

Efecto de las variaciones de las fuentes de nitrógeno, fósforo y mezcla de micronutrientes en agua residual municipal para la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp

Effect of the variations of the sources of nitrogen, phosphorus and mixing of micronutrients in municipal residual water for the biomass production of *Scenedesmus* sp

Leslie Estephanie Cerón¹, Kevin Mauricio Miramag¹, Pablo Fernández Izquierdo^{2*}, Fedra Lorena Ortiz³

¹. Facultad de ciencias exactas y naturales, Programa de Biología, Universidad de Nariño.

². Grupo de Biotecnología Microbiana, Universidad de Nariño.

³. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. Colombia

Recibido: Octubre 14 del 2018

Aceptado: Diciembre 18 del 2018

*Correspondencia del autor: Pablo Fernández Izquierdo, E-mail: pfernandez@udenar.edu.co



Resumen

La biomasa algal tiene gran interés a nivel mundial por poseer principios bioactivos y ser la materia prima utilizada para el desarrollo de biocombustibles y productos de alto valor agregado, no obstante, su cultivo genera altos costos de producción que se deben en su mayoría a los precios de los componentes químicos del medio. Teniendo en cuenta que las aguas residuales municipales pueden representar una fuente considerable de nitrógeno y fósforo, se han postulado como un medio de cultivo alternativo que representa una posible solución ante esta problemática. En este sentido, la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp se evaluó en cuatro tratamientos, tres tuvieron como base agua residual municipal, uno compuesto únicamente por esta agua, otro enriquecido con micronutrientes y el último con macronutrientes, y para el cuarto tratamiento se usó medio de cultivo BG11 modificado. Se obtuvieron mayores densidades celulares en el tratamiento de agua residual con macronutrientes y agua residual con valores de células/mL $8,2 \times 10^8$ células/mL y $6,6 \times 10^8$ células/mL respectivamente y un mínimo de densidad celular en el tratamiento de agua residual con micronutrientes con un valor de $3,5 \times 10^8$ células/mL, que al contrastar con otros estudios se corresponde a la alta capacidad de las microalgas del género *Scenedesmus* para adaptarse al medio e incorporar grandes concentraciones de nutrientes para su crecimiento, incrementando su velocidad específica de crecimiento (μ) y su número de generaciones (n).

Palabras clave: *Scenedesmus*, Agua residual, macronutrientes, micronutrientes, biomasa, algas

Abstract

The algal biomass has great interest worldwide because it has bioactive principles and is the raw material used for the development of biofuels and high value added products, however, its cultivation generates high production costs that are mostly due to the prices of the chemical components of the medium. Taking into account that municipal wastewater can represent a considerable source of nitrogen and phosphorus, they have been postulated as an alternative culture medium that represents a possible solution to this problem. In this sense, the biomass production of *Scenedesmus* sp was evaluated in four treatments, three were based on municipal wastewater, one composed solely of this water, another enriched with micronutrients and the last one with macronutrients, and for the fourth treatment was used medium of BG11 culture modified. Higher cell densities were obtained in the treatment of residual water with macronutrients and residual water with values of $8,2 \times 10^8$ cells/mL y $6,6 \times 10^8$ cells/mL respectively and a minimum of cell density in the treatment of residual water with micronutrients with a value of $3,5 \times 10^8$ cells/mL, which when contrasted with other studies corresponds to the high capacity of the microalgae of the genus *Scenedesmus* to adapt to the environment and incorporate large concentrations of nutrients for its growth, increasing its specific growth rate (μ) and its number of generations (n).

Keywords: *Scenedesmus*, wastewater, macronutrients, micronutrients, biomass, alga.

