y oxígeno OxiCal® -Cx.

**Monitoreo de macronutrientes (N y P).-** Para el análisis del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ -N), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), se tomaron 50 mL de muestra

de cada tratamiento a las 8 de mañana y se realizaron las lecturas por 9 días, empleando un fotómetro multiparámetro para laboratorios HI 83200 (Hanna Instruments). Fueron utilizados tres rangos, rango alto (RA), rango bajo (RB) y rango medio (RM) (Tabla 2).

## Resultados y discusión Monitoreo de parámetros abióticos

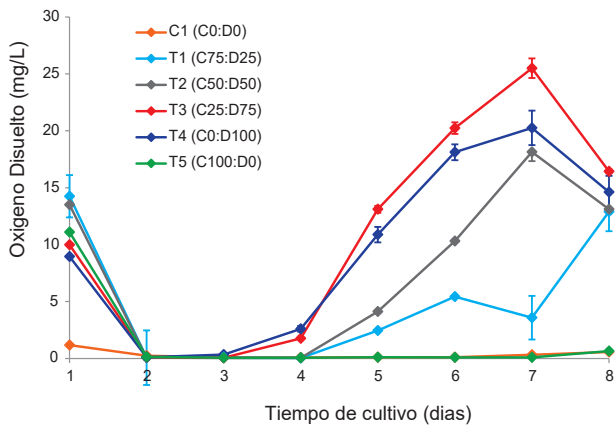
**Oxígeno disuelto (OD).-** El nivel de OD en aguas naturales y residuales depende de las actividades físicas, químicas y bioquímicas del receptor de agua. Su cuantificación es determinante en la polución del agua y en el control de procesos de tratamiento de desechos (Rice et al., 2012). Por otro lado, el OD es un indicador de la actividad fotosintética de las microalgas y los valores registrados son más altos que los encontrados en equilibrio con el aire (Su et al. 2012b). La variación del OD en los 6 tratamientos se muestra en la Figura 1.

**Tabla 1.** Diseño de mezclas del experimento para el tratamiento del efluente de la PTAR Taboada con las microalgas *Desmodesmus asymmetricus* y *Chlorella vulgaris*.

Numero de Orden	Numero de ensayo	Valor mínimo	Valor máximo	<i>C. vulgaris</i>	<i>D. asymmetricus</i>	Tratamientos
14	1	-1	1	0.75	0.25	T1
15	2	-1	1	0.25	0.75	T3
1	3	1	1	1.00	0.00	T5
11	4	1	1	1.00	0.00	T5
12	5	1	1	0.00	1.00	T4
6	6	1	1	1.00	0.00	T5
3	7	0	1	0.50	0.50	T2
8	8	0	1	0.50	0.50	T2
13	9	0	1	0.50	0.50	T2
2	10	1	1	0.00	1.00	T4
5	11	-1	1	0.25	0.75	T3
9	12	-1	1	0.75	0.25	T1
4	13	-1	1	0.75	0.25	T1
10	14	-1	1	0.25	0.75	T3
7	15	1	1	0.00	1.00	T4

**Tabla 2.** Especificaciones del medidor Fotómetro multiparámetro para laboratorios HI 83200

Parámetros	Métodos de análisis	Rango de medida (mg/L)	Código de reactivo
Nitrato	Reducción por Cadmio	0.0 - 30.0 ± 0.1	HI 93728
Nitrito	Sulfato ferroso (RA)	0.0 - 150.0 ± 1.0 (RA)	HI 93708 (RA)
	Diazotización (RB)	0.00 - 0.35 ± 0.01 (RB)	HI 93707 (RB)
Fosfato	Aminoácido (RA)	0.0 - 30.0 ± 0.1 (RA)	HI 93717 (RA)
	Ácido Ascórbico (RB)	0.00 - 2.50 ± 0.01 (RB)	HI 93713 (RB)
Amonio	Nessler	0.00 - 3.00 ± 0.01 (RB)	HI 93700 (RB)
		0.0 - 10.0 ± 0.01 (RM)	HI 93715 (RM)



**Figura 1.** Variación diaria de la cantidad de Oxígeno Disuelto (mg/L) (barras verticales son la desviación estándar).

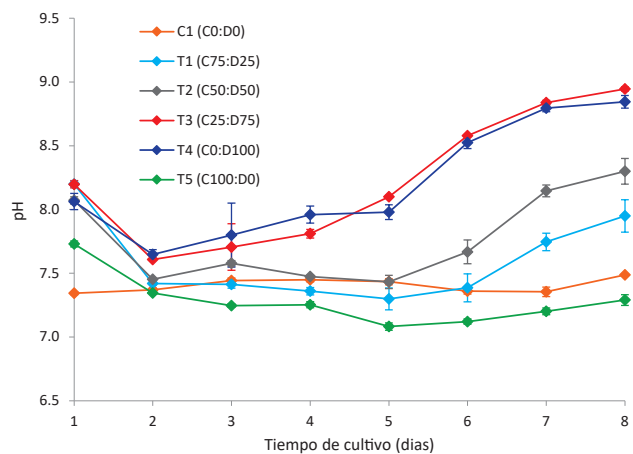
Al iniciar el experimento el OD (mg/L), registró valores de  $11.59 \pm 2.03$ , luego tuvo una disminución hasta  $0.12 \pm 0.11$ , durante los 3 primeros días de experimentación (Fig. 1), esto posiblemente debido al consumo realizado por microorganismos heterotróficos (principalmente bacterias aeróbicas), sin embargo, a partir del día 3 comenzó a incrementarse, debido a la actividad fotosintética realizada por las microalgas, se alcanzaron valores máximos durante el día 7 del experimento (T3 =  $25.50 \pm 0.28$ , T4 =  $20.26 \pm 2.47$  y T2 =  $18.14 \pm 0.63$ ), se obtuvo diferencias significativas en todos los tratamientos evaluados excepto entre C1-T5 ( $p=0.970$ ).

Estas concentraciones son superiores a los reportados por Su et al. (2012), quienes emplearon consorcios nativos de microalgas/lodos activados, en diferentes concentraciones, durante 14 días, y el incremento del OD comenzó a partir del segundo día (tratamiento solo con microalgas), mientras en los demás a partir del octavo día. De igual manera en el estudio de Maity et al. (2014), con la cianobacteria *Leptolyngbya* sp. después de 7 días de cultivo el OD alcanzó un valor máximo de  $7.96 \pm 0.87$ , uno de los últimos estudios realizado por López et al. (2016), también empleando consorcios nativos de microalgas/lodos activados, obtuvieron concentraciones máximas de 19.46 al cuarto día de cultivo (tiempo de duración del experimento) y el incremento del OD comenzó a partir del segundo día.

