










## Nitrogen and phosphorus removal coupled to CO<sub>2</sub> fixation by two green microalgae, *Chlorella* sp. and *Quadrigula* sp., native to the coast of Chiapas, Mexico

## Remoción de nitrógeno y fósforo acoplada a la fijación de CO<sub>2</sub> de dos microalgas verdes, *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp., nativas de la costa de Chiapas, México

Isui Guadalupe Velázquez-Sánchez<sup>1</sup>, Edgar Tovar-Juárez<sup>1</sup>, Yaneth Estrada-Santos<sup>1</sup>, Pedro Martín Negrete-Moreno<sup>1</sup>, Virginia Aurora Herrera-Valencia<sup>2</sup>, Santy Peraza-Echeverría<sup>2</sup>, Jalsen Iván Tecó-Bravo<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Coordinación Académica de la Licenciatura de Ingeniero en Sistemas Costeros, Universidad Autónoma de Chiapas, Calzada Escolleras, Sin Número, Frente al Faro, Colonia Emiliano Zapata, C. P. 30830, Puerto Madero, Tapachula, Chiapas, México.

<sup>2</sup>Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 × 32 y 34, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida 97205, Yucatán, México.

\*Corresponding author

E-mail address: [jalsen.teco@unach.mx](mailto:jalsen.teco@unach.mx) (J. I. Tecó-Bravo).

Article history:

Received: 27 June 2023 / Received in revised form: 4 September 2023 / Accepted: 4 September 2023 / Published online: 1 October 2023.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2023.8.4.68>

### ABSTRACT

Microalgae remove nitrogen and phosphorus from water for their growth and biomass production, which has several biotechnological applications. This study evaluated the growth, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, urea, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and total nitrogen removal capacity, as well as the biomass production and the CO<sub>2</sub> fixation of two new microalgae isolates, *Chlorella* sp. and *Quadrigula* sp., from the coast of Chiapas, México. *Chlorella* sp. had a higher specific growth rate (0.74/day) and a shorter doubling time (0.92 days) than *Quadrigula* sp. Removal per unit volume (mg/L) of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and total nitrogen by *Chlorella* sp. was higher (26.88%, 10.58% and 16.63%, respectively) than removal by *Quadrigula* sp. On the other hand, daily removal (mg/L/d) of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; urea and total nitrogen by *Chlorella* sp. was also higher (88%, 33%, 89%, 15% and 50%, respectively) than daily removal by *Quadrigula* sp. The biomass productivity (mg/L/d) and the CO<sub>2</sub> fixation rate

(mg/L/d) were similar among both microalgae. The results of this study suggest that *Chlorella* sp. and *Quadrigula* sp. have potential for nutrient removal, biomass production and CO<sub>2</sub> fixation.

**Keywords:** Biomass; CO<sub>2</sub> fixation, doubling time, growth rate, microalgae culture, nutrient removal

## RESUMEN

Las microalgas remueven el nitrógeno y el fósforo del agua para su crecimiento y producción de biomasa, la cual tiene diversas aplicaciones biotecnológicas. Este estudio evaluó el crecimiento, la capacidad de remoción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, urea, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y nitrógeno total, así como también la producción de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub> de dos nuevos aislados de microalgas, *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp., de la costa de Chiapas, México. *Chlorella* sp. tuvo mayor tasa de crecimiento específica (0.74/día) y menor tiempo de duplicación (0.92 días) que *Quadrigula* sp. La remoción por unidad de volumen (mg/L) de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y nitrógeno total por *Chlorella* sp. fue mayor (26.88%, 10.58% y 16.63%, respectivamente) que la remoción por *Quadrigula* sp. Por otra parte, la remoción diaria (mg/L/d) de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; urea y nitrógeno total por *Chlorella* sp. también fue mayor (88%, 33%, 89%, 15% y 50%, respectivamente) que la remoción diaria por *Quadrigula* sp. La productividad de biomasa (mg/L/d) y la tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (mg/L/d) fue similar entre ambas microalgas. Los resultados de este estudio sugieren que *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. tienen potencial para la remoción de nutrientes, la producción de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub>.

**Palabras clave:** Biomasa, cultivo de microalgas, fijación de CO<sub>2</sub>, remoción de nutrientes, tasa de crecimiento, tiempo de duplicación

## 1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de remoción de nutrientes de aguas residuales y la fijación de CO<sub>2</sub> atmosférico se han venido desarrollando desde hace más de medio siglo, métodos como el tratamiento aeróbico de lodos activados, la nitrificación–desnitrificación, la remoción química de fósforo, los lechos flotantes o la coagulación/floculación son difíciles de aplicar a gran escala ya que requieren procesos largos, altos costos de mantenimiento y operaciones complejas (Molazadeh *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020; Ni *et al.*, 2020; Ahmed *et al.*, 2022).

El uso de microalgas para remover nutrientes del agua ha mostrado tener ventajas respecto a otros métodos ya que estos microorganismos transforman las distintas formas de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y urea), el fósforo (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) y el CO<sub>2</sub> en macromoléculas como proteínas, péptidos, enzimas, ácidos grasos poliinsaturados como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el ácido docosahexaenoico (DHA) y el ácido araquidónico (ARA), pigmentos, carbohidratos, terpenos y fitoesteroles, que tienen aplicaciones en las industrias de alimentación humana, agropecuaria, farmacéutica y cosmética (Salama *et al.*, 2017; Nie *et al.*, 2020).

A pesar de los avances en el uso de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y la producción de biomasa, todavía se requiere de más investigación para lograr la optimización de estos sistemas y alcanzar una viabilidad económica (Mohsempour *et al.*, 2021). La búsqueda de nuevas especies con características deseables como son la alta tasa de crecimiento, alta tolerancia a la variación estacional, corto tiempo de duplicación y la capacidad de crecer a gran escala, entre otras, que no todas presentan, se considera como una de las estrategias que contribuye a alcanzar la viabilidad económica (Hernández-Pérez & Labbé, 2014; Salama *et al.*, 2017; Shanmugam *et al.*, 2020). El número de especies de microalgas que se sabe se emplean en la remoción de nutrientes es bajo (aproximadamente de 100) con respecto a la diversidad total que existe alrededor del mundo (aproximadamente 30,000 especies conocidas), entre las que destacan los géneros *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Chlamydomonas*. Lo que indica que existe un amplio espectro de oportunidades para explorar e identificar nuevas especies de microalgas que tengan eficiencia para la remoción de nutrientes superiores a las reportadas (Yu & Lee, 2019; Khanzada, 2020; Wirth, 2020).

La acuicultura es una de las actividades más importantes para el suministro de proteína animal a la población mundial. Sin embargo, debido a la baja digestibilidad del alimento para peces, esta actividad genera altos niveles de nitrógeno y de fósforo, proveniente del alimento no consumido y de las excretas, que son liberados al agua de los estanques acuícolas (Nie *et al.*, 2020), sugiriendo que las microalgas que crecen en esos estanques podrían remover el nitrógeno y el fósforo presente para su reproducción, sin embargo, esto ha sido poco estudiado. También, se conoce que los estuarios son ecosistemas en los que se descargan escorrentías continentales, generalmente con alto contenido de nutrientes y de materia orgánica, provenientes de ambientes naturales y antropizados, con variaciones ambientales importantes a lo largo del año en los que su alta productividad primaria es una de las características más distintivas en donde las microalgas son agentes biológicos fundamentales (Lemley *et al.*, 2016; Cañavate *et al.*, 2021). En la costa del Estado de Chiapas existe un extenso sistema de lagunas costeras y estuarios altamente productivos, donde la bioprospección de la diversidad de microalgas para usos biotecnológicos ha sido muy limitada. Derivado de ello, tanto los estanques acuícolas como las lagunas costeras podrían considerarse como reservorios de especies de microalgas con características deseables para la remoción de nutrientes del agua, la producción de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub> (Sandeep *et al.*, 2019). El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la remoción de nutrientes y la fijación de CO<sub>2</sub> de dos microalgas, *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp., aisladas de la costa de Chiapas, México.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Aislamiento e identificación de las microalgas

La microalga verde *Chlorella* sp. fue aislada de un estanque para el cultivo de *Oreochromis niloticus* en las instalaciones de la Unidad Académica de la Licenciatura de Ingeniero en Sistemas Costeros de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH). *Quadrigula* sp. fue aislada de la laguna costera Pampa-“El Cabildo”, ubicada en la localidad de Puerto Madero, Tapachula, Chiapas, México, tal como fue reportado

previamente por Teco–Bravo *et al.* (2021b). Ambas microalgas fueron colectadas al inicio de la columna de agua con una botella “Van Dorn” y las muestras se dejaron sedimentar durante 24 h a 12 °C. El aislamiento de las microalgas se realizó con la muestra sedimentada mediante diluciones seriadas con agua destilada en proporción 1:10 (v:v), haciendo seis diluciones sucesivas de la muestra ( $1/10^6$ ). Para incrementar el número de células aisladas, se inocularon alícuotas de la muestra en 1 mL de medio de cultivo Basal Bold Modificado (Sigma–Aldrich, B5282, UK) a pH 7 y fueron incubadas en un agitador rotatorio a 140 rpm,  $25 \pm 2$  °C, fotoperiodo de 16h/8h (luz/oscuridad) e iluminación de 20  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  (Herrera–Valencia *et al.*, 2011). El mantenimiento de ambos aislados se hizo bajo las mismas condiciones en medio de cultivo adicionado con agar (15 g/L), haciendo recambios de medio cada 15 días.