Introducción

Las microalgas son organismos que presentan una amplia distribución que se extiende a diferentes hábitats acuáticos y terrestres (1,2) encontrando algunas especies poco exigentes que pueden vivir en condiciones extremas como cavernas, suelos desérticos, nieves perpetuas, lagos hipersalinos, ácidos, alcalinos y con elevadas temperaturas (3). La mayor parte pertenecen a hábitats acuáticos, presentándose una mayor abundancia de microalgas verdes en aguas dulces ricas en nutrientes (4)

La biomasa de estas algas tiene gran interés a nivel mundial por ser la materia prima utilizada para el desarrollo de biocombustibles y productos de alto valor agregado con principios bioactivos utilizados en diferentes sectores como el de cosméticos, nutracéuticos, farmacéuticos, entre otros (5). En los últimos años, los estudios en esta línea de investigación se han orientado hacia la búsqueda de energías sustentables y el cuidado del medio ambiente, por medio de procesos de reciclaje con la reutilización de residuos y la reducción de agentes contaminantes (6,7). En este contexto, el cultivo de microalgas requiere condiciones específicas y es necesario evaluar los diferentes parámetros que inciden en el crecimiento in vitro de la especie a trabajar. Entre los factores más relevantes se encuentra el pH, intensidad

de luz, fotoperiodo, temperatura y la composición del medio de cultivo (8); siendo este último aspecto un punto clave en la productividad de niveles altos de biomasa, dado que en función de las diferentes concentraciones de los compuestos que lo conforman, este representa la fuente primaria de nutrientes necesarios para el crecimiento del organismo (9).

No obstante, uno de los principales inconvenientes que se presenta para el uso de microalgas son los elevados costos de producción que genera el uso de medios de cultivo comerciales (10), ya que sus diferentes fórmulas están compuestas por varias soluciones madre en donde se emplean fuentes sintéticas de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas (11,12), razón por la cual la búsqueda de medios de cultivo alternativos que logren reducir dichos costos es fundamental.

El uso de aguas residuales municipales como fuente considerable de nitrógeno orgánico, nitritos, nitratos, fósforo orgánico y fósforo inorgánico (13) representa una de las posibles soluciones que ha surgido a este problema, en este tipo de agua se puede encontrar concentraciones hasta de 80 mg/L y 20 mg/L de nitrógeno y fósforo respectivamente (14). Entre las especies de microalgas que logran crecer en este tipo de aguas, se encuentran las pertenecientes al género *Scenedesmus* que

poseen una actividad metabólica elevada para asimilar diferentes sustancias (15), logrando utilizar los nutrientes desechados y de esta manera optimizar la producción de biomasa (16).

En 2016 se aisló una microalga del género *Scenedesmus* de la Laguna la Barrosa de la reserva natural del Volcán Azufraal ubicada en el departamento de Nariño en medio de cultivo BG11, sin embargo, no se revaluó si la composición y concentración de nutrientes de este medio afectan la producción de biomasa; por lo que la evaluación de agua residual de la ciudad de San Juan de Pasto como un medio de cultivo alternativo puede presentarse como un gran atrayente económico y ambiental al aprovechar la remoción de nitrógeno y fósforo por parte de *Scenedesmus* sp.

Materiales y métodos

Aislamiento de *Scenedesmus* sp

Scenedesmus sp es una especie dulceacuícola que pertenece a la división Chlorophytas, Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, familia Scenedesmaceae y puede encontrarse solitaria o formando cenobios de 2 a 32 células, aunque normalmente estas son de 4-8 células, con formas que van desde casi esféricas a elipsoidales alargadas o fusiformes (17). Para el aislamiento de esta

especie se usó un microscopio invertido, en donde se observaron varias muestras de un cultivo mixto procedente de la laguna barrosa de la reserva natural del Volcán Azufraal en el departamento de Nariño, con una micropipeta graduada a un volumen de 5 μ L se tomaron alícuotas de las zonas con un gran número de células de *Scenedesmus* sp, estas fueron depositadas en diferentes tubos de ensayo con 5 mL de medio de cultivo BG11 modificado por Gómez y colaboradores (18). La incubación se realizó a una temperatura de 24°C, un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y una agitación constante de 100 rpm.

Medio de cultivo

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron 2500 mL de agua residual municipal proveniente del municipio de San Juan de Pasto, Departamento de Nariño, cantidad que fue trasladada a la universidad de Nariño para su respectivo análisis fisicoquímico. Los macronutrientes utilizados fueron NO₃-N y PO₄-P como fuentes de Nitrógeno y Fósforo respectivamente y para los micronutrientes se tomaron los reportados en la composición del medio de cultivo BG11 modificado por Gómez y colaboradores (2015) (18).

