

# REMOCIÓN DE NUTRIENTES Y DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO POR *Scenedesmus obliquus* (CHLOROPHYTA) BAJO CICLOS DE LUZ/OBSCURIDAD

## NUTRIENTS AND BIOCHEMICAL OXYGEN DEMAND REMOVAL BY

## *Scenedesmus obliquus* (CHLOROPHYTA) UNDER LIGHT AND DARK PERIODS

Alejandro Ruiz-Marín, Silvia Campos-García, Juan Carlos Robles-Heredia, Reyna Sánchez-Junco, Joaquín Humberto Moreno-López, Yunuen Canedo-López.

Fecha de recepción 3 de Noviembre 2008

Fecha de aceptación 20 de Diciembre de 2008

### RESUMEN

Se evaluó el uso de *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing (1833), para la remoción de N-NH<sub>4</sub>, P-PO<sub>4</sub>, así como la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) en agua residual artificial equivalente a un efluente de procesos de lodos activados. Los experimentos se realizaron en reactores con volumen de operación de 2.5 L de agua residual artificial. Dos tipos de agua residual fueron evaluados: agua residual sin carbón orgánico (MA) y agua con peptona como aporte de carbón orgánico (AR); ambos tratamientos bajo ciclos de luz/obscuridad (12/12 h) a una temperatura de 26±1 °C. Se encontró mayor densidad celular en MA (5.8 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup>) que en los cultivos con peptona (AR) (4.8 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup>) a las 200 horas. Se obtuvo una tasa de crecimiento similar en ambos tratamientos (MA y AR) de 0.163 d<sup>-1</sup> y 0.134 d<sup>-1</sup>, respectivamente. El N-NH<sub>4</sub> removido (95.3%) en cultivo MA fue mayor que en AR, mientras que la remoción de fósforo no mostró diferencias entre los tratamientos. La DBO en cultivo AR fue de 77 %, sugiriendo que la microalga *S. obliquus* es apta para crecer en presencia de carbón orgánico bajo ciclo de luz/obscuridad, con probable consumo de carbón orgánico y nutrientes simultáneamente, resultando un buen candidato para el tratamiento terciario de aguas residuales domiciliarias.

**Palabras clave:** agua residual artificial, tratamiento terciario, cultivo de microalgas, fotobiorreactores.

### ABSTRACT

The use of *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing (1833) was evaluated for N-NH<sub>4</sub>, P-PO<sub>4</sub> removal, as well as the Biochemical Oxygen Demand (DBO) in artificial wastewater equivalent to one effluent of sludge activated processes. The experiments were carried out in reactors of 2.5 L volume of operation with artificial wastewater. Two types of artificial wastewater were evaluated: without organic carbon (MA) and water with peptone as a source of organic carbon (AR), both treatments under light and dark periods (12/12 h) and temperature of 26±1 °C. A higher cellular density in MA of 5.8 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> was obtained than those cultures with peptone (AR) of 4.8 x 10<sup>6</sup> cel ml<sup>-1</sup> at 200 hours. A similar growth rate was obtained in both treatments (MA and AR) of 0.163 d<sup>-1</sup> and 0.134 d<sup>-1</sup>, respectively. The N-NH<sub>4</sub> removed (95.3 %) in culture MA was higher than in AR, whereas the phosphorus removal did not show any differences between the treatments. The DBO in AR culture was 77 %, coming up with the microalgae *S. obliquus* is suitable to grow in presence of organic matter under light and dark periods, with pro-

DES-Area Ingeniería y Tecnología. Universidad Autónoma del Carmen. Av.56 N° 4 esquina Av. Concordia. Col. Benito Juárez. C.P.24180. Tel. (938)38 26514. Ciudad del Carmen, Campeche, México.

Autor para correspondencia: aruiz@pampano.unacar.mx

bable consumption of organic matter and nutrients simultaneously, turning out to be a good candidate for the tertiary treatment of domiciliary wastewater.

**Key words:** Artificial wastewater, tertiary treatment, microalgae culture, photobioreactors.

## INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales tienen una composición variada de residuos tales como metales pesados, plaguicidas, materia orgánica, nitrógeno y fósforo. Estos últimos son los principales causantes de la eutrofización en cuerpos de agua (Lavoie y de la Noüe, 1985; Lau *et al.*, 1994; Tam y Wong, 2000). En cuanto a su composición biológica, contienen una gran variedad de microorganismos que constituyen la parte viva de la materia orgánica y su presencia es de suma importancia, ya que en gran parte, el tratamiento de aguas depende de sus actividades metabólicas (Bitton, 1994).

