

Remoción de contaminantes y crecimiento del alga *Scenedesmus* sp. en aguas residuales de curtiembres, comparación entre células libres e inmovilizadas

A.G. Rosales¹, C.D. Rodríguez², y
M. Ballen-Segura³

Recepción: 14-04-2018 | Aceptación: 27-07-2018 | En línea: 23-11-2018

doi:10.17230/ingciencia.14.28.1

Resumen

Las aguas residuales de curtiembres conllevan un problema ambiental y de salud, debido a las altas concentraciones de contaminantes como el cromo, sulfuros, entre otros. Una forma de realizar el tratamiento de estas aguas es por medio del uso de microorganismos tales como las microalgas, debido a su capacidad de utilizar los compuestos inorgánicos y acumular metales y otras sustancias contaminantes. Esta capacidad podría verse magnificada con la inmovilización celular en diferentes matrices. En este artículo se presenta una evaluación de la capacidad de crecimiento y de remoción de nitrógeno, fósforo y cromo por parte de la microalga *Scenedesmus* sp., comparando la eficiencia entre las células libres e inmovilizadas en una matriz de esponja de *Luffa*. De esta manera, se obtuvo un mayor crecimiento en las células libres en comparación a las inmovilizadas, aunque sin diferencias significativas entre ambos experimentos. En ambos casos se observaron remociones superiores al 90 % para NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} y cromo total, así

¹ Universidad Sergio Arboleda, ana.rosales@usa.edu.co, Bogotá, Colombia.

² Universidad Sergio Arboleda, carlosd.rodriguez@usa.edu.co, Bogotá, Colombia.

³ Universidad Sergio Arboleda, miguel.ballen@usa.edu.co, <https://orcid.org/0000-0003-4998-8278>, Bogotá, Colombia.

como una reducción importante de la DBO y DQO (> 97%) que puede deberse a efecto sinérgico con las bacterias presentes en los cultivos de la microalga. Finalmente, los porcentajes de lípidos en ambos casos fueron superiores al 20% indicando que esta biomasa podría presentar un alto potencial como materia prima para la generación de biodiesel.

Palabras clave: Cromo; curtiembres; fitorremediación; microalga; inmovilización celular; DBO; DQO.

Pollutant Remotion and Growth of *Scenedesmus* sp. on Wastewater from Tannery. A Comparison Between Free and Immobilized Cells

Abstract

Tannery wastewater are a public health and ecosystem hazard, due to the high concentration of contaminants such as chrome, sulfides and others. One way to treat these waters is by the use of microorganisms such as microalgae due to their capacity to use the inorganic compounds, as well as to accumulate metals and other contaminant substances; ability that could be improve with cellular immobilization. In this paper, the growth and removal of nitrogen, phosphorus and chrome by the microalgae *Scenedesmus* sp. were evaluated, comparing the rates between free and immobilized cells in a *Loofa* matrix. In this way, a higher growth in the free cells was obtained, compared to the immobilized ones. However, there were no significant differences between removals of contaminants. In both cases, higher reductions than 90% for NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{3-} and Chromium, as well as a significant reduction in BOD and COD (> 97%) were obtained, probably by a synergy effect between algae and bacteria presents in the culture. Finally, lipids in both cases were higher than 20%, showing that this biomass could present a high potential as a raw material for the generation of biodiesel.

Keywords: Chromium; cell immobilization; microalgae; phycoremediation; tannery; BOD; COD.

1 Introducción

Las curtiembres son consideradas una de las industria más contaminantes [1]. Durante los procesos de pelambre y curtido se utilizan grandes volúmenes de agua y las pieles son puestas en contacto con azufre y cromo, por lo cual se generan efluentes industriales ricos en estos elementos, que pueden terminar siendo vertidos sin ningún tratamiento directamente sobre

los cuerpos de agua naturales, especialmente en países en vía de desarrollo como Colombia. De igual forma, estas aguas residuales presentan altos valores de DBO y DQO además de nitrógeno y fósforo, lo que puede generar procesos de eutrofización en sistemas naturales con la subsecuente pérdida de biodiversidad y problemas de salud pública [2].

Debido a esta problemática, múltiples tratamientos han sido propuestos con el fin de reducir el potencial contaminante de estas aguas. Estos incluyen tratamientos fisicoquímicos como la filtración [3],[4], coagulación, floculación y oxidación electroquímica [5],[6],[7], entre otros. Sin embargo, estos tratamientos suelen ser complejos y costosos, especialmente cuando deben ser utilizados en países como Colombia, donde la industria del curtido es principalmente artesanal y llevada a cabo por familias de bajos recursos. Es por esto que los tratamientos biológicos han ido ganando importancia bajo estas circunstancias, ya que pueden ser más económicos, fáciles de instalar y operar, además de generar una biomasa que podría ser utilizada en procesos biotecnológicos [8],[9]. En estos tratamientos, microorganismos como bacterias y hongos, son utilizados con el fin de oxidar, aeróbicamente o anaeróbicamente, la materia orgánica presente en el agua, además de transformaciones químicas de otros compuestos contaminantes como metales y nutrientes inorgánicos.

Dentro de los tratamientos biológicos, el uso de microalgas ha ganado amplia atención en las últimas décadas. Estos microorganismos fotosintéticos tienen la capacidad de usar el nitrógeno y el fósforo de los efluentes residuales para su crecimiento [10],[11], además de presentar la capacidad de remover importantes cantidades de metales pesados por medio de procesos de absorción y adsorción [12],[13]. De igual forma, generan asociaciones con bacterias que pueden contribuir a la eliminación de materia orgánica y reducción de sólidos suspendidos, además de consumir directamente compuestos orgánicos disueltos en aquellas especies que exhiben comportamientos de mixotrofia [14],[15],[16].

Con el fin de optimizar el tratamiento con microalgas, se ha propuesto la inmovilización celular como una estrategia para aumentar la eficiencia de remoción de los contaminantes. De esta forma, se han probado diferentes matrices de inmovilización como son el alginato de sodio, el poli-estireno y las espumas de poliuretano [17],[18]. Sin embargo, el uso de fibras naturales podría hacer el proceso más económico y ambientalmente sostenible, por

lo cual se ha utilizado la matriz del fruto de la *Luffa cylindrica*, planta ampliamente producida en países de las zonas tropicales y subtropicales, donde su fruto es utilizado como esponjas de baño, debido a su estructura fibrosa de lignina y celulosa y que presenta múltiples microcanales que producen un sistema de poros, lo cual ha mostrado buenos resultados tanto en el atrapamiento de las microalgas, como en la remoción de contaminantes por parte de estas [19],[20],[21].