En la Figura 1, se puede observar que los tratamientos con *C. vulgaris*, presentan menor OD, es más notorio en T5 (100% *C. vulgaris*), donde se registró un mínimo incremento del OD ( $0.65 \pm 0.54$ ) al día 8 del experimento, posiblemente está asociado a la ausencia del incremento de la densidad microalgal, y la poca aglomeración para incrementar la superficie de absorción y lograr capturar de manera más eficiente los nutrientes disponibles a su alrededor (Kagami & Urabe 2001) a diferencia de *D. asymmetricus* que son organismos coloniales agrupadas en cenobios, formadas en general por 4 células, dispuestas lado a lado (Lee 2008).

**Potencial de hidrógeno (pH).**- El pH es uno de los factores importantes en el cultivo de microalgas, debido

a que su variación en el medio de cultivo puede afectar el metabolismo celular y el incremento de la biomasa microalgal. Cada especie de microalga, necesita un rango determinado de pH que permita un crecimiento óptimo (Xin 2010, Zhang 2014), dependiendo de qué especies químicas esté más habituada a asimilar (De Moraes & Costa 2007), se ha indicado el pH 8 es el más indicado para especies dulceacuícolas (Park et al., 2011), sin embargo, en cultivos continuos de los géneros *Chlorella* y *Desmodesmus*, se encontraron mejores resultados sobre la producción de biomasa en pH entre 7.2 - 8.7 (Azov 1982, Ma et al. 2014). La variación del pH en los 6 tratamientos se presenta en la Figura 2.



**Figura 2.** Variación diaria del pH (barras verticales son la desviación estándar).

El pH, al segundo día del experimento presento una caída en todos los tratamientos, alrededor de  $7.47 \pm 0.13$ , debido a la baja actividad fotosintética y al proceso de nitrificación. Al final del experimento, se registraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, excepto entre C1-T5 ( $p=0.941$ ), T1-T2 ( $p=0.439$ ) y T3-T4 ( $p=0.998$ ). En T1, T2, T3 y T4, a partir del día 4, el pH del cultivo comenzó a incrementarse posiblemente por efecto de la fotosíntesis (proceso de alcalinización), en T3 y T4 se encontraron los mayores valores durante el octavo día ( $8.95 \pm 0.03$  y  $8.84 \pm 0.09$ , respectivamente), en el caso de C1 y T5, los valores se mantuvieron estables hasta el final del experimento.

La microalga *C. vulgaris* normalmente es cultivada a pH ácido, se presume que para su crecimiento prefiere asimilar el ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) como fuente de carbono. Esto se debe a que a pH por debajo de 7.0, el medio de cultivo está dominado por moléculas de  $CO_2$  libres o  $H_2CO_3$  cuando el  $CO_2$  se disuelve en agua (Abalde 1995). En el caso de T1 y T5, esto se lograría mediante la aireación o inyección controlada de  $CO_2$ , cosa que no se realizó en este experimento, solamente se realizó la agitación horizontal 3 veces al día. A menudo en el cultivo *C. vulgaris*, se realiza un control de pH a través del rociado directo de gas de fuentes industriales y municipales (Ge & Champagne, 2016). Todo lo contrario, con el género *Scenedesmus*, Su et al. (2012a) descubrieron que

la condición ácida dio como resultado un bajo crecimiento de las microalgas y por ende una baja eficiencia en la eliminación de nutrientes.

Por último, empleando consorcios nativos de microalgas y lodos activados, en diferentes concentraciones, encontraron resultados similares a nuestro experimento, el pH en el tratamiento solo con algas, se incrementó a alrededor de 9.2 después de los primeros 7 días y se mantuvo estable hasta el final de la prueba (Su et al. 2012, López 2016). Se han reportado resultados similares en cultivos *Phormidium* sp., *Chlamydomonas reinhardtii* y *Scenedesmus rubescens*, llegando a la conclusión que el pH óptimo está en el rango neutral a ligeramente alcalino (6.0 hasta 8.3) (Azov 1982; Olaizola 2003; Ying et al. 2014, López 2016, Beltrán-Rocha et al. 2017, Morales et al. 2018).

**Macronutrientes (N y P).**- El primer paso para el tratamiento de aguas residuales es conocer su composición inicial y de este modo decidir su uso como medio de cultivo, en razón de ello, primero se determinó, según Redfield 1958, la relación N/P (18.3) (Tabla 3), ya que el incremento de la densidad microalgal y la eliminación de N y P están afectados por las proporciones de N/P. Durante el experimento esta relación tuvo una variación desde 5 hasta 18, estos valores se encuentran dentro del rango establecido como relación óptima para la eliminación de nutrientes con microalgas, el cual varía de 5 a 30, dependiendo de las condiciones de las aguas residuales y es especie específica. Algunas investigaciones en *D. asymmetricus* registraron la proporción óptima entre 9 y 13, y para *C. vulgaris* entre 11 y 19 (Choi & Lee, 2014), mientras en cultivos mixtos entre 5 y 20 (Prathima et al. 2012).

Dado que la descarga del efluente tratado proveniente de la PTAR La Taboada, muestra una composición adecuada para el cultivo de microalgas, se realizó el experimento.

**Tabla 3.** Características del efluente de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales (PTAR)- La Taboada.

Parámetro	Unidad	Resultado
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/L	55.9
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	mg/L	9.00
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	mg/L	19.9
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	mg/L	129.0
pH	Unid pH	7.40
Temperatura	°C	21.9

**Nitrógeno (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> / NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N / NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N).**- La eliminación de nutrientes, entre ellos el nitrógeno, es básicamente un efecto de la asimilación de nutrientes a medida que crecen las microalgas, es el constituyente de los ácidos nucleicos, aminoácidos y de todas las proteínas sintetizadas en base a estos, los cuales son esenciales para su funcionamiento (Beltrán-Rocha et al. 2017, Lachmann et al. 2019).

El nitrógeno en forma de amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), tuvo una concentración inicial de 59.8 mg/L. A lo largo del experimento en presencia de los tratamientos no se logró observar una tendencia clara en la disminución de la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La remoción diaria de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se observa en la Figura 3A, se registraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados excepto entre T2-T3 ( $p=0.651$ ) y T1-T4 ( $p=0.539$ ), el tratamiento C1 fue significativamente menor a los demás tratamientos ( $p<0.01$ ). Se observa la mayor eficiencia de eliminación entre los días 8 y 9 en los tratamientos T2 y T3 (24.0 ± 0.35, 17.8 ± 0.10 %, corresponden a las concentraciones de 45.4 ± 0.35 y 49.2 ± 0.72, respectivamente) seguidos de T1, T4 y T5.