Los sistemas convencionales de depuración pueden ser sustituidos por el uso de algas para eliminar nutrientes (Mengharaj *et al.*, 1992; Oswald, 1992; Kaya *et al.*, 1996). El empleo de la biotecnología de microalgas ofrece una valiosa alternativa y ventajas dado que está basada en principios de ecosistemas naturales, y por tanto, no es ambientalmente peligrosa; no causa contaminación secundaria si la biomasa producida es reutilizada, permite un reciclaje eficiente de los nutrientes contenidos en los efluentes dado que las microalgas asimilan eficientemente nitrógeno y fósforo inorgánico para su crecimiento (Marfínez *et al.*, 2000).

El uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales puede reducir los costos de tratamiento convencional debido a la producción de oxígeno fotosintético; mediante el cultivo de microalgas en

aguas residuales es posible obtener un doble beneficio, la remoción de nutrientes y la producción de biomasa (De la Noüe y De Pauw, 1988).

Para tener una producción óptima en un cultivo de microalgas, es necesario tener una tasa máxima de fijación de carbono (fotosíntesis máxima) por unidad de biomasa. A medida que los organismos unicelulares crecen y se dividen, la densidad del cultivo va en aumento, el proceso es el resultado final de una interacción del conjunto de tres factores principales que lo controlan: luz, temperatura y nutrientes (relación N/P, metales trazas y CO<sub>2</sub>) (Robinson *et al.*, 1986).

La temperatura y los nutrientes apropiados son condiciones indispensables para tener un buen incremento de la biomasa. La fuente principal de carbono en las microalgas es el CO<sub>2</sub>, sin embargo muchas microalgas son capaces de utilizar el carbono de los compuestos orgánicos para su crecimiento. Los diversos tipos de nutrición organotrófica en microorganismos fotosintéticos están relacionados con la utilización de energía luminosa y CO<sub>2</sub>, además de los compuestos orgánicos asimilados. La condición heterotrófica se establece cuando la microalga es capaz de mantener un crecimiento estable y sostenido como producto del metabolismo de algún sustrato orgánico en ausencia de iluminación. En el caso que utilice simultáneamente para su crecimiento luz y sustratos orgánicos, la microalga manifiesta una capacidad mixotrófica (Lau *et al.*, 1994).

En el presente estudio se determinó la eliminación de N, P y carbón orgánico por *Scenedesmus obliquus* en cultivos con agua residual artificial equivalente a un efluente de lodos activados bajo ciclos de luz/oscuridad. La producción de biomasa y tasa de crecimiento fueron también evaluados. El objetivo fue conocer la capacidad de la microalga para degradar la materia orgánica y si es posible su uso en tratamientos de aguas residuales evaluándose estas accio-

nes a través de la remoción de nutrientes y de la DBO en determinados regímenes de cultivo.

## MATERIALES Y METODOS

### Selección de microalga

La especie de microalga *Scenedesmus obliquus* (Turpin) Kützing (1833), pertenece a la clase Chlorophyceae. Esta cepa fue obtenida de suelo agrícola de Ensenada, B. C., México, muestra buen crecimiento en agua residual urbana y presenta tolerancia al agua salobre (12 UPS). La cepa se obtuvo de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE).

### Condiciones de crecimiento

La especie de microalga fue cultivada en medio agua residual artificial equivalente a un efluente de lodos activados previamente esterilizado y de acuerdo al descrito por De Bashan et al. (2002) preparado con las siguientes concentraciones: 7 mg l<sup>-1</sup> NaCl; 4 mg l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>; 2 mg l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 15 mg l<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 115 mg l<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl, este medio de cultivo fue denominado MA (medio de cultivo sin fuente de carbono), en adición se preparó otro medio con las mismas características al anterior pero con 650 mg l<sup>-1</sup> en peptona, denominado AR (medio de cultivo con fuente carbón orgánico). Los metales trazas y vitaminas se agregaron según las concentraciones descritas para el medio f/2 por Guillard y Ryther (1962) en ambos medios.

La microalga *S. obliquus*, previamente aclimatada en medio de cultivo agua residual artificial, fue traspasada a fotobiorreactores, los cuales consistieron en recipientes cerrados de tres litros con un volumen de operación de 2.5 L. El aire para agitación se proporcionó a cada uno de los fotobiorreactores por medio de un compresor adaptado a un filtro con carbón activado y membrana de fibra de vidrio (0.2 μm Whatman). Para los tratamientos con ambos

medios de cultivo MA y AR, se transfirió a los biorreactores AR y MA un volumen de cultivo con una densidad celular de 50 x 10<sup>4</sup> cel ml<sup>-1</sup> previamente determinado por conteo en cámara Neubauer, con tres repeticiones por cada tratamiento.