En el presente trabajo se evaluó la capacidad del crecimiento de la microalga verde *Scenedesmus* sp. en un agua residual de curtiembre, determinando la remoción de los principales contaminantes del efluente y comparando la eficiencia entre un tratamiento con células libres y otro con células inmovilizadas en una matriz de *Luffa*. Finalmente se evaluó el contenido de lípidos de la biomasa obtenida, con el fin de estimar su potencial uso en la generación de biodiesel.

2 Materiales y Métodos

2.1 Toma de muestra y caracterización del agua residual

Una muestra puntual de agua residual fue recolectada en una curtiembre ubicada en el barrio San Benito de la ciudad de Bogotá D.C, en la salida de una caja de filtración donde se retiran los pelos y pedazos de carne provenientes de los procesos de pelambre y curtido de la piel (Figura 1).



Figura 1: Punto de recolección de la muestra de agua residual de curtiembre. Se observa una caja rejilla con sustrato filtrante (rocas) con el fin de retirar pelos y carne procedente del proceso de pelambre. El flujo del agua es de izquierda a derecha y la muestra fue recolectada en la salida de la caja.

En este punto el agua no presentaba ningún tipo de tratamiento. La muestra fue tomada en un recipiente de 20 L oscurecido con bolsas plásticas negras y fue transportada en refrigeración hasta el laboratorio. Paralelamente se realizaron mediciones in situ de oxígeno disuelto (Numak ODZ-608), pH (Hanna HI 98128), conductividad (Hach SensION5) y turbidez (HACH 2100Q).

Posteriormente en el laboratorio, la muestra se dejó en decantación con el fin de permitir la precipitación de cualquier material particulado que pudiera estar presente y fue caracterizada utilizando los kits de análisis por espectrofotometría de HACH para los parámetros de nitritos (método 8507), nitratos (método 8171), amonio (método 8155), sulfatos (método 8051), fosfatos (método 8048), cromo hexavalente (método 8023) y demanda química de oxígeno DQO (método 8000). De igual forma, se determinó la demanda bioquímica de oxígeno por incubación durante 5 días (DBO_5) y la concentración de cromo total por absorción atómica de llama (ContrAA700).

2.2 Inmovilización de la microalga

La inmovilización celular se hizo con 15 días de anticipación a los experimentos, para esto primero se cortó el estropajo en forma de discos, con diámetro aproximado de 1 cm y altura de 0.5 cm. Después para eliminar las impurezas, fueron lavados con agua del grifo durante 5 min, posteriormente se sumergieron en agua destilada por 24 horas durante las cuales se realizaron recambios del agua cada 8 horas. Finalmente los discos fueron dejados en un horno a 70°C durante 24 horas con el fin de eliminar la humedad y se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 min.

Finalizada la esterilización, cada disco fue identificado y pesado, con el fin de hacer seguimiento a la biomasa inmovilizada. Inmediatamente después, se sumergieron en un litro de medio de cultivo estéril (fertilizante NPK al 1 %) durante 10 min y posteriormente fueron introducidos al cultivo de la microalga, donde se dejaron por un periodo de 4 días, con un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas, con el fin de permitir la inmovilización de *Scenedesmus*. Finalmente, los discos con el microorganismos inmovilizado fueron puestos en medio fresco y dejados por 7 días más para su crecimiento,

momento en el cual fueron pesados con el fin de establecer la cantidad inicial de biomasa en la matriz de *Luffa* (Figura 2).



Figura 2: Discos de la matriz del fruto de *Luffa* con células de *Scenedesmus* sp. inmovilizadas

2.3 Montaje de los experimentos

2.3.1 Experimento con células libres La evaluación de la capacidad de crecimiento y remoción de contaminantes por parte de *Scenedesmus* en suspensión, se realizó en reactores tipo batch con un volumen efectivo 2 L. Para el montaje, el agua residual fue esterilizada a 120°C por 20 minutos para eliminar los posibles microorganismos que estuviesen presentes y se diluyó 1:1 con agua destilada con el fin de disminuir la turbidez del agua, lo cual podría afectar la captación de la luz por parte de la microalga. Al reactor se agregó 1.8 L de la dilución y se adicionó un volumen igual (1.8 L) de un cultivo en crecimiento exponencial de *Scenedesmus* sp. Sin embargo este volumen de cultivo fue previamente centrifugado a 6000 RPM (3830 G) durante 2 min y agregado solo el pellet obtenido. Cada tratamiento fue realizado por triplicado y se tuvo un control que consistió en un reactor que contenía 1.8 L del agua residual diluida esterilizada sin la adición del microorganismo. Los cuatro reactores fueron mantenidos en condiciones controladas, a una temperatura de 20°C y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (Figura 3).

2.3.2 Experimento con células inmobilizadas Los experimentos realizados con las células inmobilizadas, consistieron en reactores de un volumen de 2 L donde se adicionaron 1.8 L del agua residual diluida estéril como se explica en el apartado 2.3.1. Al reactor fue adicionado diez discos de *Luffa* donde se habían inmobilizado previamente las células de *Scenedesmus* y que fueron marcados y pesados inicialmente, con el fin de determinar los cambios en la biomasa de la microalga. Los tratamientos se realizaron por triplicado y adicionalmente se realizó un control que consistió en un reactor que contenía 1.8 L del agua residual diluida sin esterilizar y 10 discos de *Luffa* sin células inmobilizadas. Los cuatro reactores fueron mantenidos en condiciones controladas, a una temperatura de 20°C y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas (Figura 3).

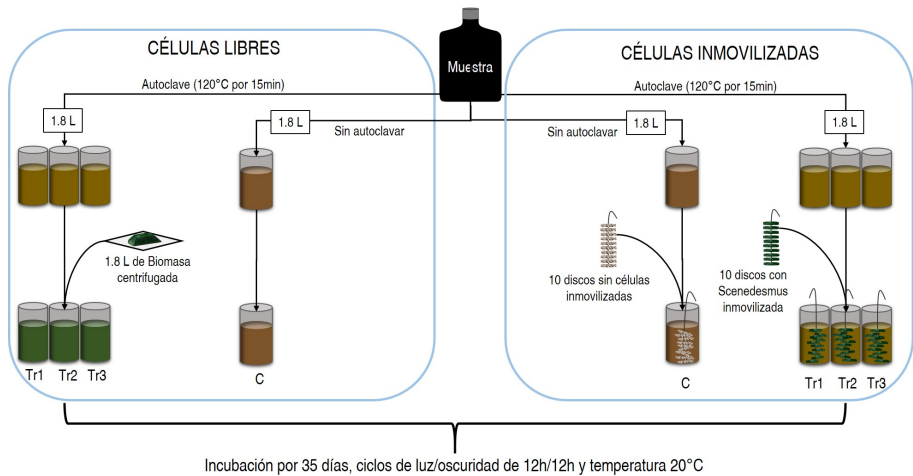


Figura 3: Diseño experimental utilizado en el presente estudio. C: control, Tr: tratamientos replica 1, 2 y 3.

