

TASA DE REMOCIÓN DE FÓSFORO DE AGUAS MARINAS MEDIANTE EL CULTIVO DE *Tetraselmis suecica*

Phosphorus removal rate from seawater through the culture of *Tetraselmis suecica*

 Sorayda Mendoza Espinoza¹  Juan Fernando Merino Moya¹  Carmen Yzásiga Barrera¹
 Mirian Noemi Velásquez Guarniz¹

¹Universidad Nacional del Santa, Ancash, Perú.

Correspondencia:

Dr. Juan Fernando Merino Moya
fmerino@uns.edu.pe

RESUMEN

La disposición de fósforo en los océanos es una de las principales causas de contaminación de los ecosistemas marinos, con severos impactos sobre la vida acuática y por lo cual urge desarrollar medidas de mitigación. En este estudio, se evaluó el uso de la microalga *Tetraselmis suecica* para remover fósforo (P) del agua marina. Se emplearon tratamientos experimentales de 23.03, 44.80, 79.50 y 94.20 mg L⁻¹ de (NH₄)₂ HPO₄ y un control con medio Heussler-Merino (HM). Las unidades de cultivo consistieron de fotobiorreactores (2000 mL) conservados con aireación e iluminación constante. Durante el cultivo, las unidades mantuvieron crecimientos similares, sin embargo, los controles presentaron mayores tasas de crecimiento. Al final del experimento, los porcentajes de remoción disminuyen con el aumento de la concentración del P, con valores de 77.83 % en los controles y 36.20 % en los dosificados con 94.2 mg L⁻¹ de P. Estos resultados demuestran las excelentes posibilidades de utilizar cultivos masivos de *T. suecica*, para remover el exceso de P del ambiente acuático marino.

Palabras clave: microalgas, *Tetraselmis suecica*, remoción de fosforo, biorremediación.

ABSTRACT

The disposal of phosphorus in the oceans is one of the main causes of pollution of marine ecosystems, with severe impacts on aquatic life and therefore it is urgent to develop mitigation measures. In this study, the use of *Tetraselmis suecica* to remove phosphorus (P) from seawater was evaluated under laboratory conditions. Experimental treatments of 23.03, 44.80, 79.50 and 94.20 mg L⁻¹ of (NH₄)₂ HPO₄ and a control with Heussler-Merino medium (HM) were used. The culture units consisted of photobioreactors with a culture volume of 2000 mL, preserved with aeration and constant lighting. During cultivation, the experimental units maintained similar growths, however, the controls presented higher growth rates. At the end of the



experiment, the removal percentages decrease with increasing P concentration, with values of 77.83 % in controls and 36.20 % in those dosed with 94.2 mg L⁻¹ of P. These results demonstrate the excellent possibilities of using cultures massive of *T. suecica* to remove excess P from the marine aquatic environment.

Key words: microalgae, *Tetraselmis suecica*, phosphorus remotion, biorremediation.

INTRODUCCIÓN

Los residuos y efluentes provenientes de diversas actividades antrópicas, productivas y extractivas, contaminan el medio ambiente terrestre y acuático. En el litoral de la región Norte del Perú, durante los últimos años, se vierten grandes volúmenes de efluentes provenientes de la actividad acuícola, que contienen material orgánico ricos en compuestos nitrogenados y fosfatados (Aguirre-Velarde *et al.*, 2019; Páez-Osuna, 2005). Ello ha causado severos impactos sobre los ecosistemas y la biodiversidad marina, sin embargo, los elementos contenidos en estos residuos pueden ser utilizados para el cultivo de microalgas con la finalidad de reducir su impacto.