Para la identificación de ambas microalgas se utilizaron las descripciones de género de Beijerinck (1890), Printz (1916), Smith (1920), Shihira & Krauss (1965), Ortega (1984), Moreno *et al.* (1996), John & Tsarenko (2002) y Bock *et al.* (2011).

## **2.2. Bioensayos**

Para realizar los experimentos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de agua enriquecida los cuales fueron inoculados con 50,000 células/mL de microalgas en crecimiento exponencial. En todos los experimentos, las microalgas fueron cultivadas durante 10 días, sin suministro de CO<sub>2</sub> ni fuente de carbono en el medio, bajo las condiciones descritas en la Sección 2.1. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y las unidades experimentales fueron distribuidas completamente al azar.

### **2.2.1. Preparación del agua enriquecida**

El agua enriquecida fue preparada con agua destilada y 320 mg/L del fertilizante inorgánico sólido hidrosoluble Poly-Feed™ (Sacristán–de Alva *et al.*, 2014; Haifa México S. A. de C. V.), para alcanzar una concentración de 20 mg/L de nitrógeno total, simulando la concentración de este nutriente en las aguas residuales domésticas (Gao *et al.*, 2016; Binnal & Babu, 2017; Das *et al.*, 2019). La composición del fertilizante se puede observar en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición del fertilizante inorgánico sólido hidrosoluble Poly-Feed™. Fuente: ficha técnica del fabricante (<http://www.ferman.mx/producto/poly-feed-gg-20-30-10-1mgo-me-zn-saco-25-kg>).

**Table 1.** Poly-Feed™ solid water-soluble inorganic fertilizer composition. Source: manufacturer's datasheet. (<http://www.ferman.mx/producto/poly-feed-gg-20-30-10-1mgo-me-zn-saco-25-kg>).

| Nutriente                                | Concentración |
|--|---------------|
| Nitrógeno Total (N)                      | 20.0%         |
| Nitrógeno nítrico (N-NO <sub>3</sub> )   | 2.80%         |
| Nitrógeno Amoniacal (N-NH <sub>4</sub> ) | 5.9%          |
| Nitrógeno Ureico (N-NH <sub>2</sub> )    | 11.30%        |
| Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) | 30.0%         |
| Potasio soluble (K <sub>2</sub> O)       | 10.0%         |
| Magnesio (MgO)                           | 1.0%          |
| Hierro (Fe)                              | 1000 ppm      |
| Manganeso (Mn)                           | 500 ppm       |
| Zinc (Zn)                                | 1000 ppm      |
| Boro (B)                                 | 200 ppm       |
| Cobre (Cu)                               | 110 ppm       |
| Molibdeno (Mo)                           | 70 ppm        |

### 2.2.2. Caracterización del crecimiento de las microalgas

Se obtuvieron las curvas de crecimiento mediante el conteo de células cada 24 h con un hemocitómetro de Neubauer (Herrera–Valencia *et al.*, 2011). Se graficaron los valores del tiempo (días), como variable independiente, contra la concentración celular, como variable dependiente y se identificaron las fases de crecimiento (adaptación, exponencial y estacionaria). Se calculó la tasa de crecimiento específica  $\mu$  (1/d), la velocidad de crecimiento  $V$  (células/mL/d) y el tiempo de duplicación  $TD$  (d), utilizando las ecuaciones 1, 2 y 3, respectivamente (Kumar *et al.*, 2021; Dinpazhooh *et al.*, 2022).

$$\mu = \frac{(\ln X_2 - \ln X_1)}{(t_2 - t_1)} \quad (1)$$

$$V = \frac{X_2 - X_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

$$TD = \frac{\ln(2)}{\mu} \quad (3)$$

Donde  $X_1$  y  $X_2$  representan la concentración celular (células/mL) al inicio ( $t_1$ ) y al final ( $t_2$ ) de la fase exponencial (días), respectivamente.

### 2.2.3. Análisis de la remoción de nutrientes

Para medir la concentración de nutrientes en el medio, se tomaron 20 mL de muestra cada 24 h, fueron centrifugados a 3000 rpm, durante 5 minutos y el sobrenadante fue

filtrado con un filtro de membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Se midió la concentración de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y urea ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ ) mediante métodos espectrofotométricos. Para medir los primeros cuatro nutrientes se utilizaron reactivos Hach (números de catálogo: 21061–69, 21075–69, 21060–69, 26069–45 y 21065–69, respectivamente) (Qin *et al.*, 2016). La concentración de urea fue medida con el kit enzimático VALTEK® Urea Salicilato (Mexlab, México). En todos los casos, las absorbancias fueron medidas en un espectrofotómetro (Hach DR1900, USA). Se calculó el porcentaje y la eficiencia de remoción de nutrientes utilizando las ecuaciones 4 (Qin *et al.*, 2016) y 5, respectivamente. Adicionalmente, se tomaron muestras de 1 mL cada 24 h para el conteo de células.

$$\text{Porcentaje de remoción de nutrientes (\%)} = \frac{C_i - C_s}{C_i} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Eficiencia de la remoción de nutrientes } \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{C_i - C_s}{t_2 - t_1} \quad (5)$$

Donde  $C_i$  y  $C_s$  son la concentración inicial y final de los nutrientes (mg/L), respectivamente,  $t_1$  y  $t_2$  son el inicio y el final de la fase exponencial (días), respectivamente.

#### 2.2.4. Producción de biomasa y estimación de la fijación de $\text{CO}_2$

La biomasa de las microalgas fue cosechada mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se deshidrató en un horno a 80 °C hasta obtener un peso constante. Se calculó la concentración  $B$  (g/L) y la productividad  $P$  (g/L/d) de la biomasa con las ecuaciones 6 y 7, respectivamente (Qin *et al.*, 2016).

$$B \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{W}{V} \quad (6)$$

$$P \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right) = \frac{B_s - B_i}{T} \quad (7)$$

Donde  $W$ , es el peso seco de la biomasa (mg);  $V$ , es el volumen del cultivo (L);  $T$ , es el tiempo de cultivo;  $B_s$  y  $B_i$ , son la biomasa final e inicial, respectivamente.

Para evaluar la capacidad de ambas microalgas de fijar el  $\text{CO}_2$  que se encontraba en el aire, se estimó la fijación de  $\text{CO}_2$  utilizando la ecuación 8 (Dinpazhooh *et al.*, 2022).

$$\text{CO}_2 = (B \times 0.5)3.67 \quad (8)$$

Donde  $B$  es la biomasa en peso seco; 3.67 es la constante entre el peso molecular del  $\text{CO}_2$  y el del carbono; 0.5 es el factor de carbono que indica que la biomasa seca de las microalgas contiene aproximadamente 50% de carbono (Sánchez–Mirón *et al.*, 2003). Para estimar la fijación de  $\text{CO}_2$  durante todo el periodo de cultivo se usaron los valores de la producción de biomasa como  $B$  en la Ecuación 8 y para estimar la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$  (fijación diaria) se utilizó, en su lugar, los valores de la productividad de biomasa.

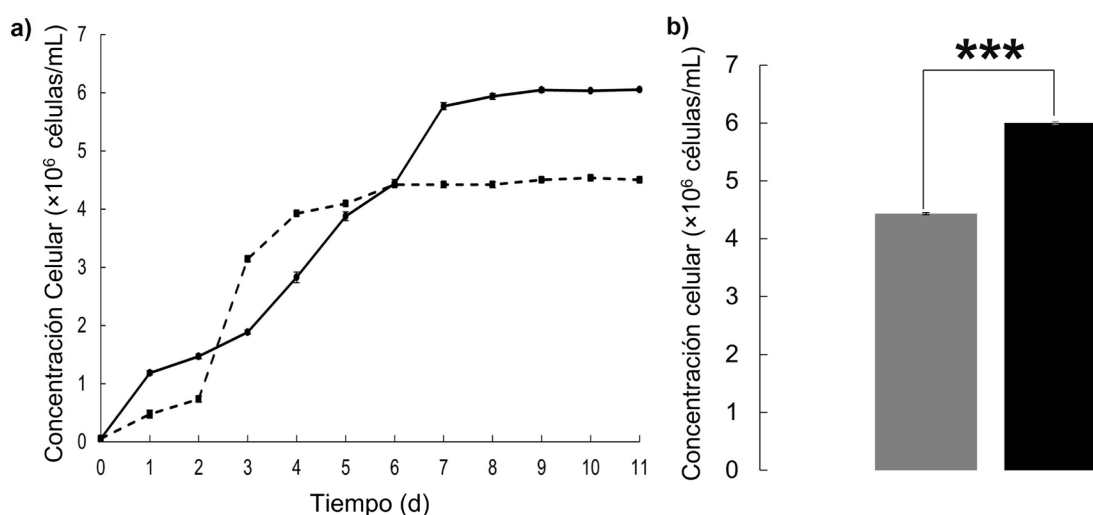
### 2.3. Análisis estadísticos

Para estimar diferencias de las variables evaluadas entre ambas microalgas, se aplicó la prueba *t* de Student para muestras independientes ( $p = 0.05$ ) utilizando el software InfoStat, versión 2020 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Caracterización del crecimiento de las microalgas