### Crecimiento del alga y remoción de nutrientes

En cada uno de los tratamientos se realizó el registro del número de células (células ml<sup>-1</sup>) en cámara Neubauer al final de cada ciclo de luz/oscuridad (12 / 12 h). La tasa de crecimiento ( $\mu$ ) fue determinada en la fase exponencial mediante la ecuación:

$$\mu = (\log N - \log N_0) / (t_1 - t_0)$$

Donde N es el número de células en la muestra en el tiempo t<sub>1</sub> y N<sub>0</sub> es el número inicial de células al inicio del experimento en el tiempo t<sub>0</sub>. La remoción de nutrientes se determinó mediante el análisis de nitrógeno (N-NH<sub>4</sub>) y fósforo (P-PO<sub>4</sub>) en los biorreactores cada 12 horas al final de cada ciclo de luz/oscuridad. De igual forma, se colectaron muestras de agua cada 12 horas para el análisis de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO). El análisis de nutrientes y DBO se llevó a cabo de acuerdo a las técnicas analíticas descritas en AWWA-APHA-WPCF. (1995). La tasa de remoción fue determinada mediante la ecuación:

$$q = (S - S_0) / (X_0 - X)$$

Donde S, es la concentración de sustrato (mg l<sup>-1</sup>) en el tiempo t<sub>1</sub>; S<sub>0</sub> es la concentración de sustrato (mg l<sup>-1</sup>) en el tiempo t<sub>0</sub>; X<sub>0</sub> y X son las concentraciones de células (cel ml<sup>-1</sup>) en los tiempos t<sub>0</sub> y t<sub>1</sub>, respectivamente.

### Análisis Estadístico

Para contrastar el crecimiento, la remoción de materia orgánica y de nutrientes entre los dos medios de cultivo, se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA,  $\alpha$ : 0.05), usando el software Statistica V.7. (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Densidad celular

El incremento de la densidad celular muestra una cinética de crecimiento típica, con una fase de aclimatación en ambos medios de cultivo (MA y AR) de 50 horas, seguido por una fase exponencial en ambos casos hasta las 200 horas. Posteriormente, se observó la fase de muerte (Figura 1).

Al final del periodo de tratamiento (230 horas) no se observaron diferencias significativas ( $P = 0.206$ ) en el incremento de la densidad celular de *S. obliquus* para los dos

tasa de crecimiento de 0.134 d<sup>-1</sup> similar al obtenido en medio MA de 0.163 d<sup>-1</sup> (Figura 1). Lo anterior sugiere, que *S. obliquus* en medio AR mostró capacidad de realizar división celular en medios donde se encuentran presentes fuentes de carbón orgánico, exhibiendo en el presente estudio una tasa de crecimiento similar a las reportadas en medios convencionales para cultivo de microalgas donde únicamente están presentes el N y P.

Fue evidente que la presencia de carbón orgánico no afectó el crecimiento de la microalga. Sin embargo, aunque el crecimiento no fue interrumpido en los cultivos AR; en