2.3.3 Seguimiento de los experimentos A cada uno de los experimentos se les realizó un seguimiento diario del crecimiento de la microalga, por un periodo total de 33 días. Para las células libres se realizaron mediciones de densidad óptica a una muestra de 10 mL, en una longitud de onda de 660 nm utilizando un espectrofotómetro UV/visible (HACH DR6000). Posteriormente los datos fueron transformados a biomasa en peso seco utilizando la relación $Y = 0.19299X + 0.09812$, reportada por Pérez Silva

et al. [22] para esta misma especie, donde X corresponde al valor de absorbancia a 660 nm y Y a la biomasa en $mgmL^{-1}$. Por su parte, para el tratamiento con células inmovilizadas, dos discos, los mismos en cada medición, fueron pesados a diario en una balanza analítica para determinar el incremento o disminución de la biomasa atrapada en la matriz de *Luffa*. Esta biomasa posteriormente fue expresada $mgmL^{-1}$ teniendo en cuenta el volumen aproximado de los diez discos.

Finalizados los 33 días, la biomasa fue cosechada con el fin de analizar las características del agua resultante. En el caso de los tratamientos con células libres, el agua de los diferentes reactores fue centrifugada a 6000 RPM por 3 min, con el fin de sedimentar la biomasa y el sobrenadante fue recolectado para su posterior análisis. En los tratamientos con células inmovilizadas la cosecha consistió en retirar los discos con la biomasa inmovilizada. El agua residual proveniente de los diferentes tratamientos, fue caracterizada fisicoquímicamente de la misma forma como se explicó en el apartado 2.1, con el fin de comparar las condiciones previas y posteriores a tratamiento con la microalga.

La biomasa obtenida en los dos tratamientos, fue analizada para determinar su contenido de lípidos, con el fin de evaluar su potencial uso en la generación de biocombustibles. Para esto, tanto la biomasa libre como la atrapada en la matriz de *Luffa*, fueron secadas en un horno a 70°C durante 24 horas y posteriormente fue aplicado el protocolo de extracción de lípidos por solventes propuesto por Folch et al. [23] y finalmente cuantificados por el método de gravimetría.

2.4 Análisis de datos

Para determinar las posibles diferencias en el crecimiento de *Scenedesmus* en los dos tratamientos evaluados (libre e inmóvil) se realizó una prueba no paramétrica U de Mann-Whitney, ya que los datos no presentaron una distribución normal. De igual forma, se compararon los valores iniciales y finales de los diferentes parámetros fisicoquímicos y se calculó el porcentaje de remoción por medio de la Ecuación (1)

$$\% \text{ Remoción} = \frac{\text{Concentración inicial} - \text{Concentración final}}{\text{Concentración inicial}} * 100 \quad (1)$$

3 Resultados y Discusión

3.1 Características del agua residual

En la Tabla 1 se pueden observar las características fisicoquímicas del agua residual de curtiembre utilizada en el presente trabajo. El nitrógeno presente se encontró principalmente en la forma de nitratos y amonio con valores de 350 y 118 mgL^{-1} respectivamente.

Tabla 1: Características fisicoquímicas del agua residual de curtiembres utilizada en el presente trabajo

Parámetro	(Valor Inicial)	Unidades
NO_3^-	70	mgL^{-1}
NO_2^-	0.1	mgL^{-1}
NH_4^+	23.6	mgL^{-1}
PO_4^{3-}	30.6	mgL^{-1}
Ratio $\frac{N}{P}$	3.06	
SO_4^{2-}	10200	mgL^{-1}
DBO	3280	mgL^{-1}
DQO	7960	mgL^{-1}
Cr total	156.7	mgL^{-1}
Cr^{+6}	0.08	mgL^{-1}
pH	8.55	
Conductividad	> 2999	$\mu S cm^{-1}$
SST	0.01	mgL^{-1}
SS	1.5	mlL^{-1}
Oxígeno Disuelto	0.23	mlL^{-1}

De igual forma, se observó una concentración de fosfatos de 153 mgL^{-1} , lo que representa un ratio N:P aproximado de 3, lo cual indica un efluente limitado por nitrógeno, lo cual puede tener efectos directos sobre el crecimiento de las microorganismos y su estequiometría [24],[25]. Por su parte la DBO y DQO presentaron valores de 3280 y 7960 mgL^{-1} respectivamente, los cuales son similares a los reportados en otros trabajos para aguas residuales de curtiembres [26], así mismo la proporción de DQO:DBO es de 2.43, indicando una alta biodegradabilidad de este efluente. Finalmente, el agua residual presentó concentraciones de cromo total de 156,7 mgL^{-1} y

0,08 mgL^{-1} en su forma hexavalente (Cr^{+6}), elemento utilizado en forma de sales de cromo durante el proceso de curtido de la piel. Es importante destacar, que los valores obtenidos tanto para DBO, DQO como Cromo son más altos que los permitidos por la legislación vigente en Colombia para efluentes provenientes del proceso de curtido y transformación de la piel [27], lo cual hace necesario un tratamiento de estas aguas previo a su vertimiento sobre un cuerpo de agua superficial.

