

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA DE UN SISTEMA
COINMOVILIZADO *BACILLUS PUMILUS*- *CHLORELLA SOROKINIANA* PARA EL
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

Daniela Fernanda Pardo Ruiz

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA**

BOGOTÁ, 2021

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE pH Y TEMPERATURA DE UN SISTEMA
COINMOVILIZADO *BACILLUS PUMILUS-CHLORELLA SOROKINIANA* PARA EL
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

Daniela Fernanda Pardo Ruiz
Trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo

Director:
Msc. Juan Pablo Hernández Sánchez

Codirector:
Dra. Lina María González

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE, FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE BIOLOGIA
BOGOTÁ
2021**

Página de aprobación



Juan Pablo Hernández Sánchez



Lina María González González

Codirectora



Oskar Alejandro Palacios López

Jurado



Francisco Javier Choix Ley

Jurado



Fabio Eduardo Díaz López

Jurado

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado a mi papá, por enseñarme a luchar por mis sueños, por su entrega incondicional, por darme todo su amor y ser mi fuerza en los días de oscuridad, espero te sientas orgulloso.

Hasta el cielo...

“Cuando mi voz calle con la muerte, mi corazón te seguirá hablando”

Rabindranath Tagore

Agradecimientos

A mi mamá, por su amor infinito, por depositar una y otra vez su confianza sobre mi y ser un apoyo.

A mis hermanos por estar para mi incondicionalmente y seguir cada una de mis aventuras.

A mis hermanas por ayudarme a cumplir mis sueños y ser mi ejemplo de fuerza y valentía.

A mis sobrinos por enseñarme que el amor lo puede todo y por funcionar como el combustible que le da vida a mis sueños.

A mi tío Honorio, por ser un ejemplo, por apoyarme y guiarme.

A Camila, por su amistad incondicional, sus consejos, ánimos y buenos momentos.

A María José, por apoyarme incondicionalmente, por su amistad, sus palabras de calma en los días de estrés y guiarme para ser mejor persona.

A Laura y Tatiana, por su amistad y apoyo durante toda la carrera.

A María Paula, por su apoyo cuando lo necesité y por todos los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

A mi director Juan Pablo Hernández, por su acompañamiento, guía y consejos y por su calidad humana.

A mi codirectora Lina González, por su guía y acompañamiento.

Nota de salvedad

“La Universidad el Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por el investigador en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético de este en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”

TABLA DE CONTENIDO

1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO DE REFERENCIA.....	3
2.1 ANTECEDENTES	3
2.2 MARCO TEÓRICO.....	7
3. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	14
5. OBJETIVOS.....	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6. 1 MICROORGANISMOS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO	16
6. 2 INMOVILIZACIÓN DE <i>C. SOROKINIANA</i> Y <i>B. PUMILUS</i>	16
6. 3 CONDICIONES EXPERIMENTALES	17
6. 3.1 Agua residual sintética.....	17
6.3.2 Conteo de microorganismos	17
6.3.3 Pruebas de eliminación de fosfatos y nitratos.....	17
6.4 pH.....	18
6.4.1 Diseño experimental.....	18
6.4.2 TEMPERATURA.....	19
6.4.2.1 Acondicionamiento de temperatura.....	20
6.4.2.2 Adaptación de la microalga a temperaturas altas	20
6.4.3 Análisis estadístico	21
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
7.1 pH.....	22
7.1.1 Crecimiento poblacional.....	22
7.1.2 Eliminación de nutrientes	25
7.2 TEMPERATURA.....	28
7.2.1 Crecimiento poblacional.....	28
7.2.2 Eliminación de nutrientes	32
8. CONCLUSIONES.....	35
9. RECOMENDACIONES	36
10. BIBLIOGRAFÍA.....	37

Lista de figuras

<i>Figura 1.</i> Montaje experimental pH	19
<i>Figura 2.</i> Montaje experimental acondicionamiento temperatura	20
<i>Figura 3.</i> Crecimiento poblacional de <i>C.sorokiniana</i> inmovilizada sola y coinmovilizada con <i>B. pumilus</i> a diferentes pHs.	23
<i>Figura 4.</i> Crecimiento poblacional de <i>B.pumilus</i> coinmovilizada con <i>c.sorokiniana</i> a diferentes pHs.	24
<i>Figura 5.</i> Porcentaje de remoción de nitratos por tratamiento a diferentes pHs.	26
<i>Figura 6.</i> Porcentaje de remoción de fosfatos por tratamiento a diferentes pHs.	28
<i>Figura 7.</i> Crecimiento poblacional de <i>C.sorokiniana</i> inmovilizada sola y coinmovilizada con <i>B. pumilus</i> a diferentes temperaturas.	30
<i>Figura 8.</i> Crecimiento poblacional de <i>B.pumilus</i> coinmovilizada con <i>C.sorokiniana</i> a diferentes temperaturas.	31
<i>Figura 9.</i> Porcentaje de remoción de nitratos por tratamiento a diferentes temperaturas.	32
<i>Figura 10.</i> Porcentaje de remoción de fosfatos por tratamiento a diferentes temperaturas.	34

Resumen

El uso de sistemas coinmovilizados de microalgas y bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) para el tratamiento terciario de aguas residuales ha recibido en los últimos años mayor atención, como un sistema alternativo para la eliminación de nutrientes. Este tipo de procesos en comparación a los tratamientos terciarios convencionales representan un sistema más seguro y con menor costo, además de ser considerada una de las tecnologías de mediana complejidad al hacer uso de organismos vivos que involucra una serie de parámetros (nutrientes, intensidad lumínica, temperatura, pH, fotoperiodo entre otros) que le permiten generar mayor eficiencia de eliminación de nutrientes al sistema. En este estudio se evaluaron las condiciones de pH y temperatura que permitieran optimizar la eficiencia de un sistema coinmovilizado entre la bacteria *Bacillus pumilus* y la microalga *Chlorella sorokiniana*, para la eliminación de nitratos y fosfatos en aguas residuales. La eliminación de nitratos y fosfatos resultó ser más eficiente en pH 8,0 con un porcentaje de remoción del 60,20% y 74,23% respectivamente, en comparación con el pH 5,0 que presentó menor eliminación para nitratos (35,90 %) y el pH 10 para fosfatos (8,71%). Los cultivos presentaron mayor densidad celular a pH 8.0 con $1,90 \times 10^2$ cels/ml. En cuanto al efecto de la temperatura sobre la eliminación de nitratos y fosfatos, se observó que a temperatura de 30°C se presentó mayor porcentaje de eliminación de nitratos (54,84%) y fosfatos (62,84%). La densidad poblacional fue mayor a temperatura de 30°C con $2,071 \times 10^2$ cels ml⁻¹ en comparación a los demás tratamientos. Estos resultados demuestran que el ajuste del pH y la temperatura tiene efectos significativos sobre el crecimiento y remoción de nutrientes por el sistema coinmovilizado bacteria-microalga.

Palabras clave: microalga, bacteria, pH, temperatura, eliminación de nutrientes

Abstract

The use of coinmobilized systems of microalgae and plant growth-promoting bacteria (PGPB) for tertiary treatment of wastewater has received an increasing amount of attention in the last few years as an alternative system for nutrient removal. Compared to other types of conventional tertiary systems, these types of processes represent a safer and less expensive option. Additionally, it is considered a médium complexity technology as it uses living organisms, taking into account a wide range of parameters (nutrients, light intensity, temperature, pH, photoperiod, among others), allowing a more effective nutrient removal from the system. This study evaluated pH and temperature that allow the improvement of a coinmobilized system between the bacteria *Bacillus pumilus* and the microalgae *Chlorella sorokiniana*, in order to eliminate nitrates and phosphates from wastewater. The elimination of nitrates and phosphates was more efficient at pH 8 with a removal percentage of 60,2% and 74,23% respectively. In contrast, a pH of 5 showed the lowest removal of nitrates (35.9%) and a pH of 10 the lowest removal of phosphates (8,71%). The cultures had a higher celular density with a pH of 8.0 with $1,90 \times 10^2$ cels/ml. At a temperature of 30°C the removal of nitrates (54,84%) and phosphates (62,84%) was the highest, as well as the population density with $1,90 \times 10^2$ cels/ml c. These results show that adjusting the pH and temperature has significant effects over growth and nutrient removal on behalf of the coinmbolized bacteria-microalgae system.

Key Words: microalgae, bacteria, pH, temperatura, nutrient removal

1.Introducción

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para el desarrollo de la vida humana y la sostenibilidad del medio ambiente, que como consecuencia de su uso inadecuado y de la rápida urbanización e industrialización, ha sufrido un alarmante deterioro (Barceló y López, 2008), generando aguas residuales que suelen ser nocivas para las poblaciones humanas y el medio ambiente. Dentro de las fuentes principales de agua residual se encuentran las aguas domésticas o urbanas, aguas industriales, escorrentía de uso agrícola y pluviales (Ramalho,2003).

En Latinoamérica, menos del 20% del agua residual recibe un tratamiento adecuado, mientras que, en Colombia, el avance en materia de saneamiento hídrico se encuentra en un atraso significativo, en donde solo el 12 % del agua residual generada es tratada (Ávila, 2015; González y Echeverri, 2004). Los tratamientos convencionales, para las aguas residuales, son excesivamente costosos y en muchos casos no eliminan parte de los contaminantes que contienen (Abdel et al., 2012), por lo cual, el uso de cultivos de microalgas ha surgido como alternativa para el tratamiento terciario de aguas residuales debido a que se han destacado por su alta capacidad de eliminación de nutrientes, además pueden disminuir los efectos nocivos de las aguas residuales y reducir la eutrofización en los medios acuáticos (Abdel et al., 2012).

La aplicación de microalgas en suspensión se ha visto obstaculizada por las dificultades de remoción de la biomasa microalgal que se desarrolla en el agua después del tratamiento (Ávila, 2015; de-Bashan y Bashan, 2010). Esto implica procesos de filtración y centrifugación de alto costo y tiempo, con alta demanda energética que requieren de una serie de etapas para recuperar por completo dicha biomasa (Ávila, 2015). Ante esto, surge como alternativa la inmovilización de microalgas en matrices de diferente naturaleza, los cuales resultan ser una de las técnicas más

promisorias y rentables para separar microalgas de su medio de cultivo en el tratamiento terciario de aguas residuales (Olguín, 2003).