Las microalgas aisladas del estanque acuícola y de la laguna costera “Pampa el Cabildo” fueron identificados a nivel de género como *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp., respectivamente. *Chlorella* sp. fue obtenida en la dilución  $1/10^3$  y *Quadrigula* sp. en la dilución  $1/10$ . El método utilizado permitió aislar la microalga más abundante de cada muestra. Las curvas de crecimiento de ambas microalgas mostraron un incremento en la concentración celular respecto al tiempo de cultivo (Fig. 1a). *Chlorella* sp. tuvo una mayor fase de adaptación (2 d), una fase exponencial más corta (4 d) y alcanzó la fase estacionaria un día antes (día 6) que *Quadrigula* sp. (Fig. 1a). La concentración celular máxima alcanzada en la fase estacionaria fue significativamente mayor ( $p < 0.001$ ) para *Quadrigula* sp. ( $6.05 \pm 0.02 \times 10^6$  células/mL) que para *Chlorella* sp. ( $4.5 \pm 0.04 \times 10^6$  células/mL) (Fig. 1b).



**Fig. 1.** Curvas de crecimiento (a) y concentración celular (b) de las microalgas *Chlorella* sp. (---■---, ■) y *Quadrigula* sp. (—■—, ■) durante 10 días. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ).

**Fig. 1.** Growth curve (a) and cell concentration (b) of the microalgae *Chlorella* sp. (---■---, ■) and *Quadrigula* sp. (—■—, ■) for 10 days. Values are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ).

Los parámetros de crecimiento fueron significativamente diferentes ( $p < 0.001$ ) entre ambas microalgas (Tabla 2). *Quadrigula* sp. tuvo mayor velocidad de crecimiento (*V*) y

mayor tiempo de duplicación (TD) que *Chlorella* sp., mientras que la tasa de crecimiento específica ( $\mu$ ) de *Chlorella* sp. fue mayor que la de *Quadrigula* sp. (Tabla 2).

**Tabla 2.** Parámetros de crecimiento de las microalgas *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3). (\*\*\*) = p < 0.001).

**Table 2.** Growth parameters of the microalgae *Chlorella* sp. and *Quadrigula* sp. Values are the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). (\*\*\*) = p < 0.001).

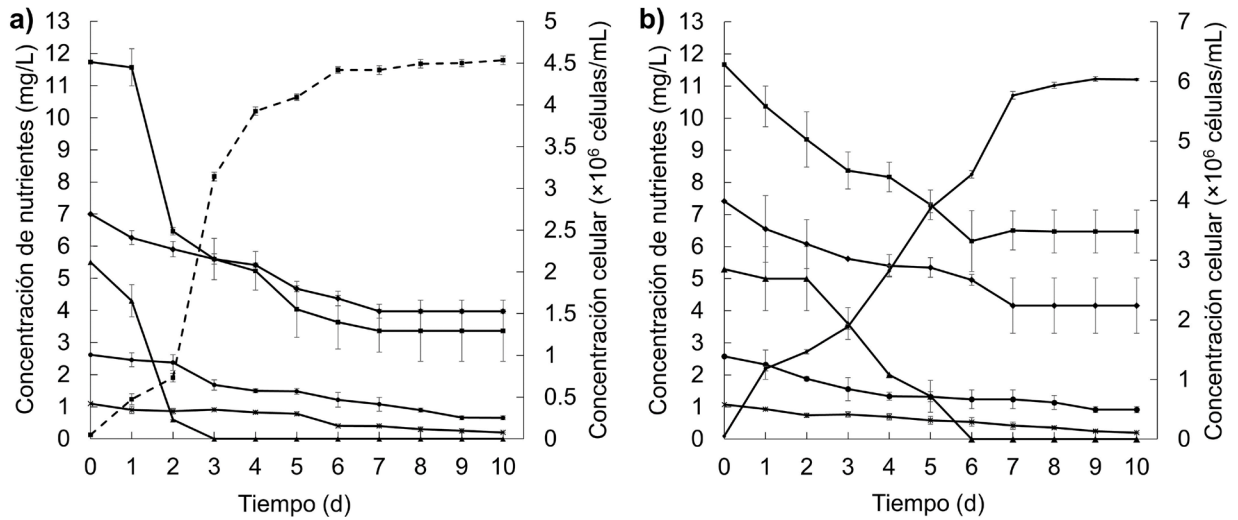
| Microalga             | Tasa de crecimiento específica (1/d)*** | Velocidad de crecimiento (células/mL/d) *** | Tiempo de duplicación (d) *** |
|-----------------------|---|---|-------------------------------|
| <i>Chlorella</i> sp.  | 0.74 $\pm$ 0.00                         | 7.28 $\pm$ 0.06 $\times$ 10 <sup>5</sup>    | 0.92 $\pm$ 0.00               |
| <i>Quadrigula</i> sp. | 0.67 $\pm$ 0.00                         | 8.17 $\pm$ 0.09 $\times$ 10 <sup>5</sup>    | 1.02 $\pm$ 0.00               |

### 3.2 Remoción de nutrientes

En la Figura 2, se puede observar que la concentración de todos los nutrientes (mg/L) disminuyó desde el inicio de la incubación y la concentración celular de ambas microalgas empezó a incrementar. En ambos cultivos, la concentración de nitrito se redujo a cero, a los tres días con *Chlorella* sp., y a los seis con *Quadrigula* sp. (Fig. 2a y 2b). La concentración de los nutrientes restantes siguió disminuyendo, sin llegar a cero, hasta los siete días de cultivo de ambas microalgas, cuando el crecimiento de éstas se detuvo (Fig. 2a y 2b). La concentración de todos los nutrientes disminuyó conforme la concentración celular incrementó y se mantuvo constante cuando ambas microalgas alcanzaron la fase estacionaria (Fig. 2a y 2b).

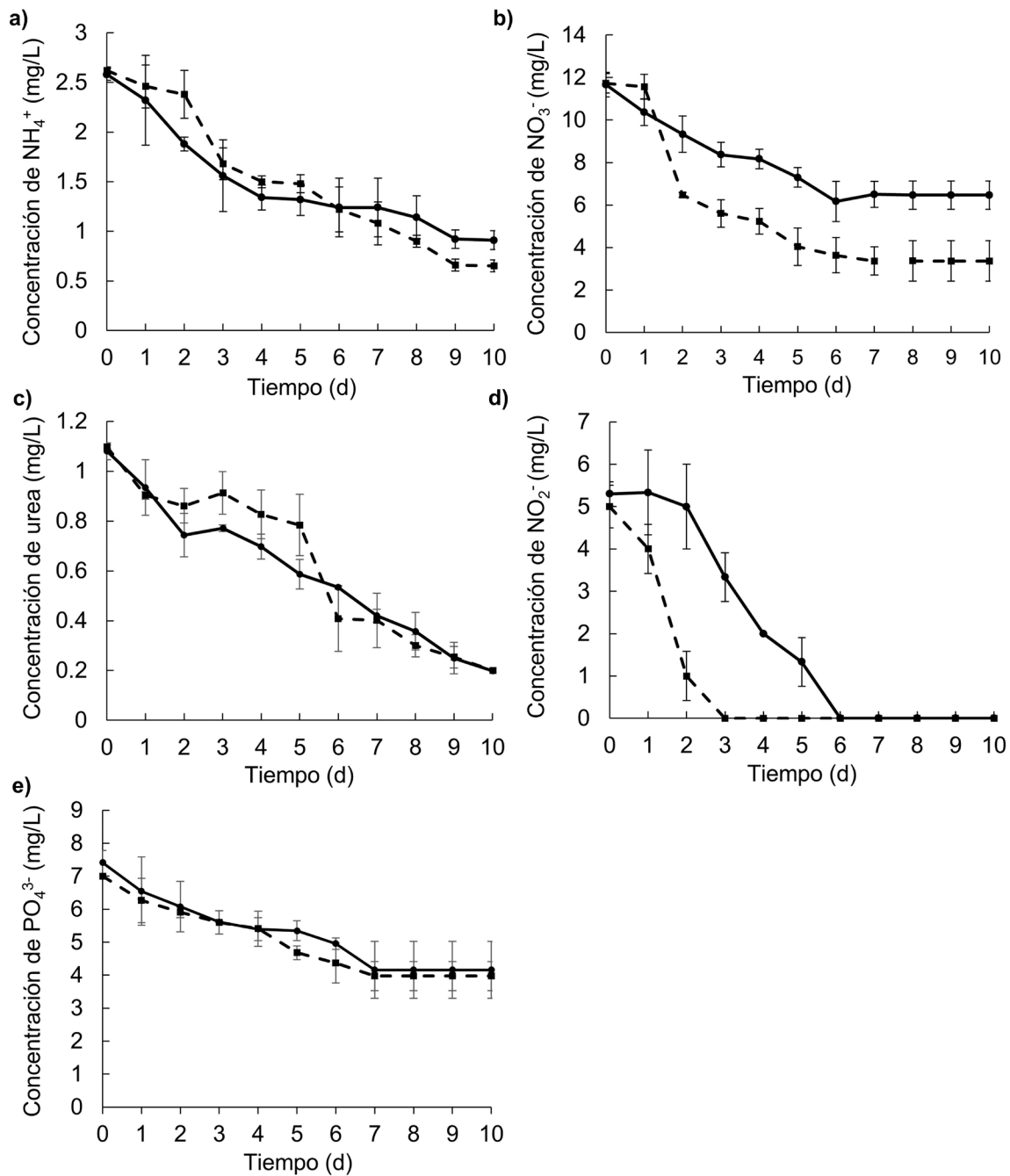
La dinámica de remoción de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y urea fue similar entre ambas microalgas, tanto en concentración como en temporalidad (Fig. 3a y 3e). En el caso de la urea, la remoción fue similar en temporalidad y concentración, sin embargo, a diferencia de los demás nutrientes, ésta continuó durante la fase exponencial (Fig. 3c). La remoción de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> fue similar en tiempo, pero no en concentración (Fig. 3b) mientras que la remoción de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> fue total en ambas microalgas, sin embargo, *Chlorella* sp. lo hizo en tres días y *Quadrigula* sp. en seis (Fig. 3d).