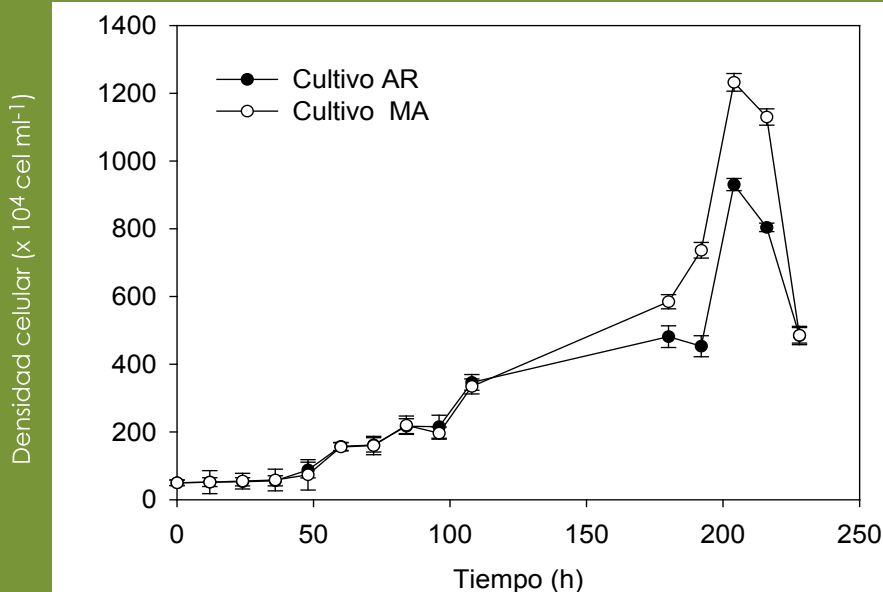


Figura 1. Incremento de la densidad celular de *Scenedesmus obliquus* en medio algal (MA) y medio peptona (AR) bajo ciclos de luz/oscuridad (barras significan desviación estándar, n=3)

tipos de medio (MA y AR). Se encontró una densidad celular en el tratamiento MA de  $5.8 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> y  $4.8 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup> en cultivos con peptona (AR). La densidad celular en medio AR incrementó gradualmente con respecto al tiempo presentando una

el presente estudio, no se obtuvo evidencia suficiente para sugerir que la microalga presenta la habilidad de utilizar fuentes de carbón orgánico en los periodos de oscuridad.

Las tasas de crecimiento (0.134 d<sup>-1</sup> y 0.163 d<sup>-1</sup>) para *S. obliquus* (AR y MA, respectiva-

mente) fueron menores a lo reportado en otros estudios para cultivo de microalgas con suministro de carbón inorgánico. A diferencia de los resultados de este estudio, *S. obliquus* en medio agua residual artificial mostró altas tasas de crecimiento (0.273 d<sup>-1</sup> y 0.374 d<sup>-1</sup>), en condiciones de cultivo semicontinuo bajo luz continua (Ruiz-Marín y Mendoza-Espinosa, 2008); en cambio a una tasa mayor de crecimiento (0.806 d<sup>-1</sup>) para *S. obliquus* en medio de cultivo artificial. Estas diferencias pueden ser atribuidas a la diferente concentración de N y condiciones de iluminación (continua o ciclos de luz/oscuridad), sugiriendo también que *S. obliquus* puede alcanzar una mayor tasa de crecimiento bajo iluminación continua y preferencia a fuentes de nutrientes y carbón inorgánicos (Martínez *et al.*, 2000). Entonces se puede decir que el crecimiento de la microalga pudo ser afectado por los ciclos de luz/oscuridad, en comparación a los experimentos bajo luz continua previa-

mente mencionados.

Se conoce que *Scenedesmus obliquus* puede cambiar su metabolismo de autotrófico a heterotrófico, dado que es capaz de utilizar tanto carbón orgánico como inorgánico (Chevalier y de la Noüe, 1988). Contrario al presente estudio, se ha reportado que la microalga *S. obliquus* no presenta una característica heterotrófica, una probable explicación es atribuido a los cortos periodos de aclimatación. Aunque en el presente estudio fue posible aclimatar a la microalga previo al experimento a fuentes de carbón orgánico y ciclos de luz/oscuridad, dado que bajo esta condición la microalga cambia su metabolismo para ser heterotrófica.

### Remoción de amonio

Se observó una producción de amonio particularmente en cultivos con peptona (AR) alcanzando un contenido de 75 mg l<sup>-1</sup> en las primeras 48 horas (Figura 2). Este in-