Los sistemas inmovilizados resultan ser muy promisorios, sin embargo, podrían ser más eficientes si se incrementa la biomasa microalgal y se establecen las condiciones óptimas de crecimiento. Una de las alternativas para el aumento de la biomasa, es el uso de otros microorganismos como las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) inmovilizadas de manera conjunta con las microalgas, ya que la acción directa de estas bacterias puede aumentar su crecimiento, actividad metabólica y capacidad de remoción de nutrientes inorgánicos (de-Bashan y Bashan, 2003).

Finalmente, la eficiencia de este tipo de sistemas depende de las condiciones óptimas de crecimiento que son dadas por diferentes factores como el tipo de efluente a tratar, características operacionales (pH, CO₂ y nutrientes), biológicas (concentración inicial de inóculo, tolerancia a contaminantes u organismos depredadores) y ambientales (temperatura e intensidad lumínica) (Abdel-Raouf et al. 2012). En esta investigación se evalúan las condiciones de pH y temperatura que permitan optimizar la eficiencia de un sistema coinmovilizado entre *Bacillus pumilus* y *Chlorella sorokiniana*, para la eliminación de nutrientes (nitratos y fosfatos) de aguas residuales.

2. Marco de referencia

2.1 Antecedentes

El uso de microalgas para el tratamiento terciario de aguas residuales ha recibido en los últimos años mayor atención, como un sistema alternativo para la remoción de nitratos, fosfatos y metales pesados de las aguas residuales, dado que han demostrado gran efectividad en la disminución de las concentraciones de N y P (González et al., 1997). Gracias a esta capacidad de remoción de nutrientes, el uso de microalgas para este tipo de tratamientos se ha convertido en una opción eficiente, sin que se generen impactos negativos en el ecosistema (de la Noüe y De Pauw, 1988).

La eliminación de nutrientes a partir de microalgas en suspensión ha sido estudiada por diferentes autores. González et al., (1997) evaluaron la eficiencia *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus dimorphus* en la eliminación de amoníaco y fosforo de aguas residuales agroindustriales, obteniendo como resultado una eliminación de hasta el 55% de fosfatos y 95% de amoníaco. Voltolina et al., (1999), estudiaron la eliminación de nutrientes por la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando cultivos semicontinuos. En 24 h, la eliminación de fosfato fue superior al 50% y el nitrógeno total eliminado fue aproximadamente del 50% y 66%.

Abe et al., (2002) evaluaron la remoción de iones de nitrato, nitrito, amonio y fosfato del agua residual sintética por la microalga *Trentepohlia aurea*. La microalga mostró mayor eliminación de iones nitrito (37%) y nitrato (32%) en las aguas residuales en comparación con los iones de amonio y fosfato que mostraron una eliminación del 5%.

A inicios de los años 70, se comenzaron a utilizar microalgas inmovilizadas en diferentes matrices (agar, alginato, carragenina y poliuretano, entre otros), como alternativa para la recolección

de la biomasa producida en el agua tratada (de-Bashan y Bashan, 2010). Las principales ventajas de la inmovilización son el aumento de la eficiencia de remoción de N y P, eliminación de metales pesados de efluentes industriales gracias a la unión de estos elementos a la superficie de la pared celular u otros mecanismos de detoxificación, mayor concentración de biomasa, evita la filtración de las aguas residuales tratadas, alta resistencia a los compuestos tóxicos provenientes de las aguas residuales e inmovilización de más de un microorganismos (Moreno et al., 2005; de-Bashan y Bashan, 2010).

Las investigaciones se han centrado en ver los efectos de la inmovilización sobre la eliminación de nutrientes de las aguas residuales, Travieso et al., (1992) inmovilizaron *Chlorella vulgaris* en carragenina para la eliminación de nutrientes en aguas residuales, teniendo como resultado un porcentaje de remoción de 69% N y 82% P en un lecho fluido con luz natural. Tam et al., (1994) inmovilizaron *Chlorella vulgaris* en perlas de alginato de calcio para determinar la eliminación de nitrógeno y fósforo de las aguas residuales domésticas, obteniendo como resultado mayor crecimiento celular en las microalgas inmovilizadas y una eficiencia de eliminación del 100% para el amonio y del 71% para el fósforo, concluyendo que las células de *Chlorella* inmovilizadas se pueden utilizar en el tratamiento secundario de aguas residuales domésticas.

En otro estudio, Lau et al., (1997) inmovilizaron *Chlorella vulgaris* en dos matrices, una de carragenina y una de alginato para tratar aguas residuales domésticas sedimentadas. La microalga logró eliminar el 95% de N y el 99% de P en los primeros tres días de tratamiento, en comparación a las microalgas sin inmovilizar que solo lograron eliminar el 50% de N y P en el mismo periodo de tiempo. Por su parte Tam y Wong (2000), determinaron el efecto de la concentración de esferas de microalgas inmovilizadas en la eliminación de nutrientes en el agua residual, teniendo como

resultado una eliminación completa de $\text{NH}_4^+ -\text{N}$ (100%) y una reducción del 94% de $\text{PO}_4^{3-} -\text{P}$ dentro de las 16 y 8 h de tratamiento con una concentración de perlas de 12 esferas/ml.

Huang y Wang (2003), determinaron la eficacia en la eliminación de nitratos y fosfatos usando *Chlorella pyrenoidosa* coinmovilizada con lodos activos en diferentes valores de pH. Los resultados mostraron que la eliminación de nitratos no se ve afectada por la variación de pH. La mayor eficiencia de remoción fue de aproximadamente el 80% para cada tratamiento durante los cuatro periodos del experimento. Por el contrario, el sistema coinmovilizado se vio afectado directamente por el pH para la eliminación de fosfatos, siendo los valores neutros los más adecuados para la eliminación.

Otra de las formas para aumentar la eficiencia del sistema de microalga inmovilizada en perlas de alginato es mejorar significativamente los parámetros de crecimiento, incluida la población en general, el tamaño de la colonia y la biomasa (de-Bashan y Bashan, 2008a). Para incrementar la población algal, se puede hacer uso de otros microorganismos que promuevan el crecimiento de la microalga (Bashan y Holguin, 1997). de-Bashan et al., (2002), estudiaron la capacidad de la microalga *Chlorella vulgaris* inmovilizada con la bacteria promotora de crecimiento de microalgas *Azospirillum brasilense* en condiciones de cultivo por lotes, semicontinuo y continuo para eliminar iones de fósforo y amonio de agua residual sintética. En los resultados se concluyó que los cultivos continuos y en lotes presentan una tendencia de eliminación similar de los iones de fósforo y amonio en comparación a los cultivos semicontinuos. Los cultivos discontinuos presentaron un porcentaje de remoción del 93% de amonio y del 75% del fósforo por parte del coinmovilizado durante las primeras 48 h en comparación con la microalga sola que no eliminó el fósforo y la eliminación de amonio fue de un 53%. Por otra parte, en los cultivos continuos los coinmovilizados presentaron una eliminación del 91% de amonio mientras que la microalga sola eliminó el 59% de amonio.

Finalmente, el cultivo semicontinuo en el primer ciclo eliminó el 100% de amonio con los coinmovilizados, mientras que los cultivos con microalgas inmobilizadas solas fueron menos eficientes.

de-Bashan y Bashan (2003), investigaron cómo extender el uso de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Azospirillum* a bacterias promotoras de crecimiento de microalgas, con el fin de aumentar la capacidad de remoción de nutrientes de aguas residuales de la microalga *Chlorella* spp. Para esto, realizaron la inmobilización conjunta de *Chlorella vulgaris* y *Azospirillum brasilense* Cd en esferas de alginato, obteniendo como resultado un aumento del crecimiento celular y tamaño de las colonias microalgales dentro de la esfera. Además, el sistema coinmovilizado tuvo un aumento en la capacidad de remoción de los nutrientes del agua residual sintética alcanzando porcentajes de eliminación del 100% para amonio y 92% de fósforo durante un periodo de seis días con cultivos semicontinuos.

Por otra parte, Hernandez et al., (2009) estudiaron el efecto de la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria promotora de crecimiento vegetal *Bacillus pumilus* sobre la promoción de crecimiento de *Chlorella vulgaris*. Sus resultados demostraron que *C. vulgaris* por sí sola no aporta amonio al medio, al inmobilizar los dos microorganismos conjuntamente aumentó ligeramente la acumulación de amonio, pero a niveles muy bajos. En presencia de amonio *B. pumilus* no indujo ninguna promoción del crecimiento en *C. vulgaris* y ambos sistemas (microorganismos inmobilizados solos y coinmovilizados) desarrollaron poblaciones elevadas similares. Por último, los resultados permitieron concluir que lo más probable es que el mecanismo de *B. pumilus* para promover el crecimiento de *C. vulgaris* es la fijación de nitrógeno en condiciones de escasez severa de este nutriente.

Finalmente, de-Bashan et al., (2008b) realizaron un estudio del potencial de *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805 para eliminar amonio de aguas residuales, bajo condiciones extremas de temperatura e intensidad lumínica. El crecimiento de *C. sorokiniana* a 40°C bajo alta intensidad de luz por 5 h cada 24 h, fue tolerado por la microalga creciendo con éxito en todas las intensidades de luz. El límite de crecimiento de esta microalga fue de 42 °C para el período probado. Por otra parte, el crecimiento de *C. sorokiniana* inmovilizada con *A. brasilense* en perlas de alginato a diferentes temperaturas (28 y 40 ° C) e intensidades de luz (60 y 2500 $\text{lmol m}^2 \text{s}^{-1}$) bajo la influencia de diferentes concentraciones de amonio, fue mayor a temperaturas e intensidades de luz extremas y bajo altas concentraciones de amonio. En cuanto a la eliminación de amonio de aguas residuales sintéticas, mediante *C. sorokiniana* inmovilizada con *A. brasilense* bajo las condiciones extremas de temperatura e intensidad de luz se logró la eliminación del 100% de amonio después de las 96 h. Bajo las condiciones de crecimiento regulares, los co-cultivos no alcanzaron este nivel de remoción de amonio, pero se encontraron cerca al porcentaje de eliminación.

2.2 Marco teórico

Tratamiento de aguas residuales

El aumento de las poblaciones y el uso indiscriminado de los recursos naturales han provocado la contaminación y deterioro de las fuentes hídricas (An et al., 2008). Por lo cual, se han desarrollado diferentes tratamientos para la disminución de la contaminación de aguas residuales. El tratamiento primario se centra en la remoción de los sólidos suspendidos y materia orgánica a partir de procesos físicos y químicos. El tratamiento secundario tiene como objetivo la remoción de la materia orgánica biodegradable y sólidos inorgánicos suspendidos. Esto se lleva a cabo en unidades de procesos químicos o biológicos como los lodos activados. Finalmente, el tratamiento terciario o avanzado consiste en la remoción de sólidos suspendidos residuales, desinfección y la eliminación de

nutrientes (principalmente fósforo y nitrógeno) (Rawat et al., 2010; Metcalf et al., 2002). Dentro del tratamiento terciario de aguas residuales se encuentra el tratamiento biológico con microalgas, el cual ofrece una solución para la eliminación total o parcial de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (Manea et al., 2016).