Por otro lado, la concentración de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) no tuvo diferencias significativas excepto el tratamiento C1 ( $p<0.05$ ) (Fig. 3B). Al iniciar el experimento el nitrato tuvo un valor de 12.6 mg/L, luego al día 2 de cultivo una disminución hasta en promedio 3.67 ± 0.62 y al día 4 se registró 0.88 ± 0.34, finalmente al último día del experimento se obtuvo una concentración de 0.30 ± 0.23 mg/L y en T3 0.00 mg/L. Mientras la concentración inicial del nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N) fue de 3.33 mg/L, al día 2 del cultivo se incrementó (en promedio 3.54 ± 0.47), para luego descender hasta el día 5 (1.83 ± 0.58), luego la reducción se volvió constante hasta obtener 0.0 mg/L (Fig. 3C), presentándose solo variación estadística con respecto a C1.

Las microalgas obtienen los compuestos nitrogenados del medio generalmente en forma de Ion amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) debido a que se incorpora directamente a los aminoácidos por condensación con glutamato, aunque en condiciones de deficiencia pueden incorporar el nitrógeno en forma de nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N) y nitritos (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N). Si bien el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es la especie de nitrógeno preferentemente asimilada por las microalgas debido a que evita los pasos de reducción de nitrógeno que consume energía, se encuentra el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N en un contenido mayoritario, siendo la fuente principal de nitrógeno, el cual es propia de aguas tratadas (como los efluentes de las PTAR) (Sanz-Luque et al. 2015, Beltrán-Rocha et al. 2017). El NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N, es la forma más oxidada del nitrógeno, a diferencia de las formas amonio y nitrito, es menos toxico, además induce la actividad de la enzima nitrato reductasa, clara ventaja sobre el amonio ya que el exceso de este (>20 mg/L) puede tener efectos negativos sobre el crecimiento microalgal (Morris & Syrett 1963, Lachmann et al. 2019).

El amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) durante el experimento no tuvo una reducción significativa de su concentración (Fig. 3A). Este tipo de resultados posiblemente es explicado por la actividad fotosintética (reducción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) para la asimilación reductora del N (Fischer y Klein, 1998; Crawford 1995, Fidalgo 1995, Sanz-Luque et al. 2015). Además, las formas NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/NH<sub>3</sub> son altamente dependientes de temperatura y pH, siendo este último el factor más importante, tal como se explica en el Diagrama de predominancia (Markou & Georgakakis 2011, Beltrán-Rocha 2017), donde a pH con concentraciones inferiores de 9.25 favorecen la formación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y valores superiores a 9.25 predomina el NH<sub>3</sub> (Abeliovich y Azov 1976, Markou & Georgakakis 2011), de acuerdo a las condiciones de nuestro estudio el

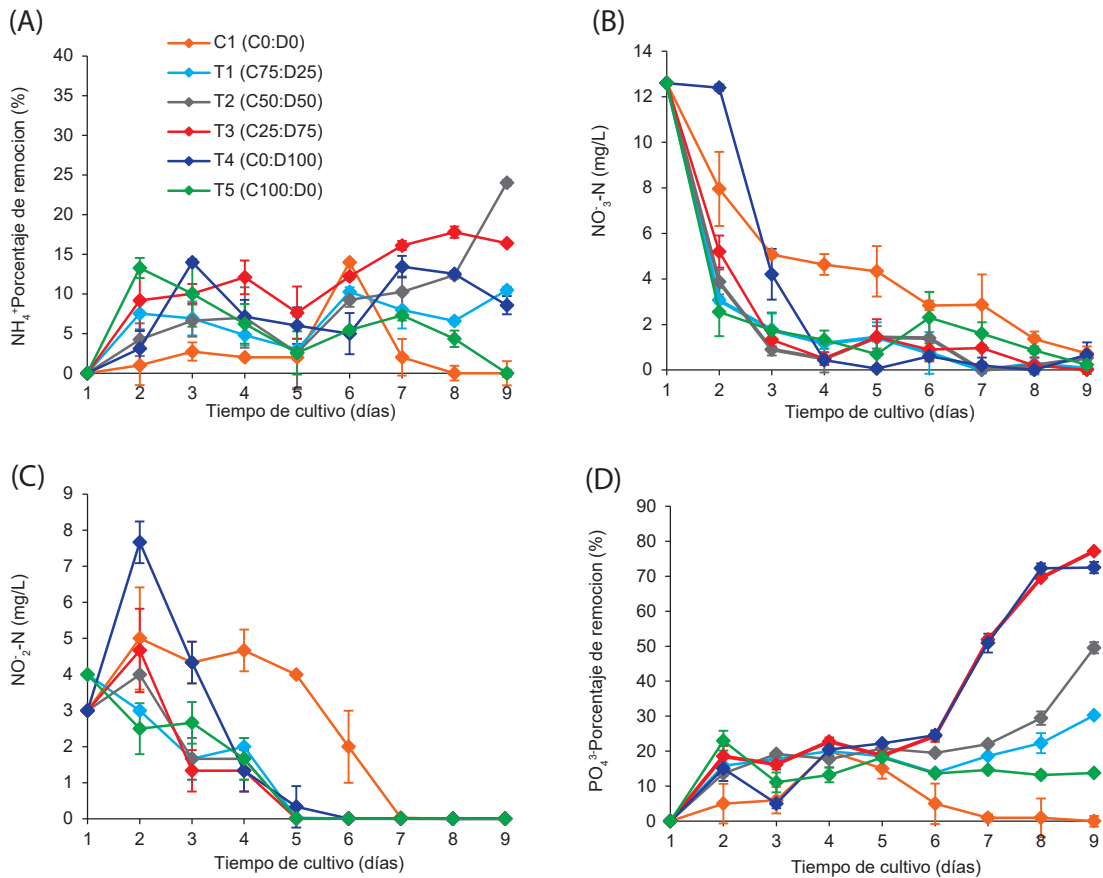
pH más alto fue de 8.95, este valor no permitió la disminución de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4^+$ .

Caso contrario a la concentración de  $\text{NO}_3^-$ -N, donde se tuvo una disminución a partir del cuarto día de cultivo, excepto C1 que obtuvo poca disminución, en este tratamiento aparentemente no hay presencia de organismos fotosintéticos. Durante el experimento se observaron reducciones de  $\text{NO}_3^-$ -N (Figura 3B) e incrementos de pH (Figura 2), esta relación fue reportado en estudios donde se asimilaban  $\text{NO}_3^-$ -N como fuente de nitrógeno (Zhang et al. 2014, López et al. 2016), así como también se menciona el efecto de la fotosíntesis microalgal, al realizar la interconversión metabólica del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ -N) al reducir a  $\text{NH}_4^+$  (Abalde et al. 1995, Sanz-Luque et al. 2015, Taziki et al. 2015, Lachmann et al. 2019).