Las microalgas son organismos fotosintéticos, eucariotas o procariotas, que crecen en ambientes acuáticos (Borowitzka, 2018). Desde hace varias décadas, se han empleado con fines nutricionales, farmacéuticos e industriales (Fabris *et al.*, 2020) y en la actualidad, las metodologías para el cultivo de ciertas especies se han desarrollado exitosamente a escala de laboratorio (in-doors) y al aire libre (out-doors) (Pavasant *et al.*, 2014; Sarker & Salam, 2019). Una de las principales aplicaciones de las microalgas es la biorremediación, en donde se destaca su eficiencia sobre otras técnicas (Ummalyima *et al.*, 2018; Wollmann *et al.*, 2019). La biorremediación con microalgas ha sido exitosa en la remoción de nutrientes (Lei *et al.*, 2018), metales pesados (Novák *et al.*, 2020), moléculas orgánicas contaminantes (Pandey *et al.*, 2019) e inclusive en la remoción de elementos radioactivos (Kim *et al.*, 2019). Tal capacidad es explicada por el metabolismo de adecuación con la que cuentan ciertas especies (López-Rodas *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2020). En ese sentido, resulta necesario determinar las mejores condiciones para que una especie sea usada óptimamente en biorremediación.

El fósforo es uno de los elementos más abundantes y tiene gran importancia biológica, siendo el elemento que más frecuentemente limita la productividad en un ecosistema acuático natural o artificial (Doering *et al.*, 1995). El rango del P para el crecimiento de diferentes especies algales, variando entre 0.042 mmol de PO₄⁻³ y 19.43 mmol de fósforo inorgánico (Pi) por gramo de peso seco en *Chorella vulgaris* (Guerra-Renteria *et al.*, 2019), habiéndose hallado que altas concentraciones inhiben el crecimiento. Asimismo, se ha demostrado que la tasa de incorporación por las algas es influenciada por su concentración en el medio (Solovchenko *et al.*, 2019). Es así que, la utilización del P contenido en las aguas evitará su disposición al medio ambiente mediante su dosificación a los cultivos masivos de la microalga.

El P tiene gran importancia biológica en la productividad del ecosistema acuático y es uno de los nutrientes mayores requeridos para el crecimiento de las microalgas por su participación en casi todas las fases del metabolismo, particularmente en las reacciones que implican gastos de energía (Abd Elfata & Wagih Abou, 2017). Bajo este concepto, en esta investigación se evaluó la tasa de remoción de P del agua marina utilizando a la microalga *T. suecica* sometida a diferentes concentraciones de este nutriente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

La cepa de *T. suecica* se mantuvo en condiciones de laboratorio, bajo iluminación y aireación constante, y dosificada con medio de cultivo HM (Merino, 2000) cada siete días. El agua de mar usada fue tratada previamente con hipoclorito de sodio (1 mL L⁻¹) y neutralizada con tiosulfato de sodio 15 % (1 mL L⁻¹), con la finalidad de evitar interferencias de otros microorganismos.



Acondicionamiento de los cultivos

Los cultivos iniciaron con una densidad de 35×10^4 cel. mL⁻¹, en un volumen de 2000 mL. Además, todos los cultivos fueron realizados por triplicado y las concentraciones finales del P fueron ajustadas al inicio de los cultivos de *T. suecica*.

Las unidades experimentales consistieron de fotobiorreactores plásticos de 3000 mL de volumen total. En ellas, los cultivos

fueron inoculados con el medio HM, variando gradualmente el contenido de P según cada tratamiento. La dosificación del P fue realizada mediante una solución patrón de fosfato diamónico, (NH₄)₂PO₄, conteniendo 19 mg mL⁻¹ de P y añadiendo 1, 2, 4 y 5 mL de dicho patrón por litro de cultivo. El medio HM fue preparado con insumos agrícolas convencionales cuyas impurezas son aprovechadas como micronutrientes (Tabla 1).