3.2 Crecimiento de la microalga en el agua residual

En la Figura 4 se observa el crecimiento presentado por *Scenedesmus* durante el periodo de experimentación, tanto en la forma de células libres (4a) como inmovilizadas (4b). La tasa de crecimiento en los tratamientos con células libres correspondió a $0.006d^{-1}$ con una producción diaria de biomasa de $0.013 mgmL^{-1}d^{-1}$, mientras que las células inmovilizadas presentaron una tasa de decrecimiento de $0.022 d^{-1}$ con una disminución diaria de biomasa inmovilizada de $17.88 mgmL^{-1}d^{-1}$. Las diferencias en el crecimiento entre ambos tratamientos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$; $n = 102$). Si bien la inmovilización celular ha sido planteada como una estrategia para facilitar la recolección de la biomasa y disminuir los costos asociados a esta operación, así como aumentar la eficiencia de remoción de contaminantes [28], presenta una serie de limitaciones, especialmente relacionadas en la difusión de nutrientes y factores de crecimiento requeridos por lo microorganismos inmovilizados [29],[21],[30]. En el presente trabajo se observó una disminución de la biomasa adherida a los discos de *Luffa*, lo cual podría ser debido a una baja difusión a través de la matriz, de los nutrientes necesarios para su crecimiento, sin embargo durante el desarrollo de los experimentos se evidenció una acumulación de biomasa en el fondo de los reactores, lo cual podría indicar un desprendimiento de la microalga, bien a causa de la manipulación de los discos en el momento de hacer las mediciones de peso, o bien por una saturación del área efectiva de adhesión de los discos.

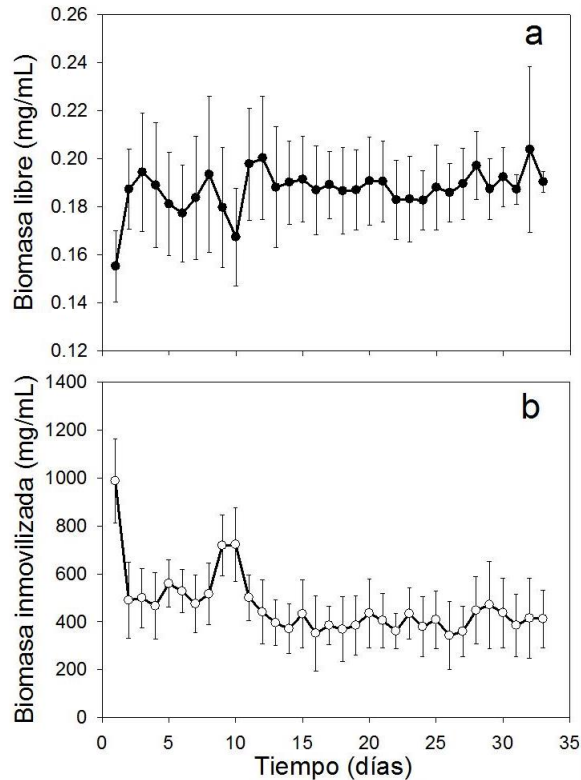


Figura 4: Gráficas de crecimiento de la biomasa promedio de *Scenedesmus* sp. durante el periodo del experimento. A) tratamiento con células libres, b) tratamiento con células inmovilizadas.

En el presente trabajo se utilizó la matriz del fruto de la planta *Luffa*, debido a que es un material económico y de fácil acceso en un país como Colombia, de igual forma ha sido utilizado previamente en otros trabajos para la inmovilización de microalgas con el objetivo de remover metales pesados [31],[19]. Sin embargo, otros materiales de inmovilización como el alginato [30], polivinilos [32], poliuretano [33] y poliestirenos [34] también han sido utilizados para el crecimiento microalgas y la remoción de nutrientes y otros contaminantes en el agua, obteniendo resultados similares a los encontrados en el presente estudio.

El tratamiento con células libres exhibió un mayor crecimiento con res-

pecto a las células inmovilizadas, sin embargo la biomasa obtenida durante el periodo de experimentación es menor a los reportados en otros trabajos. Ajayan et al. [14] evaluaron el crecimiento de *Scenedesmus* en aguas residuales de curtiembres en la India, alcanzado una tasa específica de crecimiento de $1.24 d^{-1}$. De igual forma Ballén-Segura et al. [15] utilizando también *Scenedesmus* en aguas residuales de curtiembres, obtuvieron una tasa de crecimiento durante 15 días de $0.085 d^{-1}$ una producción de biomasa de $0.01 mgmL^{-1}d^{-1}$. Estas diferencias, especialmente con la primera referencia, pueden ser debidos a las características propias del agua, ya que el agua residual de curtiembres utilizada en el presente estudio, presentó valores ampliamente superiores de cromo (156.7 vs $12.8 mgL^{-1}$), el cual ha sido reportado por afectar el crecimiento y la fotosíntesis de las microalgas [35],[36], así como una fuerte limitación por nitrógeno (Ratio N/P 3.06 vs 12.56), que también puede influir sobre el crecimiento de los microorganismos autótrofos.

La capacidad de uso de los nutrientes presentes en aguas residuales industriales por parte de microalgas ha sido ampliamente reportada [14],[37],[38]. En el presente trabajo, se observó una importante reducción de la concentración de nitrógeno tanto en forma de amonio como nitratos, y de fósforo inorgánico (Tabla 2 y 3) todos estos asimilables por las microalgas, lo cual permite pensar que el efluente fue utilizado como sustrato de crecimiento por *Scenedesmus*, especialmente en los tratamientos con células libres.

3.3 Remoción de contaminantes del agua residual

Las microalgas tienen la capacidad de utilizar el nitrógeno y el fósforo inorgánico presente en las aguas residuales, los cuales son utilizados para la síntesis de proteínas, generación de ATP, formación de membranas, entre otras. En el agua de curtiembre utilizada, el nitrógeno se presentó principalmente en forma de nitratos y amonio, éste primero fue removido en un 99 % tanto en el tratamiento con células libres (Tabla 2) como inmovilizadas (Tabla 3), mientras que el amonio fue removido en 95 % en ambos casos. Por su parte el fósforo, en la forma de ortofosfatos fue eliminado en un porcentaje superior al 83 % en ambos tratamientos. Estos valores son similares a los reportados por otros estudios en aguas residuales de cur-

tiembres [15] y otros efluentes municipales [39]. Sin embargo, cabe destacar que en los controles realizados tanto para las células libres como inmovilizadas se alcanzaron porcentajes de remoción similar. Esto parece indicar que además de la absorción directa que pueden realizar las microalgas sobre estos nutrientes, otros factores adicionales participaron en dicha eliminación. Dentro de estos podemos ver el papel de las bacterias (control 2), las cuales no solo utilizan parte de estos nutrientes, sino que pueden participar en la transformación de los nitratos en nitritos, los cuales presentaron menores valores de remoción (Tabla 2 y 3), por medio del proceso de desnitrificación [40], el cual pudo verse favorecido ante las bajas concentraciones de oxígeno disuelto presentes en el agua residual (0.23 mgL^{-1}).

Tabla 2: Concentración de contaminantes inicial y final, y porcentajes de remoción obtenidos con el tratamiento de *Scenedesmus* sp. en forma de células libres.

