



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“APROVECHAMIENTO DEL AGUA RESIDUAL MUNICIPAL
TRATADA COMO SUSTRATO PARA EL CRECIMIENTO DE
LA MICROALGA *Scenedesmus acuminatus*”

Que para obtener el título de

B I O L O G O

P R E S E N T A

MIRIAM NAYELI MIRANDA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. PEDRO RAMÍREZ GARCÍA



Los Reyes Iztacala, Edo. de México 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Primeramente a la Universidad Nacional Autónoma de México, en donde desarrolle habilidades y aptitudes y también el lugar donde encontré una parte de mí al estudiar esta hermosa carrera, Biología.

A mis padres Leticia Hernández Iglesias y Severiano Miranda Ordoñez, por su paciencia y amor, dedico el presente trabajo, y agradezco sus enseñanzas y agradezco esta vida junto a ustedes. A mi hija Valeria Mailen Hernández Miranda, por ser un motivo de esfuerzo y felicidad en mi vida.

A mis hermanas Jessica Miranda y Tania Miranda, por su compañía y confianza.

A mis amigos Aleydis, Brenda y Antonio por su compañía y por sus consejos.

Agradezco al laboratorio de Bacteriología y al Doctor Pedro Ramírez García por permitirme crecer como profesionista. Y a las personas que ahí laboran Margarita, David, Diego gracias por su ayuda incondicional.

Finalmente a mi familia, amigos y personas que he conocido y que han contribuido para que sea la persona que soy y que finaliza esta etapa crucial. Gracias!!!

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	6
Objetivos	7
Metodología	7
Resultados	11
Discusión	21
Conclusiones	25
Bibliografía	27

Resumen

En el presente trabajo se consideró la importancia de los efluentes de aguas tratadas. Sin embargo, aunque las descargas de aguas residuales municipales pasan por procesos de tratamiento, continúan presentando concentraciones altas de fósforo y nitrógeno. Debido a lo anterior se fijó el objetivo de aprovechar los nutrientes de esos efluentes como medio de crecimiento de microalgas y en nuestro caso particular de *Scenedesmus acuminatus*. Para el logro de nuestro objetivo, se emplearon tres tratamientos para diferenciar la eficacia de crecimiento de la microalga y aprovechamiento de nutrientes. El diseño experimental fue el siguiente: el primero, agua residual tratada del efluente; el segundo, agua residual tratada y enriquecida con el Stock 1 (NaNO_3) del medio Bold Basal (la concentración de fósforo no era deficiente), y el tercer tratamiento Medio Bold Basal como medio de cultivo de referencia. Se utilizaron reactores de PET a escala de laboratorio con un volumen de 2 L y acondicionados con una bomba de acuario para proporcionar oxígeno y mezclado. En cada reactor se inocularon 200 ml de *S. acuminatus* en medio Bold Basal, iluminados con lámparas fluorescentes SILVANYA 30 W ($62 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), con fotoperiodo 12:12. Se midió la concentración de nitrógeno inorgánico soluble y fósforo reactivo soluble con el equipo (YSI-9500 Photometers) en el cual se determinaron las concentraciones de nitrógeno como nitratos, nitritos y amonio en mg/L. Diariamente se extrajo 1 ml de cada reactor para realizar conteo celular en una cámara de Neubauer. Como resultados, se obtuvieron tres medianas de crecimiento celular de los tres tratamientos, ART (6,360,000 cel./mL); ART-E (6,040,000 cel./mL); M-BB (3,947, 000 cel./mL), en donde las medianas más altas y por lo tanto crecimiento elevado se presentó en el medio ART y ART-E, para observar diferencias significativas se realizó una prueba de Tukey, en la cual no se observa diferencia significativa entre estos dos tratamientos; en el medio Bold Basal se observó el crecimiento más bajo de *S acuminatus*, con la mediana más baja. Se observó, que el consumo de nitratos ocurre mayormente en el tratamiento ART y ART-E, con medianas de 0.00 mg/L y 39.4 mg/L respectivamente, y se observa un consumo mínimo en el M-BB con una mediana de 46.9 mg/L. En cuanto al FRS se observa que el mayor consumo de fósforo se presentó en ART y ART-E, con medianas de 6.90 mg/L y 10.75 mg/L respectivamente, y un consumo menor en M-BB con una mediana de 69.0 mg/L.

En cuanto al consumo de amonio, en el análisis de ANOVA, no hay diferencia significativa entre tratamientos. Para observar si influyo la adición de nitrógeno en forma de nitratos, en el tratamiento ART-E, se realizó una correlación de Pearson, la cual mostro que si hubo influencia de la concentración de nitrógeno en este tratamiento en relación al crecimiento de células; en lo que respecta al medio ART, el nutriente que se relaciona al crecimiento celular fue el fósforo; y en el Medio Bold Basal el nutriente que se relaciona al crecimiento celular por presentar valores de $P > \alpha = 0.05$ más alto es el nitrógeno en forma de nitrato. Estos resultados nos muestran que las microalgas tienen un alto aprovechamiento del nitrógeno en los efluentes de aguas residuales tratadas, en el caso del fósforo el aprovechamiento es menor. Las microalgas aunque contribuyen en gran medida a la remoción de nutrientes no llegan a eliminarlos totalmente.

Palabras clave: Agua Residual Tratada, *Scenedesmus acuminatus*, Nutrientes (Nitratos, fosfatos y amonio).

Introducción

En México se desechan cerca de 191 m³/s al día de aguas residuales, de las cuales se tratan 37 m³/s al día y generalmente este volumen de agua no puede ser reutilizado debido a la presencia de compuestos que generan un desequilibrio en los ecosistemas acuáticos y en ocasiones afectan a la salud humana (CONAGUA, 2011).

El método más utilizado para el tratamiento de aguas residuales, es el sistema de lodos activados, proceso biológico utilizado para su depuración. Consta de cuatro pasos en general; pre tratamiento (donde se retira la materia inerte, controlando el caudal hacia el sistema de tratamiento), tratamiento primario (donde se separan sólidos sedimentables), tratamiento secundario (proceso aerobio en el que ocurren la mayoría de las actividades de depuración de materia orgánica por los microorganismos) y tratamiento terciario (proceso opcional a

través de pulimiento o cloración) (Guido *et al.*, 2012). Y debido al proceso de mineralización efectuado por las bacterias el agua del efluente contiene una alta concentración de fósforo y nitrógeno, aunque la concentración final dependerá del tipo de agua que se esté tratando.

El resultado final de cada uno de estos procesos genera un efluente con menor cantidad de materia orgánica (Guido *et al.*, García, 2012; Willey, 2007). Sin embargo, la cantidad de estos compuestos va a depender del tipo de agua que se esté tratando, ya que puede haber diversas entradas de agua no solamente municipal sino de algún desecho industrial, lo cual contribuye a un aumento en la concentración de nitrógeno y fósforo en el agua. Por lo tanto, existe la presencia de altas concentraciones de estos elementos al final del proceso de tratamiento, acumulándose dichos elementos contribuyendo a la eutrofización de los cuerpos de agua receptores hacia los que pueda llegar el agua (Alvarado, 2012, De la Noue *et al.*, 1992; Escorihuela *et al.*, 2007).

En el agua residual cruda el nitrógeno puede encontrarse en varias formas, como nitrato (NO_3), nitrito (NO_2), amonio (NH_4), amoníaco (NH_3) y también formando parte de compuestos orgánicos como proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; se encuentra en mayor cantidad en forma de amonio y también como nitrógeno orgánico constituido por la suma de amonio y amoníaco.

Al igual que el nitrógeno, el fósforo se encuentra en formas que van desde inorgánicas y/o disueltas [PO_4 , HPO_4 , H_2PO_4 , $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3$, F, Cl, OH] y orgánicas (ácidos nucleicos, DNA y RNA), etc. Cabe recalcar que el fósforo también es un componente importante en la preparación de productos para la limpieza como detergentes, y de otra índole como insecticidas y plaguicidas, por lo que se considera como una fuente principal de aporte de fósforo en el agua residual tratada, encontrándose como ortofosfato (PO_4).

El aumento del uso del fósforo y su presencia en las aguas residuales domésticas ha elevado su concentración en el efluente de 3 a 4 mg/l, en épocas anteriores al uso de detergentes, a valores actuales de 10 a 20 mg/l. Esta situación ha contribuido a la eutrofización de los sistemas acuáticos.

El nitrógeno amoniacal se produce por la desaminación de compuestos que contienen nitrógeno orgánico y por la hidrólisis de la urea. También puede producirse por la reducción de los nitratos en condiciones anaerobias, por bacterias autótrofas nitrificantes del grupo de las nitrosomonas.