Las microalgas se pueden aplicar en el tratamiento de aguas residuales en forma de sistemas de monocultivos y sistemas combinados o consorcios. Los sistemas de monocultivos hacen referencia a los métodos en donde solo se utilizan algas para la eliminación de nutrientes sin la ayuda de ningún otro microorganismo, mientras que los sistemas combinados hacen uso de microalgas y bacterias para la eliminación de nutrientes y contaminantes orgánicos (Jia y Yuan , 2016; Fito y Alemu,2019). En los sistemas combinados o consorcios, las algas y bacterias presentan una amplia gama de interacciones que proporcionan mayor eficiencia al sistema, por ejemplo, la actividad fotosintética de las algas suministra oxígeno para la oxidación de la materia orgánica por parte de las bacterias, a su vez las algas utilizan el CO₂ producido por la respiración bacteriana para su crecimiento (Fito y Alemu, 2019). Adicionalmente, en sistemas combinados las bacterias oxidan de manera más eficiente compuestos orgánicos que contienen nitrógeno debido a la asimilación del amonio liberado por las microalgas.

Inmovilización de microorganismos para el tratamiento de aguas residuales

La inmovilización de células es utilizada para una amplia variedad de aplicaciones biotecnológicas, esta se encuentra definida como la limitación o confinamiento de microorganismos por medios naturales o artificiales dentro de una matriz inerte (de-Bashan y Bashan, 2010). Las técnicas de inmovilización de células tienen como fin incrementar la concentración celular, el aumento de la estabilidad biológica, la separación de células del medio, reducir las concentraciones

del sustrato en el medio de cultivo y la reducción de costos en procesos de recuperación de la biomasa, entre otros (Karel et al., 1985).

Las técnicas de inmovilización pueden ser de seis tipos: acoplamiento covalente, inmovilización por afinidad, adsorción, confinamiento en emulsión líquido- líquido, captura a través de una membrana semipermeable y atrapamiento en polímeros (Mallick, 2002). En la inmovilización de microorganismos para el tratamiento de aguas residuales, la técnica más usada es el atrapamiento y encapsulamiento en polímeros, en donde los microorganismos vivos quedan confinados dentro del polímero debido a que los poros de este tienen un diámetro menor al del tamaño de los microorganismos, mientras que el líquido fluye a través de él y mantienen el metabolismo y crecimiento (Cohen,2001). Diversos derivados poliméricos sintéticos (acrilamida, polivinilo y resinas) y naturales de polisacáridos de algas (alginato, carragenina, agar, agarosa) han sido utilizados como matriz en este tipo de técnicas, siendo los polímeros naturales de alginato y carragenina los más usados. A pesar de que algunos polímeros naturales son menos estables y pueden llegar a disolverse en agua residual muy contaminada, presentan mayor difusividad y una producción menos peligrosa en comparación con los polímeros sintéticos (de- Bashan y Bashan, 2010).

Por otra parte, el alginato es un polímero natural que se encuentra como componente estructural de las algas pardas marinas (Phaeophyta) en forma de polisacárido, producido principalmente en las paredes celulares y espacios intercelulares en forma de sales del ácido algínico. Se caracteriza por formar geles con iones Ca^{+2} , Na^{+} , Mg^{+2} , Sr^{+2} y Ba^{+2} y su función principal es dar fuerza y flexibilidad a las algas (Hernández et al., 2012). El uso de los alginatos se da gracias a que posee propiedades como la habilidad de incrementar la viscosidad de soluciones acuosas, formación

de geles en presencia de sales de calcio y la capacidad de formar películas de alginato de sodio o calcio (McHugh, 2003).

Chlorella sorokiniana

Las microalgas son microorganismos autótrofos con una alta tasa de conversión de energía solar a biomasa (Avila, 2015), poseen la capacidad de crecer y hacer fotosíntesis con diferentes fuentes de nutrientes, en condiciones autotróficas, mixotróficas y heterotróficas (Chinnasamy et al., 2010; Ortiz et al., 2012). Debido a su potencial uso biotecnológico, el género *Chlorella* es uno de los más estudiados y cultivados en la actualidad. Este género se clasifica dentro de la división Chlorophyta y la familia Trebouxiophyceae (Lizzul et al., 2018). Las especies de este género se encuentran distribuidas en diferentes ambientes tales como aguas continentales y marinas (Dariencko et al., 2019), bajo temperaturas entre los 15 y 40 °C. Se caracterizan por ser unicelulares o coloniales con un solo cloroplasto y un pirenoide (Bock et al., 2011), poseen una pared celular lisa, con una morfología no flagelada generalmente esférica u ovoide (Lizzul et al., 2018). Su reproducción es exclusivamente asexual por medio de auto esporas (Pérez, 2009). Las especies de *Chlorella* tienen un alto potencial para el uso en diferentes procesos industriales, como la producción de biocombustible, biofertilizante, proteínas como suplementos alimenticios, pigmentos, biorremediación, entre otros (Luna, 2007; Lim et al., 2010; Li et al., 2013).

Una de las microalgas con mayor potencial biotecnológico es *Chlorella sorokiniana*, una especie unicelular de 2- 4.5 µm de diámetro, su crecimiento óptimo se encuentra entre 30 a 40 °C (de-Bashan et al., 2008), presenta altos niveles de resistencia al calor (38-42°C) e intensidad de lumínica, puede crecer en condiciones autotróficas, heterotróficas y mixotróficas y en ambientes extremos como las aguas residuales (Morita et al., 2000; Lizzul et al., 2018; de-Bashan et al., 2004). Esta especie ha sido estudiada principalmente por su fisiología, genética y para potencializar su

producción de biomasa por medio de la fotosíntesis (Morita et al.,2000), y también para la biorremediación de suelos áridos degradados en coinmovilización con *Azospirillum brasilense* (Trejo et al., 2012; López et al., 2013).

Bacterias Promotoras de Crecimiento Vegetal (PGPB)

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal se encuentran definidas según Bashan y de-Bashan (2005) como “bacterias de vida libre del suelo, la rizosfera, el rizoplasma que, en algunas condiciones, son benéficas para las plantas”. Estas bacterias pueden promover el crecimiento de las plantas a partir de diferentes mecanismos directos e indirectos. Los mecanismos directos afectan el metabolismo de la planta facilitándoles la obtención de recursos, la asimilación de nitrógeno y fósforo, el secuestro de hierro y la producción de hormonas vegetales (auxinas, giberelinas, citoquininas y etileno). En los mecanismos indirectos denominados biocontrol-PGPB se encuentran la síntesis de antibióticos y enzimas líticas asociados con la capacidad de las bacterias para producir sideróforos, la resistencia sistémica inducida y prevenir la proliferación de patógenos vegetales, entre otros (Glick, 2012; Bashan y de-Bashan, 2005).

Bacillus pumilus

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* se caracterizan por ser células de tipo Gram positivas, aeróbicas, formadoras de endosporas resistentes al calor y a adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Parvathi et al., 2009). Las células bacterianas de este género tienen un tamaño variable (0,5 a 10 μm) (Tejera et al.,2011). Su capacidad metabólica muy diversa les permite tener una colonización exitosa en el ambiente rizosférico. Se encuentran asociadas a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Tejera et al.,2011), a partir de distintos mecanismos como la solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas como el ácido indol acético y la capacidad de controlar algunos hongos patógenos en la rizósfera (Chatli et al., 2008; Vessey, 2003; Calvo y Zuñiga, 2010).

B. pumilus es una de las especies de *Bacillus* más predominante de la rizosfera, se encuentra clasificada dentro del grupo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) (Bravo,2009). Es una bacteria aerobia, su crecimiento se da en pH 5 y 10, temperatura mínima de 5° C y máxima de 40–50°C. Presenta alta resistencia al estrés ambiental, exposición a la luz ultravioleta, y desecación en presencia de H₂O₂ (Duarte et al., 2000; Logan y Vos, 2015). Las características para su identificación son: Bacilo ligeramente redondeado en los extremos, suele tener un tamaño de 0,6-0,7 μm de ancho y 2,0-3,0 μm de longitud, se encuentran individualmente o en pares y forman esporas cilíndricas a elipsoidales. La morfología colonial es variable; las colonias en medio nutritivo son irregulares con márgenes ondulados, no presentan pigmentación y la mayoría son lisas y opacas (Logan y Vos, 2015).

Bacillus pumilus ES4, utilizada en este trabajo, es una bacteria de suelo, aislado de cactus cardón *Pachycereus pringlei* por Puentes et al., (2009), que ha sido utilizado en el sistema microalga-bacteria con el fin de remover nitrógeno y fosforo de aguas residuales mientras se encuentra coinmovilizada con *Chlorella vulgaris* (Hernández et al.,2009).

3. Pregunta de investigación

¿Cuáles son los valores óptimos de pH y temperatura de un co-cultivo de bacterias (*Bacillus pumilus*) y microalgas (*Chlorella sorokiniana*) coinmovilizadas en esferas de alginato, para la máxima remoción de nitratos y fosfatos de aguas residuales?

4. Justificación

Los sistemas coinmovilizados de microalgas y bacterias promotoras de crecimiento han sido utilizados para el tratamiento terciario de aguas residuales para la eliminación de compuestos nitrogenados, fosforados y metales pesados (de-Bashan y Bashan,2003). Este tipo de procesos en comparación con los tratamientos terciarios convencionales representan un complemento ecológico más seguro y con menor costo que incorpora los beneficios de recuperación y reciclaje de los recursos (Beltrán et al.,2017).También es considerada como una de las tecnologías de mediana complejidad al hacer uso de organismos vivos que involucra una serie de parámetros (nutrientes, intensidad lumínica, temperatura, pH, fotoperiodo entre otros) que deben ser considerados, evaluados, determinados y medidos para la eficiencia en la eliminación de nutrientes y producción de biomasa (Hernández y Labbé, 2014). Dentro de las condiciones que se deben cumplir para la optimización, eficiencia y rentabilidad económica de este tipo de sistemas es el conocimiento y control de factores ambientales (luz, temperatura), biológicos (concentración inicial de inóculo, contaminación por hongos y bacterias) y operacionales (pH, CO₂ y nutrientes) (Beltrán et al., 2017).