Parametro	Concentración Inicial (mgL^{-1})	Concentración final (mgL^{-1})		% Remoción	
		Tratamiento	Control	Tratamiento	Control
NO_3^-	70	0.60 ± 0.20	0.40	99.14	99.43
NO_2^-	0.1	0.03 ± 0.01	0.06	73.33	38.00
NH_4^+	23.6	> 1.00	> 1.00	> 95.76	> 95.76
PO_4^{3-}	30.6	> 5.00	> 5.00	> 83.66	> 83.66
SO_4^{2-}	2040	210.66 ± 21.94	212.00	89.67	89.61
DBO	3280	63.33 ± 54.12	104.00	98.07	96.83
DQO	7960	442 ± 22.54	434.00	94.45	94.55
Cr total	156.7	2.27 ± 0.86	2.28	98.55	98.54
Cr^{+6}	0.08	0.04 ± 0.02	0.14	40.83	-75.00

Tabla 3: Concentración de contaminantes inicial y final, y porcentajes de remoción obtenidos con el tratamiento de *Scenedesmus* sp. en forma de células inmovilizadas.

Parámetro	Concentración Inicial (mgL^{-1})	Concentración final (mgL^{-1})		% Remoción	
		Tratamiento	Control	Tratamiento	Control
NO_3^-	70	0.60 ± 0.35	0.60	99.14	99.14
NO_2^-	0.1	0.050 ± 0.04	0.08	49.33	16.00
NH_4^+	23.6	> 1.00	> 1.00	> 95.76	> 95.76
PO_4^{3-}	30.6	> 5.00	> 5.00	> 83.66	> 83.66
SO_4^{2-}	2040	224 ± 2	212.00	89.02	89.61
DBO	3280	84.66 ± 34.64	202.00	89.02	89.61
DQO	7960	142.66 ± 42.02	296.00	98.21	96.28
Cr total	156.7	3.06 ± 1.43	9.30	98.05	94.07
Cr^{+6}	0.08	0.03 ± 0.02	0.12	53.33	-50.00

Por su parte, los sulfatos fueron removidos en porcentajes superiores al 89%. Esta remoción puede ser llevada a cabo directamente por la microalga,

la cual puede incorporar el azufre a su metabolismo central, ser reducido y utilizado en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas [41]. De igual forma, las bacterias pudieron contribuir a esta eliminación del azufre, por medio de su participación en el ciclo del azufre, donde llevan a cabo procesos de sulfato reducción en condiciones anaeróbicas, con la subsecuente formación de sulfuro de hidrógeno, lo cual pudo ser evidenciado en el olor que se desprendían de los reactores.

Por otro lado, la materia orgánica, medida como DBO y DQO, presentó remociones del 98 y 94 % para el tratamiento con células libres (Tabla 2) y del 97 y 98 % para el tratamiento con células inmovilizadas (Tabla 3) respectivamente. Estos valores son superiores a los reportados por Ajayan et al. [14] para aguas de curtido, donde observaron eliminaciones del 35 % para DBO y 40 % para DQO por parte de *Scenedesmus*. De igual forma, son levemente superiores a los encontrados para DBO por Ballén-Segura et al. [15] con un 88 %. Estas diferencias pueden ser debidas al tiempo de duración del experimento, ya que ellos realizaron incubaciones de 12 y 15 días respectivamente, mientras en el presente las incubaciones fueron de 33 días, dando mayor tiempo para la asimilación de esta materia orgánica tanto por parte de las microalgas, como de las bacterias presentes (control 2).

A pesar de que las microalgas, especialmente las algas verdes grupo al cual pertenece *Scenedesmus*, son conocidos como organismos autótrofos, una creciente evidencia ha demostrado que estos organismos pueden presentar la capacidad de utilizar compuestos orgánicos como fuente de carbono, fenómeno conocido como mixotrofia [42],[43],[44]. De esta forma, es posible pensar que en el presente trabajo *Scenedesmus* pudo utilizar parte de la materia orgánica disuelta como una fuente complementaria de carbono, llevando a la reducción y remoción de la DBO. Así mismo, es bien reconocido desde la postulación por Azam et al. [45] del bucle microbiano (microbial loop), que las microalgas y las bacterias generan interacciones de sinergismo, en las cuales el carbono orgánico disuelto (COD) es utilizado por parte de las bacterias quien a su vez remineralizan esta materia orgánica, colocando de nuevo a disposición de las microalgas los nutrientes inorgánicos requeridos para su crecimiento. En el presente trabajo, *Scenedesmus* se encontraba en un monocultivo, sin embargo no era axénico, por lo cual las bacterias acompañantes pudieron contribuir en la oxidación de la

materia orgánica presente en el efluente. En cualquier caso, cabe destacar que los valores permitidos por la legislación en Colombia tanto para DQO como DBO son de 1200 y 600 mgL^{-1} respectivamente, por lo cual el tratamiento utilizado con *Scenedesmus* permitió reducir los valores iniciales hasta valores dentro de este rango.

Las microalgas son utilizadas para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados, debido a su capacidad de tolerancia [46]. El cromo es el principal metal pesado presente en las aguas residuales de curtiembres y en el presente trabajo se encontró en concentraciones de 156.7 mgL^{-1} para el total y 0.08 mgL^{-1} para la forma hexavalente. Después del tratamiento con *Scenedesmus* se alcanzaron remociones de cromo total de 98 % tanto en la forma de células libres como inmovilizadas y del 40 y 53 % para el cromo hexavalente (Tabla 2 y 3). Previos trabajos como los de Ajayan et al. [14], Das et al. [47], Subashini and Rajiv [48] y Das et al. [49] han reportado porcentajes similares de remoción con diversas especies de microalgas, y se han descrito diferentes mecanismos por los cuales estas pueden remover metales pesados del agua, entre los cuales cabe destacar procesos de sorción (adsorción y absorción) que involucran la superficie celular o ligandos intracelulares [50]. De igual manera, las microalgas pueden facilitar la precipitación química de los metales debido al cambio de pH generado durante su crecimiento fotosintético [51]. Finalmente, de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se observa que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con células libres e inmovilizadas, sin embargo, la inmovilización celular, sigue siendo una alternativa viable desde el punto de vista económico, ya que reduce los costos asociados a la recolección y separación de la biomasa microalgal generada durante el tratamiento, biomasa que puede ser posteriormente utilizada como materia prima para diversos procesos biotecnológicos, dando un valor adicional al tratamiento convencional de aguas residuales.