En años recientes se han buscado diferentes tipos de alternativas para mejorar los efluentes de las aguas tratadas, entre las que destacan el uso de microalgas como depuradoras de aguas residuales, procesos que surgen a comienzos de los años 50`s, utilizando cultivos masivos para el tratamiento de aguas residuales y producción simultánea de proteína en la industria (Lau *et al.*, 1995).

En la actualidad el uso de estos microorganismos es una alternativa para el tratamiento de agua residual en el proceso terciario, ya que estos microorganismos utilizan compuestos inorgánicos del nitrógeno (NO_2 , NO_3 , NH_4) y fósforo como ortofosfatos (PO_4), generando biomasa, mejorando la calidad del agua y aumentando la concentración de O_2 (Hernández *et al.*, 2012).

Las microalgas comúnmente utilizadas han sido *Chlorella* y *Scenedesmus* (Tam *et al.*, 1989; Chacón *et al.*, 2004) que se han empleado en el tratamiento de agua residual proveniente de plantas de tratamiento (Lavoie *et al.*, 1985; Tam *et al.*, 1990), aguas residuales industriales (Gonzales *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 2000) y residuos animales (Travieso *et al.*, 1982), Así como en la producción masiva de biomasa para fines comerciales (Rosales, 2007).

Se realizan producciones masivas de microalgas a nivel mundial, ya que la demanda de sus diversas aplicaciones para consumo ha ido aumentando con el paso de los años; en la industria alimentaria por ejemplo, el alga *Arthrospira máxima*, a la cual se le considera como un alimento completo y funcional, es cultivada en agua de mar y utilizada como suplemento alimenticio (Ciferri, 1983). En la industria cosmética como ejemplo, la microalga *Dunaliella salina*, que es crecida en salinidades altas, es utilizada para la producción de pigmentos, en la producción de metabolitos, remoción de metales, captación de CO_2 , etc. (Raja *et al.*, 2007).

Las microalgas son un conjunto heterogéneo de microorganismos fotosintéticos, unicelulares, procariontes (cianobacterias) y eucariontes, que se localizan en

hábitats diversos tales como aguas marinas, dulces, salobres, residuales o en el suelo, bajo un amplio rango de temperaturas, pH y disponibilidad de nutrientes; se les considera responsables de la producción del 50% del oxígeno y de la fijación del 50% del carbono en el planeta.

Las especies más estudiadas para aplicaciones biotecnológicas corresponden a las algas verdes y a las diatomeas (Arredondo *et al.*, 1991; Sheehan *et al.*, 1998; Hu *et al.*, 2008).

La depuración es el principal objetivo de la instalación y la producción de microalgas es un beneficio adicional.

El atractivo de las microalgas actualmente es encauzado hacia otras aplicaciones tales como la acuicultura (cultivo de especies acuáticas vegetales y animales en medios naturales y artificiales), el tratamiento de aguas residuales, la obtención de sustancias químicas finas, la producción de farmacéuticos y los procesos de bioconversión energética.

Actualmente hay una línea de investigación, en cuanto a la producción de biomasa para la creación de biocombustibles como una contribución a resolver el problema del calentamiento global resultante de la emisión de gases de efecto invernadero; por ejemplo la producción de biodiesel a partir de la transesterificación de los lípidos, o bioetanol a partir de azúcares fermentables, así como la reciente utilidad en el procesamiento de antibióticos, para lo cual se debe considerar, el tipo de medio de crecimiento en el que se va a mantener la microalga, para que la producción de biomasa sea elevada y con factores de inducción que puedan hacer esto posible, (por ejemplo la adición de nutrientes, el aumento de luz y la regulación de su calidad, temperaturas constantes y pH adecuado, etc. dependiendo del microorganismo, cantidad de oxígeno, etc.) proporcionándole a la microalga las condiciones idóneas para su crecimiento y reproducción y de esta manera poder obtener beneficios extras a lo que podemos llamar valor agregado. El crecimiento de las algas puede darse a muy bajo flujo de fotones fotosintéticos a densidades tan bajas como $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ lo cual implica generalmente la adaptación o aclimatación (John, 2001).

Las microalgas verdes o Chlorophyceas como *Scenedesmus acuminatus*, incorporan nitrógeno, preferentemente en forma de amonio, para formar aminoácidos por medio de transaminación. Sin embargo también tienen la capacidad de incorporar el nitrógeno en forma de nitrato (González, 2012). Las microalgas absorben el fosfato inorgánico y a veces expresan fosfatasas extracelulares para incorporar polifosfatos orgánicos y esterres de fosfato (John, 2001).

Antecedentes

Valencia en el 2012 evaluó la capacidad de remoción de nutrientes del agua residual municipal, particularmente de amonio y ortofosfatos, trabajando con dos especies microalgales: *Scenedesmus quadricauda* y *Chlorella* sp. La remoción de los nutrientes fue eficiente, *S. quadricauda*, presentó valores de remoción del 90% mientras que *Chlorella* sp., del 30% de amonio y ortofosfatos respectivamente. En cuanto a ortofosfatos tanto *S. quadricauda* como *Chlorella* sp., tuvieron una tasa de remoción del 85%.

Charity en el 2009, empleó la microalga *Scenedesmus* sp. en aguas residuales de pescadería para evaluar la remoción de nutrientes y la calidad de la biomasa producida. El obtuvo valores de 8.05×10^6 cél/mL, así como la remoción 4.66 mg/L de fosfato y 23.80 mg/L de nitrógeno, lo cual representó el 70% y 90% respectivamente, referido al grupo control.

El proceso integral de tratamiento de aguas residuales utilizando cultivos de microalgas presenta ciertas ventajas, como el mejoramiento de la calidad del efluente, y la producción de biomasa a partir de la cual se puede obtener productos de índole industrial (Ryan, 2009).

Aplicaciones de las microalgas

Se han utilizado las microalgas para la acuicultura, biocaptación de CO₂, biorremoción de nutrientes (N y P), fijación de N (biofertilizantes), producción de bioenergéticos, por ejemplo biodiesel, los cuales son derivados de lípidos

naturales como aceites de tipo vegetal, en la industria alimenticia, producción de metabolitos, etc.

Objetivo general

Aprovechar el agua residual municipal tratada como medio de crecimiento para la microalga *Scenedesmus acuminatus*.

Objetivos particulares

- Evaluar pruebas fisicoquímicas de pH, temperatura, nitrógeno inorgánico soluble (amonio, nitritos y nitratos), fósforo reactivo soluble (FRS) como ortofosfatos, al agua residual tratada del efluente de la planta de tratamiento OPDM (Organismo de Agua Potable Alcantarillado y Saneamiento Tlalnepantla de Baz), el Rosario, para determinar las condiciones del agua, donde se cultivará a *S. acuminatus*.
- Examinar las mediciones de nitrógeno orgánico disuelto, como nitrato y como amonio, y de fósforo reactivo soluble como ortofosfatos, a los 3 grupos de tratamiento: con agua residual tratada, con agua residual tratada enriquecida con nutrientes y al grupo control (medio BB).
- Realizar el conteo celular durante 21 días utilizando una cámara de Neubauer, para hacer las curvas de crecimiento de *S. acuminatus* para los tres tratamientos.