El pH y la temperatura son algunos de los factores más importantes para la eficiencia de este tipo de sistemas, debido a que el pH es un factor determinante para la solubilidad de dióxido de carbono e influye directa o indirectamente en el metabolismo de las microalgas (Morris et al, 1999; Moronta et al., 2006). Así mismo, la temperatura no solo afecta las reacciones celulares, sino también los requerimientos nutricionales y la composición de biomasa microalgal (Abalde et al., 1995; Fabregas et al., 1989; Moronta et al., 2006).

Por lo tanto, es necesario desarrollar investigaciones encaminadas a determinar los parámetros de pH y temperatura que permitan optimizar la eficiencia de un sistema coinmovilizado bacteria (*Bacillus pumilus*) y microalga (*Chlorella sorokiniana*), para la eliminación de nitratos y fosfatos en aguas residuales.

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar las condiciones de pH y temperatura que permitan optimizar la eficiencia de un sistema coinmovilizado entre la bacteria *Bacillus pumilus* y la microalga *Chlorella sorokiniana*, para la eliminación de nitratos y fosfatos en aguas residuales.

Objetivos específicos

- Determinar el pH en el que se genera la máxima eficiencia de un sistema microbiano coinmovilizado para la eliminación de nitratos y fosfatos en aguas residuales.
- Determinar la temperatura en la que se genera la máxima eficiencia de un sistema microbiano coinmovilizado para la eliminación de nitratos y fosfatos en aguas residuales.
- Determinar el porcentaje de remoción de nitratos y fosfatos de aguas residuales de un sistema coinmovilizado de bacterias y microalgas.

6. Materiales y métodos

6.1 Microorganismos y condiciones de crecimiento

Chlorella sorokiniana UTEX 2714 se aisló en medio de cultivo mineral C30 estéril a temperatura ambiente $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ en agitación continua (110 r.p.m) y luz constante de $24,8 \mu\text{mol} / \text{m}^2/\text{s}$. *Bacillus pumilus* ES4 se aisló en caldo nutritivo y se incubó a 32°C por 24 a 48 horas, con recambios cada siete días.

6.2 Inmovilización de *C. sorokiniana* y *B. pumilus*

La coinmovilización de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* se llevó a cabo siguiendo el método propuesto por de-Bashan et al., (2004) de la siguiente manera: se tomaron 50 ml de *C. sorokiniana* y *B. pumilus*, se lavaron con solución salina 0,85% dos veces, centrifugando a 4.200 rpm por 10 minutos, después de los lavados se resuspendió cada cultivo en 10 ml de solución salina 0,85%, para el caso del inmovilizado de *C. sorokiniana* se resuspendió 20 ml de la solución; estos se mezclaron con 80 ml de solución de alginato de sodio al 2%, durante 15 minutos hasta homogenizar. La mezcla se agregó en una solución de CaCl_2 al 2% por goteo con una jeringa de 20 ml estéril; las esferas formadas se mantuvieron durante 10 minutos en CaCl_2 , luego se lavaron

tres veces con solución salina al 0,85% para finalmente dejarlas en caldo nutritivo al 10% durante 24 horas, teniendo en cuenta que durante el proceso de inmovilización se reduce el número de microorganismos dentro de las esferas (Bashan, 1986).

6.3 Condiciones experimentales

6.3.1 Agua residual sintética

El agua residual sintética se preparó usando: CaCl₂ 4 mg/L; K₂HPO₄ 21,7 mg/L; KH₂PO₄ 8,5; KNO₃ 24 mg/L; NaCl 7 mg/L; Na₂HPO₄ 33,4 mg; NH₄Cl 5 mg/L y MgSO₄ 7H₂O 2 mg/L (de Bashan et al.,2005).

6.3.2 Conteo de microorganismos

El recuento de la microalga se realizó a partir de la solubilización de una esfera de alginato de cada matraz en 1 ml de solución de NaHCO₃ al 4% durante 3 a 5 minutos. Posteriormente, se realizó el conteo directo por duplicado, en microscopio óptico con la cámara de Neubauer.

El recuento de la bacteria se llevó a cabo por extensión en superficie en placa de agar nutritivo, a partir de diluciones seriadas hasta 10⁶ en tubos de eppendorf con 900 µl de solución salina al 0.85%; las cajas se incubaron a 32°C por 24 horas, posteriormente se realizó el conteo directo en placa de las unidades formadoras de colonia (UFC).

6.3.3 Pruebas de eliminación de fosfatos y nitratos

Las pruebas de eliminación de nutrientes se realizaron tomando 20 ml de agua residual sintética de cada tratamiento. Los nitratos se midieron por el método de reducción de cadmio y los fosfatos por el método de aminoácido, ambas técnicas estándar para análisis de agua utilizando kits especiales y fotómetro multiparamétrico (Hanna Instruments: Gipuzkoa, España, modelo HI 83099).

El porcentaje de remoción de fosfatos y nitratos se calculó a partir de la siguiente ecuación (Jiménez et al., 2004):

$$\%R = \left(\frac{C_0 - C}{C_0} \right) \times 100$$

Donde:

% R: porcentaje de remoción de nutrientes

C_0 : concentración inicial de nutrientes en el agua residual

C: La concentración final de los nutrientes después del tratamiento

6.4 pH

6.4.1 Diseño experimental

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de 500 ml usados como biorreactores, se agregaron 400 ml de agua residual sintética y 16 g de esferas (pesadas en balanza estándar ADAM, modelo EBL 1602e); se mantuvo con aireación constante usando bombas de aire para acuario y con una intensidad de lumínica de $40 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en periodos de luz-oscuridad de 12/12 h y temperatura ambiente. Se realizaron dos montajes experimentales con las mismas condiciones. Cada experimento tuvo una duración de siete días y se evaluaron 3 réplicas por cada tratamiento. La toma de muestras y conteo de los microorganismos se realizaron el primer, tercer y séptimo día del tratamiento.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes:

1. Sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a pH 5
2. Sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a pH 8

3. Sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a pH 10
4. Control: sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a pH 7

El pH se midió mediante electrodo de pH (Benchtop pH/mV/°C Meter, modelo PHS-3BW), se realizó el ajuste del pH en cada uno de los tratamientos cada 36 horas con NaOH al 4% y HCl al 1,4%.



Figura 1. Montaje experimental pH

6.4.2 Temperatura

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces de 500 ml usados como biorreactores, se agregaron 400ml de agua residual sintética y 16 g de esferas (pesadas en balanza estándar ADAM, modelo EBL 1602e); se mantuvo con aireación constante usando bombas de aire para acuario y con una intensidad de lumínica de $52 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ en periodos de luz-oscuridad de 12/12 h. Se realizaron dos montajes experimentales con las mismas condiciones. Cada experimento tuvo una duración de siete días y se evaluaron 3 réplicas por cada tratamiento. La toma de muestras y conteo de los microorganismos se realizaron el primer, tercer y séptimo día del tratamiento.

Los tratamientos fueron los siguientes:

1. Sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a temperatura 25°C

2. Sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a temperatura 30°C
3. Sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a temperatura 38°C
4. Control: sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana* y *B. pumilus* a temperatura ambiente

6.4.2.1 Acondicionamiento de temperatura

Para la variación de la temperatura se utilizaron una lámpara halógena de manera lateral y dos bombillas incandescentes (200 W) con reguladores de intensidad lumínica alrededor de los matraces con el fin controlar el aumento o disminución de la temperatura (Figura 2). La variación de la temperatura se encontró entre $\pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 2. Montaje experimental acondicionamiento de temperatura.

6.4.2.2 Adaptación de la microalga a temperaturas altas

La exposición abrupta a temperaturas altas genera la muerte de *C. sorokiniana* (Bashan et al., 2016). Por lo tanto, es necesario generar periodos de aclimatación durante tres días. Los cuales se realizaron de la siguiente manera: la temperatura fue elevada a 38°C, a partir de periodos de aumento gradual de 30- 35°C durante 30 min, 15 min a 35 °C y un lento aumento de la temperatura a 38°C por 15 min. Una vez alcanzados los 38 °C la temperatura se mantuvo durante 5 h y luego se volvió gradualmente a 30°C (de-Bashan et al.,2008b).

6.4.3 Análisis estadístico

Para el crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* y *B.pumilus* y el porcentaje de remoción de nutrientes se realizaron pruebas de homogeneidad de varianza por el test de Levene y las pruebas de normalidad por el test de Shapiro-Wilks, se realizó el ajuste de datos a una distribución normal, posteriormente un análisis de varianza (ANOVA) de una vía $P < 0.05$ y una prueba de Tukey $P < 0.05$ para ver si existían diferencias significativas entre los tratamientos, usando el programa IBM SPSS versión 23.

7. Resultados y Discusión

7.1 pH

7.1.1 Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* aumentó significativamente cuando se encontraba coinmovilizada con *B. pumilus* a pH 8, comparado con los otros tratamientos, los valores pasaron de $0,59 \times 10^2$ a $1,90 \times 10^2$ cels ml^{-1} , contrario a los cultivos que se encontraban a pH 10 los cuales presentaron valores de $0,62 \times 10^2$ a $0,50 \times 10^2$ cels ml^{-1} (Fig.3). Esto puede deberse a que el pH tiene una influencia directa sobre diferentes procesos celulares, que incluyen el metabolismo energético, la estructura y función de orgánulos, enzimas y proteínas (Beltrán et al., 2017). Además, un pH extremo puede causar la interrupción de muchos procesos celulares que podrían conducir al colapso del cultivo (Cautteau, 1996).

Kumar et al., (2014), observaron que a pH entre 7,5 a 8,5 *C. sorokiniana* tiene un aumento en su crecimiento poblacional de manera continua. Además, evidenciaron que el pH de 5,5 era perjudicial para el crecimiento de la microalga generando un efecto inhibitorio en el crecimiento celular contrario a lo obtenido en este trabajo, posiblemente porque la inmovilización proporciona ventajas contra el estrés ambiental (de-Bashan y Bashan 2010; Moreno et al., 2005), permitiendo el crecimiento celular de los microorganismos bajo pH extremos. de- Bashan et al., (2005) reportaron una densidad celular de $2,2 \times 10^6$ cels/ ml en medios con pH 8, el cual mejoró significativamente el crecimiento de *C. vulgaris* coinmovilizada con *A. brasilense* y produjo una mayor concentración de microalgas.