Tabla 1
Composición química del medio de cultivo HM

Sustancia	mg L ⁻¹	N	P	K	Fe	Na	Ca	Mg	S	Cl
CH ₄ N ₂ O	172	80.9	-	-	-	0.1	-	-	-	-
(NH ₄) ₂ PO ₄	96	16.3	19.2	0.8	-	1.3	0.4	0.3	-	10.2
KCl	19	-	-	10.4	-	10.5	1.9	1.3	0.2	0.8
Soluc. Fe*	2.5	-	-	-	2.5	-	-	-	-	2.4
Total		96.3	19.2	11.2	2.5	11.9	2.3	1.6	0.2	13.4

Determinación del crecimiento

El crecimiento poblacional de *T. suecica* fue determinada mediante conteos microscópicos diarios utilizando cámara Neubauer y las tasas de crecimiento específico (μ) mediante la ecuación de Guillard (1973):

$$\mu = \ln(N_2 - N_1) / T_2 - T_1$$

Donde N₁ y N₂ representan la densidad celular en los tiempos T₁ y T₂, respectivamente.

Determinación de la concentración del fósforo

Las concentraciones de P, como fosfato (PO₄), fueron determinadas mediante el uso del kit respectivo basado en la determinación fotolorimétrica del método del molibdato de amonio y paquetes de análisis de Nutrafin Test para fosfato (0.0 – 5.9 mgL⁻¹).

Determinación de la remoción y asimilación del P

El consumo del P fue determinado de la diferencia diaria de la concentración (mg L⁻¹) en los cultivos. La tasa de remoción total (%) fue estimada del total del P consumido durante el experimento. Asimismo, el consumo diario (CD) del P por cada célula (mg g⁻¹) fue determinado de la división del consumo de P (mg L⁻¹) y el número de células ($\times 10^4$ cel mL⁻¹).

$$CD = A / C$$

Donde A es el consumo diario del fósforo y C la población de células ($\times 10^4$ cel mL⁻¹).

Parámetros del cultivo

Diariamente, se registró la temperatura y el pH de los cultivos, utilizando un termómetro de 0-100 °C y un pH-metro digital. Estos registros ayudaron a monitorear el crecimiento óptimo del cultivo



RESULTADOS

Crecimiento Poblacional

Todos los cultivos mantuvieron crecimientos similares, demostrando la activa participación del P en un amplio rango de concentración. Al final del experimento, los cultivos controles

presentaron el mayor crecimiento poblacional (213.33×10^4 cel mL⁻¹); sin embargo, estos no mostraron diferencia estadística significativa comparados con los cultivos con mayores concentraciones de P (Tabla 2 y Fig. 1).

Tabla 2
Crecimiento poblacional (x 10⁴ cel mL⁻¹) de los cultivos de *T. suecica*

Día	Densidad celular (cel. L ⁻¹)			
	23.03	44.80	79.50	94.20
0	35.00 ±0.00 ^a	35.00 ±0.00 ^a	35.00 ±0.00 ^a	35.00 ±0.00 ^a
1	50.67 ±9.24 ^a	36.00 ±4.00 ^a	45.33 ±4.62 ^a	49.33 ±12.22 ^a
2	61.33 ±8.33 ^a	97.33 ±6.11 ^b	100.00 ±4.00 ^b	101.33 ±28.10 ^b
3	71.33 ±16.04 ^a	61.67 ±8.14 ^a	63.33 ±25.01 ^a	64.00 ±12.17 ^a
4	81.00 ±13.00 ^a	77.17 ±15.37 ^a	88.00 ±25.24 ^a	81.33 ±12.42 ^a
5	90.67 ±10.07 ^a	92.67 ±24.03 ^a	112.67 ±26.63 ^a	98.67 ±23.01 ^a
6	126.67 ±22.03 ^a	120.00 ±29.05 ^a	136.00 ±17.44 ^a	130.00 ±24.33 ^a
7	213.33 ±16.17 ^a	162.67 ±34.49 ^a	156.00 ±34.18 ^a	146.67 ±35.85 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$.