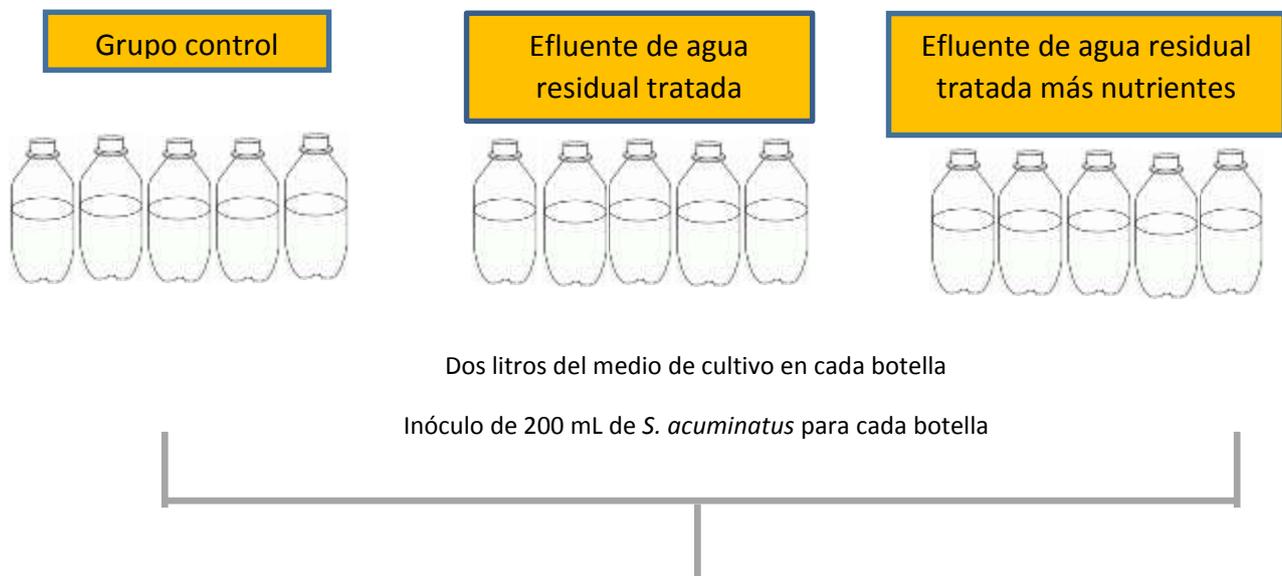
Metodología

Se utilizó una cepa de *Scenedesmus acuminatus*, se cultivó en el Agua Residual Tratada del efluente (ART) de la planta de tratamiento OPDM (Organismo de Agua Potable Alcantarillado y Saneamiento Tlalnepantla de Baz) que recibe aguas residuales domésticas de la zona urbana denominada el Rosario (Azcapotzalco, D.F.), se utilizó como grupo control para dicho tratamiento, el medio de crecimiento enriquecido Bold Basal (M-BB). Por otra parte se implementó un tratamiento con Agua Residual Tratada a la cual se le adicionaron

nutrientes (ART-E) ya que antes de montar los experimentos, se observó que existía un desbalance del cociente N:P, y se buscó llevar a un equilibrio de acuerdo al cociente de Redfield N:P=1:16 (Redfield, 1958).

Los cultivos se mantuvieron en condiciones óptimas de crecimiento en el laboratorio: $62 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ determinada con un sensor de luz, con fotoperiodo de 12:12 hrs. de luz-oscuridad.

Para la caracterización del agua residual tratada; se realizó la medición de pH por el método potenciométrico (con un potenciómetro Hanna), se midió la concentración de nitrógeno inorgánico soluble y fósforo reactivo soluble con el equipo (YSI-9500 Photometers) en el cual se determinaron las concentraciones de nitrógeno como nitratos, nitritos y amonio en mg/L.



En un periodo de 21 días se realizaron las siguientes pruebas a cada uno de los grupos.

- Conteo celular en cámara de Neubauer para determinar la tasa de crecimiento de cada repetición
- Medición del consumo en mg/L de nutrientes NO_3 , PO_4 y NH_4 cada 3 días para cada repetición.

Fig. 1 Diseño experimental del crecimiento de *Scenedesmus acuminatus*.

Una vez realizada la caracterización del agua residual, se sembró un inóculo de 200 ml de *S. acuminatus* en una botella de Pet con dos litros de medio Bold Basal, con cuatro repeticiones, obteniendo 5 botellas en total, utilizando una botella como blanco de cada tratamiento, en el cual no se realizó inóculo para el cultivo (figura 1). Los cultivos se mantuvieron en las condiciones de irradianza con lámparas fluorescentes SILVANYA 30 W ($62 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$), aeración con bomba de acuario para cada tratamiento y fotoperiodo 12:12. Se obtuvo un volumen de 1 ml para cada prueba. Cada tercer día, se realizaron mediciones del nitrógeno y FRS con el equipo YSI 9500 y así observar el aprovechamiento o consumo de nutrientes por *S. acuminatus* y diariamente se extrajo 1 ml de cada repetición para realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer.

Terminando este cultivo, se procedió a inocular 200 mL de *S. acuminatus* en una botella conteniendo dos litros de agua residual tratada, con las respectivas 4 repeticiones y un grupo testigo. Las condiciones de cultivo y los parámetros que se analizaron fueron los mismos que en el tratamiento 1.

Un tercer tratamiento al cual se sometió *S. acuminatus*, fue el grupo con agua tratada de la planta OPDM ya mencionada pero con un aporte de Nitrógeno, que se obtuvo del medio de crecimiento Bold Basal del Stock I para obtención del nitrógeno en forma de NaNO_3 , realizando mediciones previas de nutrientes del agua residual, igualando el valor con el medio Bold Basal. Las condiciones del experimento fueron iguales a los tratamientos anteriores.

Se realizó una prueba estadística de ANOVA para determinar si se presentaban diferencias significativas entre los tratamientos.

Se utilizó el agua residual de la planta de tratamiento OPDM de Tlalnepantla, debido a los valores constantes que presenta de los nutrientes, tanto de nitrógeno como de fósforo y porque presentó una temperatura constante por arriba de los 20°C y un pH mayor a 7.9, valores que son considerados óptimos para la reproducción de *S. acuminatus*. En cuanto a los metales pesados, los valores proporcionados por el personal de la planta de tratamiento OPDM Tlalnepantla, indican que se encuentran por debajo de los límites máximos

permisibles en la Normas Oficiales Mexicanas para aguas residuales (Tabla 1), lo cual no se podría considerar como un factor que inhiba en el crecimiento de las células.

Parámetro	Resultado (promedio de un año-2014)	Límites máximos permisibles	Método
pH	7.44	5.0-10	NMX-AA-008-SCFI-2011
Temperatura	21.2	40	NMX-AA-007-SCFI-2000
Arsénico	<0.002	0.40	NMX-AA-051-SCFI-2001
Cadmio	<0.199	0.40	NMX-AA-051-SCFI-2001
Cobre	<0.180	6.00	NMX-AA-051-SCFI-2001
Cianuros	<0.01	3.00	NMX-AA-058-SCFI-2001
Cromo	<0.250	1.50	NMX-AA-051-SCFI-2001
Mercurio	<0.004	0.02	NMX-AA-051-SCFI-2001
Níquel	<0.250	4.0	NMX-AA-051-SCFI-2001
Plomo	<0.180	1.00	NMX-AA-051-SCFI-2001
Zinc	<0.171	20.00	NMX-AA-051-SCFI-2001
Fósforo total	0.585	30.0	NMX-AA-029-SCFI-2001
Nitrógeno total	5.00	60	NMX-AA-026-SCFI-2010

Tabla. 1 Relación de parámetros medidos durante el año 2014, en la planta de tratamiento OPDM de Tlalnepantla que recibe aguas residuales domésticas de la zona urbana denominada el Rosario (Azcapotzalco, D.F).

De acuerdo a los datos observados en un análisis previo se puede decir que la calidad del efluente del agua residual tratada en la planta OPDM Tlalnepantla por medio de la técnica de lodos activados queda dentro de los límites permisibles que se establecen en la Norma Oficial Mexicana, como sucede con los valores de pH, temperatura, metales pesados y nutrientes que se presentan en la tabla anterior, esto es de gran importancia ya que no se observan variaciones elevadas de dichos parámetros, pues una variación pronunciada podría interferir con el crecimiento celular de *S. acuminatus*; otro factor importante es que este tipo de agua residual presenta nitrógeno inorgánico soluble y FRS, considerados como elementos primordiales para las microalgas y de igual manera se presentan con valores constantes lo cual es adecuado para la realización del proyecto, de acuerdo a lo mencionado se puede decir que el agua podría resultar un medio de crecimiento potencial para este tipo de microalgas.

Resultados

Tablas y análisis estadísticos

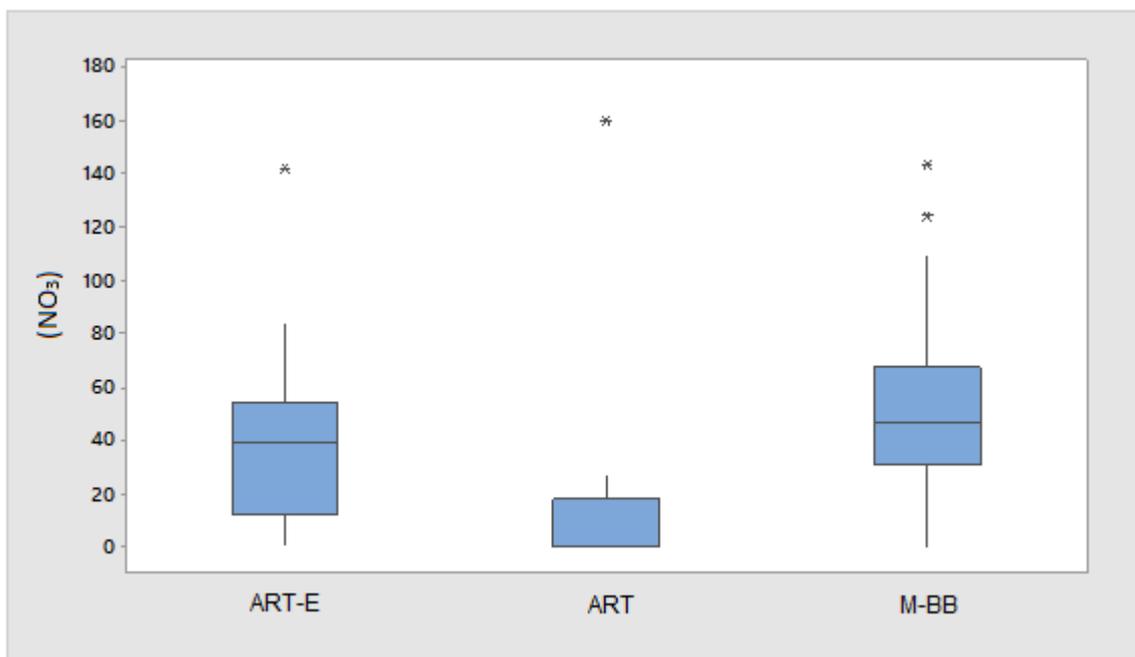
Número de Repetición	Medio Bold Basal (Control)	Agua Residual Tratada	Agua Residual Enriquecida
1	8.40	8.92	8.20
2	8.41	8.81	8.77
3	8.30	8.92	9.30
4	7.05	8.74	9.34
5	8.06	8.80	8.95