Tabla 1. Composición química y concentraciones de los diferentes nutrientes.

Macronutrientes	Composición de las soluciones madre	Cantidad utilizada
NaNO ₃	10g /100mL	1mL / 1L
K ₂ HPO ₄	1g /100mL	1mL /1L
Micronutrientes	Composición de la solución madre	Cantidad empleada
H ₃ BO ₃	0,28g /100mL	1mL /1L
MnSO ₄ H ₂ O	0,018g / 100mL	
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,022g /100mL	
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,05g /100mL	
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,001g /100mL	
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,001g/100mL	

Diseño experimental

Se desarrolló un diseño completamente aleatorizado, evaluando cuatro tratamientos con tres réplicas para un total de 12 montajes:

Tratamiento 1. Medio de cultivo compuesto únicamente por agua residual municipal.

Tratamiento 2. Medio de cultivo constituido por agua residual municipal y micronutrientes.

Tratamiento 3. Medio de cultivo constituido por agua residual municipal y macronutrientes.

Tratamiento 4. Medio de cultivo con BG11 modificado.

Las réplicas de cada tratamiento presentaron un volumen efectivo de 250 mL con un 30 % de inóculo de *Scenedesmus* sp y el 70% restante con medio de cultivo. En todos los tratamientos se utilizó un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, un pH de 8.0, una temperatura de 24 °C y una agitación de 100 rpm.

Para cuantificar la producción de biomasa se siguió el protocolo establecido por Arredondo (2007) (19), realizando medición directa de crecimiento por medio de conteos celulares diarios durante 18 días, tomando alícuotas de cada réplica por tratamiento que fueron observadas en el microscopio con el objetivo de estimar el número de células/mL utilizando una cámara de Neubauer.

Análisis estadístico

Se aplicaron los estadígrafos convencionales de la estadística descriptiva, media y desviación estándar. A cada conjunto de datos se evaluaron los supuestos de normalidad de Shapiro–Wilk y de homogeneidad de varianza, dado que los datos no se ajustaron a una distribución normal se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para determinar diferencias significativas y adicionalmente se aplicó el Test de Tukey como prueba complementaria de contraste.

Resultados y discusión

Las curvas de crecimiento de *Scenedesmus* sp obtenidas en los diferentes medios de cultivo se presentan en la figura 1, es posible observar que la densidad celular incrementa conforme hay una mayor disponibilidad de nitrógeno y fósforo, siendo en el medio de cultivo de agua residual enriquecido con macronutrientes donde se obtuvo el mayor crecimiento, con el aporte de una concentración total de nitrógeno (135,70 mg/L) y fósforo (13,56 mg/L) correspondiente a la suma entre las concentraciones de nutrientes propias del agua y las sales adicionadas.

