

Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery

**Charity E. Andrade R.¹, Alexandra L. Vera B.¹, Carmen H. Cárdenas L.²
y Ever D. Morales A.^{1*}**

¹Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Apartado Postal 526. Maracaibo 4001-A, Venezuela.
evermster@gmail.com (0261)7597734 (0414)3602104.

²Centro de Investigación del Agua, Facultad de Ingeniería. Universidad del Zulia.

Abstract

The microalgae represent an alternative for the treatment of wastewater for his capacity of removal of nutrients and high commercial value of produced biomass. There was evaluated the growth, removal of nutrients and organic matter of Microalgae *Scenedesmus* sp. in wastewater derived from remains of fish. Discontinuous cultures were in use in tanks to sky opened with 150L, constant aeration and in conditions no controlled of photoperiod and temperature. The growth of microalgae we evaluated by means of cell counting, dry weight and content of pigments, realizing the compilation of the same one in stationary phase by means of natural sedimentation, and effecting physicochemical analyses to the biomass dried to the sun. The microalgae grew in wastewater to opened sky, reporting efficiencies of removal of 94.44% (23.80 mg/L) for ammonia nitrogen, 77.54% (7.04 mg/L) for phosphates and 35.59 % (26.09 mg/L) for organic matter. The dry biomass recollected was a component of high contained protein (24,41%), fibrous (10,04%), with levels of fats (2,47%) and mineral (23,52%) adapted to complement the animal nutrition. These results showed that *Scenedesmus* can be used for the treatment of wastewater by production of a biomass of added value.

Key words: Microalgae, wastewater, removal, recollection, biomass.

Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería

Resumen

Las microalgas representan una alternativa para el tratamiento de aguas residuales por su capacidad de remoción de nutrientes y alto valor comercial de la biomasa producida. Se evaluó el crecimiento, remoción de nutrientes y materia orgánica de la microalga *Scenedesmus* sp. en aguas residuales derivadas de restos de pescadería. Se utilizaron cultivos discontinuos en tanques a cielo abierto con 150L, aireación constante y en condiciones no controladas de fotoperiodo y temperatura. Se evaluó el crecimiento de la microalga mediante recuento celular, peso seco y contenido de pigmentos, realizando la recolección de la misma en fase estacionaria mediante sedimentación natural, y efectuando análisis fisicoquímicos a la biomasa secada al sol. La microalga creció en agua residual a cielo abierto, reportando eficiencias de remoción de 94,44% (23,80mg/L) para nitrógeno amoniacal, de 77,54% (7,04mg/L) para fosfatos y de 35,59% (26,09mg/L) para materia orgánica. La biomasa seca resultó ser un componente de alto contenido proteico (24,41%), fibroso (10,04%), con niveles de grasa (2,47%) y minerales (23,52%) adecuados para complementar la nutrición animal. Estos resultados demostraron que *Scenedesmus* puede ser utilizada para el tratamiento de aguas residuales con la producción de una biomasa de valor agregado.

Palabras clave: Microalga, agua residual, remoción, recolección, biomasa.

Introducción

Las aguas residuales, ya sean de origen doméstico, animal o industrial, debido a su alto contenido de nutrientes (N y P) constituyen un medio apropiado para el crecimiento de microalgas, las cuales han demostrado su capacidad de remover cantidades apreciables de nitrógeno y fósforo para su desarrollo [1].

El uso de microalgas como depuradoras de aguas residuales, surge a comienzos de los años 50, cuando Oswald y colaboradores, sugirieron la utilización de cultivos masivos de microalgas para el tratamiento de aguas residuales y producción de proteína, simultáneamente [2].

Las microalgas comúnmente utilizadas han sido *Chlorella* y *Scenedesmus* [3, 4], empleadas en el tratamiento de residuales provenientes de plantas de tratamientos convencionales [5, 6], aguas residuales industriales [7, 8] y residuos animales [9, 10]. Así como en la producción masiva de biomasa para fines comerciales [11, 4].