Tabla 2. Valores de pH de los tres grupos, al término del tratamiento.

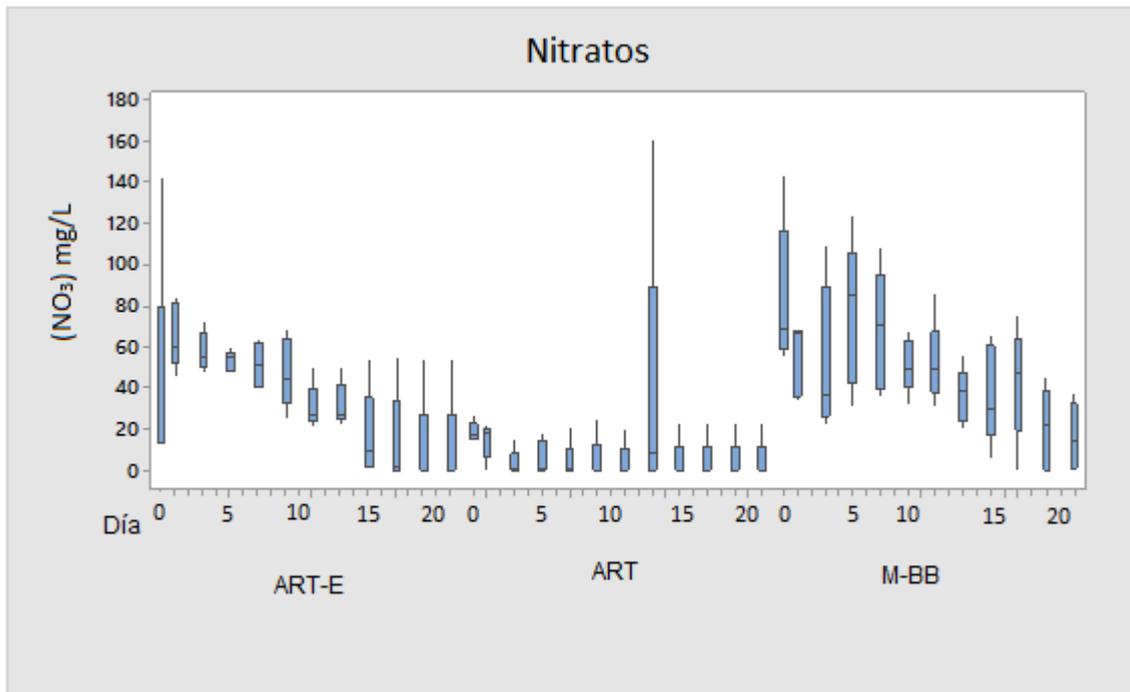
	Agua Residual Tratada	Agua Residual Enriquecida	Medio Bold Basal (Control)
Nitratos mg/l			
Mediana	0.00	39.40	46.90
Valores mínimos	0.00	0.00	0.00
Valores máximos	160.00	142.00	143.00

Fosfatos mg/l			
Mediana	6.90	10.75	69.00
Valores mínimos	1.90	0.00	56.00
Valores máximos	20.00	23.00	100.00
Amonio mg/l			
Mediana	0.000	0.000	2.100
Valores mínimos	0.000	0.000	0.100
Valores máximos	0.100	0.300	9.000
Número de células			
Mediana	6 360 000	6 040 000	3 947 000
Valores mínimos	690 000	474 000	810 000
Valores máximos	12 400 000	13 200 000	9 500 000

Tabla 3. Valores de las concentraciones de nutrientes y crecimiento celular de los tratamientos de ART, ART-E y M-BB, representando los valores mínimos, la mediana y valores máximos en 21 días.



Gráfica 1. Diagrama de caja y bigotes para comparar a los tres grupos ART, ART-E y M-BB, en cuanto a la concentración de nitrógeno, en forma de nitratos.

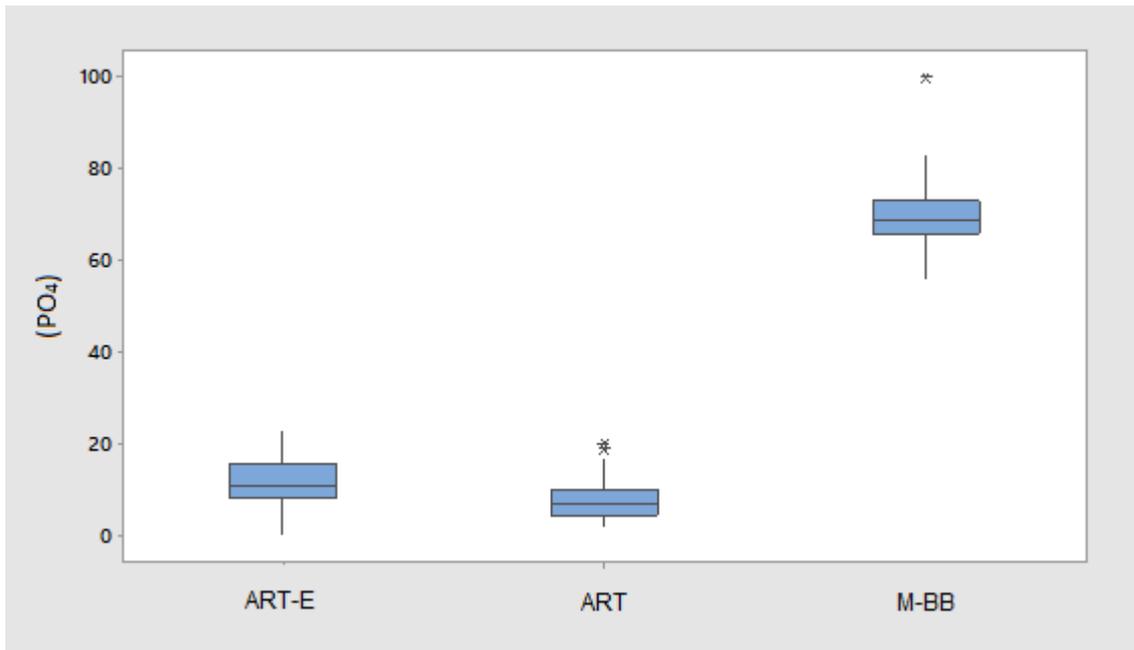


Gráfica 2. Tratamientos ART, ART-E y M-BB, en cuanto a la concentración de nitratos por la microalga *Scenedesmus acuminatus* en 21 días.