3.4 Concentración de lípidos de la biomasa

En la Figura 5 se observa los valores promedio obtenidos para la cuantificación de lípidos de cada experimento. En el caso de las células libres el porcentaje de lípidos con respecto a la biomasa seca fue 28.82 %, mientras en las células inmovilizadas fue 32.26 %. Estos valores son altos comparados

con los reportados por Ruiz-Marín et al. [52] quienes evaluaron la producción de lípidos en *Scenedesmus obliquus* en aguas residuales con valores de 12 – 14 %. De igual forma, son altos comparados por los encontrados por Aravantinou et al. [53] en un agua residual sintética, en la cual *Scenedesmus rubescens* acumuló un promedio de lípidos entre 4.97 a 14.91 %. Esta diferencia puede ser debida a que el agua residual utilizada en este trabajo, presento una fuerte limitación de nitrógeno (ratio N:P de 3), lo cual ha sido demostrado como un factor generador de estrés en microalgas, lo cual dispara el metabolismo de los ácidos grasos, aumentando la producción de lípidos [54],[25], especialmente en microalgas oleaginosas como lo son los individuos del genero *Scenedesmus* [55].

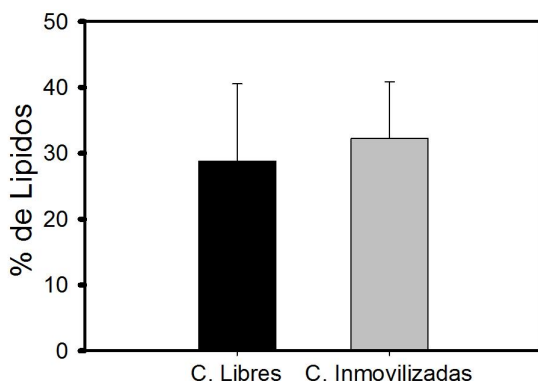


Figura 5: Valores promedio del porcentaje de lípidos en relación a la biomasa seca de *Scenedesmus* en los dos tratamientos evaluados en el presente trabajo

La producción de biomasa rica en lípidos, como en el caso de presente estudio, aporta un valor agregado a los tratamientos de aguas residuales, ya que dichos lípidos, formados por ácidos grasos y triglicéridos, pueden ser extraídos y transesterificados con el fin de obtener ácidos grasos metil-esteres (FAMES por sus siglas en inglés) compuestos principales del biodiesel [56]. Sin embargo es de tener en cuenta que la producción o uso de microalgas que han estado en contacto con sustancias peligrosas como los metales, podrían ser un obstáculo para su comercialización, ya que los productos derivados de estas tendrían altas concentraciones de estas sustancias y su combustión generaría emisiones contaminantes a la atmósfera. De esta forma, sería

necesario acoplar otros tratamientos adicionales sobre los efluentes, con el fin de reducir la concentración de los metales previo al contacto con las microalgas.

4 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que el la microalga *Scenedesmus* creció utilizando el agua residual de curtiembre como sustrato, especialmente en forma de células libres. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en el crecimiento, ambos tratamientos (libres e inmovilizadas) presentaron remociones importantes de N, P, Cr y materia orgánica (medida como DBO y DQO). Esto indica que es viable utilizar esta microalga como agente de remoción de compuestos contaminantes, al menos a escalas de laboratorio. Son necesarios estudios posteriores que permita evaluar a escalas mayores, donde otros factores como el uso de reactores, la incidencia de la luz y la agitación pueden afectar el crecimiento y por lo tanto las tasas de remoción.

De igual forma, esta reducción de contaminantes no puede ser atribuida solamente a la microalga, ya que los controles utilizados (agua sin esterilizar) presentaron valores similares, lo cual demuestra el papel jugado por las bacterias dentro de estos tratamientos. Finalmente, el porcentaje de lípidos fue superior a lo reportado en otros estudios similares, posiblemente debido a la fuerte limitación de nitrógeno que presentaba el agua evaluada, lo cual convierte esta biomasa en una potencial materia prima para la generación de biocombustibles u otros procesos biotecnológicos siempre teniendo en cuenta la posible interferencia que puede ejercer la presencia de altas concentraciones de metales en la biomasa microalgal o bioproductos derivados de ella, lo cual hace actualmente inviable el doble uso (tratamiento de aguas y producción de biocombustibles).

Agradecimientos

A la Universidad Sergio Arboleda por el apoyo y soporte experimental de este trabajo por medio del Programa de Investigación en Cambio Climático y Desarrollo Sostenible (IN.BG.086.17.001). A la profesora Marie Jose Chery por las sugerencias y recomendaciones dadas. A la Ingeniera Karen Pérez por su colaboración en la edición del documento.

Referencias

- [1] M. Azom, K. Mahmud, S. Yahya, A. Sontu, and S. Himon, “Environmental impact assessment of tanneries: a case study of hazaribag in bangladesh,” *International Journal of Environmental Science and Development*, vol. 3, no. 2, p. 152, 2012. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.7763/IJESD.2012.V3.206> 12
- [2] O. Akpor and B. Muchie, “Environmental and public health implications of wastewater quality,” *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no. 13, pp. 2379–2387, 2011. [Online]. Available: <http://doi.org/10.5897/AJB10.1797> 13
- [3] M. Chowdhury, M. Mostafa, T. K. Biswas, and A. K. Saha, “Treatment of leather industrial effluents by filtration and coagulation processes,” *Water Resources and Industry*, vol. 3, pp. 11–22, 2013. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.wri.2013.05.002> 13
- [4] R. Suthanthararajan, E. Ravindranath, K. Chits, B. Umamaheswari, T. Ramesh, and S. Rajamam, “Membrane application for recovery and reuse of water from treated tannery wastewater,” *Desalination*, vol. 164, no. 2, pp. 151–156, 2004. [Online]. Available: [http://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)00174-2](http://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)00174-2) 13
- [5] Q. Imran, M. Hanif, M. Riaz, S. Noureen, T. Ansari, and H. Bhatti, “Coagulation/flocculation of tannery wastewater using immobilized chemical coagulants,” *Journal of applied research and technology*, vol. 10, no. 2, pp. 79–86, 2012. [Online]. Available: <http://www.scielo.org.mx/pdf/jart/v10n2/v10n2a1.pdf> 13
- [6] N. N. Rao, K. M. Somasekhar, S. N. Kaul, and L. Szyrkowicz, “Electrochemical oxidation of tannery wastewater,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 76, no. 11, pp. 1124–1131, 2001. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1002/jctb.493> 13