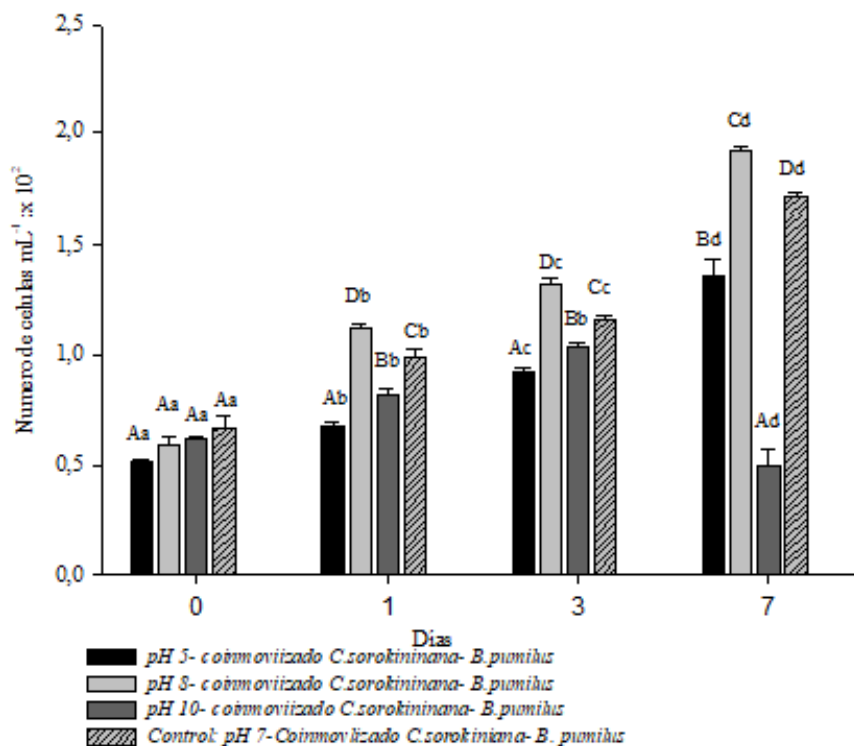


Figura 3. Crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* coinmovilizada con *B. pumilus* a diferentes pHs. Las barras verticales representan el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un Análisis de Varianza ($P < 0,05$).

Por otra parte, el crecimiento poblacional de *B. pumilus* se comportó de manera similar al crecimiento de *C.sorokiniana* coinmovilizada bajo los distintos pHs. A pH 8 *B. pumilus* obtuvo $6,3 \times 10^7$ UFC mL^{-1} comparado con el pH 10 con $2,7 \times 10^7$ UFC mL^{-1} después de los 7 días de tratamiento (Fig.4). El crecimiento similar de las poblaciones de *C. sorokiniana* y *B.pumilus* puede ser debido a la interacción microalga-bacteria, algunos autores sugieren que las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPB) llevan a cabo diferentes mecanismos que pueden ser a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando

nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la toma de agua y minerales) y el aumento de su actividad enzimática (Bashan y Holguin, 1998). También poseen la capacidad como control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir los fitopatógenos (de-Bashan et al.,2007).

B. pumilus posee la capacidad de fijar nitrógeno y producir fitohormonas como auxinas y giberelinas (Gutiérrez et al.,1996). De acuerdo con Hernández et al., (2009) *B. pumilus* ES4 demostró ser una bacteria promotora del crecimiento de microalgas que afecta el crecimiento de *C. vulgaris* cuando se coinmovilizada en perlas de alginato a través de un mecanismo actualmente desconocido.

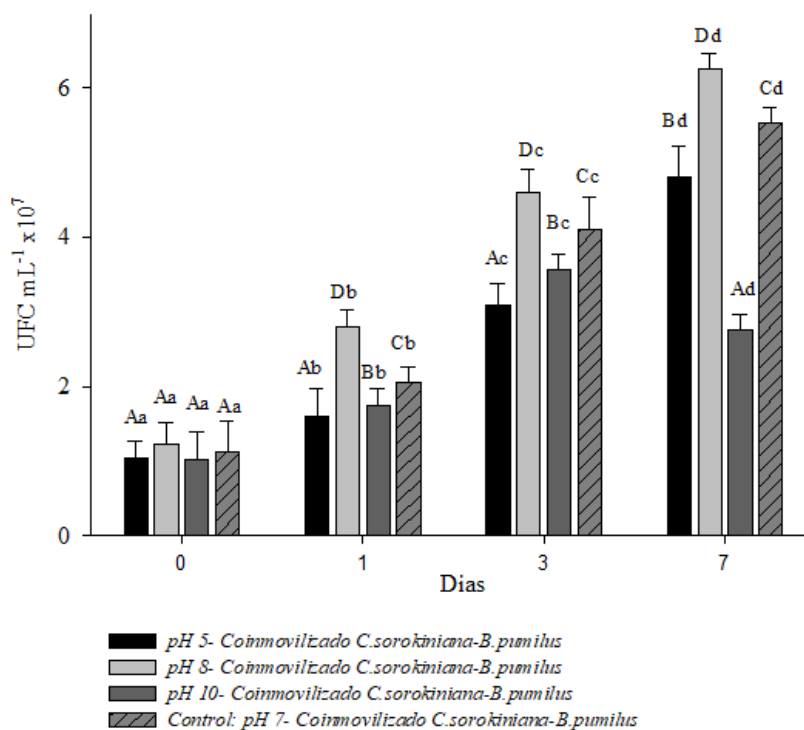


Figura 4. Crecimiento poblacional de *B. pumilus* coinmovilizada con *C.sorokiniana* a diferentes pHs.

Las barras verticales representan el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias

estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un Análisis de Varianza ($P < 0,05$)

7.1.2 Remoción de nutrientes

La remoción de nitratos se dio en mayor porcentaje en el pH 8 con 67,6%, seguido del tratamiento control coinmovilizado a pH 7 que removió 60,2%. Por el contrario, el pH 5 solo logró un 35,90% (Fig. 5). Esto se debe a que la eficiencia en la remoción de nutrientes está estrechamente relacionada con el pH del medio (Liang et al., 2015). Zhou et al., (2015) encontraron que los intervalos de pH óptimos para *C. vulgaris* en la remoción de nitrógeno estaban entre 7 y 8.

Por otra parte, la comparación entre tratamientos muestra que a partir del día uno, los cultivos comenzaron a diferir significativamente entre ellos (Fig. 5). Los datos obtenidos en este trabajo pueden ser comparados con los trabajos realizados con otras especies de *Chlorella*. En un estudio realizado por Huang y Wang (2003) observaron que el sistema coinmovilizado de *Chlorella pyrenoidosa* con lodos activos evaluado a diferentes pH, presentó una eficiencia de remoción más alta a pH 8 (83,12%) y la más baja a pH 6 y 10 (78,65%) sin embargo, los resultados mostraron que la remoción de nitratos no se ve afectada por la variación de pH.

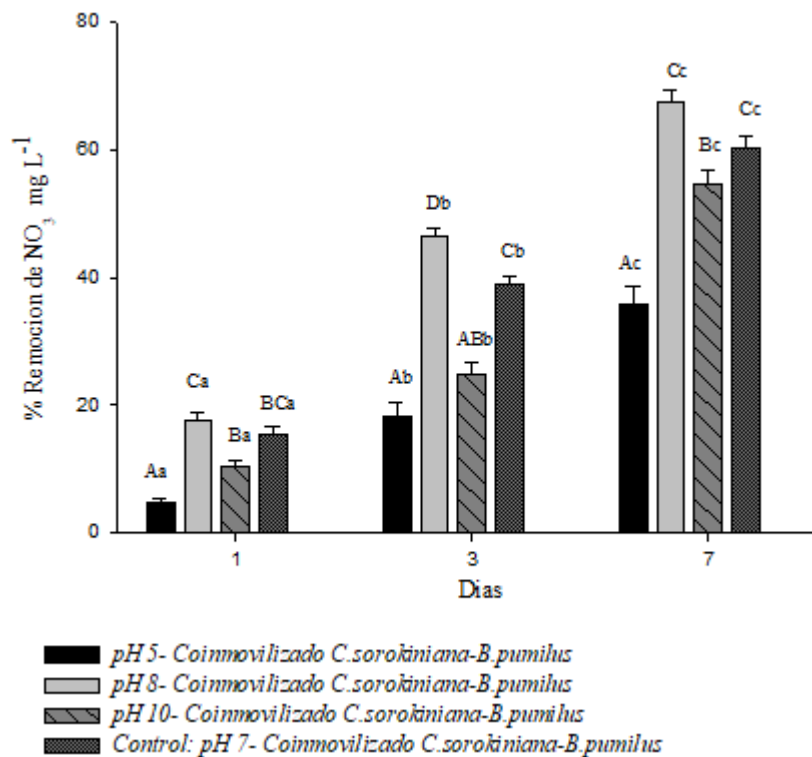


Figura 5. Porcentaje de remoción de nitratos por tratamiento a diferentes pHs. Las barras verticales representan el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un Análisis de Varianza ($P < 0,05$)

Para la remoción de fosfatos se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, siendo el sistema coinmovilizado a pH 8 el que presentó el mayor porcentaje de remoción (74,23%), mientras que el pH 10 presentó la menor eliminación (8,71%). Durante los siete días del cultivo se observaron variaciones en el porcentaje de remoción de fosfatos, donde a pH 8 se obtuvo un aumento en relación con los días de tratamiento, el pH 5 fue el que presentó menor remoción en los días 1 y 3 (Fig.6). En general, la remoción de fosfatos se puede atribuir

tanto a la asimilación por parte de la biomasa como a la precipitación química del sistema microalga-bacteria. Con base en esto, se han desarrollados diferentes estudios para la eliminación de fosfatos de las aguas residuales con sistemas microalga-bacteria. Liang et al., (2013) evidenciaron una eficiencia de remoción de fosfatos del 93% en el sistema combinado de *B. licheniformis* y *C. vulgaris* a pH 7; en otro estudio, Huang y Wang (2003) encontraron que la remoción de fosfatos usando el sistema coinmovilizado de *C. pyrenoidosa* con lodos activos, eliminaron 73,97% a pH 7 después del cuarto periodo del tratamiento, por el contrario, a pH de 5 y 10 se presentaron los valores más bajos de remoción (38,36% y 21,92% respectivamente).

Megharaj et al., (1992) demostraron que la precipitación de fosfato es un fenómeno importante a valores de pH por encima de 9 y desfavorable a pH bajos, en este trabajo no se considera la precipitación como mecanismo principal de remoción, debido a que la remoción de fosfatos a pH 10 fue la más baja. La reducción de la eficiencia de eliminación de fosfatos a pH 10 en el día siete puede deberse al aumento de la concentración de fosfato en el medio, esto puede ser causado gracias a la ruptura celular de la microalga y bacteria, liberando el contenido de fosfato intercelular al medio (Martínez et al., 2000).