**Fig. 2.** Concentración de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■); NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (●); PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (◆); NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (▲) y urea (\*), así como crecimiento (---■---, —■—) de las microalgas *Chlorella* sp. (a) y *Quadrigula* sp. (b) durante 10 días. Valores promedio ± desviación estándar (n = 3).

**Fig. 2.** Concentration of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (■); NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (●); PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (◆); NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (▲) and urea (\*), as well as cell growth (---■---, —■—) of the microalgae *Chlorella* sp. (a) and *Quadrigula* sp. (b) for 10 days. Values are the mean ± standard deviation (n = 3).

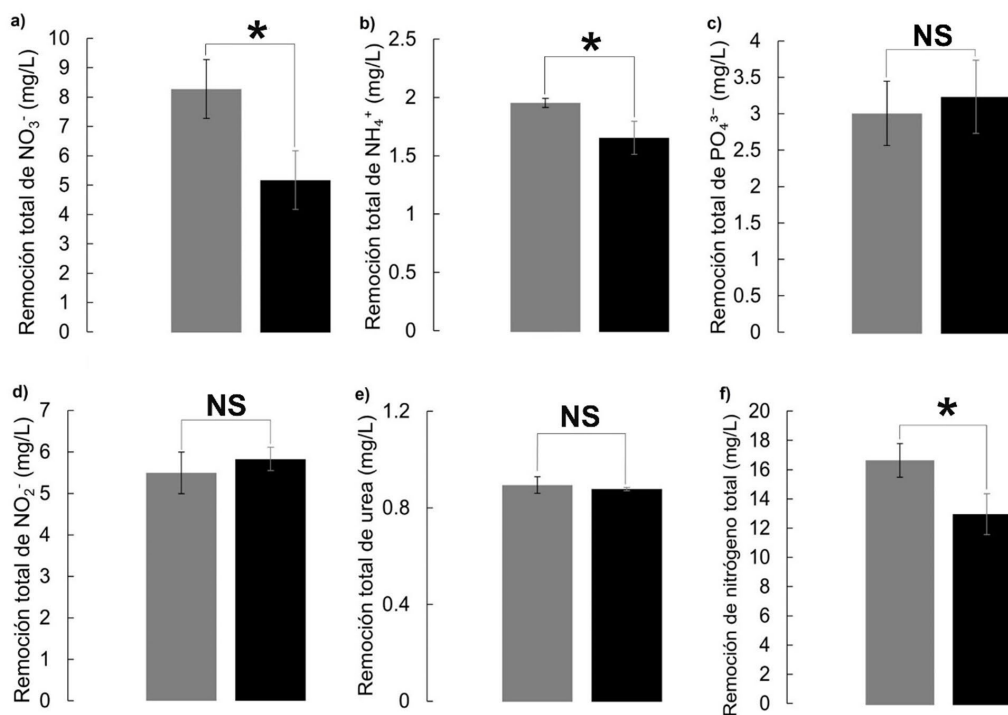


**Fig. 3.** Concentración de  $\text{NH}_4^+$  (a);  $\text{NO}_3^-$  (b); urea (c);  $\text{NO}_2^-$  (d) y  $\text{PO}_4^{3-}$  (e) durante 10 días de cultivo de las microalgas *Chlorella* sp. (---■---) y *Quadrigula* sp. (—■—). Valores promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3).

**Fig. 3.** Concentration of  $\text{NH}_4^+$  (a);  $\text{NO}_3^-$  (b); urea (c);  $\text{NO}_2^-$  (d) and  $\text{PO}_4^{3-}$  (e) for 10 days of culture of the microalgae *Chlorella* sp. (---■---) and *Quadrigula* sp. (—■—). Values are the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3).

La remoción total (durante los 10 días de cultivo) de nitrato, amonio y nitrógeno total ( $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ + \text{urea}$ ) fue significativamente mayor para *Chlorella* sp. que para *Quadrigula* sp. ( $p < 0.05$ ). *Chlorella* sp. removió 71.27% de  $\text{NO}_3^-$  ( $8.36 \pm 1.07$  mg/L), 74.95% de  $\text{NH}_4^+$  ( $1.96 \pm 0.03$  mg/L) y 79.81% de nitrógeno total ( $16.73 \pm 1.14$  mg/L) mientras que *Quadrigula* sp. removió 44.39% ( $5.19 \pm 1.05$  mg/L), 64.37% ( $1.65 \pm 0.14$  mg/L) y 63.18% ( $13.03 \pm 1.39$  mg/L), respectivamente (Fig. 4a, b y f; Tabla 3). No hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en la remoción de  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_2^-$  y urea (Fig. 4c–e; Tabla 3).

La eficiencia en la remoción de nutrientes, es decir, la remoción diaria (mg/L/d) fue significativamente mayor para *Chlorella* sp. que para *Quadrigula* sp. ( $p < 0.01$ ). La remoción diaria de  $\text{NO}_3^-$  ( $1.39 \pm 0.18$  mg/L/d),  $\text{NH}_4^+$  ( $0.32 \pm 0.01$  mg/L/d),  $\text{NO}_2^-$  ( $1.83 \pm 0.17$  mg/L/d), urea ( $0.15 \pm 0.01$  mg/L/d) y nitrógeno total ( $2.79 \pm 0.19$  mg/L/d) por *Chlorella* sp. fue mayor (88%, 33%, 89%, 15% y 50%, respectivamente) que la remoción diaria por *Quadrigula* sp. ( $0.74 \pm 0.15$  mg/L/d;  $0.24 \pm 0.02$  mg/L/d;  $0.97 \pm 0.05$  mg/L/d;  $0.13 \pm 0.00$  mg/L/d y  $1.86 \pm 0.16$  mg/L/d, respectivamente) (Fig. 5a, b, d–f). No hubo diferencia significativa en la eficiencia de la remoción de fosfato entre ambas microalgas ( $p > 0.05$ ).