El proceso integral de tratamiento de aguas residuales usando cultivos de microalgas, presenta ventajas tan importantes como son: el mejoramiento de la calidad del efluente, mediante un mecanismo de bajo costo energético con el aprovechamiento de nutrientes que estaban siendo desechados y que son incorporados a la biomasa; la cual presenta un alto valor comercial [12]. Esta biomasa según su composición química, puede convertirse en fuente productora de fertilizantes, alimentos animales (avicultura, ganado porcino, ganado vacuno y acuicultura), energía, además de otras aplicaciones en la industria química, biomedicina y farmacología [13, 14, 12].

La presente investigación tuvo por finalidad utilizar aguas residuales de pescadería para la producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. con lo que se pretende evaluar la capacidad de remoción de nutrientes de la misma y la calidad de la biomasa producida en conexión con este tratamiento.

Parte Experimental

Microorganismo seleccionado

Se utilizaron cultivos unialgales de la microalga de agua dulce *Scenedesmus* sp., sumi-

nistrada por el Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Esta microalga fue aislada de la Laguna Gato Negro ubicada 10°47' latitud Norte y 71°38' longitud Oeste sobre la costa Noroeste del Lago de Maracaibo, Municipio Maracaibo del Estado Zulia-Venezuela [15].

Esta microalga pertenece a la división Chlorophyta, Clase Chlorophyceae, Orden Chlorococcales, familia Scenedesmaceae y puede encontrarse solitaria o en parejas formando cenobios [15]. *Scenedesmus* fue seleccionada por su capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en las aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada y capacidad de resistir variaciones ambientales lo que la hacen sobrevivir y ser un género común de aguas residuales [12].

El inóculo de la microalga se produjo utilizando como medio de cultivo Nitrofoska Foliar a una concentración de 5 mL/L, lo que equivale a una concentración de nitrógeno amoniacal, nitrógeno total kjeldahl, fosfato y demanda química de oxígeno de 3,08; 7,84; 7,21 y 30,97 mg/L, respectivamente. Inicialmente el inóculo se reprodujo a nivel de laboratorio bajo condiciones controladas de temperatura 26±2°C, iluminación de 156 $\mu\text{mol}\cdot\text{quanta}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, fotoperiodo 12h:12h y aireación constante sin CO₂, hasta alcanzar los 12 L cuando mostró un pH de 7,80; y luego, fue transferido a tanques de asbesto a cielo abierto de 1,04×1,04×0,55 m (aproximadamente 600 L de capacidad), donde se aumentó su volumen hasta 150 L. Esto se realizó con la finalidad de promover la adaptación del mismo a las condiciones de ensayo.

Medio de cultivo

Se empleó agua residual de pescadería; preparada a partir de la mezcla de 7,5 Kg de restos de pescado compuestos de 30% piel, 30% cabezas y colas, 40% vísceras, obtenidos de una pescadería comercial, con 80 L de agua potable, estos se agitaron vigorosamente y se filtraron por gravedad utilizando una gasa tipo USP VII para separar los restos sólidos de mayor tamaño. El volumen de agua residual así obtenido, se mantuvo con aireación constante a temperatura ambiente bajo sombra (26±2°C) durante tres días,

con la finalidad de inducir la biodegradación aeróbica de la misma, por parte de su flora bacteriana asociada [1]. Luego, este residual fue aumentado hasta 150 L con agua potable, obteniendo una concentración de final de $50g_{\text{residuos}}/L$, lo que representó la siguiente composición química: nitrógeno amoniacal 23,52 mg/L, nitrógeno total kjeldahl 25,20 mg/L; fosfato 6,01 mg/L, demanda química de oxígeno 75,83 mg/L y un pH de 9,80.

Como cultivo de control se empleó agua potable enriquecida con un nutriente comercial (Nitrofoska Foliar) a una concentración de 5 mL/L en agua potable.

Sistema de cultivo

Los cultivos fueron iniciados con un inóculo de $1,0 \times 10^6$ cel/mL de la microalga *Scenedesmus*, en tanques de asbesto, de 600 L de capacidad conteniendo un volumen de 150 L de medio de cultivo y manteniéndose bajo condiciones de iluminación y fotoperiodo natural, y una temperatura que osciló entre los $30 \pm 4^\circ C$, con un máximo de $34^\circ C$ en horas del medio día (12:00am a 2:00pm).