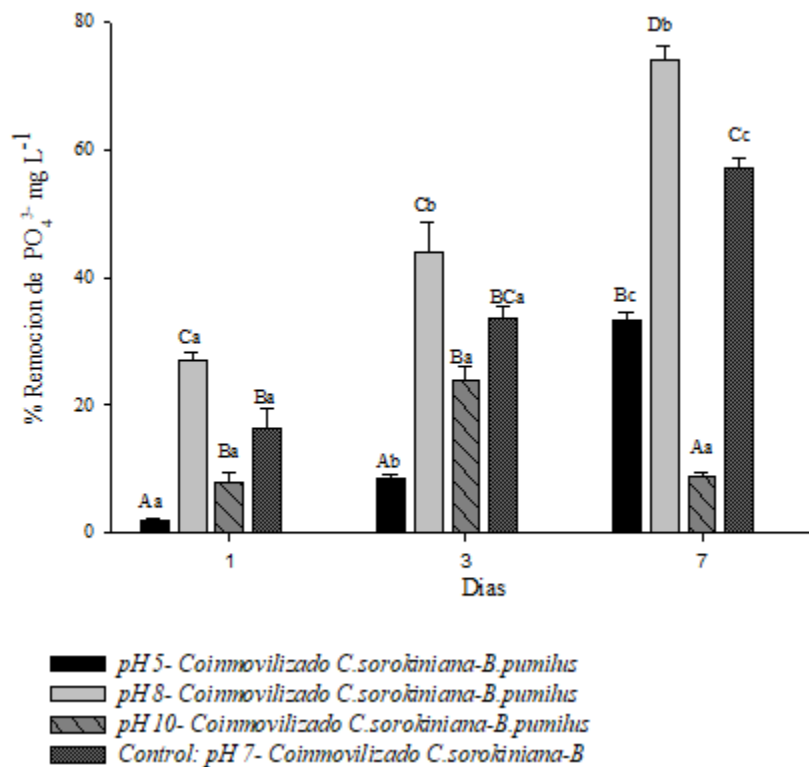


Figura 6. Porcentaje de remoción de fosfatos por tratamiento a diferentes pHs. Las barras verticales representan el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un Análisis de Varianza ($P < 0,05$)

7.2 Temperatura

7.2.1 Crecimiento poblacional

El crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* coinmovilizada con *B. pumilus* expuesta a diferentes temperaturas presentó diferencias significativas, siendo la temperatura a 30°C en la que se obtuvo mayor densidad celular de $2,071 \times 10^2$ cels ml^{-1} a los siete días mientras que a temperatura ambiente solo se obtuvo $1,25 \times 10^2$ cels ml^{-1} (Fig.7). La temperatura es uno de los parámetros que más

influye en el crecimiento de las microalgas al afectar la velocidad de crecimiento, la tasa de división celular y la velocidad fotosintética. Aunque cada especie presenta un rango de temperatura de crecimiento, generalmente *Chlorella sorokiniana* presenta un crecimiento óptimo a 30- 40°C (de-Bashan et al., 2008b), además presenta altos niveles de resistencia al calor (38-42°C) (Moronta et al., 2006). El aumento en la temperatura incrementa la tasa metabólica y fotosintética de las microalgas, debido al aumento en la velocidad de reacciones intracelulares (Adenan et al., 2013; De Nicola, 1996), incrementado a su vez la toma de nutrientes del medio para llevar a cabo los procesos metabólicos. Sin embargo, un aumento en la temperatura óptima de crecimiento genera la disminución de la velocidad fotosintética y de división celular debido principalmente a la inhibición y desactivación de las enzimas fotosintéticas (Abalde, et al., 1995; Salvucci y Crafts-Brandner, 2004).

Contrario a lo encontrado en el presente trabajo, de-Bashan et al., (2008b) reportaron que *C. sorokiniana* UTEX 2805 coinmovilizada con *Azospirillum brasilense* Cd aumenta su densidad poblacional en aguas residuales sintéticas a temperaturas de 40-42°C después de los periodos de aclimatación y exposición por cinco horas a altas temperaturas.

El crecimiento del *C. sorokiniana* fue menor a temperatura de 38°C, esto puede deberse posiblemente a que la cepa UTEX 2714 utilizada en este trabajo, es una cepa no termo-tolerante que presenta una disminución en el crecimiento a temperaturas altas, su crecimiento óptimo es a 27°C (Bashan et al., 2016). No obstante, Kumar et al., (2014) observaron que la temperatura adecuada para el crecimiento de *C. sorokiniana* fue a 30°C y por debajo de su temperatura óptima disminuía la tasa de crecimiento.

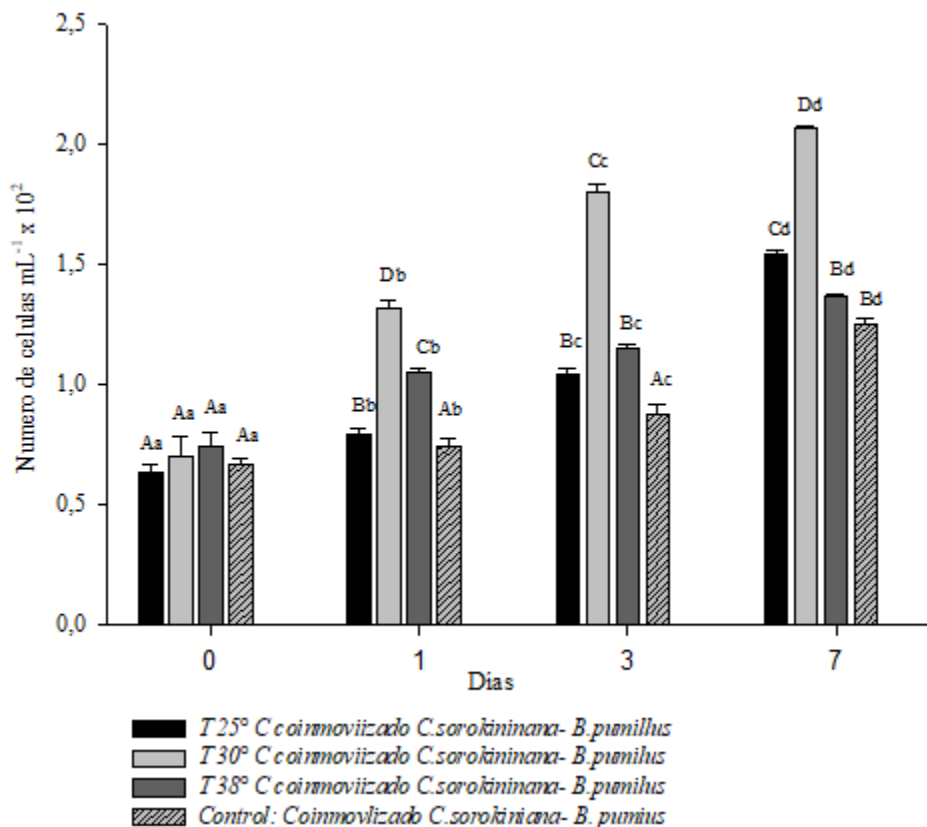


Figura 7. Crecimiento poblacional de *C. sorokiniana* coinmovilizada con *B. pumilus* a diferentes temperaturas. Las barras verticales representan el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza ($P < 0,05$).

Por otra parte, el crecimiento de *B. pumilus* fue mayor a 30°C pasando de $1,1 \times 10^7$ UFC mL⁻¹ a $7,73 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, a diferencia del tratamiento control que presentó menor crecimiento ($3,20 \times 10^7$ UFC mL⁻¹) (Fig.8). Esto puede deberse a que la temperatura es el factor más determinante en el crecimiento bacteriano, dado que proporciona la energía necesaria para la transición del umbral de activación que es requerido en las diferentes reacciones posteriores a la fase de adaptación (Álvarez y Sánchez, 2016). *B. pumilus* tiene un crecimiento en un rango amplio de temperaturas, sin embargo, a

temperaturas entre 30 y 45 °C presenta un crecimiento óptimo (Duarte et al., 2000; Logan y Vos, 2015).

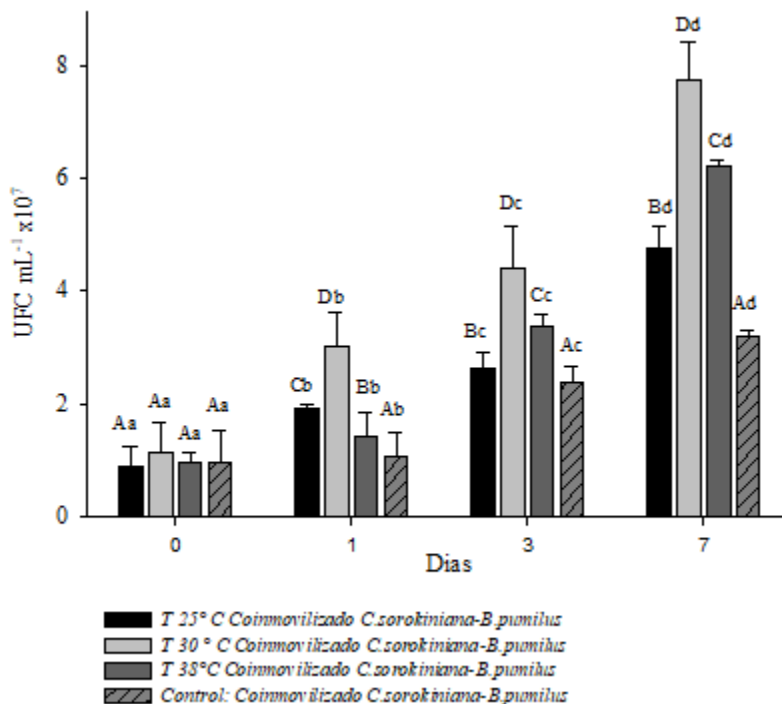


Figura 8. Crecimiento poblacional de *B. pumilus* coinmovilizada con *C.sorokiniana* a diferentes temperaturas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey (P<0,05), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza (P<0,05)

7.2.2 Remoción de nutrientes

La remoción de nitratos fue mayor a temperatura de 30°C con 59,40%, contrario a la temperatura de 38°C que presentó menor remoción con 23,09 %. La remoción de nutrientes en un cultivo de microalgas depende de varios factores, siendo uno de los más importantes la temperatura, la cual influye directamente en la capacidad celular de las microalgas para remover nutrientes del medio, ya que el metabolismo es altamente sensible a los cambios de temperatura (Xin et al., 2011; Ruiz et al., 2015).