La concentración de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ -N) mostró tendencias de incremento durante el periodo experimental con un posterior descenso de concentración (Fig. 3C). Es más notorio en T4 y C1, este último se mantuvo casi constante hasta el quinto día de cultivo, el incremento fue debido posiblemente a dos distintas actividades por microorganismos, en C1 se incrementó la concentración de nitritos debido a la actividad de oxidación bacteriana (presentes en toda agua residual) tiene como característica principal la interconversión de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$ -N (Krekeler 2008) y en el resto de tratamientos probablemente al desarrollo de las microalgas (Beltran-Rocha 2017). También se

pudo observar, el aumento de  $\text{NO}_2^-$ -N con una disminución en la concentración de  $\text{NO}_3^-$ -N, este comportamiento también fue observado en estudios realizados con *Chlorella* sp. en aguas residuales (Wang et al. 2010). Esto es debido a que la incorporación del nitrógeno en forma oxidada en organismos fotosintéticos, ocurre en dos etapas en el cloroplasto (Fischer & Klein 1988, Crawford 1995), por lo tanto, se genera  $\text{NO}_2^-$ -N en el proceso que  $\text{NO}_3^-$ -N es reducido a  $\text{NH}_4^+$  y posiblemente parte del  $\text{NO}_2^-$ -N formado es excretado al citosol (Fidalgo 1995, Burhenne & Tischner 2000, Beltrán-Rocha et al. 2017).

Según Abalde et al. 2012, las microalgas poseen una mejor absorción del nitrógeno en forma de amonio, luego nitritos y por último los nitratos, esto se debe a que la transformación a sus formas reducidas implica un gasto de energía. Sin embargo, hay casos en que nitrato, nitrito y amonio son asimilados simultáneamente (Fidalgo 1995). Se ha sugerido que el fitoplancton es oportunista en cuanto a la capacidad de asimilar rápidamente cualquier pulso de amonio que pueda surgir en su ambiente a partir de cualquier fuente (Fidalgo 1995). Los autores Su et al (2012b), afirman que los microorganismos en asociación dentro de un cultivo de microalgas contribuyen a la remoción de nutrientes a través del proceso de nitrificación y desnitrificación, es decir, catalizan el proceso de remoción de los nitratos presentes en el medio, permitiendo el crecimiento microalgal.



**Figura 3.** Variación diaria de los macronutrientes con los diferentes tratamientos. (A) Porcentaje de remoción de  $\text{NH}_4^+$ ; (B)  $\text{NO}_3^-$ -N; (C)  $\text{NO}_2^-$ -N; (D) Porcentaje de remoción de  $\text{PO}_4^{3-}$  (barras verticales son la desviación estándar).

**Fósforo ( $PO_4^{3-}$ ).**- El ortofosfato ( $PO_4^{3-}$ ), forma química del fósforo preferentemente utilizado por las microalgas, juega un rol importante en los procesos celulares que implican la transferencia de energía y en la biosíntesis de ácidos nucleicos, es un componente esencial que gobierna la síntesis de proteínas así como componente del adenosínfosfato (ADP), el cual es responsable del correcto funcionamiento del transporte intracelular (Martínez et al. 1999, Cai et al. 2013, Zeng et al. 2015, Beltrán-Rocha et al. 2017). El comportamiento de la remoción durante el experimento se observa en la Figura 3D.

El fósforo, tuvo una concentración inicial de 30.0 mg/L. El porcentaje de remoción del C1 fue significativamente menor que en los demás tratamientos ( $p < 0.001$ ), lo que puede deberse a la falta de participación de las microalgas y a la pobre capacidad de eliminación de fósforo de los organismos presentes en el agua residual. Hasta el día 6 del experimento, no hubo una disminución considerable de las concentraciones (<20%) ni diferencias significativas entre los tratamientos. Posteriormente, del sexto al noveno día, en T1 y T5 la reducción se volvió constante (<20%), entre los tratamientos restantes hubo diferencias significativas excepto entre T3-T4 ( $p = 0.761$ ). Se observa la mayor eficiencia de eliminación al noveno día (T3=  $77.1 \pm 0.32$ , T4=  $72.4 \pm 1.62$  %, corresponden a las concentraciones de  $6.9 \pm 0.32$  y  $8.3 \pm 1.62$ , respectivamente).

De acuerdo a los resultados, la eliminación tanto de fosfatos como de nitratos en el agua residual, depende de procesos complejos, de acuerdo a lo expuesto anteriormente. Por un lado, las microalgas utilizan distintas especies químicas de nitrógeno (amonio, nitrito, nitrato y fosfato) para su desarrollo (Beltrán 2014, Fidalgo 1995).

Por otro lado, las bacterias que hay presentes en el medio emplean igualmente dichos nutrientes como sustrato (Su et al. 2012b). En este tipo de experimento, el fosfato es, con seguridad, el más eliminado.

**Optimización de la proporción de las microalgas**

*D. asymmetricus* y *C. vulgaris*.- En la Tabla 4 se muestra las remociones promedio en función del tiempo de cada tratamiento producto del diseño experimental. De acuerdo a los resultados, los tratamientos (T1, T2, T3 y T5) lograron remover en sólo 5 días más del 99% de  $NO_2^-$ -N (mg/L), y el tratamiento T3 en 9 días logra remover el mayor porcentaje de  $PO_4^{3-}$  (mg/L) y  $NH_4^+$  (mg/L), siendo el tratamiento que logró la mayor remoción de nutrientes del agua de la PTAR La Taboada.

Por otro lado, en la Tabla 5 se aprecian los promedios de las condiciones fisicoquímicas en los cultivos. Un buen indicador de la adaptación de las microalgas a los efluentes de la PTAR es la concentración de OD (mg/L), se aprecia que los tratamientos con mayor proporción de *D. asymmetricus* (T2, T3 y T4), presentan las mayores concentraciones de oxígeno disuelto al día 7 de cultivo, en la Figura 4, el diagrama de cajas determino que el tratamiento T3 obtuvo el mejor resultado, alcanzando una media de  $25.50 \pm 0.28$  mg/L con menor dispersión en los resultados.

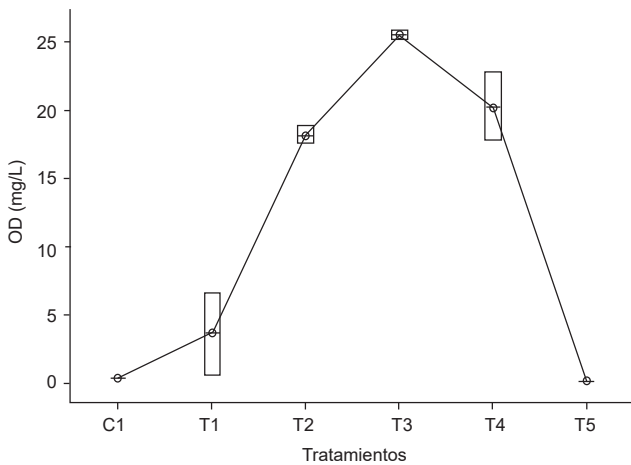
Empleando el diseño de mezclas en el programa estadístico Minitab, se determinó que la mezcla óptima de microalgas que lograría la mayor producción de OD, por ende, la mejor adaptación en los efluentes, fue la proporción de 94% de *Desmodesmus asymmetricus* y 6% de *Chlorella vulgaris* (Fig. 5), esto coincide con el T3 que estuvo compuesto en mayor cantidad por *D. asymmetricus*.