Evaluación del crecimiento poblacional y análisis fisicoquímicos de la biomasa microalgal

El crecimiento de la microalga se evaluó cada tres días, a través de contajes celulares en cámara de Neubauer de 0,1 mm de profundidad. En la fase estacionaria (15 días) se retiró la aireación de los cultivos, a fin de inducir la sedimentación de la biomasa por espacio de tres días; posteriormente la biomasa se separó del sobrenadante por decantación y se colocó extendida en bandejas con un espesor menor o igual a 1cm, para su secado al sol (de 1 a 3 días).

La biomasa seca y pulverizada con un mortero, se evaluó en cuanto a su contenido de humedad, cenizas, proteína total [19], fibra cruda, extracto etéreo y nutrientes digeribles totales [20]. El contenido de pigmentos (clorofila *a*, *b* y carotenoides totales) se determinó en la biomasa fresca, utilizando acetona:metanol (2:1) como solvente de extracción y aplicando las ecuaciones de Jeffrey y Humprey [16] y Strickland y Parson [17].

La concentración de nutrientes y materia orgánica se determinó mediante análisis de nitrógeno amoniacal, nitrógeno total kjeldahl (nitrógeno amoniacal+nitrógeno orgánico), ortofosfato y demanda química de oxígeno, al inicio y al final del ensayo [18].

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor para la comparación de medias, aplicando la prueba Scheffé a un nivel de significancia de 0,05; junto a un análisis de correlación lineal utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Estos análisis se realizaron utilizando programa SPSS 10.0 para Windows.

Resultados

El crecimiento de *Scenedesmus* sp. tanto en el agua residual de pescadería como en el control mostró desde el inicio del ensayo un crecimiento exponencial, indicando la rápida adaptación de la microalga al medio residual en condiciones mixotróficas (Figura 1). De igual manera, la curva de crecimiento en ambos tratamientos fue similar y en fase estacionaria, tomaron valores de densidades celulares alcanzadas sin diferencia significativa ($p > 0,05$), de $8,05 \pm 0,55 \times 10^6$ cel/mL y $7,39 \pm 0,18 \times 10^6$ cel/mL en el cultivo con el agua residual de pescadería y el control, respectivamente.

De acuerdo al contenido de nutrientes (N y P) y de materia orgánica (DQO) en ambos medios de cultivos, se puede indicar que el agua residual de pescadería contiene una concentración de nitrógeno significativamente mayor ($p < 0,05$), que el control. No obstante, a pesar de estos altos valores en el medio residual, la microalga exhibió un comportamiento de crecimiento sin diferencia significativa ($p > 0,05$).

El contenido de pigmentos y masa seca de los cultivos (Tabla 1), al igual que en el crecimiento, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el tratamiento con agua residual y el control. Esto significa que en cuanto a la clorofila se produjeron valores de $2,94 \pm 0,15$ y $2,23 \pm 0,22 \mu g/mL$; de carotenoides de $1,11 \pm 0,03$ y $0,89 \pm 0,04 \mu g/mL$ y de masa seca con $0,39 \pm 0,03$ y $0,44 \pm 0,01$ mg/mL, para el control y agua residual de pescadería, respectivamente.

El avance de los cultivos estuvo acompañado de la disminución del contenido de nitrógeno en el medio de cultivo (Figura 2), reportándose una remoción total de nitrógeno amoniacal del 100% en ambos tratamientos; lo cual representa 23,52 mg/L y 3,08 mg/L, para el agua residual de pescadería y control, respectivamente.

Para el caso del nitrógeno total, la remoción observada no tuvo diferencia significativa con respecto a la reportada para nitrógeno amoniacal, removiendo 23,80 y 3,15 mg/L, lo que representa un 94,44 y 40,18%, para el tratamiento con agua residual de pescadería y control, respectivamente.

En cuanto a la remoción de fosfato (Figura 3), el tratamiento con agua residual de pescadería logró una remoción de 4,66 mg/L de fosfato; lo que represento el 77,54% del contenido inicial; mientras que, el tratamiento de control superó esta cantidad removiendo 7,04 mg/L equivalente a 97,64%.

La remoción de materia orgánica, en el agua residual de pescadería, fue de 26,99 mg/L (35,59%). En cambio, en el control fue de 22,97 mg/L (71,17%) (Figura 4).