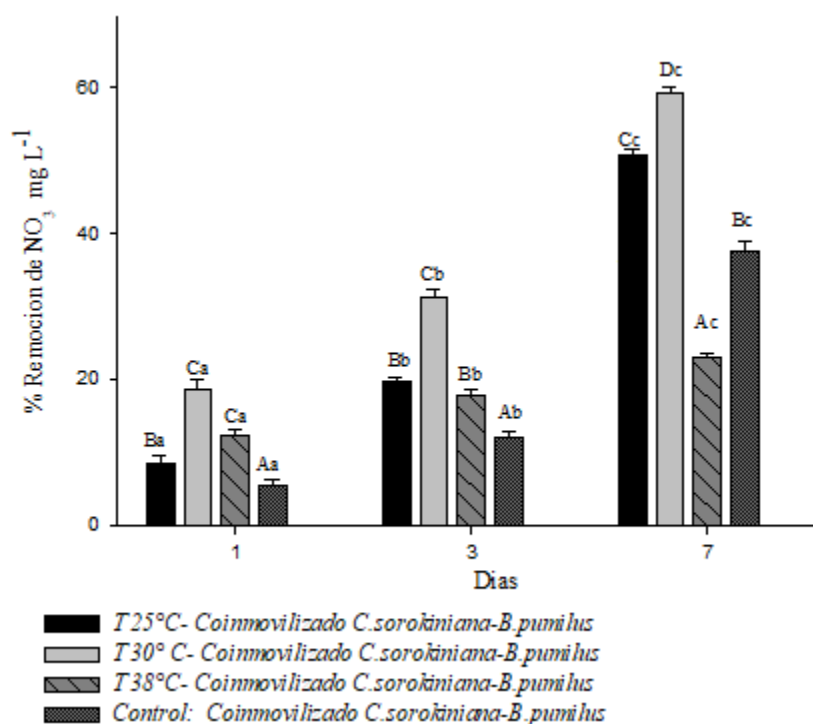


Figura 9. Porcentaje de remoción de nitratos por tratamiento a diferentes temperaturas. Las barras verticales representan el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey (P<0,05), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un Análisis de Varianza (P<0,05)

Algunos estudios han reportado el comportamiento en la remoción de nitratos por *Chlorella vulgaris* bajo distintas temperaturas, como es el trabajo de Ramírez (2019), donde la mayor remoción de nitratos fue de 193,10 mg·L⁻¹ a 31°C y la menor remoción a 23°C con 73,5 mg·L⁻¹. Por el contrario, Zhang et al., (2016), en su estudio sobre los efectos de la temperatura sobre las características de remoción de nutrientes de *Chlorella sp.* reportó una remoción del 94,9% de nitrógeno en un rango de temperatura entre los 18 y 25°C (Fig.9).

Por otra parte, el mayor porcentaje de remoción de fosfatos se dio en la temperatura 30°C con 62,84%, el segundo tratamiento que removió más fosfatos fue a 38°C con 46,50 %. Sin embargo, a partir del día tres no se presentó más remoción de fosfatos por parte de este tratamiento (Fig.10). Esto concuerda con lo reportado por Ramírez (2019) en donde la máxima remoción de fosfatos por *C.vulgaris* se dio a 31°C con 118,35 mg·L⁻¹, por el contrario, Delgadillo et al., (2016), encontraron un porcentaje de remoción de fosfatos del 100% en los cultivos mixtos de microalga-bacteria a 25°C y 18°C.

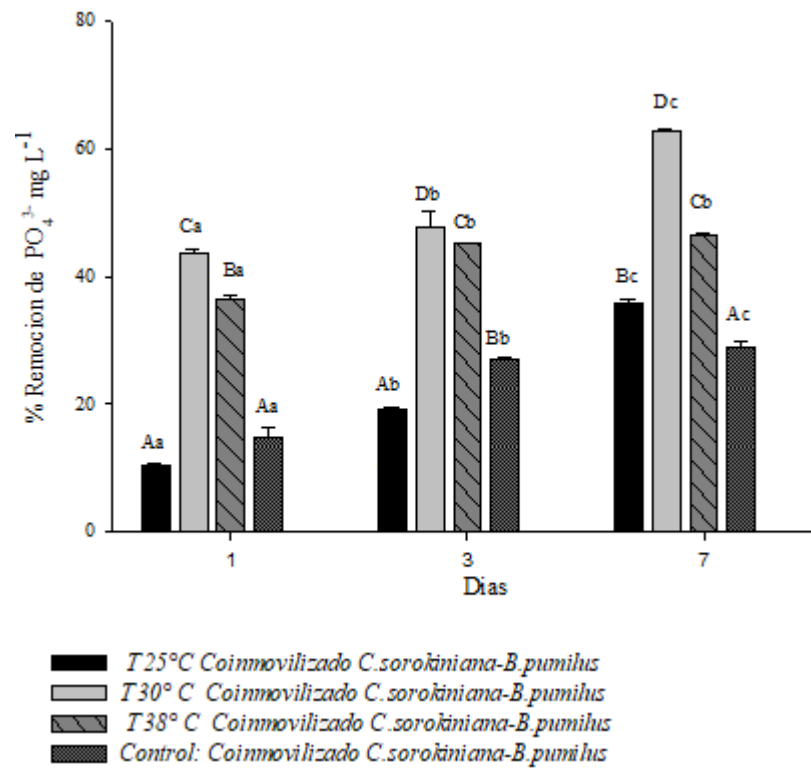


Figura 10. Porcentaje de remoción de fosfatos por tratamiento a diferentes temperaturas. Las barras verticales indican el error estándar. Letras en mayúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba de Tukey ($P < 0,05$), letras en minúscula indican las diferencias estadísticamente significativas entre los días de cada tratamiento con un análisis de varianza ($P < 0,05$)

8. Conclusiones

La temperatura y pH óptimos para el crecimiento de *C. sorokiniana* coinmovilizada con *B. pumilus* es de 30°C y pH 8.0, respectivamente

Ajustar el pH y la temperatura del cultivo de un sistema coinmovilizado de *C. sorokiniana*-*B. pumilus* es crucial para generar la máxima eficiencia de remoción de nitratos y fosfatos en agua residuales.

La remoción de nitratos y fosfatos por el sistema *C. sorokiniana*-*B. pumilus* tiene su máxima eficiencia a pH 8.0 y temperatura de 30°C.

9. Recomendación

En estudios futuros identificar los cambios fisiológicos que puede presentar tanto la bacteria como la microalga, bajo variaciones de pH y temperatura.

10. Bibliografía

- Abalde, J., Cid, P., Fidalgo, E., Torres y C. Herrero. (1995). *Microalgas: Cultivo y Aplicaciones*. Universidad de la Coruña. España. 210 p.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., y Ibraheem, M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 257-275.
- Abe, K., Imamaki, A., y Hirano, M. (2002). Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*. *Journal of Applied phycology*, 14(2), 129-134.
- Adenan, N. S., F. Md. Yusoff y M. Shariff. (2013). Effect of salinity and temperature on the growth of diatoms and green algae. *Journal of Fisheries and Aquatic Science* 8: 397-403.
- Alvarez, E. C., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53-62.
- An, T., Zhou, L., Li, G., Fu, J., y Sheng, G. (2008). Recent patents on immobilized microorganism technology and its engineering application in wastewater treatment. *Recent Patents on Engineering*, 2(1), 28-35.
- Ávila, J. (2015). Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales. [Tesis de pregrado, Universidad Ricardo Palma].

- Barceló, D., y López, M. J. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Jornadas de presentación de resultados: el estado ecológico de las masas de agua. Panel científico-técnico de seguimiento de la política de aguas, Sevilla.
- Bashan Y., Lopez, B.R., Huss, V.A.R., Amavizca, E. y de-Bashan, L.E. (2016). *Chlorella sorokiniana* (formerly *C. vulgaris*) UTEX 2714, a non-thermotolerant microalga useful for biotechnological applications and as a reference strain. *Journal of Applied Phycology*. 28: 113-121.
- Bashan, Y. (1986). Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Applied and Environmental Microbiology*, 1089-1098.
- Bashan, Y. y Holguín, G. (1997). *Azospirillum-plant* relationships: Environmental and physiological advances (1990-1996) *Can. J. Microbiol.* 43, 103-121
- Bashan, Y., Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biol. Biochem.* 30, 1225–1228.
- Bashan, Y., y de-Bashan, L. E. (2005). Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*, 1, 103-115.
- Beltrán, J., Guajardo, C., Barceló, I., y López, U. (2017). Biotratamiento de efluentes secundarios municipales utilizando microalgas: Efecto del pH, nutrientes (C, N y P) y enriquecimiento con CO₂. *Revista de biología marina y oceanografía*, 52(3), 417-427
- Bock, C., Krienitz, L., y Proeschold, T. (2011). Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea*, 11(2), 293-312.

- Bravo, O. M. Z. (2009) Crecimiento de *Bacillus pumilus* Productor de la Auxina Ácido Indolacético, Como Base para Formular un Biofertilizante en Polvo.
- Calvo, P., y Zúñiga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología aplicada*, 9(1), 31-39.
- Cautteau, P. (1996). Algal production. In P. Lavens & P. Sorgeloos (Eds.), *Manual on the production and use of live food for aquaculture* (pp. 10–30). Roma: Food and Agriculture Organization (FAO).
- Chatli A.S., Beri V. y Sidhu B.S. (2008). Isolation and characterisation of phosphate solubilising microorganisms from the cold desert habitat of *Salix alba* Linn. in trans Himalayan region of Himachal Pradesh. *Indian Journal of Microbiology*. 48: 267-273.
- Chinnasamy, S., Bhatnagar, A., Hunt, R., y Das, K. (2010). Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications. *Bioresource Technology*; 101: 3097-3105.
- Cohen, Y. (2001). Biofiltration—the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource technology*, 77(3), 257-274.
- Darienko, T., Rad-Menéndez, C., Campbell, C., y Pröschold, T. (2019). Are there any true marine *Chlorella* species? Molecular phylogenetic assessment and ecology of marine *Chlorella* like organisms, including a description of *Droopiella* gen. *Systematics and Biodiversity*, 17(8), 811-829
- de la Noue, J., y de Pauw, N. (1988). The potential of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotechnology advances*, 6(4), 725-770.

De Nicola, D.M. (1996). Periphyton responses to temperature at different ecological levels. 150-166.