**Tabla 4.** Resumen del porcentaje de remoción de los tratamientos para el efluente de la PTAR La Taboada con la mezcla de *Desmodesmus asymmetricus* y *Chlorella vulgaris* en condiciones de invernadero.

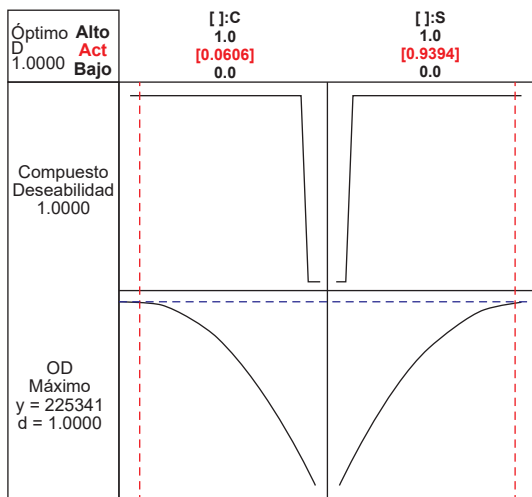
Compuestos Nutricionales	Día de mayor remoción porcentual	C1	T3	T2	T1	T5	T4
$NH_4^+$	9	-16.05	17.78	24.02	10.48	4.35	8.58
$NO_3^-$ -N	9	89.15	<u>100.00</u>	95.77	99.47	98.15	94.71
$NO_2^-$ -N	5	50.25	<u>100.00</u>	99.92	99.17	99.67	91.58
$PO_4^{3-}$	9	-18.39	<u>77.11</u>	49.56	30.22	13.78	72.44

**Tabla 5.** Promedio de parámetros fisicoquímicos de los cultivos realizados con agua de PTAR La Taboada, en condiciones de invernadero.

Tratamiento	pH	Oxígeno disuelto (mg/L)	Salinidad (%)	Temperatura (°C)
C1	$7.41 \pm 0.04$	$0.34 \pm 0.03$	$0.69 \pm 0.00$	$24.70 \pm 0.20$
T1	$7.60 \pm 0.33$	$4.85 \pm 3.21$	$0.64 \pm 0.03$	$26.09 \pm 0.55$
T2	$7.77 \pm 0.08$	$7.42 \pm 0.75$	$0.61 \pm 0.00$	$25.56 \pm 0.34$
T3	$8.22 \pm 0.08$	$10.90 \pm 0.60$	$0.59 \pm 0.02$	$25.42 \pm 0.32$
T4	$8.20 \pm 0.14$	$9.49 \pm 1.38$	$0.61 \pm 0.00$	$25.08 \pm 0.37$
T5	$7.28 \pm 0.04$	$1.54 \pm 0.10$	$0.67 \pm 0.01$	$25.37 \pm 0.35$



**Figura 4.** Comportamiento de los niveles de Oxígeno disuelto en cada una de las diferentes mezclas microalgales al día 7 de cultivo.



**Figura 5.** Determinación de la mezcla óptima de microalgas para lograr la mayor producción de Oxígeno disuelto.

La microalga de menor tamaño debería de asimilar en mayor cantidad tanto N como P, porque posee tasas de crecimiento más altas (Marañón et al. 2001, Cuvin-Aralar et al. 2004, Lagus 2009, Kagami & Urabe 2011), además, una menor proporción área/volumen, por lo cual la absorción y el transporte de los nutrientes debería ser más rápido. En el caso de *C. vulgaris*, las células son pequeñas (< 5 µm), tienen una mayor área superficial para la absorción de nutrientes en relación al volumen para su almacenamiento interno, por lo tanto, el tiempo requerido para que la difusión desplace las sustancias hacia el interior es menor, convirtiéndola en un organismo más eficiente para la eliminación de nutrientes.

Sin embargo, los resultados del experimento evidencian lo contrario para el caso de *C. vulgaris*, ya que la remoción de N y P fue escasa y el OD producido también fue mínimo, probablemente las pocas células están tomando mucho N, pero no lo utilizan para la división celular, posiblemente lo están almacenando en forma de asparagina (aminoácido con baja proporción C:N) de esa manera sir-

ve como almacén de nitrógeno (Cho et al. 1981, Buchanan et al. 2015), caso contrario con *D. asymmetricus*, una microalga que produce una alta aglomeración, así logra incrementar la superficie de absorción y captura de manera más eficiente los nutrientes disponibles en el medio (Kagami & Urabe 2001, Lee 2008).

Como ya se mencionó, las microalgas son oportunistas en cuanto a la capacidad de asimilar rápidamente cualquier pulso de nutriente que pueda surgir en su ambiente a partir de cualquier fuente. El  $\text{NO}_3^-$ -N se presenta como la forma más oxidada y mayor estabilidad termodinámica en aguas residuales, siendo por lo tanto la de mayor predominancia y fuente principal de nitrógeno (Barsanti & Gualtieri 2014). En condiciones naturales, se presentan varias fuentes de nitrógeno ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) y hay evidencias que en determinadas situaciones las microalgas asimilan preferencialmente el amonio porque su captación tiene un menor costo energético (Beltrán 2014, Sanz-Luque et al. 2015, Beltrán-Rocha et al. 2017). Sin embargo, la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  produce  $\text{H}^+$ , provocando la disminución del pH (<7.0), medio ácido que inhibe el desarrollo de las microalgas (Abdel-Raouf 2012, Abinandan & Shanthakumar 2015).

Por otro lado, la absorción de  $\text{PO}_4^{3-}$  por parte de las microalgas, disminuye en medios alcalinos, ya que disminuye la disponibilidad e induce la eliminación de fosfatos vía co-precipitación química con  $\text{Ca}^{2+}$  y la formación de fosfato de calcio [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] en un intervalo entre 9 y 11 de pH (Markou & Georgakakis 2011, Cai et al. 2013). Además, adicional a la remoción vía precipitación, se suma la adsorción superficial de fósforo en la pared celular de las microalgas (Martinez et al. 2000).