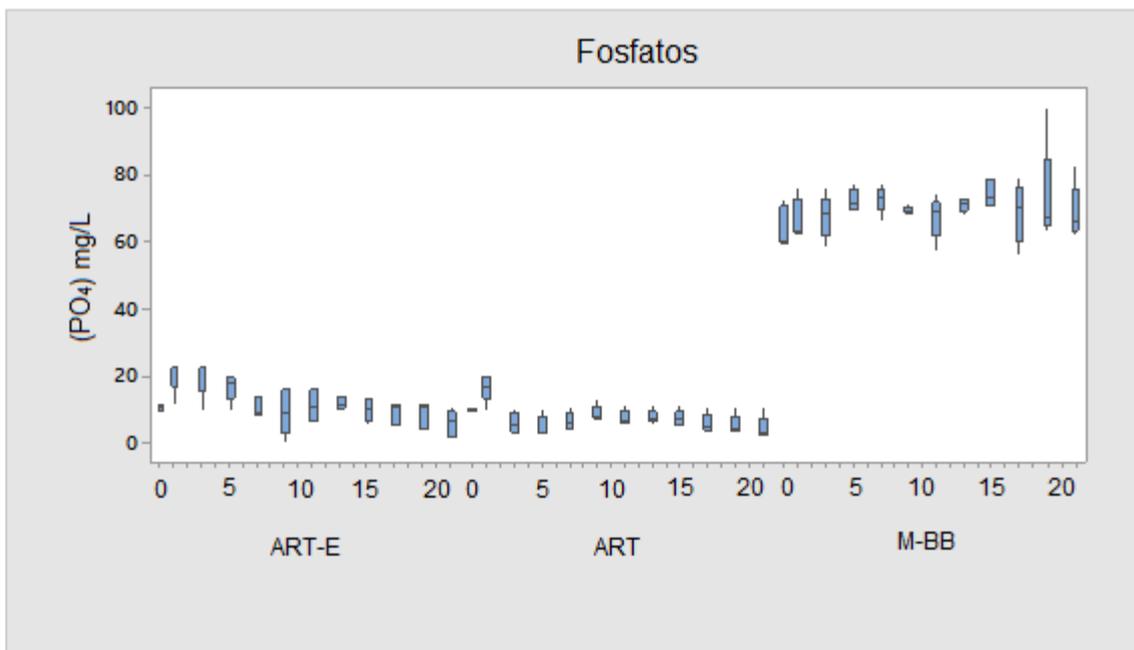
El diagrama de caja y bigote se utilizó para comparar los distintos niveles de un factor, donde podemos observar la simetría y variación de los datos. Para el análisis se determinaron valores de la mediana, valores mínimos y valores máximos, obteniendo los siguientes datos.

Para los Nitratos el valor de la mediana en ART-E presentó un valor de 39.40 mg/L, el tratamiento con ART presentó una mediana de 0.00 mg/L, y el tratamiento con M-BB presentó un valor de 46.90 mg/L.

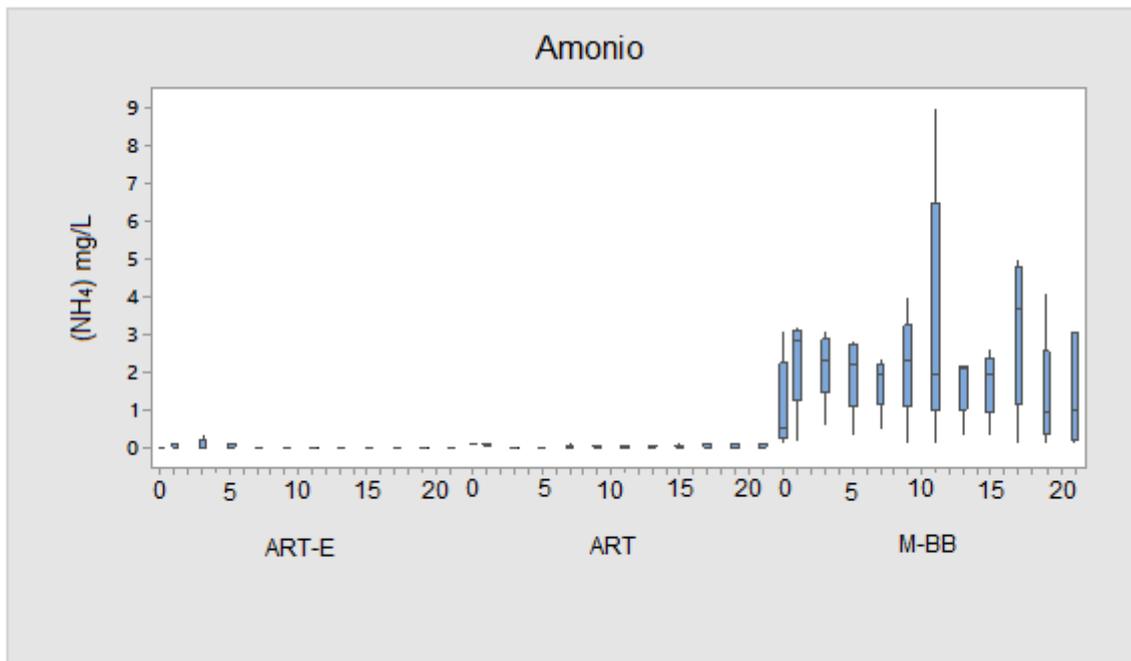
Se observa también que para el caso del tratamiento de ART-E, el valor mínimo de la concentración de nitratos fue de 0.00 mg/L y el valor máximo fue de 142.00 mg/L, para el tratamiento con ART el valor mínimo fue de 0.00 mg/L y un valor máximo de 160.00 y en el tratamiento con M-BB el valor mínimo fue de 0.00 mg/L y el valor máximo fue de 143.00 mg/L.



Gráfica 3. Diagrama de caja y bigotes para observar a los tres grupos ART, ART-E y M-BB en cuanto a la concentración de fósforo, en forma de fosfatos (FRS).

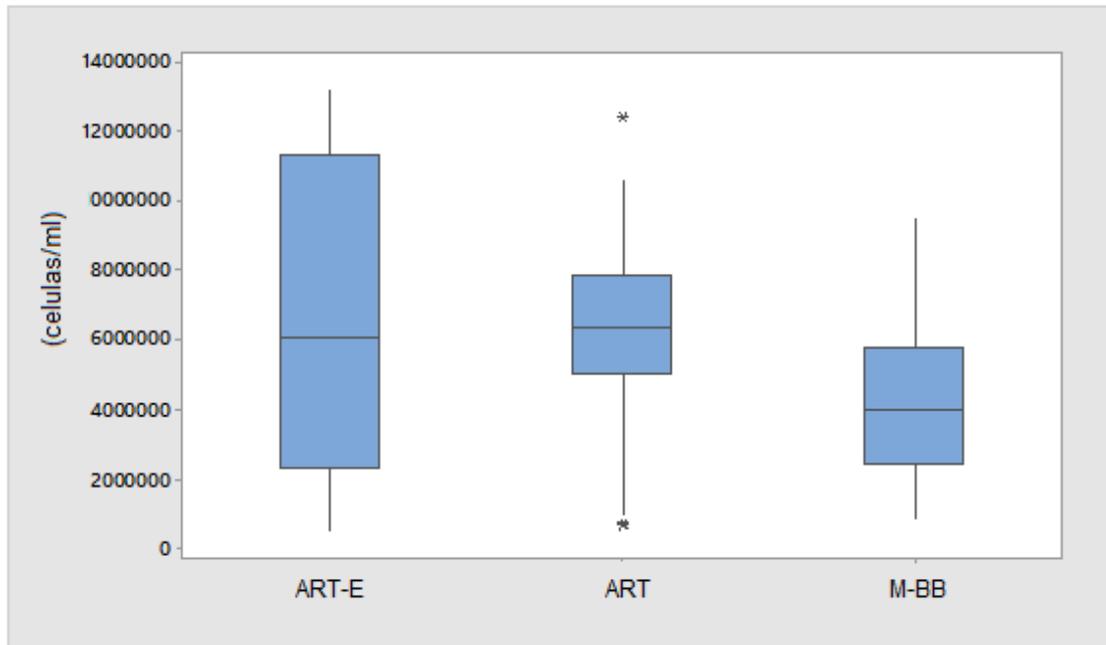


Gráfica 4. Tratamientos ART, ART-E y M-BB, en cuanto a la concentración de fosfatos por la microalga *Scenedesmus acuminatus* en 21 días.