La producción de biomasa seca de *Scenedesmus* fue ligeramente superior en el cultivo con agua residual de pescadería con respecto al control, para un periodo de 15 días (Tabla 2). El contenido de humedad fue menor del 10%, tanto para el tratamiento control, como para el agua residual de pescadería. El contenido de cenizas, estuvo por debajo del 30% para ambos tratamientos, registrando el mayor valor en el control con 28,13%.

El contenido de proteínas de la biomasa de *Scenedesmus* sp. fue de 33,15 y 24,41% para control y agua residual de pescadería, respectivamente. Esta última reportó menores valores de carbohidratos insolubles (fibra cruda) con 10,04%.

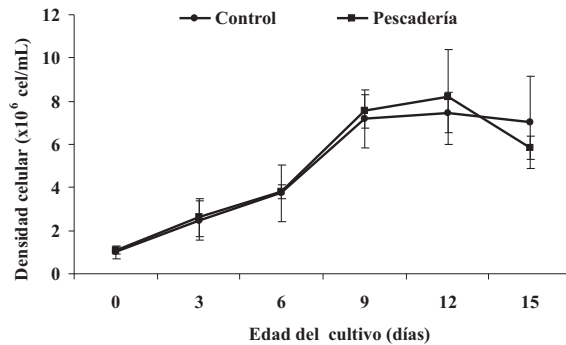


Figura 1. Crecimiento (x10⁶ cel/mL) de *Scenedesmus* sp.

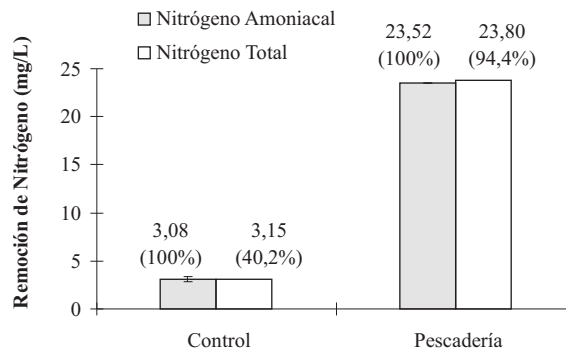


Figura 2. Remoción de nitrógeno amoniacal y total, en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.

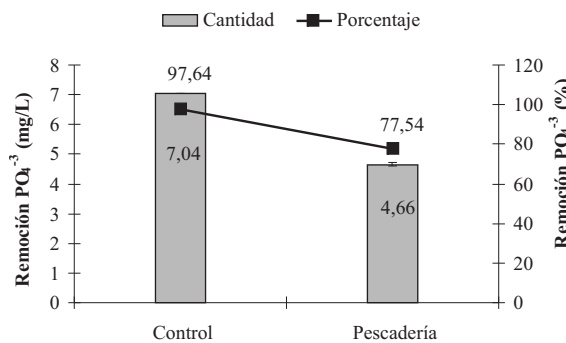


Figura 3. Remoción de fosfato en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.

Tabla 1
Crecimiento, contenido de pigmentos (clorofila a y b; carotenoides totales) y masa seca de *Scenedesmus*, en fase estacionaria (15 días)

Tratamiento	Crecimiento (x10 ⁶ cel/mL)	Clorofila (mg/mL)	Carotenoides (mg/mL)	Masa seca (mg/mL)
Control	7,39±0,18	2,94±0,14	1,11±0,03	0,39±0,03
Pescadería	8,05±0,55	2,24±0,22	0,89±0,04	0,44±0,01

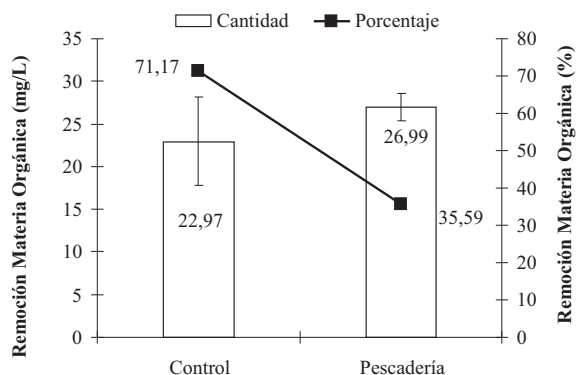


Figura 4. Remoción de materia orgánica en el cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.