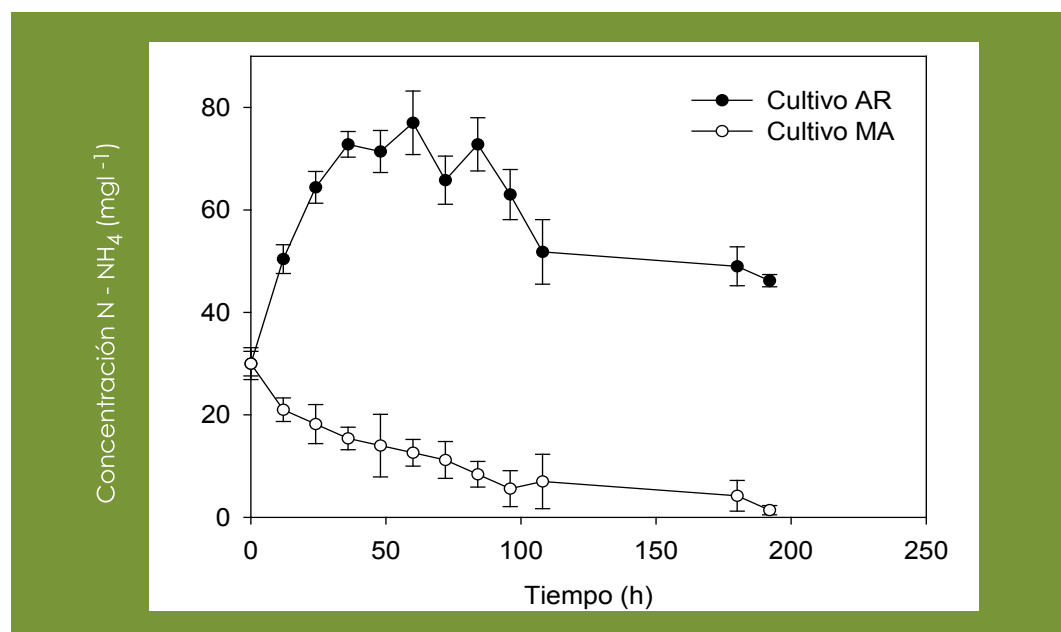


Figura 2. Eliminación de amonio del agua residual artificial (MA) y medio peptona (AR) bajo ciclos de luz/oscuridad (12/12h) (barras significan desviación estándar, n=3).

crecimiento de N se atribuye a la descomposición de materia orgánica por la actividad bacteriana. La concentración de amonio decrece posteriormente después de las 48 horas por la actividad del alga. A las 200 horas aproximadamente de tratamiento, la concentración de amonio fue de 46.2 mg l<sup>-1</sup> (40 % removido). Durante este periodo de tratamiento se obtuvo una tasa de remoción de 0.22 mg N l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>. En cambio, en cultivos semicontinuos de *Scenedesmus* sp. bajo ciclos de 14/10 horas (luz/oscuridad) con dilución del 30 % se ha logrado alcanzar una remoción del 12 % de NH<sub>3</sub> (Voltolina et al., 2004). Sin embargo, en este reporte, los reactores con medio sin peptona (MA), el contenido de amonio decreció desde 30 mg l<sup>-1</sup> a 1.4 mg l<sup>-1</sup> (95.3 %) con una tasa de remoción de 0.14 mg l<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Figura 2). Aunque el porcentaje de amonio removido en MA fue mayor al obtenido en medio AR, la tasa de remoción en cultivos AR indica que fue mayor que en cultivo MA, lo cual

podría estar relacionado con procesos de nitrificación realizado por bacterias presentes en los cultivos. La alta capacidad de *S. obliquus* de crecer y remover nitrógeno inorgánico del agua residual urbana y artificial es similar a estudios reportados previamente (Martínez et al., 2000). El éxito de los sistemas de tratamiento terciario de aguas residuales empleando microalgas, se basa en la capacidad de la células para remover nutrientes inorgánicos tales como nitrógeno y fósforo provenientes del proceso de lodos activados e incorporarlos para el mantenimiento y crecimiento celular. Como es el caso de la capacidad de remoción de *Chlorella vulgaris* cultivada en agua residual urbana, alcanzando el 98 % de remoción de N en 8 días (Lau et al., 1995). Una completa remoción en 8 días fue reportada para *C. vulgaris* incubada en efluentes provenientes de un digestor anaerobio para estiércol (De la Noüe y Basseres, 1989). En términos de remoción de nitrógeno disuelto, los resultados