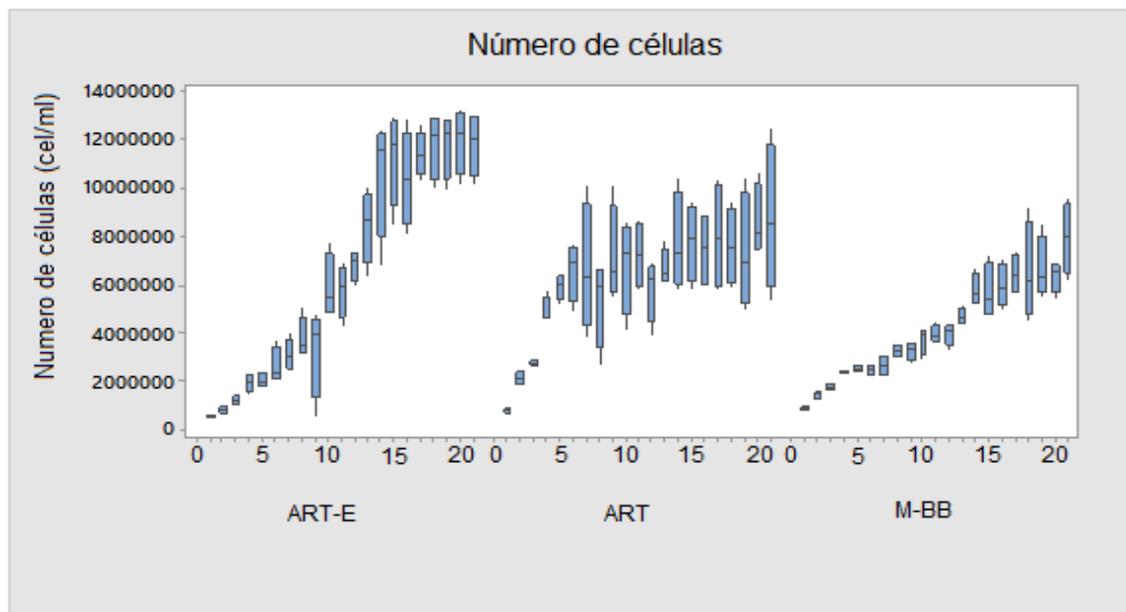


Gráfica 6. Tratamientos ART, ART-E y M-BB, en cuanto a la concentración de amonio por la microalga *Scenedesmus acuminatus* en 21 días.

En el caso del consumo de Amonio, el tratamiento del ART-E presentó un valor de la mediana de 0.0 mg/L, el tratamiento de ART presentó una mediana de 0.0 mg/L, mientras que el tratamiento con M-BB, presentó un valor de 2.1 mg/L, en el caso del tratamiento de ART-E con nutrientes el valor mínimo fue de 0.0 mg/L y un valor máximo de 0.3 mg/L, en el tratamiento con ART, el valor mínimo fue de 0.0 mg/L, y un valor máximo de 0.100 mg/L, para el tratamiento con M-BB el valor mínimo fue de 0.100 mg/L y el valor máximo fue de 9.0 mg/L.



Gráfica 7. Diagrama de caja y bigotes para comparar a los tres grupos ART, ART-E y M-BB, en cuanto a la concentración celular de *Scenedesmus acuminatus*.



Gráfica 8. Tratamientos ART, ART-E y M-BB, en cuanto a la concentración celular de *Scenedesmus acuminatus* en 21 días.

En lo que respecta al número de células, para el grupo ART-E la mediana fue de 6,040,000 cel./mL, para ART fue de 6,360,000 cel./mL y para el grupo control M-BB fue de 3,947,000 cel./mL. Observando la variación de datos, en el tratamiento

de ART-E, el valor mínimo fue de 474,000 cel./mL y un valor máximo de 13,200,000 cel./mL. Para el ART se observó un valor mínimo de 690 000 cel./mL y un valor máximo de 12,400,000 y para el grupo control Bold Basal se observó un valor mínimo de 810,000 cel./mL y un valor máximo de 9,500,000 cel./mL.

Resultados de los estadísticos

Se realizó una prueba ANOVA, para observar las diferencias de los tres tratamientos en 21 días; se estableció un $\alpha= 0.05$.

De acuerdo al análisis de varianza aplicado a la concentración de nitratos, los valores obtenidos fueron: $P=0.025$, por lo tanto, como el valor de $P < \alpha=0.05$, existieron diferencias significativas en cuanto a la concentración de nitratos en los tres tratamientos.

En el análisis de varianza realizado para comparar los tres tratamientos de ART, ART-E y M-BB con respecto a los fosfatos, el valor fue de $P= 0.000$, por lo tanto existen diferencias significativas en cuanto a la concentración de los fosfatos en los tres tratamientos.

El resultado del análisis de varianza realizado para comparar las diferencias significativas entre los tres tratamientos con el amonio el resultado fue: $P= 0.532$, como el valor de P es mayor al valor de α entonces no existen diferencias significativas entre la concentración de amonio en los tres tratamientos.

De los resultados de la prueba ANOVA, aplicada al número de células, se obtuvo un valor de $P= 0.000$, por lo tanto, como el valor de P es menor al valor de alfa establecido, podemos afirmar que existe diferencia significativa entre los tres tratamientos de ART, ART-E y M-BB, respecto al número de células.

Correlación de Pearson

Las correlaciones entre los parámetros se presentaron de la siguiente forma: en las tablas 4, 5 y 6, se muestra la relación que tuvieron los parámetros respecto

al crecimiento celular, en el caso de ART-E, la correlación que nos interesa resaltar es la de nitrógeno y nitratos, ya que tal nutriente le fue adicionado a este grupo, y se observó si se presentó un mayor consumo por la microalga *Scenedesmus acuminatus* (Tabla 4).

ART-E

En el análisis de correlación de Pearson se obtuvieron valores altos, negativos y significativos indicados con un símbolo * ($P < \alpha = 0.05$), entre el número de células, con respecto al nitrógeno total, nitratos, fósforo total y FRS, también se observaron valores altos, positivos y significativos ($P < \alpha = 0.05$), entre Nitrógeno total contra Nitratos, Fósforo Total y FRS, de igual manera nitratos contra Fósforo total, Fósforo total contra FRS, FSR contra nitrógeno amoniacal, Nitrógeno amoniacal contra amoniacal y amonio y Amoniacal contra Amonio (Tabla 4).

	Número de células	Nitrógeno (N)	Nitratos (NO ₃)	Fósforo (P)	Fosfatos (PO ₄)	Nitrógeno (amoniacal)	Amoniacal (NH ₃)
Nitrógeno (N)	-0.926* 0.000						
Nitratos (NO ₃)	-0.924* 0.000	0.810* 0.000					
Fósforo (P)	-0.737* 0.000	0.583* 0.000	0.503* 0.000				
Fosfatos (PO ₄)	-0.736* 0.000	0.577* 0.000	0.489 0.000	0.997* 0.000			
Nitrógeno (amoniacal)	-0.436 0.003	0.363 0.004	0.287 0.026	0.493 0.000	0.498* 0.000		
Amoniacal (NH ₃)	-0.394 0.008	0.309 0.016	0.243 0.062	0.455 0.000	0.461 0.000	0.979* 0.000	
Amonio (NH ₄)	-0.394 0.008	0.309 0.016	0.243 0.062	0.455 0.000	0.461 0.000	0.979* 0.000	1.000*

Tabla 4. Resultados de la correlación de Pearson, entre número de células y nutrientes para el tratamiento ART-E.

ART

En el análisis de correlación de Pearson se obtuvieron valores altos, negativos y significativos indicados con $*(P > \alpha = 0.05)$, entre el número de células con respecto al Fósforo total y FRS, también se observaron valor altos, positivos y significativos ($P > \alpha = 0.05$), de Nitrógeno total contra nitratos contra Fósforo total y FRS, Fósforo total contra FSR, el nitrógeno amoniacal contra amoniaco y amonio, y amoniaco contra Amonio (Tabla 5).

	Número de células	Nitrógeno (N)	Nitratos (NO ₃)	Fósforo (P)	Fosfatos (PO ₄)	Nitrógeno (amoniacal)	Amoniaco (NH ₃)
Nitrógeno (N)	-0.439 0.003						
Nitratos (NO ₃)	-0.079 0.610	0.536* 0.000					
Fósforo (P)	-0.587* 0.000	0.621* 0.000	0.214 0.101				
Fosfatos (PO ₄)	-0.579* 0.000	0.632* 0.000	0.219 0.092	0.999* 0.000			
Nitrógeno (amoniacal)	-0.317 0.036	0.446 0.004	0.112 0.394	0.431 0.001	0.426 0.001		
Amoniaco (NH ₃)	-0.317 0.036	0.446 0.016	0.112 0.394	0.431 0.001	0.426 0.001	1.000*	
Amonio (NH ₄)	-0.317 0.036	0.446 0.000	0.112 0.394	0.431 0.001	0.426 0.001	1.000*	1.000*

Tabla 5. Resultados de la correlación de Pearson, entre número de células y nutrientes para el tratamiento ART.

M-BB

En el análisis de correlación de Pearson se obtuvieron valores altos, negativos y significativos entre el número de células contra el nitrógeno total y nitratos, nitrógeno total contra nitratos, Fósforo total contra FSR, nitrógeno amoniacal contra amoniaco y amonio y amoniaco contra amonio (Tabla 6).