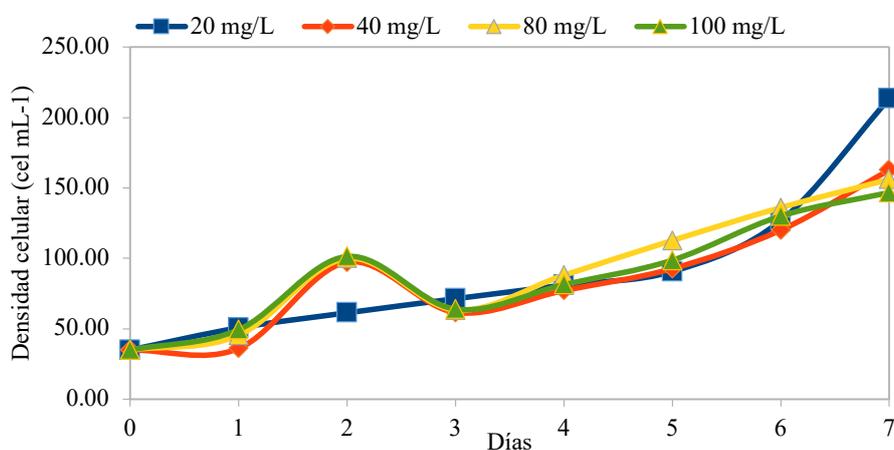


Figura 1. Curvas de crecimiento de los cultivos de *T. suecica*.

La mayor tasa de crecimiento ($\mu = 0.74 \pm 0.01$) se obtuvo con el medio HM, en los tratamientos controles; sin embargo, no se observó diferencia estadística significativa con los obtenidos en los cultivos con mayores concentraciones de P. En estos cultivos, la tasa de crecimiento fue similar con mínimas fluctuaciones (Tabla 3).



Tabla 3
Tasas de crecimiento (μ) de los cultivos de *T. suecica*

Parámetro	Concentración de P (mg L^{-1})			
	23.03	44.80	75.90	94.20
N_i	35.00 \pm 0.00 ^a	35.00 \pm 0.00 ^a	35.00 \pm 0.00 ^a	35.00 \pm 0.00 ^a
N_f	213.33 \pm 16.17 ^a	162.67 \pm 34.49 ^a	156.00 \pm 34.18 ^a	146.67 \pm 35.85 ^a
Día	7	7	7	7
μ (d^{-1})	0.74 \pm 0.01 ^a	0.69 \pm 0.04 ^a	0.68 \pm 0.04 ^a	0.67 \pm 0.04 ^a

Letras diferentes indican diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$.

Asimilación y remoción del P

La asimilación diaria del P es un proceso constante cuya cinética mostró similares tendencias durante los días de cultivo (Tabla 4 y Fig. 2). Concordante a ello, las tasas porcentuales de asimilación disminuyen con

la dosificación del P (Tabla 5), observando las menores asimilaciones en el día 7 de cultivo. Sin embargo, las cantidades de P asimiladas en los diferentes cultivos varía notablemente, y son estadísticamente diferente entre los tratamientos.

Tabla 4
Concentración del P (mg L^{-1}) en los cultivos de *T. suecica*

Día	Concentración de P (mg L^{-1})			
	23.03	44.80	75.90	94.20
1	23.03 \pm 0.50 ^a	44.80 \pm 1.71 ^b	75.90 \pm 1.93 ^c	94.20 \pm 3.39 ^d
2	18.43 \pm 0.70 ^a	36.33 \pm 1.07 ^b	67.17 \pm 1.27 ^c	81.00 \pm 3.64 ^d
3	11.27 \pm 0.86 ^a	31.87 \pm 3.20 ^b	48.63 \pm 1.80 ^c	71.67 \pm 4.75 ^d
4	7.67 \pm 0.50 ^a	21.07 \pm 2.14 ^b	40.00 \pm 3.38 ^c	65.63 \pm 5.28 ^d
5	6.46 \pm 0.60 ^a	19.03 \pm 1.23 ^b	39.21 \pm 2.18 ^c	64.20 \pm 3.67 ^d
6	5.86 \pm 0.25 ^a	18.62 \pm 1.02 ^b	37.45 \pm 1.95 ^c	62.04 \pm 3.20 ^d
7	5.07 \pm 0.72 ^a	17.33 \pm 0.81 ^b	36.37 \pm 0.32 ^c	60.03 \pm 2.91 ^d

Letras diferentes indican diferencia significativa con un valor de $p < 0.05$.