- [7] Z. Song, C. Williams, and R. Edyvean, "Treatment of tannery wastewater by chemical coagulation," *Desalination*, vol. 164, no. 3, pp. 249–259, 2004. [Online]. Available: [http://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)00193-6](http://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)00193-6) 13
- [8] K. Ajayan and M. Selvaraju, "Heavy metal induced antioxidant defense system of green microalgae and its effective role in phycoremediation of tannery effluent," *Pakistan journal of biological sciences*, vol. 15, no. 22, pp. 1056–1062, 2012. 13
- [9] M. A. Borowitzka, *Limits to growth*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1998, pp. 203–226. 13
- [10] M. Martínez, S. Sánchez, J. Jimenez, F. El Yousfi, and L. Munoz, "Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *scenedesmus obliquus*," *Bioresource technology*, vol. 73, no. 3, pp. 263–272, 2000. [Online]. Available: [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00121-2](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00121-2) 13
- [11] J. Shi, B. Podola, and M. Melkonian, "Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study," *Journal of Applied Phycology*, vol. 19, no. 5, pp. 417–423, 2007. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s10811-006-9148-1> 13
- [12] N. Abdel-Raouf, A. Al-Homaidan, and I. Ibraheem, "Microalgae and wastewater treatment," *Saudi Journal of Biological Sciences*, vol. 19, no. 3, pp. 257–275, 2012. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005> 13
- [13] R. Richards and B. Mullins, "Using microalgae for combined lipid production and heavy metal removal from leachate," *Ecological modelling*, vol. 249, pp. 59–67, 2013. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2012.07.004> 13
- [14] K. V. Ajayan, M. Selvaraju, P. Unnikannan, and P. Sruthi, "Phycoremediation of tannery wastewater using microalgae *scenedesmus* species," *International journal of phytoremediation*, vol. 17, no. 10, pp. 907–916, 2015. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1080/15226514.2014.989313> 13, 22, 24, 25
- [15] M. Ballen-Segura, L. Hernández Rodríguez, D. Parra Ospina, A. Vega Bolaños, and K. Pérez, "Using *scenedesmus* sp. for the phycoremediation of tannery wastewater," *Tecciencia*, vol. 11, no. 21, pp. 69–75, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.18180/tecciencia.2016.21.11> 13, 22, 23, 24
- [16] H. Wang, H. Xiong, Z. Hui, and X. Zeng, "Mixotrophic cultivation of *chlorella pyrenoidosa* with diluted primary piggery wastewater to produce

- lipids,” *Bioresource Technology*, vol. 104, pp. 215–220, 2012. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.020> 13
- [17] E. Eroglu, S. M. Smith, and C. L. Raston, *Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses*. Cham: Springer, 2015, vol. 2, pp. 19–44. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16640-7_2 13
- [18] N. Zamani, M. Noshadi, S. Amin, A. Niazi, and Y. Ghasemi, “Effect of alginate structure and microalgae immobilization method on orthophosphate removal from wastewater,” *Journal of applied phycology*, vol. 24, no. 4, pp. 649–656, 2012. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s10811-011-9682-3> 13
- [19] N. Akhtar, A. Saeed, and M. Iqbal, “Chlorella sorokiniana immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of luffa cylindrica: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium,” *Bioresource Technology*, vol. 88, no. 2, pp. 163–165, 2003. [Online]. Available: [http://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00289-4](http://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00289-4) 14, 21
- [20] B.-Y. Chen, C.-Y. Chen, W.-Q. Guo, H.-W. Chang, W.-M. Chen, D.-J. Lee, C.-C. Huang, N.-Q. Ren, and J.-S. Chang, “Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized scenedesmus obliquus cwn cells on loofa (*luffa cylindrica*) sponge,” *Bioresource technology*, vol. 160, pp. 175–181, 2014. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.006> 14
- [21] A. Saeed and M. Iqbal, “Immobilization of blue green microalgae on loofa sponge to biosorb cadmium in repeated shake flask batch and continuous flow fixed bed column reactor system,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 22, no. 8, pp. 775–782, 2006. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s11274-005-9103-3> 14, 20
- [22] K. R. Pérez Silva, A. M. Vega Bolaños, L. C. Hernández Rodríguez, D. A. Parra Ospina, and M. Ballen-Segura, “Uso de scenedesmus para la remoción de metales pesados y nutrientes de aguas residuales para la industria textil,” *Ingeniería solidaria*, vol. 12, no. 20, pp. 95–105, 2016. [Online]. Available: <http://dx.doi.org/10.16925/in.v19i20.1418> 18
- [23] J. Folch, M. Lees, and G. Sloane-Stanley, “A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues,” *J Biol Chem*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957. [Online]. Available: <http://aufsi.auburn.edu/recommendedmethods/05B01c03a.pdf> 18
- [24] K. I. Reitan, J. R. Rainuzzo, and Y. Olsen, “Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae,” *Journal of Phycology*, vol. 30, no. 6, pp. 972–979, 1994. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x> 19

- [25] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke, and S. Ying-xue, “Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *scenedesmus* sp,” *Bioresource technology*, vol. 101, no. 14, pp. 5494–5500, 2010. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.016> 19, 26
- [26] G. Durai and M. Rajasimman, “Biological treatment of tannery wastewater-a review,” *Journal of Environmental science and Technology*, vol. 4, no. 1, pp. 1–17, 2011. [Online]. Available: <http://doi.org/10.3923/jest.2011.1.17> 19
- [27] M. de Ambiente Y Desarrollo Sostenible, “Resolucion 0631,” p. 40, 18 de Abril 2015. 20
- [28] I. Moreno-Garrido, “Microalgae immobilization: current techniques and uses,” *Bioresource technology*, vol. 99, no. 10, pp. 3949–3964, 2008. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040> 20
- [29] P. K. Robinson, “Immobilized algal technology for wastewater treatment purposes,” *Wastewater treatment with algae*, pp. 1–16, 1998. [Online]. Available: http://doi.org/10.1007/978-3-662-10863-5_1 20
- [30] B. L. Strand, Y. A. Morch, and G. Skjak-Braek, “Alginate as immobilization matrix for cells,” *Minerva biotecnologica*, vol. 12, no. 4, p. 223, 2000. 20, 21
- [31] N. Akhtar, J. Iqbal, and M. Iqbal, “Enhancement of lead (ii) biosorption by microalgal biomass immobilized onto loofa (*luffa cylindrica*) sponge,” *Engineering in life sciences*, vol. 4, no. 2, pp. 171–178, 2004. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1002/elsc.200420019> 21
- [32] C. Garbisu, D. O. Hall, and J. L. Serra, “Removal of phosphate by foamimmobilized phormidium laminosum in batch and continuousflow bioreactors,” *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 57, no. 2, pp. 181–189, 1993. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1002/jctb.280570214> 21
- [33] I. Urrutia, J. L. Serra, and M. J. Llama, “Nitrate removal from water by *scenedesmus obliquus* immobilized in polymeric foams,” *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 17, no. 3, pp. 200–205, 1995. [Online]. Available: [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00008-F](http://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00008-F) 21
- [34] L. Travieso, F. Benitez, P. Weiland, E. Sanchez, R. Dupeyron, and A. Dominguez, “Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments,” *Bioresource Technology*, vol. 55, no. 3, pp. 181–186, 1996. [Online]. Available: [http://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00196-4](http://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00196-4) 21