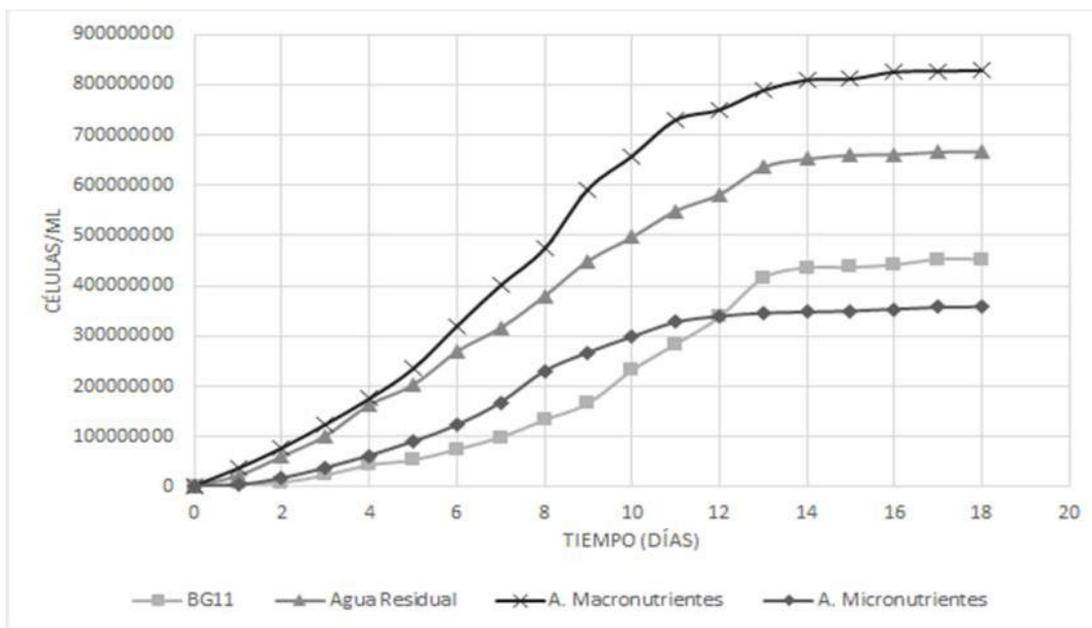


Figura 1. Curvas de crecimiento de *Scenedesmus* sp en cuatro tratamientos con diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y micronutrientes.

Cabe destacar que en las cuatro curvas de crecimiento la fase de latencia es bastante reducida debido a que las células pasaron por un periodo de activación previo a el desarrollo del estudio, tal como se menciona en el estudio de Andrade, Cárdenas, y Morales, (2009) (20) en el cual *Scenedesmus* sp cultivada en agua residual de pescadería al haber pasado por activación previa, muestra desde el momento de inoculación un crecimiento exponencial, indicando así la rápida adaptación de la microalga a los distintos compuestos del medio. Una vez determinada la fase exponencial para los distintos tratamientos se logra observar variaciones en las tasas de crecimiento, en el estudio de Chacón C, *et al* (2004) (21) se evaluaron diferentes medios de cultivos de *Scenedesmus* sp a diferentes concentraciones de nutrientes, obteniéndose una producción de $4,69 \pm 1,72 \times 10^6$ células/ml en un medio algal estándar, valor que fue menor al obtenido en el medio a mayores concentraciones

de nitrógeno que presentó una producción de $11,75 \times 10^6$ células/ml; resultados que concuerdan a los obtenidos en este estudio, en donde se observa un mayor crecimiento en los tratamientos con mayores cantidades de nitrógeno.

En la tabla 2 se organizan los parámetros cinéticos del crecimiento de *Scenedesmus* sp que permitieron evaluar los niveles de producción de biomasa en los diferentes tratamientos, los valores obtenidos en el medio de cultivo de agua residual enriquecido con macronutrientes, reportan la mayor velocidad específica de crecimiento (μ), el menor tiempo de generación (g) y el máximo número de generaciones (n), en contraste con lo obtenido para los medios de cultivo BG11 y agua residual con micronutrientes, que presentan los parámetros cinéticos menos óptimos.

Tabla 2. Parámetros cinéticos de *Scenedesmus* sp cultivada en cuatro medios de cultivo con diferentes concentraciones de nitrógeno, fósforo y micronutrientes.

Medio de cultivo	$\mu(\text{h}^{-1})$	g(h)	n(generaciones)	t(horas)
BG11	0,020	34,65	12,46	432
Agua residual	0,022	31,50	13,71	432
Agua residual con macronutrientes	0,030	23,10	18,70	432
Agua residual con micronutrientes	0,019	36,47	11,84	432

De esta manera, la producción de biomasa obtenida en los medios de cultivo de agua residual y agua residual con macronutrientes demuestra que el género *Scenedesmus* puede remover cantidades significativas de N y P del agua residual municipal. Entre las estrategias de regulación metabólica que presenta el género *Scenedesmus* se tiene que es capaz de formar cenobios o unión de varias células de 2 a 8 de ellas, para poder asimilar más eficientemente la gran cantidad de nutrientes, aumentando su número de generaciones y haciendo que la densidad celular del cultivo con agregados de nitrógeno y fósforo sea mayor (22,23).