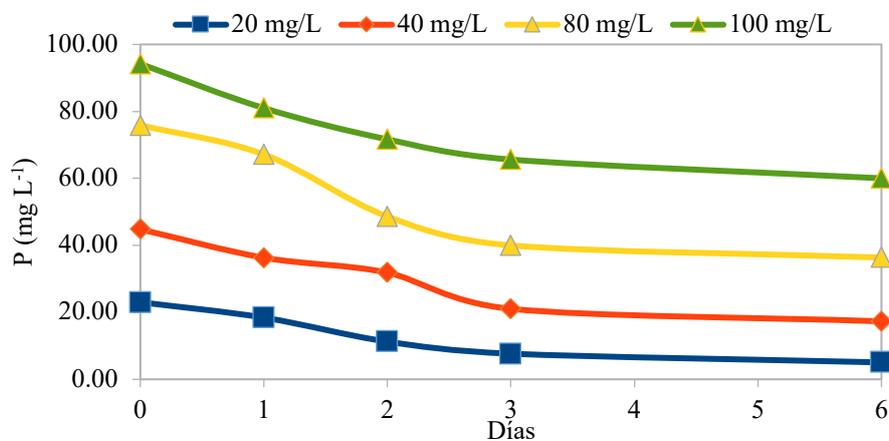


Figura 2. Concentración del P en los cultivos de *T. suecica*.

Los cultivos controles dosificados con 23.03 mg L⁻¹ de P alcanzaron mayor consumo porcentual diario en relación a los cultivos experimentales (Tabla 5). Generalmente, se dosifica el P con ligero exceso para evitar interferencias en el crecimiento algal; sin embargo, los menores valores de asimilación total podrían ser consecuencia de interferencias ocasionadas

por la precipitación extracelular, formación de complejos químicos del P con otros nutrientes y la sedimentación algal, observada en los cultivos más densos. Pese al menor porcentaje de asimilación total del P determinado en los cultivos dosificados con 94.2 mg L⁻¹ de P, resulta efectiva la asimilación de P por la microalga en aguas con altas concentraciones de P.

Tabla 5
Asimilación y remoción del P (mg L⁻¹ y %) en los cultivos de *T. suecica*

Día	Asimilación de P (mg L ⁻¹)							
	23.03		44.80		75.90		94.20	
	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%
1-2	4.6	19.74	8.5	18.97	8.7	11.46	13.2	14.01
2-3	7.2	30.90	4.5	10.04	18.5	24.37	9.3	9.87
3-4	3.6	15.45	10.8	24.11	8.6	11.33	6	6.37
4-5	1.2	5.15	2.0	4.46	0.8	1.05	1.4	1.49
5-6	0.6	2.58	0.4	0.89	1.8	2.37	2.2	2.34
6-7	0.8	3.43	1.3	2.90	1.1	1.45	2	2.12
Total	18.00	77.25	27.50	61.38	39.50	52.04	34.10	36.20

Consumo diario de P

El consumo diario del P por cada célula de *T. suecica* es mayor durante los primeros cuatro días de cultivo, durante la fase de adecuación de los cultivos. A partir del día 4, el consumo diario

muestra similar comportamiento con niveles que disminuyen paulatinamente, concordante con el aumento de la densidad celular de los cultivos y la activa asimilación del P (Tabla 6).