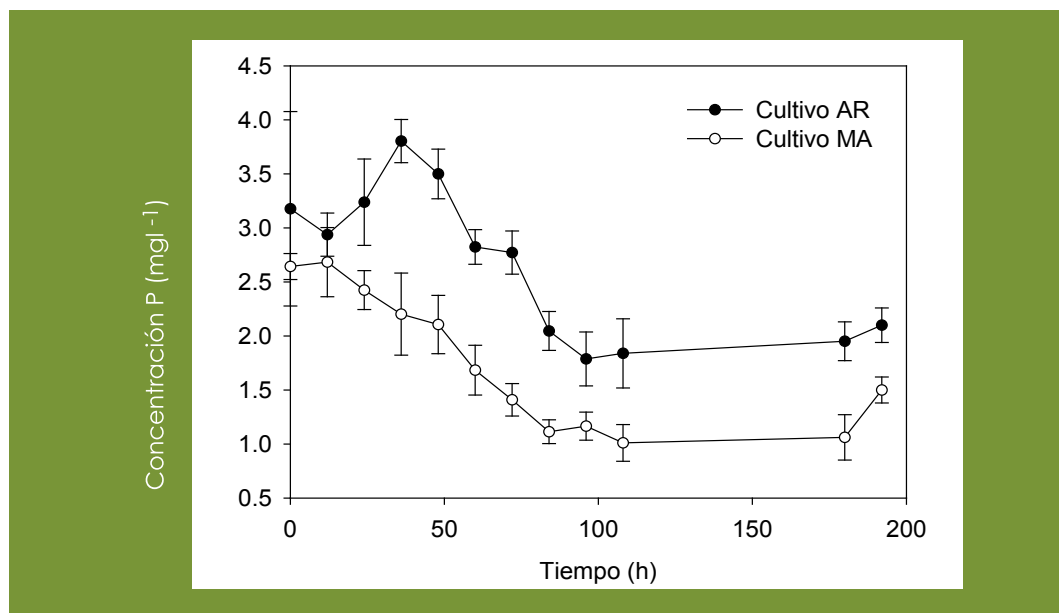


Figura 3. Eliminación promedio de fósforo del agua residual artificial sin peptona (MA) y con peptona (AR bajo ciclos de luz/oscuridad (barras significan desviación estándar, n=3)



sugieren que los ciclos de luz/oscuridad no afectaron la eficiencia de eliminación, siendo similar a lo reportado en experimentos bajo luz continua.

### Remoción de Fósforo

En cultivos con medio peptona (AR) se obtuvo un incremento de 1 mg l<sup>-1</sup> adicional a los 3 mg l<sup>-1</sup> de fosfato presentes en el medio de cultivo inicial, sugiriendo algún tipo de descomposición por bacterias presentes en el medio de cultivo. Antes de las 50 horas se observó una reducción en la concentración de fósforo logrando alcanzar al final del período de tratamiento (200 horas) 1.83 mg de P l<sup>-1</sup> (40 %), con una tasa de remoción de 0.601 mg de P l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> (Figura 3). Lo anterior es similar a cultivos semicontinuos de *Scenedesmus sp.* bajo ciclos de 14:10 h (luz/oscuridad) con dilución del 30 %, con una remoción del 43 % de PO<sub>4</sub> (Voltolina et

al. 2004)

En los reactores con medio MA, la microalga *S. obliquus* mostró variaciones en la eliminación de P, principalmente en los periodos de oscuridad donde se observó un ligero incremento de dicho nutriente al medio de cultivo. No se detectó alguna influencia de los ciclos de luz-oscuridad, mostrando que el contenido de fósforo decreció desde 2.7 mg l<sup>-1</sup> a 1 mg l<sup>-1</sup> (67 %), con una tasa de remoción de 0.384 mg de P l<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> durante 180 horas de tratamiento. Los resultados indican que el P es removido por procesos de consumo innecesario y posteriormente liberado durante los ciclos de oscuridad (Figura 3). Esta situación se puede explicar debido a que el fosfato inorgánico, es la principal forma en la cual las microalgas asimilan fósforo (H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). El fosfato orgánico puede ser usado como una fuente principal de fósforo pero debe ser hidrolizado por enzimas extracelulares tales como fosfoes-