Con la prueba de Kruskal-Wallis se registró un p-valor equivalente a 0,0037 indicando que al menos uno de los valores medios de producción de biomasa es estadísticamente diferente en comparación con los otros resultados y con el Test de Tukey se logró determinar que las diferencias se encuentran entre el medio de cultivo BG11 y agua residual con macronutrientes con un p-valor de 0,0017, y entre el medio de cultivo de agua residual con micronutrientes y agua residual con macronutrientes registrando un p-valor de 0,0016. En el gráfico de caja y bigotes se representa el notorio contraste entre el medio de cultivo con macronutrientes que generó la mayor producción de biomasa y el medio de cultivo con micronutrientes que registró la menor producción de biomasa (Figura 2), este resultado presenta la posibilidad de que la adición de los micronutrientes usados en esta investigación puede inhibir el crecimiento de *Scenedesmus* sp.

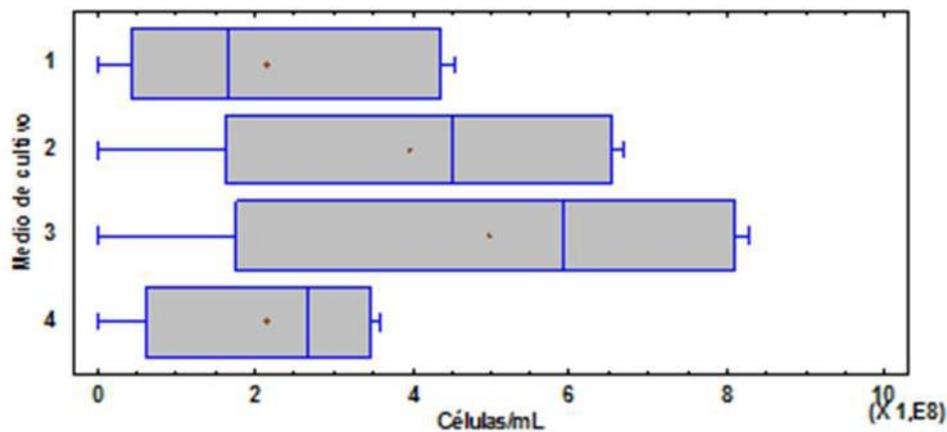


Figura 2. Se compara la densidad celular de *Scenedesmus* sp obtenida en cuatro medios de cultivo con concentraciones diferentes de nitrógeno, fósforo y micronutrientes. 1: Medio de cultivo BG11; 2: Agua residual; Agua residual con macronutrientes; 4: Agua residual con micronutrientes.

El bajo nivel de producción de biomasa obtenido en el medio de cultivo de agua residual con micronutrientes, se encuentra relacionado con una inhibición del crecimiento por toxicidad en el medio (6). Según Ruiz (2011), los micronutrientes se deben incluir en el medio de cultivo en trazas, pequeñas dosis que van acorde a cada especie, por lo cual es de suma importancia entender que cuando se realiza un agregado de micronutrientes a un medio como lo es el agua residual, el cual puede contener algunos de estos, genera un incremento excesivo de los mismos y dejan de ser trazas, micronutrientes como el molibdeno, hierro, níquel, cobre, zinc, manganeso, cobalto, boro y cloro se encuentran presentes en el agua residual municipal (24)

Este proceso de toxicidad inicia con la disminución de la solubilidad de estos micronutrientes en el medio contribuyendo a su acidificación progresiva, una variación en el pH incide en la disponibilidad de nitrógeno y fósforo para las células (25), razón por la cual las células en este tratamiento entraron más rápidamente a la fase estacionaria acelerando así la muerte celular y un menor valor del número de generaciones.

De esta manera queda claro que la producción de biomasa microalgal dependerá en gran parte de las propiedades de los medios de cultivo, proceso que implica principalmente la incorporación de macronutrientes como nitrógeno y fósforo a la mezcla, siendo estos los encargados del mantenimiento celular y de que todo el cultivo presente un óptimo desarrollo (26,11).