De acuerdo con los resultados, mientras las microalgas captaron los nutrientes, el pH del medio se incrementó, los valores alcalinos nos indican la mayor actividad fotosintética. Se señala, que durante el crecimiento de las microalgas en sistemas de lagunaje de alta carga, como sistemas naturales de depuración (una alternativa de bajo coste a los sistemas convencionales), en este tipo de tratamiento se han reportado valores que exceden (pH 11), este incremento, se explica en gran parte al consumo de iones  $\text{HCO}_3^-$  cuya disociación a  $\text{CO}_2$  proporcionan el carbono necesario para el crecimiento de las microalgas, a la par de propiciar la acumulación de  $\text{OH}^-$  (Martínez et al. 2000, Franchino et al. 2013, Andrade & Costa 2007). De acuerdo a diferentes investigaciones, el pH de los cultivos microalgales con fines de producción masiva, se encuentran en rango entre 7 y 9, con un valor óptimo de operación entre 8.2 a 8.7 (Lavens & Sorgeloos 1996, Beltrán-Rocha et al. 2017, Morales et al. 2018).

Ante esta situación, surge como alternativa y a fin de mejorar la producción, el suministro de aireación con dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que incrementaría la disponibilidad de carbono, amortiguando el incremento de pH y a la par mantener un valor óptimo favoreciendo la productividad de las microalgas (Craggs et al. 2013). Al añadir  $\text{CO}_2$  y regular el pH, se podría reducir la eliminación de nutrientes vía formación de  $\text{NH}_3$  y precipitación de  $\text{PO}_4^{3-}$  con la ventaja de mantenerlos bio-disponibles



para el desarrollo de las microalgas (Heubeck et al. 2007, Markou & Georgakakis 2011, Cai et al. 2013, Umamaheswari & Shanthakumar 2016, Lv et al. 2018).

De acuerdo a los resultados del experimento, surge como alternativa el cultivo mixto, se aprecia que los tratamientos con mayor proporción de *D. asymmetricus*, presentan los mayores porcentajes de eliminación de nutrientes en 9 días de tratamiento, probablemente se necesite mantener los cultivos en agitación a fin de lograr un mayor contacto y aprovechamiento de nutrientes y microalgas adheridas a los envases, además, de lo mencionado con el pH. Como lo señala Shi et al. (2014), es complicado realmente poder realizar comparaciones de eficiencias en virtud de que los estudios no son similares en cuanto a la relación de biomasa algal, con respecto al volumen y tipo de agua residual y la concentración de nutrientes y modo de aplicación. Simplemente se toman como referencia para tener elementos de posible discusión y aporte al conocimiento del objeto de estudio, como es el tratamiento de aguas residuales mediante el empleo de microalgas.

## Conclusiones

La biorremediación con microalgas es una alternativa interesante para remover los nutrientes  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N y  $\text{PO}_4^{3-}$ , de la PETAR La Taboada; de acuerdo a los resultados, el tratamiento T3 (25% *C. vulgaris* / 75% *D. asymmetricus*) demostró una mayor capacidad de adaptación a las condiciones del agua residual y presentó una remoción superior de los nutrientes.

Sin embargo, los resultados advierten que tanto la elección de las especies como el pretratamiento del agua son importantes. Dado que la implementación de una esterilización efectiva de aguas residuales podría aumentar el costo total de la instalación, nuestros resultados enfatizan la importancia de elegir las especies de microalgas adecuadas.

Teniendo en cuenta que ambas cepas no se vieron afectadas por la presencia de protozoos (predadores principales de microalgas), las convierte en candidatas adecuadas para el desarrollo de una tecnología basada en microalgas para tratar el agua de la PETAR. Sin embargo, *C. vulgaris*, aunque aparece de manera destacada en muchos estudios a escala de laboratorio sobre el tratamiento de aguas residuales, puede no ser adecuado en condiciones más realistas.

De acuerdo a la optimización del diseño de mezclas, se recomienda que en el proceso de biorremediación, ambas cepas sean cultivadas a una proporción de 6% de *C. vulgaris* y 94% de *D. asymmetricus* en un tiempo de cultivo de 9 días, con el fin de obtener resultados de remoción óptimos. Como no se proporcionó aireación externa, la actividad fotosintética fue la única fuerza impulsora para producir el oxígeno necesario para la oxidación y la nitrificación. Por lo tanto, el consorcio de microalgas y seguramente las bacterias heterotróficas/nitrificantes obtuvo como resultado un sistema simbiótico capaz de garantizar un proceso de tratamiento autosostenido con alta eficiencia de remoción de nutrientes, principalmente  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NO}_2^-$ -N y  $\text{PO}_4^{3-}$ .

En conclusión, se puede decir que los consorcios de microalgas y bacterias son adecuados para la depuración de aguas residuales, y pueden ser acoplados con los sistemas actuales como tratamiento terciario para la remoción de nitrógeno y fósforo residual y así evitar la recirculación de los mismos en las depuradoras convencionales. Sin embargo, aún quedan retos por resolver como el escalado de los sistemas, el aumento de la capacidad de tratamiento y el aprovechamiento de la biomasa obtenida.

## Literatura citada

- Abalde J, Cid A, Fidalgo Paredes P, et al. 1995. Microalgas: cultivo y aplicaciones. A Coruña: Universidade, Servizo de Publicacións. <https://doi.org/10.17979/spudc.9788497497695>
- Abdel-Raouf N, Al-Homaidan A, Ibraheem I. 2012. Microalgae and wastewater treatment. Saudi Journal of Biological Sciences, 19(3): 257-275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Abeliovich A, Azov Y. 1976. Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. Applied and Environmental Microbiology 31(6):801-806.
- 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>
- Ación G, Gómez-Serrano C, Fernández-Sevilla J. 2018. Recovery of Nutrients From Wastewaters Using Microalgae. Frontiers in Sustainable Food Systems 2:59. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2018.00059>
- Ación G, Gómez-Serrano C, Morales-Amaral M, et al. 2016. Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment?. Applied Microbiology Biotechnology, 100:21. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Andrade M, Costa J. 2007. Mixotrophic cultivation of microalgae *Spirulina platensis* using molasses as organic substrate. Aquaculture 264: 130-134. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.021>
- Arbib Z, Ruiz J, Álvarez-Díaz P, et al. 2014. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment,  $\text{CO}_2$  bio-fixation and low cost biofuels production. Water Research, 49: 465-474. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.10.036>
- Aslan S, Kapdan I. 2006. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. Ecological Engineering 28:64-70. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2006.04.00>
- Azov Y. 1982. Effect of pH on inorganic carbon uptake in algal cultures. Applied and Environmental Microbiology 43(6): 1300-1306. [https://doi.org/10.1009/2240-82/061300-07\\$02.00/](https://doi.org/10.1009/2240-82/061300-07$02.00/)
- Barsanti L, Gualtieri P. 2014. Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. 2nd Edition, CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton. Acceso 08/06/2020.
- Beltrán JC. 2014. Desarrollo de un proceso de remoción de nutrientes de efluentes eutróficos por un consorcio de microalgas nativas de nuevo león, México cultivadas en un nuevo fotobiorreactor. Tesis, Magister en Ciencias, con Orientación en Química Analítica Ambiental. Facultad de Ciencias Químicas Universidad de Nueva León. Acceso 08/06/2020.