El extracto etéreo (EE), estuvo por debajo del 3% para este ensayo, reportándose valores de 2,97 y 2,47% para el control y el tratamiento de pescadería respectivamente, sin diferencia significativa.

En general, el contenido de nutrientes digeridos totales en la biomasa seca de *Scenedesmus* sp. cultivada en agua residual derivada de restos de pescado, fue superior (59,91%) al presentado por el cultivo de control (56,13%).

Discusión

Crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp.

Scenedesmus sp. logró adaptarse a las condiciones de cultivo externas, tanto a temperaturas diurnas elevadas de $30 \pm 4^\circ\text{C}$, como a periodos de lluvias ocasionales; exhibiendo en todo momento un cultivo unialgal. Es decir, a pesar de ser cultivos a cielo abierto, no se observó presencia de otras especies de microalgas o de cianobacterias contaminantes; lo cual indica una ventaja

competitiva para estos tipos de cultivos a escala piloto. No obstante, se mantuvo la flora bacteriana asociada a *Scenedesmus*, presente en los cultivos en condiciones de laboratorio (resultado no presentados).

Anteriormente, Chacón y col. [4], evaluaron el crecimiento de esta microalga utilizando un medio de cultivo comercial (ALGAL) para la producción de biomasa en cultivo masivo a cielo abierto de un volumen de 500 L, y entre los resultados se destacó que, de igual forma, la microalga *Scenedesmus* sp. se adaptó a condiciones ambientales no controladas de temperatura ($26 \pm 6^\circ\text{C}$) e iluminación natural, produciendo una biomasa microalgal seca con posibles aplicaciones en alimentación animal.

Otras microalgas también han sido empleadas a cielo abierto para el tratamiento de aguas residuales. Tal fue el caso de *Chlorella* sp., cultivada en lagunas externas de $1,5 \text{ m}^3$ de capacidad, con efluentes pesqueros a 35°C y pH entre 7 y 9 [8].

El crecimiento obtenido utilizando el agua residual de pescadería y la producción de pigmentos y peso seco, sugieren que el cultivo preparado a base de restos de pescado puede ser usado como una fuente de nutrientes para la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp. a cielo abierto, estableciéndose como alternativa frente al medio de cultivo comercial; con lo cual se estarían reduciendo los costos de producción y mejorando la eficiencia de la utilización de desechos de pescados, como fuente de nutrientes para el crecimiento de microalgas de interés económico.

Remoción de nitrógeno, fósforo y materia orgánica

El crecimiento de esta microalga produjo un mejoramiento notable en la calidad del agua

Tabla 2
Composición fisicoquímica de la biomasa de *Scenedesmus* sp.

Muestra	Contenido (%)						Producción (g/L)
	H	CEN	PT	EE	FC	NTD	
Control	7,85	28,13	33,15	2,97	11,83	56,13	0,31
Pescadería	8,07	23,52	24,41	2,47	10,04	59,91	0,37

H: Humedad; CEN: Cenizas; PT: Proteína verdadera; EE: Extracto etéreo; FC: Fibra cruda; NTD: Nutrientes digeribles totales.

residual, debido a la reducción en las concentraciones de nitrógeno amoniacal, fosfato y materia orgánica. La remoción total alcanzada para el nitrógeno amoniacal, resulta superior a la reportada en estudios anteriores utilizando cultivos semicontinuos de la microalga *Scenedesmus obliquus* en agua residual artificial, los cuales han logrado remociones máximas de 9,27 mg/L.d, lo que representó más del 70% de la concentración inicial [21].

La remoción de nutrientes (N y P) obtenida para este ensayo, no tuvo relación directa con la densidad celular de la microalga alcanzada en los tratamientos, razón por la cual, la remoción de nutrientes en estos cultivos se puede además vincular a factores como la volatilización del amonio y la deposición del fosfato como sales insolubles, que se favorecen a los elevados pH causados por el proceso de fotosíntesis de la microalga [7, 21, 22]. Es decir, el elevado pH (8-9), la agitación constante y las elevadas temperaturas (30 ± 4 °C) en las que se mantuvieron ambos tratamientos, hace posible que parte del nitrógeno removido en estos se deba a la volatilización favorecida bajo estas condiciones [23].