En: Stevenson, R.J., M.L. Bothwell, R.L. Lowe (Eds) Algal ecology, freshwater benthic ecosystems. San Diego, California. 749 p.

de-Bashan L.E., Hernández J.-P., Morey, T., y Bashan, Y. (2004). Microalgae growth-promoting bacteria as "helpers" for microalgae: a novel approach for removing ammonium and phosphorus for municipal wastewater. *Water Research* 38,466-474.

de-Bashan, L. E., Antoun, H., & Bashan, Y. (2005). Cultivation factors and population size control the uptake of nitrogen by the microalgae *Chlorella vulgaris* when interacting with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Ecology*, 54(2), 197-203.

de-Bashan, L. E., y Bashan, Y. (2008a). Joint immobilization of plant growth-promoting bacteria and green microalgae in alginate beads as an experimental model for studying plant-bacterium interactions. *Applied and environmental microbiology*, 74(21), 6797-6802.

de-Bashan, L. E., y Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource technology*, 101(6), 1611-1627.

de-Bashan, L.E. y Bashan, Y. (2003). Bacterias promotoras de crecimiento de microalgas: una nueva aproximación en el tratamiento de aguas residuales (Microalgae growth-promoting bacteria: a novel approach in wastewater treatment). *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5: 85-90.

de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. (2007). Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. In: *Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biologico, planta-microorganismo*. (Eds.) Ferrera-

Cerrato, R., and Alarcon, A. Chapter 8. Published by: Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.

de-Bashan, L.E., Moreno, M., Hernandez, J.P., y Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from syntetic waste water by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research*. 36: 2941-2948.

de-Bashan, L.E., Trejo, A., Huss, V.A.R., Hernandez, J.-P. y Bashan, Y. (2008b). *Chlorella sorokiniana* UTEX 2805, a heat and intense, sunlight-tolerant microalga with potential for removing ammonium from wastewater. *Bioresource Technology* 99: 4980-4989

Delgadillo, L., Lopes, F., Taidi, B. y Pareau, D. (2016). Eliminación de nitrógeno y fosfato de aguas residuales con cultivo mixto de microalgas y bacterias. *Informes de biotecnología (Amsterdam, Países Bajos)*, 11, 18-26.

Duarte, M., Pellegrino, A., Portugal, E. P., Ponezi, A. y Franco, T. (2000). Characterization of alkaline xylanases from *Bacillus pumilus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(2), 90-94.

Fábregas, J., J. Abalde y C. Herrero. (1989). Biochemical composition and growth of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Butcher) with different ammonium nitrogen concentrations as chloride, sulphate, nitrate and carbonate. *Aquaculture*. 83: 289-304

Fito, J., y Alemu, K. (2019). Microalgae–bacteria consortium treatment technology for municipal wastewater management. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 4(1), 1-9.

Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*.

- González, D., y Echeverri, J. (2004). Saneamiento hídrico en Colombia: Instituciones y situación actual. *Ecos De Economía: A Latin American Journal of Applied Economics*, 8(18), 73-97.
- González, L. E., Cañizares, R. O., y Baena, S. (1997). Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a Colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresource technology*, 60(3), 259-262.
- Gutierrez, F., Acero, N., lucas, j., y Pobranza, a. (1996). The influence of native rhizobacteria on European older grownt. II. Characterization of grownt promoting and growth inhibiting strains. *Plant and Soil*. 192, 67-74.
- Hernández, A., y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Hernandez, J. P., de-Bashan, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y., & Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European journal of soil biology*, 45(1), 88-93.
- Huang, G., y Wang, Y. (2003). Nitrate and phosphate removal by co-immobilized *Chlorella pyrenoidosa* and activated sludge at different pH values. *Water Quality Research Journal*, 38(3), 541-551.
- Jia, H., y Yuan, Q. (2016). Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. *Cogent Environmental Science*, 2(1), 1275089.
- Jimenez, V., Sánchez, P, Romera O., Fernández, D. Pérez,C., (2004) Growth and nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme Microb.* 34: 392-398.

- Karel, F., Libicki, S y Robertson, R. (1985). The immobilization of whole cells: engineering principles. *Chemical engineering Science*. 40:1321-1354.
- Kumar, K., Dasgupta, C. N., & Das, D. (2014). Cell growth kinetics of *Chlorella sorokiniana* and nutritional values of its biomass. *Bioresource technology*, 167, 358-366.
- Lau, P. S., Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (1997). Wastewater nutrients (N and P) removal by carrageenan and alginate immobilized *Chlorella vulgaris*. *Environmental Technology*, 18(9), 945-951.
- Li, C., Yang, H., Li, Y., Cheng, L., Zhang, M., Zhang, L., y Wang, W. (2013). Novel bioconversions of municipal effluent and CO₂ into protein riched *Chlorella vulgaris* biomass. *Bioresource technology*. 132, 171-177.
- Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Liu, N., & Wong, M. (2015). A pH-dependent enhancement effect of co-cultured *Bacillus licheniformis* on nutrient removal by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering*, 75, 258-263.
- Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F., & Wong, M. (2013). Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. *Chemosphere*, 92(10), 1383-1389.
- Lim, S. L., Chu, W. L., y Phang, S. M. (2010). Use of *Chlorella vulgaris* for bioremediation of textile wastewater. *Bioresource technology*. 101(19), 7314-7322.
- Lizzul, A., Lekuona, A., Purton, S., y Campos, L. (2018). Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology*, 7(2), 25

- Logan, N. A., y Vos, P. D. (2015). *Bacillus*. Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria, 1-163.
- Lopez, B. R., Bashan, Y., Trejo, A., y de-Bashan, L. E. (2013). Amendment of degraded desert soil with wastewater debris containing immobilized *Chlorella sorokiniana* and *Azospirillum brasilense* significantly modifies soil bacterial community structure, diversity, and richness. *Biology and Fertility of Soils*. 49(8), 1053-1063.
- Luna, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista cubana de química*, 19(2), 3-20.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. *biometals*, 15(4), 377-390.
- Manea, R. G., Iordan, M., y Ardelean, I. I. (2016). Nitrogen and phosphorus removal from wastewater treatment plant outlet using immobilized *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM*, 1, 661-668.
- Martinez, M. E., Sánchez, S., Jimenez, J. M., El Yousfi, F., y Munoz, L. (2000). Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource technology*, 73(3), 263-272.
- McHugh, D. (2003). A guide to the seaweed industry FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Megharaj M, Pearson HW, y Venkateswarlu K. (1992). Removal of nitrogen and phosphorus by immobilized cells of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus bijugatus* isolated from soil. *Enzyme Microbiol. Technol.* 14:656–658.

- Metcalf y Eddy, Inc., Tchobanoglous, G., Burton, F., Stensel, H. (2002). Wastewater engineering: treatment and reuse. 4th edition. McGraw-Hill profesional. USA. p.1030
- Moreno, I., Campana, O., Lubian, L., y Blasco J. (2005) Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation. Mar. Pollut. Bull. 51(8-12): 823-9.
- Morita, M., Watanabe, Y., y Saiki, H. (2000). High photosynthetic productivity of green microalga *Chlorella sorokiniana*. Applied biochemistry and biotechnology, 87(3), 203-218.
- Moronta, R, Mora, R, y Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. Revista de la Facultad de Agronomía, 23(1), 28-43.
- Morris, H., M. Quintana, A. Almarales y Hernández, L. (1999). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. Rev. Cubana Aliment. Nutr., 13(2): 123-128.
- Olguín, E. J. (2003). Phycoremediation: key issues for cost-effective nutrient removal processes. Biotechnology advances, 22(1-2), 81-91.
- Ortiz, M., Cortés, C., Sánchez, J., Padilla, J., y Otero, A. (2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotroficas y mixotroficas. ORINOQUIA, 16(1), 11-20.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., Joseph, N., y Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. Brazilian Journal of Microbiology, 40(2), 269-275.

- Pérez, R. (2009). Eliminación de nutrientes para el tratamiento biológico de agua residual usando un sistema inmovilizado microalga-bacteria en crecimiento autotrófico, heterotrófico y mixotrófico. [Tesis de Maestría, Centro de investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C].
- Puente, M. E., Li, C. Y., y Bashan, Y. (2009). Endophytic bacteria in cacti seeds can improve the development of cactus seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 66(3), 402-408.
- Ramalho, R. (2003). Tratamiento de Aguas Residuales. Barcelona: España, Editorial Reverté, S.A.
- Ramírez, M. R. H. (2019). Efecto de la temperatura en el crecimiento de microalgas y la remoción de nutrientes en agua de invernaderos. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Querétaro].
- Rawat, I., Kumar, R. R., Mutanda, T., y Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied energy*, 88(10), 3411-3424.
- Ruiz-Martínez, A., Serralta, J., Seco, A., & Ferrer, J. (2015). Effect of temperature on ammonium removal in *Scenedesmus* sp. *Bioresource technology*, 191, 346-349.
- Salvucci, M. E., y Crafts-Brandner, S. J. (2004). Inhibition of photosynthesis by heat stress: the activation state of Rubisco as a limiting factor in photosynthesis. *Physiologia plantarum*, 120(2), 179-186.
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (2000). Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*, 107(1), 145-151.
- Tam, N. F. Y., Lau, P. S., y Wong, Y. S. (1994). Wastewater inorganic N and P removal by immobilized *Chlorella vulgaris*. *Water Science and Technology*, 30(6), 369.

- Tejera, B., Rojas, M., y Heydrich, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 42:131-138.
- Travieso, L., Benitez, F., y Dupeiron, R. (1992). Sewage treatment using immobilized microalgae. *Bioresource technology*, 40(2), 183-187.
- Trejo, A., de-Bashan, L. E., Hartmann, A., Hernandez, J. P., Rothballer, M., Schmid, M., y Bashan, Y. (2012). Recycling waste debris of immobilized microalgae and plant growthpromoting bacteria from wastewater treatment as a resource to improve fertility of eroded desert soil. *Environmental and Experimental Botany*. 75, 65-73.
- Vessey, J.K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586
- Voltolina, D., Cordero, B., Nieves, M., y Soto, L. P. (1999). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource technology*, 68(3), 265-268.
- Xin, L., Hong-ying, H. y Yu-ping, Z. (2011). Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology*, 102(3), pp.3098–3102.
- Zhang, Q., Zhan, J. J., y Hong, Y. (2016). The effects of temperature on the growth, lipid accumulation and nutrient removal characteristics of *Chlorella* sp. *HQ. Desalination and Water Treatment*, 57(22), 10403-10408.
- Zhou, L. N., Wu, F., Zhao, Z., y Wang, B. (2015). Effects of environmental factors on nitrogen and phosphorus removal by *Chlorella vulgaris* in wastewater. *Current Biotechnology*, (Jan. 25, 2015), 5(1), 60-65.