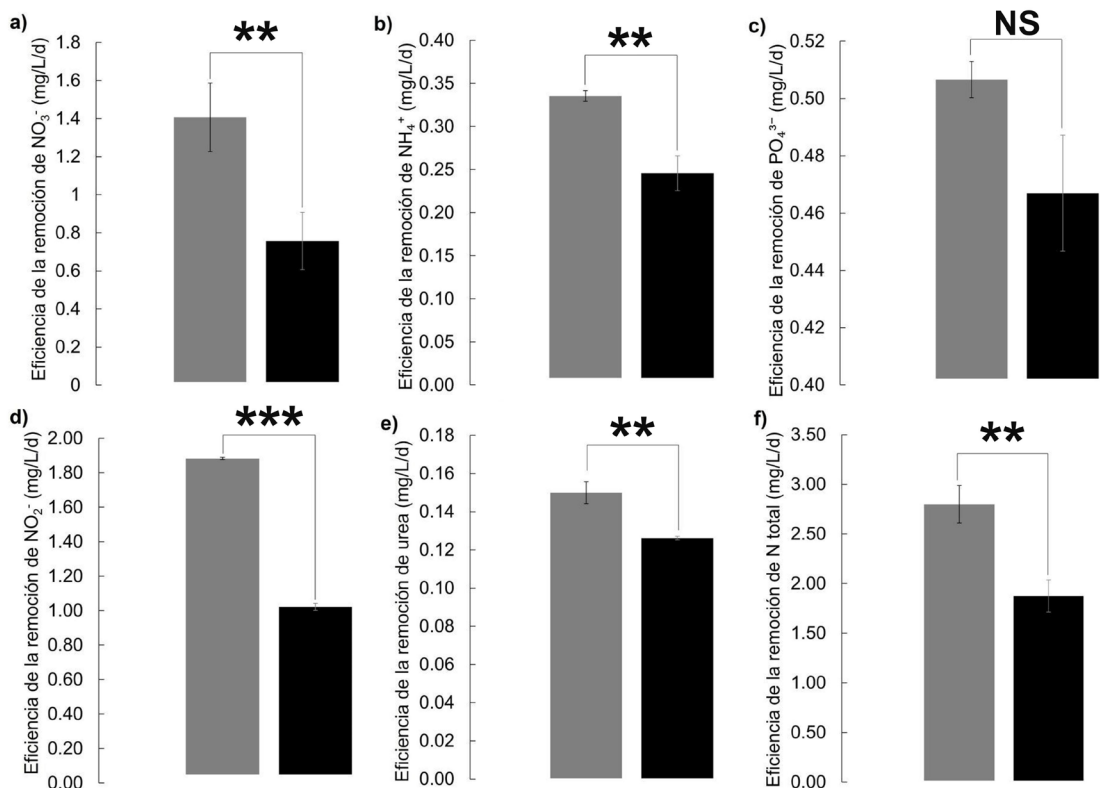
**Fig. 4.** Remoción total de  $\text{NO}_3^-$  (a);  $\text{NH}_4^+$  (b);  $\text{PO}_4^{3-}$  (c);  $\text{NO}_2^-$  (d); urea (e) y nitrógeno total (f) de las microalgas *Chlorella* sp. (■) y *Quadrigula* sp. (■). Valores promedio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ). (\* =  $p < 0.05$ ; NS = no significativo).

**Fig. 4.** Total removal of  $\text{NO}_3^-$  (a);  $\text{NH}_4^+$  (b);  $\text{PO}_4^{3-}$  (c);  $\text{NO}_2^-$  (d); urea (e) and total nitrogen (f) of the microalgae *Chlorella* sp. (■) and *Quadrigula* sp. (■). Values are the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 3$ ). (\* =  $p < 0.05$ ; NS = not significant).

**Tabla 3.** Concentración inicial y final, así como porcentaje de remoción de  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , urea, nitrógeno total y  $\text{PO}_4^{3-}$  de las microalgas *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. Valores promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3). (\* = p < 0.05; NS = no significativo).

**Table 3.** Initial and final concentration, as well as removal percentage of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , urea, total nitrogen and  $\text{PO}_4^{3-}$  of the microalgae *Chlorella* sp. and *Quadrigula* sp. Values are the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). (\* = p < 0.05; NS = not significant).

| Nutriente             | Concentración inicial (mg/L) | Concentración final (mg/L) | Remoción (%)           |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------|
| <i>Chlorella</i> sp.  |                              |                            |                        |
| $\text{NO}_3^-$       | 11.73 $\pm$ 0.50             | 3.37 $\pm$ 0.95            | 71.27 $\pm$ 8.04 (*)   |
| $\text{NO}_2^-$       | 5.50 $\pm$ 0.20              | 0.00 $\pm$ 0.00            | 100.00 $\pm$ 0.00 (NS) |
| $\text{NH}_4^+$       | 2.62 $\pm$ 0.03              | 0.66 $\pm$ 0.06            | 74.95 $\pm$ 2.04 (*)   |
| Urea                  | 1.10 $\pm$ 0.03              | 0.20 $\pm$ 0.00            | 81.77 $\pm$ 0.56 (NS)  |
| N total               | 20.95 $\pm$ 0.26             | 4.22 $\pm$ 0.89            | 79.81 $\pm$ 4.49 (*)   |
| $\text{PO}_4^{3-}$    | 7.00 $\pm$ 0.00              | 3.97 $\pm$ 0.44            | 43.24 $\pm$ 6.24 (NS)  |
| <i>Quadrigula</i> sp. |                              |                            |                        |
| $\text{NO}_3^-$       | 11.66 $\pm$ 0.60             | 6.47 $\pm$ 0.67            | 44.39 $\pm$ 7.34 (*)   |
| $\text{NO}_2^-$       | 5.30 $\pm$ 0.20              | 0.00 $\pm$ 0.00            | 100.00 $\pm$ 0.00 (NS) |
| $\text{NH}_4^+$       | 2.57 $\pm$ 0.06              | 0.92 $\pm$ 0.10            | 64.37 $\pm$ 3.80 (*)   |
| Urea                  | 1.08 $\pm$ 0.01              | 0.20 $\pm$ 0.00            | 81.57 $\pm$ 0.23 (NS)  |
| N total               | 20.61 $\pm$ 0.38             | 7.58 $\pm$ 0.75            | 63.18 $\pm$ 4.26 (*)   |
| $\text{PO}_4^{3-}$    | 7.55 $\pm$ 0.37              | 4.16 $\pm$ 0.86            | 44.17 $\pm$ 8.95 (NS)  |



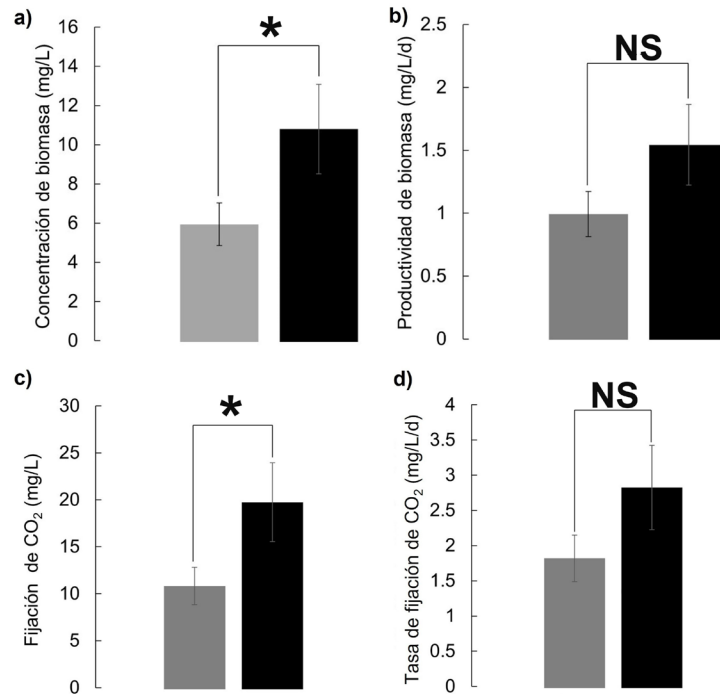
**Fig. 5.** Eficiencia de la remoción de  $\text{NO}_3^-$  (a);  $\text{NH}_4^+$  (b);  $\text{PO}_4^{3-}$  (c);  $\text{NO}_2^-$  (d); urea (e) y nitrógeno total (f) de las microalgas *Chlorella* sp. (■) y *Quadrigula* sp. (■). Valores promedio  $\pm$  desviación estándar (n = 3). (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; NS = no significativo).

**Fig. 5.** Removal efficiency of  $\text{NO}_3^-$  (a);  $\text{NH}_4^+$  (b);  $\text{PO}_4^{3-}$  (c);  $\text{NO}_2^-$  (d); urea (e) and total nitrogen (f) of the microalgae *Chlorella* sp. (■) and *Quadrigula* sp. (■). Values are the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). (\*\*\*) =  $p < 0.001$ ; \*\* =  $p < 0.01$ ; NS = not significant).

### 3.5. Producción de biomasa y fijación de $\text{CO}_2$

La concentración de biomasa, después de 10 días de cultivo, fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para *Quadrigula* sp. con  $10.86 \pm 2.28$  mg/L que para *Chlorella* sp. con  $6.19 \pm 1.08$  mg/L (Fig. 6a). Sin embargo, la productividad de biomasa fue similar ( $p > 0.05$ ) entre ambas microalgas (Fig. 6b).

La fijación de  $\text{CO}_2$ , durante toda la fase exponencial, fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) para *Quadrigula* sp. con  $19.92 \pm 4.19$  mg  $\text{CO}_2$ /L que para *Chlorella* sp. con  $11.01 \pm 1.98$  mg  $\text{CO}_2$ /L (Fig. 6c). Sin embargo, la tasa de fijación de  $\text{CO}_2$ , es decir, la fijación diaria, fue similar entre ambas microalgas ( $p > 0.05$ ) ya que *Quadrigula* sp. fijó  $2.84 \pm 0.59$  mg  $\text{CO}_2$ /L/d mientras que *Chlorella* sp. fijó  $1.89 \pm 0.33$  mg  $\text{CO}_2$ /L/d (Fig. 6d).