- Beltrán-Rocha J, Guajardo-Barbosa C, Barceló-Quinta I. 2017. Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO<sub>2</sub>. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 52(3): 417-427. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000300001>
- Buchanan B, Gruissen W, Jones R. 2015. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2nd Edition. American Society of Plant Physiologists. Berkeley
- Burhenne N, Tischner R. 2000. Isolation and characterization of nitrite-reductase-deficient mutants of *Chlorella sorokiniana* (strain 211-8k). *Planta* 211: 440-445. <https://doi.org/10.1007/s004250000327>
- Cai T, Park S, 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>
- Cho B, Sauer N, Komor E, et al. 1981. Glucose induces two amino acid transport systems in *Chlorella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 78(6): 3591-3594. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.6.3591>
- Choi H, Lee S. 2014. Effect of the N/P ratio on biomass productivity and nutrient removal from municipal wastewater. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 38(4): 761-766. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1317-z>
- Crawford NM. 1995. Nitrate: Nutrient and Signal for Plant Growth. *The Plant Cell Online*, 7(7): 859-868. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.7.859>
- Craggs R, Lundquist T, Benemann J. 2013. Wastewater treatment and algal biofuel production. In: Borowitzka M., & N. Moheimani, eds. *Algae for biofuels and energy*, Springer, New York. Pp. 153-163
- Cuvin-Aralar L, Focken U, Becker K, et al. 2004. Effects of low nitrogen-phosphorus ratios in the phytoplankton community in Laguna de Bay, a shallow eutrophic lake in the Philippines. *Aquatic Ecology*, 38(3): 387-401. <https://doi.org/10.1023/b:aeco.0000035174.35091.0b>
- De Morais G, Costa J. 2007. Isolation and selection of microalgae from coal fired thermoelectric power plant for biofixation of carbon dioxide. *Energy Conversion and Management* 48(7):2169-2173. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2006.12.011>
- Fidalgo JP. 1995. Variabilidad bioquímica de microalgas marinas en cultivo en función de la fuente de nitrógeno. Tesis, Doctor en Biología. Facultad de Ciencias Universidad de la Coruña. Acceso 03/06/2020
- Fischer P, Klein U. 1988. Localization of Nitrogen-Assimilating Enzymes in the Chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 88(3): 947-952. <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.947>
- Franchino M, Comino E, Bona F, et al. 2013. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-technical digestate. *Chemosphere*, 92(6): 738-744. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.023>
- Ge S, Champagne P. 2016. Nutrient removal, microalgal biomass growth, harvesting and lipid yield in response to centrate wastewater loadings. *Water Research*, 88: 604-612. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.10.054>
- Gonzales-Fernandez C, Muñoz R. 2018. Microalgae-Based Biofuels and bioproducts from feedstock cultivation to end-products. *Woodhead Publishing Series in Energy of Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.09993-3>
- Gonçalves AL, Pires JM, Simoes M. 2016. Wastewater polishing by consortia of *Chlorella vulgaris* and activated sludge native bacteria. *Journal of Cleaner Production* 133:348-357. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.05.109>
- Hernández J, de-Bashan L. 2006. Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella* spp. co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme and Microbial Technology* 38:190-198. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.06.005>
- Hernández-Pérez A, Labbé J. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2): 157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Herrera J. 2020. Sustainable wastewater treatment systems (2018 - 2019). *Sustainability* 12 (5):1940. <https://doi.org/10.3390/su12051940>
- Heubeck S, Craggs R, Shilton A. 2007. Influence of CO<sub>2</sub> scrubbing from biogas on the treatment performance of a high rate algal pond. *Water Science and Technology*, 55(11): 193-200. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.358>
- Kagami M, Urabe J. 2001. Phytoplankton growth rate as a function of cell size: an experimental test in Lake Biwa. *Limnology* 2: 111-117. <https://doi.org/10.1007/s102010170006>
- Khan M, Shin J, Kim J. 2018. The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17:36. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0879-x>
- Khanna N, Sridhar A, Subramanian R, et al. 2019. Nano and Bio-Based Technologies for Wastewater Treatment, Phycoremediation: A Solar Driven Wastewater Purification System. *Scrivener Publishing*, pp. 373-427. <https://doi.org/10.1002/9781119577119.ch11>
- Khatoun N, Pal R. 2015. Microalgae in biotechnological application: A commercial approach. *Plant Biology and Biotechnology: Volume II*. Elsevier, India. Pp. 27-47. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2283-5_2)
- Krekeler T. 2008. *Decentralised sanitation and wastewater treatment*. 2<sup>nd</sup> Edition. Bundesanstalt für Geowissenschaften und Rohstoffe Federal Institute for Geosciences and Natural Resources. Hannover.
- Lagus A. 2009. Role of nutrients in regulation of the phytoplankton community in the archipelago sea, northern Baltic sea. *Annales Universitatis Turkuensis A II 239*, Publications of the University of Turku, Series AII, Biologica - Geographica - Geologica Painsalama. University of Turku, Finland. <http://www.utupub.fi/handle/10024/46646>
- Lachmann S, Mettler-Altmann T, Wacker A, et al. 2019. Nitrate or ammonium: Influences of nitrogen source on the physiology of a green alga. *Ecology and Evolution*, 9(3): 1070-1082. <https://doi.org/10.1002/ece3.4790>
- Lavens P, Sorgeloos P. 1996. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, FAO Fisheries Technical Paper 361. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Lee R. 2008. *Phycology*. Fourth edition, Cambridge University Press, New York.