Respecto al agua residual se encuentra que la de origen municipal se caracteriza por su contenido de nutrientes, convirtiéndola en una buena opción como medio para el crecimiento de algunas especies de microalgas que presentan la capacidad de remover cantidades considerables de los mismos, siendo un ejemplo de ello *Scenedesmus* sp (27). El nitrógeno y el fósforo pueden tomarse del agua en forma de urea, amonio, nitrato, nitrito, gas de nitrógeno y en algunos casos óxidos de nitrógeno, en donde se ha demostrado que *Scenedesmus* sp crece más rápidamente con amonio, seguido de urea y finalmente de nitrato, y para el fósforo en forma de ortofosfatos (P-PO₄-3) (16). Sin embargo en el estudio de Ruiz (2011) se obtuvo que la asimilación de fósforo y nitrógeno fue más completa en el cultivo donde éste presentaba nitrato y urea que en aquél con amonio (24), por ende en este estudio se tendría una adición de nutrientes adecuada a los diferentes medios de cultivo en donde la fuente de nitrógeno se proporcionó por un nitrato y la fuente de fósforo por un fosfato.

El agua residual municipal obtenida para este estudio fue comparada con la clasificación de concentraciones de los componentes del agua residual reportada por el Ministerio del Medio Ambiente, (2002), encontrándose en el rango de concentración media para nitrógeno con más de 25 mg/L y una concentración baja para fósforo con menos de 15 mg/L (14), razones por las cuales los agregados de macronutrientes favorecieron en determinado grado el crecimiento de esta microalga.

Por último, es importante mencionar que la microalga

Scenedesmus sp utilizada en este estudio presenta una gran adaptabilidad al medio en el cual se cultiva, si bien BG11 como medio básico ha servido para su desarrollo, con el presente estudio puede indicarse que este microorganismo es capaz de adaptarse al agua residual como un medio de cultivo y tomar macronutrientes en una proporción mayor en su composición celular tal como lo mencionan Aslan, S y Kapdan, I., (2006) (28), por lo que la utilización de medios alternativos como este es una tentativa prometedora a la reducción de costos de producción a gran escala de este microorganismo.

Conclusiones

Las mayores producciones de biomasa de *Scenedesmus* sp se registraron para los tratamientos de agua residual con macronutrientes y agua residual con valores de 8,2

x 10⁸ y 6,6 x 10⁸ respectivamente, resultados que se encuentran relacionados con los requerimientos nutricionales de esta especie en donde la cantidad de fósforo necesaria será menor que la cantidad de nitrógeno, por lo que las concentraciones presentes en el agua residual municipal de Pasto al ajustarse a este parámetro optimizan la producción de biomasa.

Respuestas fisiológicas de *Scenedesmus* sp, como lo formación de cenobios y el ensanchamiento celular, permitieron una adecuada tolerancia a altas concentraciones de nitrógeno y fósforo.

La utilización de agua residual municipal se postula como un medio alternativo para optimizar la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp, obteniendo así un avance inicial ante las alternativas de desarrollo económico y cuidado ambiental.