**Fig. 6.** Concentración de biomasa (a); productividad de biomasa (b); fijación de CO<sub>2</sub> (c) y tasa de fijación de CO<sub>2</sub> (d) de las microalgas *Chlorella* sp. (■) y *Quadrigula* sp. (■). Valores promedio ± desviación estándar (n = 3). (\*= p < 0.05; NS = no significativo).

**Fig. 6.** Biomass concentration (a); biomass productivity (b); CO<sub>2</sub> fixation (c) and CO<sub>2</sub> fixation rate (d) of the microalgae *Chlorella* sp. (■) and *Quadrigula* sp. (■). Values are the mean ± standard deviation (n = 3). (\*= p < 0.05; NS = not significant).

#### 4. DISCUSIÓN

Las microalgas candidatas para la remoción de nutrientes, la producción de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub> deben tener altas tasas de crecimiento y cortos tiempo de duplicación que les permita alcanzar la fase estacionaria en poco tiempo y así llevar a cabo estos procesos de manera eficiente (Aslan & Kapdan, 2006; Salama *et al.*, 2017). Las microalgas bajo estudio alcanzaron la fase estacionaria en menor tiempo comparado con otras microalgas verdes cultivadas en agua residual sintética tales como *Tetraselmis* sp., *Dunaliella* sp. y *Nannochloropsis* sp. con 9, 13 y 13 días, respectivamente (Sacristán–de Alva *et al.*, 2018). Así también, *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. tuvieron mayor tasa de crecimiento específica y menor tiempo de duplicación que otras microalgas verdes cultivadas ya sea en aguas residuales naturales como *Chlorella vulgaris* con una  $\mu$  de 0.18/d (Khanzada, 2020); en aguas residuales sintéticas como *Dunaliella* sp. ( $\mu$  = 0.19/d y TD = 3.21 d), *Nannochloropsis* sp. ( $\mu$  = 0.15/d y TD = 4.13 d) y *Tetraselmis* sp. ( $\mu$  = 0.29/d y TD = 5.83 d) (Sacristán–de Alva *et al.*, 2018) o en medios de cultivo estándar (BG11, Basal Bold y Tris-Acetato-Fosfato) como *Chlorella zofingiensis* con una  $\mu$  de 0.49/d y un TD de 1.41 d (Zhu *et al.*, 2013); *Scenedesmus obliquus* con una  $\mu$  = 0.21/d (Qi *et al.*, 2018); *Scenedesmus* sp. con  $\mu$  = 0.22/d (Kumar *et al.*, 2021); *Chlorella*

*sorokiniana* y *Parachlorella kessleri* (GEEL-02 y GEEL-03) con 0.149/d, 0.156/d y 0.133/d, respectivamente (Arif *et al.*, 2020) así como *Scenedesmus obliquus* con  $\mu = 0.59/d$  (Fan *et al.*, 2020).

La remoción de los nutrientes de las microalgas bajo estudio fue directamente proporcional al crecimiento celular ya que la concentración de todos ellos en el medio disminuyó en mayor proporción durante la fase exponencial y se mantuvo prácticamente constante durante la fase estacionaria (Fig. 1). Lo anterior se debe a que durante el crecimiento exponencial las células se duplican de manera constante respecto al tiempo y se encuentran en un estado fisiológico activo donde sintetizan los metabolitos estructurales y las enzimas necesarias para su reproducción (Salama *et al.*, 2017). En esta fase, las microalgas pueden asimilar el nitrógeno ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y urea) y el fósforo de las aguas residuales para sintetizar proteínas, péptidos, enzimas, clorofilas, DNA, RNA, ADP, ATP, lípidos y membranas celulares (Salama *et al.*, 2017; Zhu *et al.*, 2019; Salbitani & Carfagna, 2021). En el citosol, las microalgas reducen el  $\text{NO}_3^-$  en  $\text{NO}_2^-$  con la enzima nitrato reductasa que trasfiere dos electrones donados por el NADH, posteriormente, dentro del cloroplasto, el  $\text{NO}_2^-$  es reducido en  $\text{NH}_4^+$  por la enzima nitrito reductasa mediante la transferencia de seis electrones donados por la ferredoxina y, finalmente, el  $\text{NH}_4^+$  es integrado en aminoácidos vía glutamato sintasa (GOGAT)–glutamina sintetasa (GS) (Salama *et al.*, 2017; Kumar & Bera, 2020; Salbitani & Carfagna, 2021). La urea es asimilada por las microalgas mediante un mecanismo de cotransporte con iones sodio, una vez dentro de la célula es desaminada en dos etapas por la enzima ureasa o la urea amidoliasa para generar  $\text{NH}_4^+$  que entra posteriormente en la vía GOGAT-GS (Kumar & Bera, 2020) mientras que el  $\text{PO}_4^{-3}$  es integrado en compuestos orgánicos durante el proceso de fosforilación que involucra la producción de ATP a partir de ADP (Salama *et al.*, 2017; Liu & Hong, 2021). Por otra parte, en la fase estacionaria el crecimiento de las microalgas se detiene al igual que la remoción de nutrientes, principalmente por el agotamiento de un nutriente esencial y/o por la acumulación de metabolitos inhibitorios, sin embargo, en esta fase incrementa la biosíntesis de las moléculas de reserva de energía y de metabolitos de interés comercial tales como lípidos, carbohidratos, pigmentos y compuestos bioactivos (Sacristán–de Alva *et al.*, 2018).

Se ha reportado ampliamente que, entre las fuentes inorgánicas de nitrógeno, la mayoría de las microalgas prefiere el amonio y no usan otra disponible hasta que éste se haya agotado o esté a punto de agotarse debido que su asimilación no requiere de energía ni de enzimas para ser reducido, como en el caso del nitrato, el nitrito y la urea (Salbitani & Carfagna, 2021). Sin embargo, la asimilación de nitrógeno en las microalgas es un proceso complejo que no permite declarar la preferencia universal por el amonio ya que algunas como *Botryococcus braunii* y *Dunaliella tertiolecta* prefieren el nitrato sobre otras fuentes de nitrógeno y muestran poco crecimiento en presencia de amonio (Kumar & Bera, 2020; Salbitani & Carfagna, 2020). Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que ninguna de las microalgas de estudio tuvo preferencia por el amonio, sino que utilizaron todas las fuentes de nitrógeno simultáneamente, aunque sí mostraron preferencia por el nitrito, el cual consumieron en su totalidad incluso antes de alcanzar la fase estacionaria (Figura 1). La remoción simultánea de diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico y la no preferencia por el amonio ha sido reportado en otras

microalgas. Por ejemplo, la remoción de amonio y nitrato en lixiviados de vertederos de desechos municipales por *Chlorella vulgaris* y *Chlamydomonas reinhardtii* (Khazada, 2020). El consumo simultáneo de nitrato, nitrito y amonio ha sido adjudicado a la baja concentración de amonio respecto a los otros nutrientes, así como a la provisión, mediante la iluminación, de la energía suficiente para reducir el nitrato en amonio (González–Camejo *et al.*, 2018).

*Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. removieron nitrógeno y fósforo con mayor eficiencia, es decir, en menor tiempo que otras microalgas verdes. Por ejemplo, *Chlorella sorokiniana* y *Parachlorella kessleri* (GEEL-02 y GEEL-03) removieron 43 mg N/L y 51.2 mgP/L del medio Basal Bold, en un periodo de 28 días con una eficiencia de 1.5 mg/L/d (Arif *et al.*, 2020); *Scenedesmus obliquus* removió 1.72 mg N/L/d y 0.20 mg P/L/d del medio BG11 en un periodo de 10 d (Fan *et al.*, 2020); *Dunaliella* sp., *Nannochloropsis* sp. y *Tetraselmis* sp. removieron 3.51, 4.02 y 7.34 mg N/L/d así como 0.89, 0.83 y 1.48 mg P/L/d de agua residual sintética, en un periodo de 14 días (Sacristán–de Alva *et al.*, 2018) mientras que *Chlorella vulgaris* removió 690 mg amonio/L, 50 mg nitrato/L y 100 mg PO<sub>4</sub>/L de lixiviados de vertederos de desechos municipales en un periodo de 30 días (Khazada, 2020). La eficiencia de la remoción de nutrientes de las microalgas en estudio está estrechamente relacionada con sus altas tasas de crecimiento y sus cortos tiempos de duplicación. Además, es posible que el cultivo de estas microalgas en condiciones heterotróficas pueda incrementar la eficiencia de la remoción de nutrientes ya que la disponibilidad de compuestos orgánicos en el medio evita el gasto de energía para biosintetizarlos, como ocurre en condiciones fotoautotróficas. El efecto positivo de la materia orgánica en el medio de cultivo sobre la remoción de N y P ha sido reportado en las microalgas *Chlorella vulgaris* y *Chlorella prototecoides* (Yu *et al.*, 2019; Mitra *et al.*, 2020).