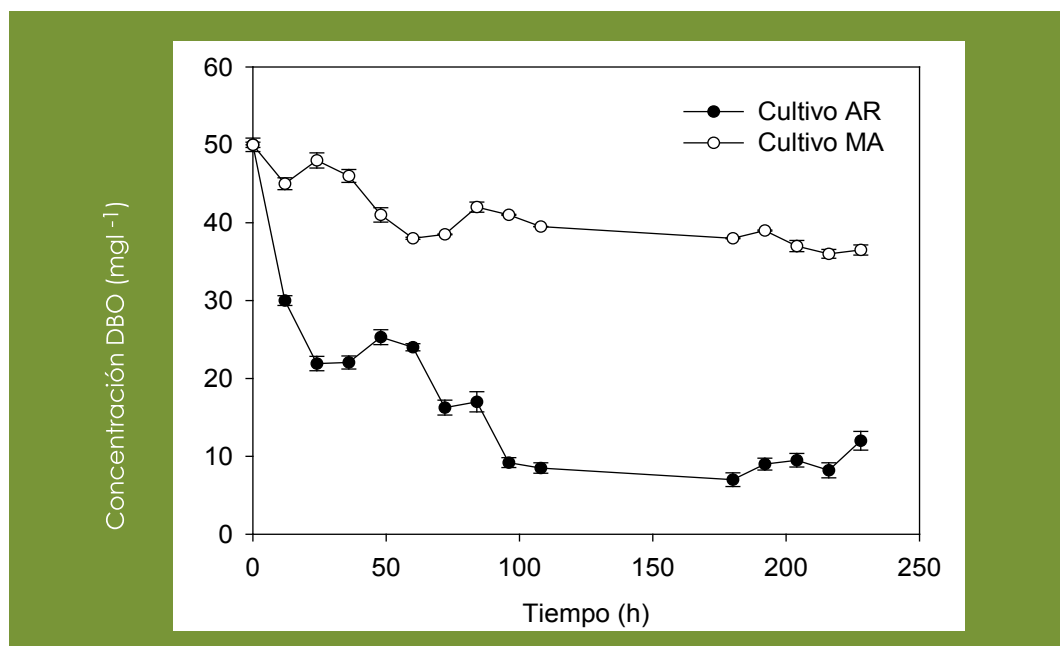


Figura 4. Disminución de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) del agua residual artificial sin peptona (MA) y con peptona (AR) como fuente de carbón bajo ciclos de luz/oscuridad (barras significan desviación estándar, n=3)

terazas o fosfatasa (Becker, 1994). Únicamente cuando la concentración externa de fosfatos llega a ser limitante, el polifosfato es utilizado para satisfacer las necesidades metabólicas de la célula. Los resultados sugieren que la microalga *S. obliquus* tuvo mayor preferencia hacia el fósforo inorgánico presente en el medio AR, dado que la eliminación fue ligeramente diferente al medio MA (Figura 3).

Sin embargo, la remoción obtenida en el presente estudio fue menor que en cultivos con densidad celular media ( $1 \times 10^6$  cel ml<sup>-1</sup>) y superconcentrados ( $1 \times 10^7$  cel ml<sup>-1</sup>) de *C. vulgaris* incubada en agua residual urbana, mostrando una remoción de fósforo del 93% y 85%, respectivamente en 10 días de tratamiento (Lau *et al.*, 1995). De igual forma, alrededor del 90 % de P-PO4 fue removido con cultivos de *C. vulgaris* y *S. obliquus* en efluentes provenientes de un digestor anaerobio para estiércol (De la Noüe y Basseres, 1989). La relativa baja remoción del fósforo puede estar afectada por la disponibilidad de luz dentro del reactor; la reacción es considerada dependiente de la energía y generalmente estimulada por la luz (Becker, 1994).

Sin embargo, las tasas de remoción aquí reportadas son similares a lo reportado para *C. vulgaris* de 0.42 mg de P I-1 d-1 (Lau *et al.*, 1998), aunque para *Scenedesmus intermedius* se reportó una tasa de remoción mayor de hasta 20.83 mg de P I-1 d-1 (Jiménez-Pérez *et al.*, 2004).

### Análisis de la DBO

Se alcanzó una reducción de la DBO del 77 % para los cultivos en medio AR, mientras que para los cultivos con medio MA no se observó una reducción importante de la DBO (Figura 4). Esto comprueba que la microalga bajo ciclos de luz/oscuridad probablemente puede aprovechar aportes de carbón orgánico para su crecimiento, dado que fue posible observar que la DBO decreció desde 50 mg I-1 a 10 mg I-1. Esta situación es similar para las especies, *Chlo-*

*rella sp.*, *S. obliquus* y *Phormidium bohneri* cultivadas en efluentes de digestores anaerobios tratando aguas residuales de granjas porcícolas; donde *S. obliquus* obtuvo mayor productividad (41-57 mg biomasa peso seco I-1 d-1), que las otras especies, con una remoción de materia orgánica del 70 % (De la Noüe y Basseres, 1989). Por otro lado, para el tratamiento de aguas residuales recalcitrantes donde se reporta el 72 % y 28 % de amonio y fósforo debido a la capacidad de remoción combinada de *C. vulgaris* y *Lemma minuscula* después de cinco días, así como una remoción de la materia orgánica del 61 % (Valderrama *et al.*, 2002).

## CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de cultivo, el crecimiento de *S. obliquus* no fue interrumpido por efecto del ciclo luz/oscuridad y fue capaz de crecer en presencia de carbón orgánico.