Igualmente, la remoción de fosfato del medio no tuvo relación directa con el crecimiento de la microalga. Sin embargo, se registró una menor remoción de fosfato en el agua residual de pesquería, que pudo ser el resultado de la reincorporación de este nutriente al medio. Es decir, al finalizar el cultivo, la microalga iniciaba la fase de muerte, en la cual se induce la ruptura celular, liberando así parte del fosfato incorporado.

Resultados similares se reportaron para cultivos de *Chlorella pyrenoidosa* en aguas residuales; los cuales removieron en un período de 4 días, más del 60% del fósforo total en el agua, y al final del tratamiento (luego de 22 días) se registró una remoción total de 70-80%. Estos resultados se atribuyen al incremento que podría causar la liberación de fósforo total, de células muertas que observaron en el fondo de los frascos de cultivo [24].

La remoción de materia orgánica obtenida, se debe principalmente a la descomposición realizada por las bacterias, por no encontrarse relación directa entre el crecimiento celular de las microalgas y esta remoción. De igual forma, Lau y col. [2] reportaron que la remoción de materia

orgánica medida como demanda química de oxígeno (DQO) no estuvo relacionada con el número de células o contenido de clorofila de la microalga *Chlorella vulgaris*, verificando que el control no inoculado con la microalga exhibió una remoción similar al tratamiento con la microalga, lo que sugiere que la remoción de materia orgánica se debe principalmente al metabolismo de las bacterias presentes.

Composición química de la biomasa de *Scenedesmus* sp.

La biomasa seca cosechada en agua residual de pesquería consistió mayormente de materia orgánica, reportando un contenido mineral (cenizas) menor al control. Ambos tratamientos estuvieron por debajo del valor reportado para algas marinas, lo que se debe a la diferencia en los medios de cultivos utilizados, ya que, el medio marino a diferencia del residual de pesquería, es rico en elementos minerales y las algas presentan una gran capacidad para almacenarlos [25, 26]. Según Boussiba y Richmond [27], el contenido proteico de las microalgas depende de la fuente de nitrógeno suministrada. De tal manera, que para la producción de proteínas es necesario nitrógeno disponible en cantidad suficiente [28]. En este ensayo los valores de proteínas superaron hasta dos veces los de algas verdes marinas (proteína cruda < 11,5%) [29]. Así como, el presentado por algunos cereales como el maíz, trigo y avena e ingredientes usados en la alimentación animal [30, 31]. Estos resultados también fueron similares a los reportados por Quevedo [32], quien evaluó el crecimiento de *Scenedesmus* sp en diferentes medios de cultivo reportando porcentajes de proteína en la biomasa seca que variaron entre 24,9 y 35,2%.

El contenido de fibra cruda considerada como el componente carbohidrato no digerible [32], estuvo en el rango estimado para las algas marinas, entre 3,9 y 13,5%. No obstante, fue menor al reportado por ingredientes empleados frecuentemente en la alimentación animal y considerados altamente fibrosos, como el heno de alfalfa y de avena, con un contenido entre 25% y 35% [30, 31]. Por su parte, el extracto etéreo [14] fue superior al presentado para las algas verdes marinas como *Enteromorpha* sp [22], así como el reportado para cereales (arroz y cente-

no) y leguminosas el cual se encuentra por debajo del 2% [30].

En cuanto al proceso de secado de la biomasa de *Scenedesmus* sp. al sol, se demostró que puede ser almacenada en condiciones apropiadas por largo tiempo, sin peligro de contaminación por el desarrollo de bacterias y hongos, ya que, estos organismos tienen como ambiente propicio un contenido de humedad mayor al 10% [28]. Por tanto, el secado al sol, resultó ser un método efectivo, de bajo costo para la deshidratación dicha biomasa. En estudios anteriores se ha reportado para algas marinas secadas al sol, valores de humedad menores a 11%, los que igualmente se consideran apropiados para la preservación de las mismas [29].