*Chlorella* sp. removió más nitrógeno y fue más eficiente para la remoción que *Quadrigula* sp. Considerando que ambas microalgas fueron cultivadas bajo las mismas condiciones, la misma concentración celular y de nutrientes, esta diferencia puede ser adjudicada a su genotipo ya que la tasa de remoción de nutrientes varía según la especie de microalga, las concentraciones iniciales de nutrientes y la proporción de N:P en el medio (Patil & Kaliwal, 2017; Sacristán–de Alva *et al.*, 2018; Arif *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2020; Dinpazhooh *et al.*, 2022). Otra posible razón de esta diferencia podría estar relacionada con que *Chlorella* sp. fue aislada de un estanque acuícola donde las concentraciones de nitrógeno y de fósforo, provenientes de las excretas y del alimento no consumido por los peces, son elevadas (Nie *et al.*, 2020), por lo cual estaba adaptada a las condiciones de enriquecimiento de nutrientes y a la remoción de éstos, a diferencia de *Quadrigula* sp. El uso de microalgas para la remoción de nitrógeno y fósforo de aguas residuales acuícolas ha sido reportado en *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella sorokiniana*, *Ankistrodesmus falcatus*, *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus* sp. (Ansari *et al.*, 2017; Jung *et al.* 2017). Finalmente, se ha observado que las microalgas que asimilan más nitrógeno tienen biomasa rica en proteínas y las que asimilan más fósforo tienen biomasa rica en lípidos, como ha sido reportado en *Scenedesmus* sp. (Panha *et al.*, 2014) y *Scenedesmus obliquus* (Fan *et al.*, 2020), sin embargo, es necesario analizar la composición de la biomasa de ambas microalgas bajo estudio para probar si este supuesto aplica para ambas.



Por otra parte, la productividad de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub> de *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. fue menor a lo reportado para otras microalgas verdes cultivadas sin suministro de CO<sub>2</sub> tales como *Scenedesmus* sp., *Tetradasmus* sp., y *Desmodesmus* sp., cuyo rendimiento de biomasa, productividad de biomasa y fijación de CO<sub>2</sub> estuvo en los rangos de 0.58–0.97 g/L, 0.032–0.054 g/L/d y 0.042–0.101 g/L/d (Dinpazhooh *et al.*, 2022). Sin embargo, dicha productividad requirió mayor tiempo (18 d) comparado con esta investigación (6 y 7 d, respectivamente). Existen escasos reportes sobre la fijación de CO<sub>2</sub> por medio de microalgas en medios sin suministro de este gas para evaluar su capacidad de fijar el que se encuentra en el aire, en la mayoría de los estudios suministran el CO<sub>2</sub> al medio de cultivo (Vidyashankar *et al.*, 2013; Patil & Kaliwal, 2017).

Las microalgas *Chlorella* sp. y *Quadrigula* sp. tienen potencial para la remoción de nutrientes en aguas residuales, la producción de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub> debido a su eficiencia de remoción, sus altas tasas de crecimiento específicas y sus cortos tiempos de duplicación, comparado con otras microalgas verdes. Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la bioprospección de microalgas tanto de estanques acuícolas como de lagunas costeras es una estrategia útil para el descubrimiento de nuevas microalgas con mayor eficiencia para la remoción de nutrientes, la producción de biomasa y la fijación de CO<sub>2</sub>.

## AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas (ICTIECH), por el financiamiento otorgado para el desarrollo de proyectos de investigación, convocatoria de apoyos únicos 2021.

## CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

## REFERENCIAS

Ahmed S. F., Mofijur M., Parisa T. A., Islam N., Kusumo F., Inayat A., Le V. G., Badruddin I. A., Khan T. M. & Ong H. C. 2022. Progress and challenges of contaminate removal from wastewater using microalgae biomass. *Chemosphere*. 286:131656. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131656>.

Ansari F. A., Singh P., Guldhe A. & Bux F. 2017. Microalgal cultivation using aquaculture wastewater: integrated biomass generation and nutrient remediation. *Algal research*. 21: 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.015>.

Aketo T., Hoshikawa Y., Nojima D., Yabu Y., Maeda Y., Yoshino T., Takano H. & Tanaka T. 2020. Selection and characterization of microalgae with potential for nutrient removal from municipal wastewater and simultaneous lipid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 129(5): 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2019.12.004>.

Arif M., Wang L., Salama E. S., Hussain M. S., Li X., Jalalah M., Al-Assiri M. S., Harraz F. Ji M. K. & Liu P. 2020. Microalgae isolation for nutrient removal assessment and biodiesel production. *BioEnergy Research*. 13: 1247-1259. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10136-5>.

Beijerinck MW. 1890. Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung*. 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.

Benítez M. B., Champagne P., Ramos A., Torres A. F. & Ochoa-Herrera V. 2019. Wastewater treatment for nutrient removal with Ecuadorian native microalgae. *Environmental Technology*. 40(22): 2977-2985. <https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1459874>.

Binnal P. & Babu P. N. 2017. Optimization of environmental factors affecting tertiary treatment of municipal wastewater by *Chlorella protothecoides* in a lab scale photobioreactor. *Journal of water process engineering*. 17: 290-298. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2017.05.003>.

Bock C., Krienitz L. & Pröschold T. 2011. Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signature (barcodes), including description of several new species. *Fottea*. 11(2): 293-312.

Cañavate J. P., van Bergeijk S., González-Ortegón E. & VÍlas C. 2021. Contrasting fatty acids with other indicators to assess nutritional status of suspended particulate organic matter in a turbid estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 254: 107329. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107329>.

Cervantes-Zepeda A. I., Cruz-Colín M. R., Aguilar-Corona R., Castilla-Hernández P. & Meraz-Rodríguez M. 2011. Caracterización fisicoquímica y microbiológica del agua tratada en un reactor UASB escala piloto. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 10(1): 67-77. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n1/v10n1a8.pdf>.

Das P., Quadir M. A., Thaher M. I., Alghasal G. S. H. S. & Aljabri H. M. S. J. 2019. Microalgal nutrients recycling from the primary effluent of municipal wastewater and use of the produced biomass as bio-fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 16: 3355-3364. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1867-8>.

Dinpazhooh Z., Niknezhad S. V., Fadaei F., Shaker S., Najafpour G., Ghasemi Y., Mousavi P. & Morowvat M. H. 2022. North by Southwest: Screening the Naturally Isolated Microalgal Strains from Different Habitats of Iran for Various Pharmaceutical and Biotechnology Applications. *International Journal of Microbiology*. 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/4386268>.

Fan H., Wang K., Wang C., Yu F., He X., Ma J. & Li X. 2020. A comparative study on growth characters and nutrients removal from wastewater by two microalgae under optimized light regimes. *Environmental Technology & Innovation*. 19: 100849. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100849>.

Gao F., Li C., Yang Z. H., Zeng G. M., Mu J., Liu M. & Cui W. 2016. Removal of nutrients, organic matter, and metal from domestic secondary effluent through microalgae cultivation in a membrane photobioreactor. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 91(10): 2713-2719. <https://doi.org/10.1002/jctb.4879>.

González-Camejo J., Barat R., Pachés M., Murgui M., Seco A. & Ferrer J. 2018. Wastewater nutrient removal in a mixed microalgae–bacteria culture: effect of light and temperature on the microalgae–bacteria competition. *Environmental Technology*. 39(4): 503-515. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1305001>.

Hernández–Pérez A. & Labbé J. I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 49(2): 157–73. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>.

Herrera–Valencia V. A., Contreras–Pool P. Y., López–Adrián S. J., Peraza–Echeverría S. & Barahona–Pérez L. F. 2011. The green microalga *Chlorella saccharophila* as a suitable source of oil for biodiesel production. *Current Microbiology*. 63: 151–157. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9956-7>.

Jain P., Minhas A. K., Shukla S., Puri M., Barrow C. J. & Mandal S. 2022. Bioprospecting indigenous marine microalgae for polyunsaturated fatty acids under different media conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.842797>.

John D. M. & Tsarenko P. M. 2002. Order Chlorococcales. In: *The Freshwater Algal Flora of the British Isles. An identification guide to freshwater and terrestrial algae*, (John D. M., Whitton B. A. & Brook A.J., eds), pp. Cambridge: Cambridge University Press.

Jung J. Y., Damusaru J. H., Park Y., Kim K., Seong M., Je H. W., Kim S., & Bai S. C. 2017. Autotrophic biofloc technology system (ABFT) using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* positively affects performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Algal research*. 27: 259-264. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.021>.

Khanzada Z. T. 2020. Phosphorus removal from landfill leachate by microalgae. *Biotechnology Reports*. 25: e00419. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00419>.