- [35] L. Travieso, R. Canizares, R. Borja, F. Benitez, A. Dominguez, and V. Valiente, "Heavy metal removal by microalgae," *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, vol. 62, no. 2, pp. 144–151, 1999. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s001289900853> 22
- [36] S. Wium-Andersen, "The effect of chromium on the photosynthesis and growth of diatoms and green algae," *Physiologia plantarum*, vol. 32, no. 4, pp. 308–310, 1974. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1974.tb03141.x> 22
- [37] S. Chinnaamy, A. Bhatnagar, R. W. Hunt, and K. Das, "Microalgae cultivation in a wastewater dominated by carpet mill effluents for biofuel applications," *Bioresourcetechnology*, vol. 101, no. 9, pp. 3097–3105, 2010. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.026> 22
- [38] V. Pathak, D. Singh, R. Kothari, and A. Chopra, "Phycoremediation of textile wastewater by unicellular microalga *Chlorella pyrenoidosa*," *Cell Mol Biol*, vol. 60, no. 5, pp. 35–40, 2014. [Online]. Available: <http://doi.org/10.14715/cmb/2014.60.5.7> 22
- [39] C. Chacón, C. Andrade, C. Cárdenas, I. Araujo, and E. Morales, "Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y dco de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela," *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, vol. 38, no. 2, 2004. [Online]. Available: <http://www.produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/26> 23
- [40] G. Tallec, J. Garnier, G. Billen, and M. Gossais, "Nitrous oxide emissions from denitrifying activated sludge of urban wastewater treatment plants, under anoxia and low oxygenation," *Bioresourcetechnology*, vol. 99, no. 7, pp. 2200–2209, 2008. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.025> 23
- [41] M. Giordano and J. A. Raven, "Nitrogen and sulfur assimilation in plants and algae," *Aquatic botany*, vol. 118, pp. 45–61, 2014. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.06.012> 24
- [42] A. Bhatnagar, S. Chinnaamy, M. Singh, and K. Das, "Renewable biomass production by mixotrophic algae in the presence of various carbon sources and wastewaters," *Applied Energy*, vol. 88, no. 10, pp. 3425–3431, 2011. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.12.064> 24
- [43] M.-K. Ji, H.-S. Yun, Y.-T. Park, A. N. Kabra, I.-H. Oh, and J. Choi, "Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and flue gas CO₂ for biomass production," *Journal of environmental management*, vol. 159, pp. 115–120, 2015. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.037> 24

- [44] S. Yang, G. Liu, Y. Meng, P. Wang, S. Zhou, and H. Shang, "Utilization of xylose as a carbon source for mixotrophic growth of *scenedesmus obliquus*," *Bioresource technology*, vol. 172, pp. 180–185, 2014. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.122> 24
- [45] F. Azam, T. Fenchel, J. G. Field, J. Gray, L. Meyer-Reil, and F. Thingstad, "The ecological role of water-column microbes in the sea," *Marine ecology progress series*, pp. 257–263, 1983. [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/24814647> 24
- [46] A. Malik, "Metal bioremediation through growing cells," *Environment international*, vol. 30, no. 2, pp. 261–278, 2004. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001> 25
- [47] C. Das, K. Naseera, A. Ram, R. M. Meena, and N. Ramaiah, "Bioremediation of tannery wastewater by a salttolerant strain of *chlorella vulgaris*," *Journal of Applied Phycology*, vol. 29, no. 1, pp. 235–243, 2017. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s10811-016-0910-8> 25
- [48] P. Subashini and P. Rajiv, "*Chlorella vulgaris* dpsf 01: A unique tool for removal of toxic chemicals from tannery wastewater," *African Journal of Biotechnology*, vol. 17, no. 8, pp. 239–248, 2018. [Online]. Available: <http://doi.org/10.5897/AJB2017.16359> 25
- [49] C. Das, N. Ramaiah, E. Pereira, and K. Naseera, "Efficient bioremediation of tannery wastewater by monostrains and consortium of marine *chlorella* sp. and *phormidium* sp.," *International journal of phytoremediation*, vol. 20, no. 3, pp. 284–292, 2018. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1080/15226514.2017.1374338> 25
- [50] S. Mehta and J. Gaur, "Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects," *Critical reviews in biotechnology*, vol. 25, no. 3, pp. 113–152, 2005. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1080/07388550500248571> 25
- [51] R. Muñoz and B. Guieysse, "Algalbacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review," *Water research*, vol. 40, no. 15, pp. 2799–2815, 2006. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011> 25
- [52] A. Ruiz-Marin, L. G. Mendoza-Espinosa, and T. Stephenson, "Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater," *Bioresource Technology*, vol. 101, no. 1, pp. 58–64, 2010. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076> 26

- [53] A. F. Aravantinou, M. A. Theodorakopoulos, and I. D. Manariotis, “Selection of microalgae for wastewater treatment and potential lipids production,” *Bioresource technology*, vol. 147, pp. 130–134, 2013. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.024> 26
- [54] M. J. Griffiths, R. P. van Hille, and S. T. Harrison, “The effect of nitrogen limitation on lipid productivity and cell composition in *Chlorella vulgaris*,” *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 98, no. 5, pp. 2345–2356, 2014. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s00253-013-5442-4> 26
- [55] —, “Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions,” *Journal of Applied Phycology*, vol. 24, no. 5, pp. 989–1001, 2012. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1007/s10811-011-9723-y> 26
- [56] L. Brennan and P. Owende, “Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products,” *Renewable and sustainable energy reviews*, vol. 14, no. 2, pp. 557–577, 2010. [Online]. Available: <http://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009> 26