El contenido de humedad, proteína verdadera y fibra cruda obtenidas para este ensayo son similares a los resultados reportados por Morris y col. [34], quienes estudiaron la composición bioquímica y la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris* cultivada a cielo abierto en una instalación experimental, recogida por centrifugación y secada mediante un secador de rocío. Así mismo, el contenido de proteína y nutrientes digeribles totales fue superior a la descrita por la planta Morera (*Morus alba*) utilizada como complemento alimenticio para vacas lecheras, la cual presenta un contenido de proteína cruda >17%, fibra neutro detergente <55% y una concentración de nutrientes digestibles de 56% [35].

Conclusiones

La microalga *Scenedesmus* sp. mostró un crecimiento significativo con agua residual derivada de restos de pescado fresco; lo que sugiere ser una fuente de nutrientes adecuada para la producción de biomasa microalgal.

La remoción de nutrientes y materia orgánica obtenida en las aguas residuales cultivadas con *Scenedesmus* sp. demuestra su efectividad en el tratamiento de las mismas, reportando eficiencias del 100% para nitrógeno, del 78% para fosfatos y del 36% para materia orgánica.

Según el contenido de proteínas, fibra cruda, extracto etéreo y minerales; la biomasa seca de *Scenedesmus* cultivada a cielo abierto con agua de pescadería, representa un componente

con alto contenido proteico, fibroso con niveles de grasas y sales minerales adecuados para complementar la nutrición de animales, a la cual se suma un alto porcentaje de nutrientes digeribles totales. Un aspecto importante antes de recomendar el uso de la biomasa de *Scenedesmus*, cultivada a cielo abierto con agua de pescadería, como alimento para animales es determinar su contenido de metales pesados, debido a que ciertos residuos de pescadería han mostrado concentraciones significativas de ciertos metales pesados.

Referencias Bibliográficas

1. Kwangyong, L. y Choul-Gyun, L. "Nitrogen removal from wastewater by microalgae without consuming organic carbon sources". *Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 12 (2002), 979-985.
2. Lau, P.; Tam, N. y Wong, Y. "Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater". *Environmental Pollution* Vol. 89 (1995) 59-66.
3. Tam, N. y Wong, Y. "Wastewater Nutrients Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp". *Environmental Pollution*, Vol. 58 (1989) 19-34.
4. Chacón, C.; Andrade, C.; y Morales, E. "Producción de Biomasa de la Microalga *Scenedesmus* sp. en Cultivo Masivo y a Cielo Abierto". X Jornadas Nacionales de Investigación Científica. Maracaibo, Estado Zulia. Venezuela, 2004. 115pp.
5. Lavoie, A. y De la Noüe, J. "Hyperconcentrated Cultures of *Scenedesmus obliquus*: A New Approach for Wastewater Biological Tertiary Treatment". *Water Research*. Vol. 19 (1985) 1437-1442.
6. Tam, N. y Wong, Y. "The Comparison of Growth and Nutrient Removal Efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* in Settled and Activated Sewage". *Environmental Pollution*. Vol. 65 (1990) 93-108.
7. González L., Cañizales R. y Baena S. "Efficiency of Ammonia and Phosphorus Removal from a Colombian Agroindustrial Wastewater by the Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*". *Bioresource Technology* Vol.60 (1997) 259-262.