Kong W., Shen B., Lyu H., Kong J., Ma J., Wang Z. & Feng S. 2021. Review on carbon dioxide fixation coupled with nutrients removal from wastewater by microalgae. *Journal of Cleaner Production*. 292: 125975. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.125975>.

Kumar A. & Bera S. 2020. Revisiting nitrogen utilization in algae: A review on the process of regulation and assimilation. *Bioresource Technology Reports*. 12: 100584. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100584>.

Kumar N., Banerjee C. & Jagadevan S. 2021. Identification, characterization, and lipid profiling of microalgae *Scenedesmus* sp. NC1, isolated from coal mine effluent with potential for biofuel production. *Biotechnology Reports*. 30: e00621. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00621>.

Lemley D. A., Adams J. B. & Bate G. C. 2016. A review of microalgae as indicators in South African estuaries. *South African Journal of Botany*. 107: 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.04.008>.

Li K., Liu Q., Fang F., Luo R., Lu Q., Zhou W., Huo S., Cheng P., Liu J., Addy M., Chen P., Chen D. & Ruan R. 2019. Microalgae-based wastewater treatment for nutrients recovery: A review. *Bioresource Technology*. 291: 121934. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121934>.

Liu X. Y. & Hong Y. 2021. Microalgae-based wastewater treatment and recovery with biomass and value-added products: a brief review. *Current Pollution Reports*. 7: 227-245. <https://doi.org/10.1007/s40726-021-00184-6>.

Lv J., Liu Y., Feng J., Liu Q., Nan F. & Xie S. 2018. Nutrients removal from undiluted cattle farm wastewater by the two-stage process of microalgae-based wastewater treatment. *Bioresource Technology*. 264: 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.05.085>.

Mitra M., Nguyen K. M. A. K., Box T. W., Gilpin J. S., Hamby S. R., Berry T. L. & Duckett E. H. 2020. Isolation and characterization of a novel bacterial strain from a Tris-Acetate-Phosphate agar medium plate of the green micro-alga *Chlamydomonas reinhardtii* that can utilize common environmental pollutants as a carbon source. *F1000Research*. 9: 656. <https://doi.org/10.12688/f1000research.24680.1>.

Molazadeh M., Ahmadzadeh H., Pourianfar H. R., Lyon S. & Rampelotto P. H. 2019. The use of microalgae for coupling wastewater treatment with CO<sub>2</sub> biofixation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 7: 42. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00042>.

Nie X., Mubashar M., Zhang S., Qin Y. & Zhang X. 2020. Current progress, challenges and perspectives in microalgae-based nutrient removal for aquaculture waste: A comprehensive review. *Journal of Cleaner Production*. 277: 124209. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124209>.

Pancha I., Chokshi K., George B., Ghosh T., Paliwal C., Maurya R. & Mishra S. 2014. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*. 156: 146-154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.025>.

Patil L. & Kaliwal B. 2017. Effect of CO<sub>2</sub> concentration on growth and biochemical composition of newly isolated indigenous microalga *Scenedesmus bajacalifornicus* BBKLP-07. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 182(1):335-348. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2330-2>.

Printz H. 1916. Die Chlorophyceen des südlichen Sibiriens und des Uriankailandes [Contributions ad floram asiae interioris pertinentes.]. *Kongelige Norske Videnskabernes Selskab Skrifter* 1915(4): 1-59, pls I-VII.

Qi F., Wu D., Mu R., Zhang S. & Xu X. 2018. Characterization of a microalgal UV mutant for CO<sub>2</sub> biofixation and biomass production. *Biomed Research International*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/4375170>.

Qin L., Wang Z., Sun Y., Shu Q., Feng P., Zhu L., Xu J. & Yuan Z. 2016. Microalgae consortia cultivation in dairy wastewater to improve the potential of nutrient removal and

biodiesel feedstock production. *Environmental Science and Pollution Research*. 23: 8379-8387. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-6004-3>.

Smith G.M. 1920. Phytoplankton of the Inland Lakes of Wisconsin. Part I: Myxophyceae, Phaeophyceae, Heterokontae, and Chlorophyceae exclusive of the Desmidiaceae. *Bulletin of the Wisconsin Geological and Natural History Survey*. 57: 1-243.

Shihira I. & Krauss RW. 1965. *Chlorella*. Physiology and taxonomy of forty-one isolates. Maryland: University of Maryland, College Park. pp. 1-97.

Sacristán-de Alva M., Luna-Pabello V. M., Cadena-Martínez E. & Alva-Martínez A. F. 2014. Producción de biodiésel a partir de microalgas y una cianobacteria cultivadas en diferentes calidades de agua. *Agrociencia*. 48(3): 271-284. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S140531952014000300003&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S140531952014000300003&script=sci_arttext).

Sacristán-de Alva M., Luna-Pabello V. M., Orta-Ledesma M. T. & Cruz-Gómez M. J. 2018. Carbon, nitrogen, and phosphorus removal, and lipid production by three saline microalgae grown in synthetic wastewater irradiated with different photon fluxes. *Algal Research*. 34: 97-103. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.07.006>.

Salama E. S., Kurade M. B., Abou-Shanab R. A., El-Dalatony M. M., Yang I. S., Min B. & Jeon B. H. 2017. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 79: 1189-1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>.

Salbitani G. & Carfagna S. 2021. Ammonium utilization in microalgae: A sustainable method for wastewater treatment. *Sustainability*. 13(2): 956. <https://doi.org/10.3390/su13020956>.

Sánchez-Mirón A., Cerón-García M. C., Contreras-Gómez A., García-Camacho F., Molina-Grima E. & Chisti Y. 2003. Shear stress tolerance and biochemical characterization of *Phaeodactylum tricorutum* in quasi steady-state continuous culture in outdoor photobioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 16(3): 287-297. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00072-X](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00072-X).

Sandeep K. P., KumaraguruVasangam K. P., Kumararaja P., Syama Dayal J., Sreekanth G. B., Ambasankar K. & Vijayan K. K. 2019. Microalgal diversity of a tropical estuary in south India with special reference to isolation of potential species for aquaculture. *Journal of Coastal Conservation*. 23: 253-267. <https://doi.org/10.1007/s11852-018-0655-4>.

Shanmugam S., Mathimani T., Anto S., Sudhakar M. P., Kumar S. S., & Pugazhendhi A. 2020. Cell density, lipidomic profile, and fatty acid characterization as selection criteria in bioprospecting of microalgae and cyanobacterium for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 304: 123061. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123061>.

Teco-Bravo J. I., Barahona-Pérez L. F., Peraza-Echeverría S., Baas-Espínola F. M., Reyes-Sosa C. F. & Herrera-Valencia V. A. 2021a. Lipid profiles of acid-tolerant mutants

of the green microalga *Chlorella saccharophila* reveal hydrocarbons and high-value lipids with potential industrial applications. *Bioresource Technology Reports*. 13: 100636. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2021.100636>.

Teco–Bravo J. I., Tovar–Juárez E., Estrada–Santos Y., Negrete–Moreno P. M. & López–Arroyo M. A. 2021b. Aislamiento y cinética de crecimiento de microalgas de la laguna “Pampa el Cabildo”, Puerto Madero, Chiapas, México. *La Ciencia Aplicada en Chiapas*. 7: 28-38. <https://icti.chiapas.gob.mx/programas/revista/LaCienciaAplicadaEnChiapas7.pdf>.

Vidyashankar S., Deviprasad K., Chauhan V. S., Ravishankar G. A. & Sarada R. 2013. Selection and evaluation of CO<sub>2</sub> tolerant indigenous microalga *Scenedesmus dimorphus* for unsaturated fatty acid rich lipid production under different culture conditions. *Bioresource Technology*. 144: 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.054>.

Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wuang Y. & Ruan R. 2010. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 162: 1174-1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>.

Wirth R., Pap B., Böjti T., Shetty P., Lakatos G., Bagi Z., Kovács K. L. & Maróti G. 2020. *Chlorella vulgaris* and its phycosphere in wastewater: Microalgae-bacteria interactions during nutrient removal. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8: 557572. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.557572>.

Yu H., Kim J. & Lee C. 2019. Nutrient removal and microalgal biomass production from different anaerobic digestion effluents with *Chlorella* species. *Scientific Reports*. 9(1): 6123. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42521-2>.

Zhu L., Wang Z., Shu Q., Takala J., Hiltunen E., Feng P. & Yuan Z. 2013. Nutrient removal and biodiesel production by integration of freshwater algae cultivation with piggery wastewater treatment. *Water research*. 47(13): 4294-4302. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.05.004>.

Zhu L., Li S., Hu T., Nugroho Y. K., Yin Z., Hu D., Chu R., Mo F., Liu C. & Hiltunen E. 2019. Effects of nitrogen source heterogeneity on nutrient removal and biodiesel production of mono-and mix-cultured microalgae. *Energy Conversion and Management*. 201: 112144. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2019.112144>.