	Número de células	Nitrógeno (N)	Nitratos (NO3)	Fósforo (P)	Fosfatos (PO4)	Nitrógeno (amoniacal)	Amoniaco (NH3)
Nitrógeno (N)	-0.633 * 0.000						
Nitratos (NO3)	-0.629 * 0.000	0.998 * 0.000					
Fósforo (P)	-0.100 0.518	-0.199 0.128	-0.204 0.118				
Fosfatos (PO4)	-0.099 0.521	-0.193 0.140	-0.198 0.129	0.989* 0.000			
Nitrógeno (amoniacal)	-0.136 0.379	-0.168 0.200	-0.168 0.198	-0.146 0.267	-0.151 0.250		
Amoniaco (NH3)	-0.135 0.382	-0.165 0.206	-0.166 0.205	-0.147 0.263	-0.152 0.246	1.000* 0.000	
Amonio (NH4)	-0.142 0.358	-0.165 0.208	-0.166 0.206	-0.149 0.256	-0.154 0.239	1.000* 0.000	0.999 0.000

Tabla 6. Resultados de la correlación de Pearson, entre número de células y nutrientes para el tratamiento M-BB.

Discusión

De los resultados observados en cuanto a las concentraciones registradas para el nitrógeno en forma de nitratos, fue en el tratamiento ART donde se presentaron los valores más bajos de este nutriente presentando la mediana más baja, como se puede observar en la gráfica 1, de lo que podría inferirse que el consumo de *S. acuminatus* fue mayor en el periodo de tiempo establecido para ese tratamiento.

En el tratamiento ART-E se observaron mayores concentraciones de nitratos al final del experimento, pues esta forma de N fue la que se adicionó para

enriquecer el agua tratada, con la finalidad de obtener mayor crecimiento de *S. acuminatus*. Sin embargo al realizar el conteo celular no se presentaron conteos altos de células y esto se corrobora con la prueba de Tuckey en donde no se vieron diferencias significativas.

El M-BB fue el tratamiento que tuvo mayor concentración de nitratos, pues la formulación está diseñada de tal manera que los nutrientes que limitan normalmente el crecimiento algal, que son fósforo y nitrógeno, se encuentren en cantidades suficientes (Reynolds, 2006).

Si bien es cierto que el valor mínimo en la concentración de nitratos fue de cero para los tres tratamientos al término de las mediciones realizadas en el periodo de 21 días. La concentración de nitratos en el tratamiento ART-E (gráfica 2), se mantiene con valores altos, por lo que podríamos decir que sería posible un mayor crecimiento celular, dejando mayor tiempo el cultivo lo cual no resulta viable debido a los objetivos a obtener niveles altos de biomasa, y esto en menor tiempo.

En lo que respecta a la concentración de FRS, observamos que los tratamientos ART y ART-E tuvieron valores más bajos con respecto al MBB, pues este medio está diseñado para que el fósforo no limite el crecimiento de las algas. Los resultados de ANOVA muestran que hay diferencia significativa en la concentración del FRS en ART con respecto a los otros dos tratamientos, dicha diferencia puede deberse a las concentraciones bajas que se presentan del nutriente, ya que los otros tratamientos también lo contenían en concentraciones altas

En lo que se refiere al nitrógeno en forma de amonio, se observa una concentración muy pequeña en los tratamientos ART y ART-E. Es necesario recordar que el efluente del agua tratada fue sometido a aireación, proceso que convierte al amonio y nitritos, presentes en el agua residual, en una forma más oxidada y estable como es el nitrato (Robles, 2004). Esta es la razón por la que se obtuvieron valores altos de nitratos en el ART y ART-E al inicio del experimento y los valores de correlación entre nitrógeno total y nitratos fueron altos y significativos en ART-E, en contraste con el tratamiento ART en el cual el

nitrito también tuvo una influencia alta en el crecimiento algal. Se observó la presencia del amonio en los tratamientos ART y ART-E, a partir del día 13 aproximadamente, en cantidades mínimas 0.1 mg/L, de este nutriente, probablemente debido a la degradación de la biomasa algal generada en ese periodo del cultivo. En el tratamiento M-BB se registraron bajas concentraciones de amonio, una explicación podría ser la esterilización del medio, al convertir las sales de nitrito en formas de amonio, sin embargo la cantidad aportada no es suficientemente grande lo que hace que no haya diferencia significativa entre tratamientos para nitrógeno, en forma de amonio, de ahí los resultados obtenidos del ANOVA.

Las altas correlaciones obtenidas entre el nitrógeno amoniacal y el amonio, nos llevan a pensar que la forma predominante de nitrógeno reducido está en forma de amonio y no de amoniaco, el pH > 8.0 registrado al final de los 21 días en los 3 tratamientos (Tabla 2), confirma esta conclusión (Reynolds, 1980). En lo que se refiere al nitrógeno, en el tratamiento M-BB, los resultados de correlación respecto al crecimiento celular aunque presentaron valores bajos, muestra la dependencia de crecimiento con respecto a este nutriente.

Con base en los resultados podemos decir que el tratamiento donde hubo un mejor consumo de amonio fue en los tratamientos ART y ART-E, ya que presentaron las medianas más bajas con respecto al grupo M-BB y en el cual no se observó un aprovechamiento significativo por la especie *S. acuminatus*.

En cuanto al crecimiento celular, en la gráfica 7 del diagrama de caja y bigotes, el tratamiento que presentó una mediana más alta fue ART (6,360,000 cel./mL); no obstante la mediana del tratamiento ART-E (6,040,000 cel./mL), fue semejante al tratamiento ART.

La prueba de ANOVA muestra las diferencias significativas en el número final de células en los tres tratamientos, por lo tanto, el número de células alcanzado al finalizar los 21 días en el M-BB es el que está marcando la diferencia significativa del resultado de ANOVA. Sin embargo aplicando una prueba de Tukey, con las medianas de los tratamientos ART y ART-E, se confirma que no hubo diferencia significativas entre ellos con un valor de ($P > 0.05$).

El resultado de la mediana en el tratamiento ART en cuanto a crecimiento celular se obtuvo el valor de mediana más alto que en los otros dos tratamientos, se puede observar en la gráfica 8 que hacia el quinto día aproximadamente, el crecimiento de *S. acuminatus* fue sostenido y poco variable, a partir del octavo día se observó una tendencia a la estabilidad del crecimiento algal, pues hubo un aumento muy pequeño en el crecimiento, con una variabilidad alta en los conteos de las cuatro botellas. Esta variabilidad podría atribuirse a errores implícitos en el conteo celular por el método elegido. En contraste, en la gráfica 8 en el tratamiento ART-E, se observa un crecimiento sostenido hasta el día 14, con un crecimiento mayor respecto a ART. La mediana de células por mililitro alcanzada en M-BB (3,947,000 cel./mL), fue la menor de los tres tratamientos a pesar del exceso de N y P presentes en el medio, aunque también quedaron restos de estos dos nutrientes al cabo de los 21 días, lo que nos hace pensar que requiere mayor tiempo para alcanzar una población estable.

Los valores de correlación negativos y altos entre el número de células y los nitratos y fosfatos en el tratamiento ART-E indican que el consumo de los dos nutrientes influyó positivamente en el crecimiento del alga.

La correlación negativa y alta entre FRS y el número de células, respectivamente, en el tratamiento ART permite deducir que el fósforo fue el elemento que determinó el crecimiento acelerado de *S. acuminatus* en este tratamiento, y que el nitrógeno como nitratos tuvo menor influencia, en tanto que si hubo una participación del amonio en este crecimiento “correlación”. La correlación negativa y alta entre número nitratos y cuenta celular en el medio Bold, indica que hace falta ajustar el cociente N:P para obtener mejores resultados en este tratamiento. Sin embargo no se puede descartar la influencia de otros elementos necesarios para el metabolismo de las algas que pudieran estar presentes en los tratamientos ART y ART-E. Dada la simplicidad de la fórmula de Bold Basal (Tabla 6) vemos que no tiene elementos como el Níquel y probablemente algunos otros elementos traza que enriquecen al agua residual y la potencializan como medio de cultivo.

La correlación positiva entre el nitrato y el FRS en el ART y ART-E no indica que estos nutrientes sean aportados por el influente que llega a la planta de

tratamiento. Las algas son capaces de utilizar fuentes de nitrógeno alternativos (Flynn *et al.*, 1986) y confirman que estos elementos son importantes en el proceso de eutrofización de los desechos urbanos (Anderson, 1995).

Por otra parte el uso de géneros como *Scenedesmus*, es adecuado para el tratamiento de agua residual, tanto por su potencial de alto crecimiento, y también por su resistencia a la manipulación de los sistemas de cultivo de baja tecnología (Medina *et al.*, 2012). Las microalgas son muy eficaces en la reducción de nitrógeno disuelto y cargas de fósforo de los efluentes urbanos y agrícolas, que son las principales causas de eutrofización de los cuerpos de agua receptora (Oswald, 1988; Smith, 1999; Talbot *et al.*, 1993).

El crecimiento elevado de *S. acuminatus* en ART y ART-E puede ser causado por la presencia de otros elementos, que deben influir en el crecimiento celular y pueden estar presentes en el agua del efluente como compuestos inorgánicos disponibles para las microalgas.