Los resultados muestran que *S. obliquus* puede ser de gran utilidad para ser empleada en sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas, con la ventaja de remover nitrógeno y fósforo.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Autónoma del Carmen por los recursos proporcionados a través del proyecto interno PR/134/2008; así como el apoyo técnico de Martina Cruz y Lorena Guevara del laboratorio de Control de Calidad-Facultad de Química, de la misma institución.



## BIBLIOGRAFÍA

- AWWA-APHA-WPCF. 1995. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (AWWA). 19th Ed. Washington, DC, USA: 1105
- Becker, E. W. 1994. Microalgae, biotechnology and microbiology. Cambridge University Press. New York. 291 p.
- Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology – Pathogens and parasites in domestic wastewater. Ed. Wiley-Liss. 112 p.
- Chevalier, P. and De la Noüe, J. 1988. Behavior of algae and bacteria co-immobilized in carrageenan, in a fluidized bed. *Enzyme Microb. Tech.* 10: 19-23.
- De Bashan, E. L.; Moreno, M.; Hernández, J. P.; and Bashan, Y. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Res.* 36: 2941 – 2948.
- De la Noüe, J. and Basseres, A. 1989. Bio-treatment of anaerobically digested swine manure with microalgae. *Biol. Waste.* 29:17-31
- De la Noüe, J. and De Pauw, N. 1988. The potential of microalgal biotechnology: A review of production and uses of microalgae. *Biotechnol. Adv.* 6: 725 - 770.
- Guillard, R. L. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies on marine planktonic diatoms *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* 8: 229 – 239.
- Jiménez-Pérez, M. V.; Sánchez-Castillo, P.; Romera, O.; Fernández-Moreno, D. and Pérez-Martínez, C. 2004. Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microb. Tech.* 34: 392 – 398.
- Kaya, V. M.; Goulet, J.; de la Noüe, J. and Picard, G. 1996. Effect of intermittent CO<sub>2</sub> enrichment during nutrient starvation on tertiary treatment of wastewater by alginate-immobilized *Scenedesmus bicellularis*. *Enzyme Microb. Tech.* 18: 550 – 554.
- Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. and Wong, Y. S. 1994. Effect of organic-N sources on algal wastewater treatment system. *Resour. Conserv. Recy.* 11: 197 – 208.
- Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. and Wong, S. Y. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environ. Pollut.* 89: 59 – 66.
- Lau, P. S.; Tam, N. F. Y. and Wong, Y. S. 1998. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technol.* 63: 115 – 121.
- Lavoie, A. and De La Noüe, J. 1985. Hyper-concentrated cultures of *Scenedesmus obliquus*. A new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water Res.* 19 (11): 1437 – 1442.
- Martínez, M. E.; Sánchez, S.; Jiménez, J. M.; Yousfi, F. E. and Muñoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technol.* 73: 263 – 272.
- Menharaj, M.; Pearson, H. W. and Venkateswarlu, K. 1992. Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Enzyme Microb. Tech.* 14 (8): 656 – 658.
- Oswald, J. W. 1992. Wastewater Treatment with Microalgae. *J. Phycol.* 28 (3): 1-12.
- Robinson, P. K.; Goulding, K. H.; Mak, A. L. and Trevan, M.D. 1986. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella*. *Enzyme Microb. Tech.* 8: 729 – 733.
- Ruiz-Marín, A. and Mendoza-Espinosa, L.G. 2008. Ammonia removal and biomass characteristics of alginate immobilized *Scenedesmus obliquus* cultures treating real wastewater. *Fresen. Environ. Bull.* 17: 1236-1241.
- Tam, N. F. Y. and Wong, Y. S. 2000. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environ. Pollut.* 107 (1): 145 – 151.
- Valderrama, T. L.; del Campo, C. M.; Rodríguez, C. M.; Bashan, L. E.; and Bashan, Y.

2002. Treatment of recalcitrant wastewater from ethanol and citric acid production using the microalga *Chlorella vulgaris* and the macrophyte *Lemna minuscula*. *Water Res.* 36: 4185 – 4192.

Voltolina, D.; Villa, H. G. and Correa, G. 2004. Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. (Chlorophyceae) in artificial wastewater, under a simulated day-night cycle. *Vie Milieu.* 54 (1): 21 – 25.

Forma correcta de citar este trabajo:

Ruiz - Marín, A.; Campos - García, S.; Robles - Heredia, J.C.; Sánchez - Junco, R.; Moreno - López, J.H. y Conedo - López, Y . 2008. Remoción de nutrientes y demanda bioquímica de oxígeno por *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta) bajo ciclos de luz/obscuridad. *U.Tecnociencia* 2(2) 30 - 39.