- Libhaber M, Orozco-Jaramillo Á. 2012. Sustainable treatment and reuse of municipal wastewater, for decision makers and practicing engineers. IWA Publishing, London.
- Liu X, Wang K, Zhang J, et al. 2019. Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from wastewater. *Bioresource Technology* 283: 184-190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.038>
- Lodi A, Binaghi L, Solisio C, et al. 2003. Nitrate and phosphate removal by *Spirulina platensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(11): 656-660. <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0094-5>
- López I, Vásquez J, Álvarez V. 2016. Remoción biológica de nutrientes en aguas residuales urbanas con fotobiorreactores utilizando microalgas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 17:3569-3580. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263149506015>
- Lv J, Wang X, Feng J, et al. 2018. Comparison of growth characteristics and nitrogen removal capacity of five species of green algae. *Journal of Applied Phycology* 31: 409-421. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1542-y>
- Ma X, Zhou W, Fu Z, et al. 2014. Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system. *Bioresource Technology*, 167: 8-13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.087>
- Maity J, Bundschuh J, Chen C, et al. 2014. Microalgae for third generation biofuel production, mitigation of greenhouse gas emissions and wastewater treatment: Present and future perspectives - A mini review. *Energy* xxx:1-10. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.003>
- Marañón E, Holligan P, Barciela R, et al. 2001. Patterns of phytoplankton size structure and productivity in contrasting open-ocean environments. *Marine Ecology Progress Series*, 216: 43-56. <https://doi.org/10.3354/meps216043>
- Markou G, Georgakakis D. 2011. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: A review. *Applied Energy* 88:3389-3401. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.042>
- Martínez M, Jiménez J, El Yousfi F. 1999. Influence of phosphorus concentration and temperature on growth and phosphorus uptake by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 67(3): 233-240. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(98\)00120-5](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(98)00120-5)
- Martínez M. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*, 73(3): 263-272. [https://doi.org/10.1016/s0960-8524\(99\)00121-2](https://doi.org/10.1016/s0960-8524(99)00121-2)
- Maity J, Hou C, Majumder D, et al. 2014. The production of biofuel and bioelectricity associated with wastewater treatment by green algae. *Energy*, 78: 94-103. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.06.023>
- Morales M, Sánchez L, Revah S. 2018. The impact of environmental factors on carbon dioxide fixation by microalgae. *FEMS Microbiology Letters*, 365(3). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx262>
- Morris I, Syrett P. 1963. The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Archiv Mikrobiology*. 47: 32-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00408287>
- Mujtaba G, Lee K. 2017. Treatment of real wastewater using co-culture of immobilized *Chlorella vulgaris* and suspended activated sludge. *Water Research*, 120:174-184. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.04.078>
- Olaizola M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20(4-6):459-466. [https://doi.org/10.1016/s1389-0344\(03\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s1389-0344(03)00076-5)
- Olguín E. 2003. Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. *Biotechnology Advances*, 22(1-2): 81-91. [https://doi.org/10.1016/s0734-9750\(03\)00130-7](https://doi.org/10.1016/s0734-9750(03)00130-7)
- Park J, Jin H, Lim B, et al. 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. *Bioresource Technology*, 101(22): 8649-8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>
- Park J, Craggs R, Shilton A. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102(1): 35-42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Prathima M, Venkata G, Venkata S. 2012. Heterotrophic cultivation of mixed microalgae for lipid accumulation and wastewater treatment during sequential growth and starvation phases: Effect of nutrient supplementation. *Renewable Energy*, 43: 276-283. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.11.021>
- Rawat I, Kumar R, Mutanda T, Bux F. 2011. Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88:3411-3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Redfield A. 1958. The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* 46: 205-222. ISSN: 0036-8504
- Renuka N, Sood A, Ratha S, et al. 2013. Evaluation of microalgal consortia for treatment of primary treated sewage effluent and biomass production. *Journal of Applied Phycology* 25:1529-1537. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-9982-x>
- Raouf MEA, Maysour NE, Farag Rk, et al. 2019. Wastewater treatment Methodologies, Review article. *International Journal of Environment and Agricultural Science* 3(1): 18. (Acceso: 03.06.2020)
- Rice E, Baird R, Eaton A. 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater. 22th (Ed.). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Washington D.C.
- Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, et al. 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. *Frontiers in Plant Science*, 6:899. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Shi J, Podola B, Melkonian M. 2014. Application of a prototype-scale Twin-Layer photobioreactor for effective N and P removal from different process stages of municipal wastewater by immobilized microalgae. *Bioresource Technology*, 154: 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.100>
- Su Y, Mennerich A, Urban B. 2012a. 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>

- Su Y, Mennerich A, Urban B. 2012b. Synergistic Cooperation Between Wastewater-Born Algae and Activated Sludge for Wastewater Treatment: Influence of Algae and Sludge Inoculation Ratios. *Bioresource Technology*, 105: 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.113>
- Taziki M, Ahmadzadeh H, Murry M, et al. 2015. Nitrate and nitrite removal from wastewater using algae. *Current Biotechnology*, 4(3):1-13. <https://doi.org/10.2174/2211550104666150828193607>
- Tilley E, Ulrich I, Luethi C, et al. 2014. *Compendium of Sanitation Systems and Technologies*. 2nd Revised Edition. Duebendorf, Switzerland: Swiss Federal Institute of Aquatic Science and Technology (Eawag). (Acceso: 03.06.2020)
- Uggetti E, García J, Álvarez J, et al. 2018. Start-up of a microalgae-based treatment system within the biorefinery concept: from wastewater to bioproducts. *Water Science and Technology*, 78(1): 114-124. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.195>
- Umamaheswari J, Shanthakumar S. 2016. Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 15: 265-284 <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9397-7>
- Wang L, Min M, Li Y, et al. 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>
- Winkler M, Straka L. 2019. New directions in biological nitrogen removal and recovery from wastewater. *Current Opinion in Biotechnology*, 57C:50-55. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.12.007>
- Ying K, Gilmour J, Zimmerman W. 2014. Effects of CO<sub>2</sub> and pH on growth of the microalga *Dunaliella salina*. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 6:3. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000138>
- Yongjun Z, Zhigang G, Hui L, Shiqing S. 2016. Ability of different microalga species in synthetic high-strength wastewater treatment and potential lipid production. *Journal Technology Biotechnology*. 91(11): <https://doi.org/10.1002/jctb.4905>
- Xin L, Hong-ying H, Ke G, Jia Y. 2010. Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources. *Ecological Engineering*, 36(4): 379-381. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.003>
- Zeng X, Guo X, Su G, et al. 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 Q, Wang T, Hong Y. 2014. Investigation of initial pH effects on growth of an oleaginous microalgae *Chlorella* sp. HQ for lipid production and nutrient uptake. *Water Science Technology*, 70(4): 712-719. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.285>

**Agradecimientos / Acknowledgments:**

Nuestro agradecimiento especial a la Ing. Cecil Tenorio y Blga. Gheraldine Inga del Instituto del Mar del Perú por proporcionar las microalgas en diferentes niveles de cultivo, y al Ing. Miguel Herrera (PTAR La Taboada) por las facilidades para obtener las muestras de agua residual.

**Conflicto de intereses / Competing interests:**

Los autores no incurrir en conflictos de intereses.

**Rol de los autores / Authors Roles:**

AOH, MCG, LFR y ARS: diseñaron el experimento, analizaron los datos y redactaron el manuscrito; AOH y MCG: colectaron y analizaron las muestras; AOH, MCG, LFR y ARS: revisaron y aprobaron el manuscrito.

**Fuentes de financiamiento / Funding:**

El presente trabajo se llevó a cabo gracias a los recursos de Asignación Presupuestal que No Resultan en Productos (APNOP) y con la administración de los recursos financieros del Presupuesto por Resultados (PpR), del Instituto del Mar del Perú (Imarpe).

**Aspectos éticos / legales; Ethics / legals:**

Los autores declaran no haber incurrido en faltas éticas o legales durante el desarrollo de la investigación y redacción de este trabajo.