Conclusiones

- El tratamiento que mostró mejores resultados fue el del grupo ART en el que se observó un mejor aprovechamiento de nutrientes y mayor crecimiento celular en un menor tiempo, el cual se inició a partir del día 7. Por otro lado en el tratamiento ART-E el crecimiento de células en la fase de aceleración se observó en días posteriores (día 11), al crecimiento celular en ART.
- Se observó una correlación alta entre el nitrógeno y aumento celular en el tratamiento ART-E, lo que demuestra un buen aprovechamiento del nutriente por *S. acuminatus*.
- Se observó en el tratamiento ART, un valor de correlación significativo para el FRS en comparación con el nitrógeno, dado el alto crecimiento celular que se obtuvo al realizar el conteo.
- En el M-BB se observó un valor de correlación bajo para el nitrógeno y fósforo con respecto al número de células, por lo tanto se puede decir que otros elementos, varios influyen en el crecimiento de las microalgas, que

el nitrógeno y el fósforo son indispensables, pero también existen otros elementos necesarios para el crecimiento celular.

- El uso de agua residual es flexible para usarse como sustrato o medio de crecimiento, ya que se pueden preparar cultivos mixtos para mejorar el aprovechamiento de nutrientes y elevar el crecimiento de biomasa algal.
- Para escalar estos resultados, se puede adaptar un tanque para aprovechamiento de nutrientes del efluente, en un área de la planta de tratamiento, para obtener un alto crecimiento de biomasa.

Bibliografía

- Alvarado Granados, A.R. (2012). Experiencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en el Estado de México. Universidad Autónoma del Estado de México. Pp 230.
- Anderson DM (1995). Toxic red tides and harmful algal blooms: a practical challenge in coastal oceanography. *Reviews of Geophysics* 33 (supplement): 1189–1200.
- Arredondo BO y Vázquez-Duhalt R (1991). Aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de microalgas. *Ciencia y Desarrollo*. 17: 99-111.
- Boyd, C.E. 1974. The utilization of nitrogen from the decomposition of organic matter by cultures of *Scenedesmus dimorphus*. *Arch. Hydrobiol.*, 73:361-368.
- Chacón, C., Andrade, C. y Morales, E. (2004). Producción de Biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. en cultivo masivo y a cielo abierto. X Jornadas Nacionales de Investigación Científica. Maracaibo. Estado Zulia. Venezuela. Pp 115.
- Charity, E. Andrade, Alexandra y L. Vera. (2009). Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia*. Pp 32:2.
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiol. Rev.* 47: 551-578.
- Comisión Nacional del Agua CONAGUA (2011). Estadísticas del agua en México. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

- De la Noüe, J., Laliberte G. y Prouls D. (1992). Algae and waste water. J. Appl. Phycol. 4, 247-254.
- Escorihuela, M., Núñez, N., Rosales, R. y Morales, E. (2007). Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Rev. Fav. Agron. 24 (1), 225-230.
- Flynn, K.J. and Butler, I. (1986). Nitrogen sources for the growth of marine microalgae. Role of dissolved free aminoacids. Mar. Ecol. Prog. Ser., 34:281-304.
- González, L., Cañizales R. y Baena S. (1997). "Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal from a Colombial Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*". Bioresource Technology. 60: 259-262.
- González Fernández, C., Sialve, B., Berner, N., Steyer, J.P. (2012). Impact of microalgae characteristics on their conversión to biofuel. Part 2: Focus on biomethane production, Biofuels, Bioproducts and Biorefining, doi: 10.1002/bbb.337.
- Guido Aguilar, J.J. y García López, J.C. (2012). Condiciones de diseño para la construcción de una planta de tratamiento, Pp. 69-92. In: A. R. Alvarado Granados (ed). Experiencias en el tratamiento de aguas residuales domésticas en el estado de México. Ed. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Hernández, B.M., *et al.* (2012). Remoción de nutrientes por tres cultivos de microalgas libres e inmovilizados. Rev. Latinoam Biotecnol Amb Algal 3(1):80-94. México, D.F. Pp 35.

- Hu Q. Sommerfeld, M. Jarvis, E. Ghirardi, M. Posewitz, M. Seibert, M. y Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstock for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* 54: 621-639.
- John Wiley *et al.*, Sons, Ltd. (2001), *Algal Metabolism*, Encyclopedia of life sciences. University of Dundee, UK.
- Lau, P, Tam, N. y Wong. Y. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environment Pollution* 89:59-66.
- Lavoie, A. y De la Noue, J. (1985) Hyperconcentrated Cultures of *Scenedesmus obliquus*: A New Approach for Wastewater Biological Tertiary Treatment. *Water Research.* 19:1437-1442.
- Medina Jasso, A., P. Piña Valadez, M. Nieves Soto, J.F. Arzola González y M. Guerrero Ibarra. (2012). La importancia de las microalgas. *CONABIO. Biodiversitas*, 103:1-5.
- Oswald, W. J. (1988). Micro-algae and waste water treatment. In: M.A. Borowitzka and L. Borowitzka, (Eds.), *Micro-algal Biotechnology*, Cambridge University Press, Cambridge: 304-328.
- Parsons, T.R., Stephens, K. and Stickland, J.D.H. (1961). On the chemical composition of eleven species of marine phytoplankton. *J. Fish. Res. Can.*, 18:1001-1004.
- Raja, R., Hemaiswarya, S., Balasubramanyam, D., y Rengasamy, R. (2007). Exploitation of *Dunaliella* for B- carotene production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74: 517-523.
- Ryan C, (2009). *Cultivation Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels*. Alice Hartley, Terrapin Bright Green, LLC. Pp. 1-92.

- Redfield, A. C. (1958). The biological control of chemical factors in the environment. *American Scientist* 46: 205–222.
- Reynolds, C. S. (1980). Phytoplakton assemblages and their periodicity in stratifying lake ecosystems. *Holarct, Ecol*, 3: 141-159.
- Reynolds, C. S. R. (1988). Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton. *In*: Sandgren, C.D. (Ed.). Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton. Cambridge University Press, Cambridge. Pp. 388–433.
- Reynolds, C. S. (2006). The Ecology of Phytoplankton. Ecology, Biodiversity and Conservation. Cambridge University. Pp. 27-30.
- Robles, V. E. (2004). Contaminantes físicos y químicos del Agua: sus efectos en el hombre y el medio ambiente. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Pp 66-68.
- Romero, T. Miyashita, H. y Kurano, N. (2000) Crecimiento y composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en residual pesquero. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, 34:2:93-100.
- Rosales, N. Bermúdez, J. Moronta, R. y Morales E. (2007). Residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal. Revista colombiana de Biotecnología, 9:1:41-48.
- SShapiro, J. (1990). Current beliefs regarding dominance by blue-greens: The case for the importance of CO₂ and pH. *Verh. Internat. Limnol.* 24: 38-54.
- Sheehan, J. Dunahay, T. Benemann, J. y Roessler, P. (1998). A look back to the US Department of Energy's Aquatic Species Program – biodiesel from algae. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO; Report NREL/TP-580-24190, 328 p. www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24190.pdf

- Smith, V. H. y Bennett, S. J. (1999). Phosphorus supply ratios and phytoplankton community structure in lakes. *Arch. Hydrobiology* 146 (1):37-53.
- Tam, N. y Wong, Y. (1990). The comparison of growth and nutrient removal efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* in Settled and Activated Sewage. *Environmental Pollution*. 65 93-108.
- Tam, N. y Wrong, Y. (1989). Wastewater Nutrients Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp. *Environmental Pollution*. 58:19-34.
- Talbot, P. and De la Noue, J. (1993). Tertiary treatment of a wastewater with *Phormidium bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. *Water Res.*, 27: 153-159.
- Travieso, L. y Benitez, S. (1982). Unicellular Growth on Swine Waste. *Science and Technique on Agriculture*. 5: 89-99.
- User Manual YSI 9500 Photometers 1725 Brannum Lane Yellow Springs, Oh 45387.
- Valencia, D. A. (2012). Capacidad de remoción de amonio y ortofosfato a gran escala, de dos especies de microalgas, en aguas residuales municipales, Laboratorio de Ficología Aplicada, UAM-I, Programa Interdisciplinario del Medio Ambiente, UIA Puebla.
- Willey, N. (2007). *Phytoremediation. Methods and reviews*. Editorial Humana Press. Towa, Pp 141-468.
- http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&method=list&ArticleListID=621648099&sort=v&st=25&view=c&origin=article&md5=52e69e38747cd4715614badf3ec785c6&searchtype=a

<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/NormasOficialesMexicanas.pdf>