Referencias

1. Chisti, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. Trends Biotechnol. 2007; 26: 126-131.
2. Richmond, A.: "Handbook of: Microalgal Culture Biotechnology and Applied Phycology", Blackwell Publishing. 2004, 566 pp
3. Gomez, L. Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos. Rev cubana quím 2007; Universidad de oriente. Vol. XIX, N° 2: 3-20
4. Garibay-Hernández, A., Vázquez-Duhalt, R., Sánchez-Saavedra, M. y Martínez-Jiménez, A. Biodiesel a partir de Microalgas. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería. 2009; 13: 38-61.
5. Hernández-Pérez, A., y Labbé, J. I. Microalgas, cultivo y beneficios. Rev Biol Mar Oceanogr 2014; 49(2): 157-173.
6. Markou, G., Georgakakis, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue- green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters. Appld Energ 2011; 88(10):3389-3401.
7. Malgas. Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica. Asturias: AST ingeniería S.L ED. 2013, p. 9. Disponible en: <http://proyectomalgas.com/wp-content/uploads/2014/04/guiamalgas.pdf>
8. Tzovenis, I., De Pauw N y Sorgeloos, P. Optimization of T-ISO biomass production rich in essential fatty acids I. Effect of different light regimes on growth and biomass production. Aquaculture. 2003; 216: 203-222.
9. Martínez L. Eliminación de CO₂ con microalgas autóctonas. Tesis Doctoral, Instituto de Recursos Naturales, Universidad de León, León. 2008; 226 pp. Disponible en <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/1414/2008ONMART%25CDNEZ%20GARC%25CDA%2C%20LORENA.pdf?sequence=1>
10. Nieves, M.; Voltolina, D.; Sapiens, M. T.; Gerhardus, H.; Robles, A. L. y Villa, M. A. Culturing microalgae with agricultural fertilizers. Riv. Ital. Aquacult. 1996; 31: 81- 84
11. Andersen, R. Algal Culturing Techniques; Elsevier Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2005, 578 pp.
12. Guillard, R.R.L. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith W.L. and Chanley M.H (Eds.) Culture of Marine Invertebrate Animals. Plenum Press, New York, USA. 1975, 26-60 pp.
13. Riveros Olivares, B. Tratamiento de Aguas Residuales Municipales en la Ciudad de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 2013. Disponible en: http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/3205/Tesis_BrunoRiveros.pdf?sequence=1.

14. Ministerio del Medio Ambiente. Gestión para el manejo, tratamiento y disposición final de las aguas residuales municipales. 2002. Disponible en: http://www.minvivienda.gov.co/Documents/ViceministerioAgua/PLAN_NACIONAL_DE_MANEJO_DE_AGUAS_RESIDUALES_MUNICIPALES_EN_COLOMBIA.pdf.
15. González, M. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Universidad Nacional Abierta y a Distancia. 2006; 59, 64-70.
16. Xin L., Hong-ying H., Ke G., y Ying-xue, S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour. Technol* 2010; 101(14), 5494-5500.
17. Ramos GJP, Bicudo CEM, Moura CWN. Scenedesmaceae (Chlorophyta, Chlorophyceae) de duas áreas do Pantanal dos Marimbus (Baiano e Remanso), Chapada Diamantina, Estado da Bahia, Brasil. *Hoehnea*. 2015; 42 (3): 549-566.
18. Gómez, M., Fernandez, P., Ortiz, F. Avances en la evaluación de la actividad Anti-*Helicobacter pylori* de extractos lipídicos de *Chlorella* sp. V Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal. Resúmenes Congreso. Valparaíso – Chile. 2015.
19. Vega, B. O. A., y Voltolina, D. Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal. 2007; 1: 17-25.
20. Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., y Morales, E. D. Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. 2009; 32: 126 -134.
21. Chacón C, Andrade C, Cárdenas C, Araujo I, Morales E. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Bol. Centro Inv. Biol.* 2004; 38: 94-106.
22. Tam N.F.Y., J.P.K. Wong y Y.S. Wong. Repeated use of two *Chlorella* species, *C. vulgaris* and WW1 for cyclic nickel biosorption. *Environ Pollu* 2001; 114: 85-92.
23. Catalina Q, Morales V, Sonia P, Acosta C, Alejandro. Crecimiento de *scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae*. 2008; 15: 25-31.
24. Ruiz, A. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia. 2011. Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>
25. Guerrero, V. P. P., y Castro, A. C. P. Evaluación del rol de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga *scenedesmus* sp. en condiciones de Laboratorio. 2013. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/6013/1/UPS-QT03777.pdf>
26. Granados C, Bückle F. Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. *An. Inst. Cs. Mar Limnol.* 1983; 11: 241-256.
27. Vázquez, R. A. U. Efecto de la limitación de Nitrógeno y Fósforo en la producción de lípidos en cultivos de las microalgas verdes *Scenedesmus obliquus* y *Scenedesmus* sp. Unidad de Energía Renovable del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 2011. Disponible en: https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1003/670/1/PCER_M_Tesis_2011_Roberto_And%20-%20Us_V%20-%20V%C3%A1lquez.pdf
28. Aslan, S., Kapdan, I.K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecol Eng.* 2006; 28: 64-70.