8. Romero, T.; Miyashita, H. y Kurano, N. "Crecimiento y composición bioquímica de *Chlorella* sp. cultivada en residual pesquero". Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas, Vol. 34 No2, (2000) 93-100.
9. Travieso, L. y Benítez, S. "Unicellular Growth on Swine Waste". Science and Technique on Agriculture. Piggery. Vol. 5 No3, (1982) 89-99.
10. Rosales N., Bermúdez J., Moronta R. y Morales E. "Gallinaza: Un residual avícola como fuente alternativa de nutrientes para producción de biomasa microalgal". Revista Colombiana de Biotecnología, Vol.9 No1, (2007) 41-48.
11. Voltolina D., Gómez H. y Correa G. "Biomass production and nutrient removal in semicontinuous cultures of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater under a simulated day-night cycle". Vie Milieu, Vol. 54 No1, (2004) 21-25.
12. González, M. "Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales". Contactos, Vol. 59 (2006) 64-70.
13. Borowitzka, M. y Borowitzka, L. "Vitamins and Fine Chemical from Microalgae". Micro-algal Biotechnology. (1988) 153-196.
14. Abalde, J.; Cid, A.; Fidalgo, P.; Torres, E. y Herrero, C. "Microalgas: Cultivo y Aplicaciones". Universidad de Da Coruña. España. (1995) 210pp.
15. Villasmil, T. "Aislamiento, Identificación y cultivo de cianobacterias presentes en la Laguna Gato Negro, Municipio Maracaibo, Estado Zulia". La Universidad del Zulia. Maracaibo, República Bolivariana de Venezuela, 2004. 90pp.
16. Jeffrey, S. y Humphrey, G. "New spectrophotometric equations for determinations Chlorophylls *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in higher plants, algae and natural populations". Biochemie und Physiologie der Pflanzen Vol. 167 (1975) 191-194.
17. Strickland, J. y Parson, T. "A practical handbook of seawater analysis fisheries research board of Canada". Journal of the Fisheries Research Board of Canada. Bulletin 167 (1972). 311pp.
18. AWWA. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater". American Water Works Association, 21st Edition. 2005. 900pp.
19. Herbert D., Phipps P. y Strange R. "Chemical analysis of microbial cells. In: Methods in Microbiology 5B". Academic Press, London. 1971. 209-344.
20. AOAC. "Official Methods of Analysis of AOAC Internacional" 18th Edition. Vol. 1 Agricultural Chemicals, Contaminants, Drugs, 2005. 2200 pp.
21. Voltolina D., Gómez H. y Correa G. "Nitrogen removal and recycling by *Scenedesmus obliquus* in semicontinuous cultures using artificial wastewater and simulated light and temperature cycled". Bioresource Technology, Vol. 96 No.3, (2005) 359-362.
22. Talbot P. y De la Noüe J. "Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium bohneri* (Schindler) under various light and temperature conditions". Water Research Vol. 27 (1993) 153-159.
23. Liao P., Chen A. y Lo K. "Removal of nitrogen from swine manure wastewaters by ammonia stripping". Bioresource Technology, Vol. 54 No1, (1995) 17-20.
24. Tam, N. y Wong, Y. "Wastewater Nutrients Removal by *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus* sp". Environmental Pollution, Vol. 58 (1989) 19-34.
25. Piña P., Ortega M. y Landeros D. "Contribución al estudio de la composición química del alga mexicana *Ulva fasciata* Delile". Serie Botánica, UNAM., Vol. 54(1983) 243-246.
26. Castro G., Pérez F., Pérez E. y Carrillo D. "Chemical composition of the green alga, *Ulva lactuca*". Ciencias Marinas, Vol. 22 No.2, (1996) 205-213.
27. Boussiba, S. y Richmond A. "C-phycocyanin as a storage protein in the blue-green algae *Spirulina platensis*". Archiv für Microbiologie Vol.125 (1980)143-147
28. Becker, E. "Microalgae Biotechnology and Microbiology". Cambridge, University. 1995. 304pp.
29. Carrillo S., Casas M., Ramos, F., Pérez, F. y Sánchez, I. "Algas marinas de Baja California

- Sur, México: Valor nutrimental". Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN). Vol. 52 No 4 Caracas, Venezuela, (2002). 400-405.
30. Chávez M., Chávez V., Roldán A., Ledesma S., Mendoza M., Pérez F.; Hernández C. y Chaparro F. "Tablas de valor nutritivo de los alimentos de mayor consumo en Latinoamérica". Editorial Pax, México, 1996. 330pp.
31. Bondi A. "Animal Nutrition. John Wiley and Sons". Great Britain. 1987. 562pp.
32. Quevedo O., Morales S. y Acosta A. "Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal". Vitae, Vol. 15 No1, 2008. 25-31.
33. Tacón A. "Nutrición y alimentación de peces y camarones cultivados manual de capacitación Brasil". Vol. 4(1989), 592pp.
34. Morris H., Quintana M., Almarales A. y Hernández N. "Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*". Revista Cubana de Alimentación y Nutrición. Vol. 13 No2, (1999) 123-128.
35. Boschini C. "Nutrientes digeribles, energía neta y fracciones proteicas de la Morera (*Morus alba*) aprovechables en vacas lecheras". Agronomía Mesoamericana, Vol. 17 No2, (2006) 141-150.

Recibido el 16 de Septiembre de 2008
En forma revisada el 15 de Junio de 2009