Tabla 6
Consumo diario (CD) del P x 10⁷ célula de *T. suecica*

Día	Consumo de P (mg x 10 ⁷ cel ⁻¹)			
	23.03	44.80	75.90	94.20
1-2	0.075	0.087	0.087	0.130
2-3	0.101	0.073	0.292	0.145
3-4	0.044	0.140	0.098	0.074
4-5	0.013	0.022	0.007	0.014
5-6	0.005	0.003	0.013	0.017
6-7	0.004	0.008	0.007	0.014

La cantidad de P asimilado intracelularmente aumentó en los cuatro primeros días según la dosificación del P, alcanzado los dosificados con 75.90 mg L⁻¹ de P el mayor valor (0.292 mg x 10⁷ cel⁻¹) en el día 2 del ensayo, relacionados con la disminución del área fotosintética y aumento de espacios lisígenos intracelulares (Fig. 3).



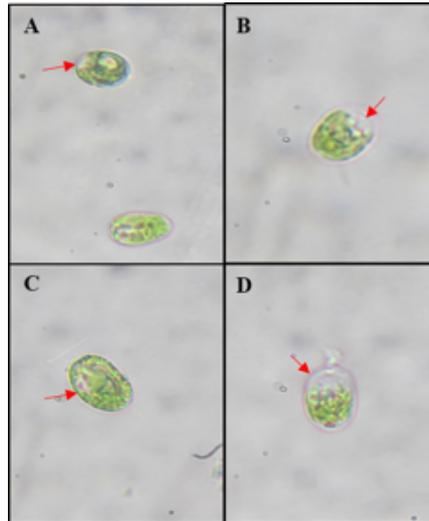


Figura 3. Microfotografías de *T. suecica*. Se muestran las áreas fotosintéticas de las células de *T. suecica* (x 400 magnificaciones) en las diferentes concentraciones de P: A) 23.03; B) 44.8; C) 75.9 y D) 94.2 mg L⁻¹ P.

Parámetros del cultivo

Las variaciones de temperatura (25.1 - 26.9) y pH (7.2 - 8.9) de los cultivos mostraron pocas variaciones por las condiciones de laboratorio, de tal manera que no afectaron el crecimiento de *T. suecica* ni la tasa de asimilación del P.

DISCUSION

Crecimiento poblacional

Los cultivos de *T. suecica* presentaron crecimientos desde el inicio de los ensayos debido a la capacidad de utilizar el P como macronutriente (Laws *et al.*, 2011), alcanzando valores más altos en los días 6 y 7; Sin embargo, todos los cultivos mostraron similar tendencia en crecimiento (Tabla 2). Asimismo, las curvas de crecimiento demuestran la constante utilización del P, independientemente del exceso de P dosificado. Por otro lado, el incremento de P, de 2 a 5 veces de su concentración normal (23 mg L⁻¹ de P), ocasiona turbidez de los cultivos algales, lo cual puede interferir con los procesos fotosintéticos y ser la causa de la ligera disminución del crecimiento (Tirok & Scharler, 2014), en relación al cultivo control (Fig. 1).

Asimismo, la tasa de crecimiento (μ) de los cultivos controles son ligeramente más altos, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) con los dosificados a diferentes concentraciones de P (Tabla 3),

ratificando la activa utilización del P en el crecimiento algal. Sin embargo, el exceso del P en los tratamientos experimentales propicia su activa incorporación intracelular como gránulos o formación de vesículas que al disminuir el área fotosintética disminuyen la coloración verde característico de los cultivos controles. Pese a ello, las tasas de crecimiento observadas en los cultivos con mayores concentraciones de P están consideradas dentro de un rango normal para la especie.

Asimilación y remoción del P

Se determinó que la remoción de P no tuvo relación directa con el crecimiento algal, por su uso como nutriente y por la liberación del P adherido extracelularmente durante el proceso de reproducción. En tal sentido, las mayores asimilaciones observadas en los cultivos con dosificación de P fueron determinadas a 75.90 mg L⁻¹ en el día 4, con posteriores disminuciones debido a la división y/o muerte de las células con formación de vesículas y pérdida de área fotosintética. Además, se identificó diferentes patrones en la asimilación del P por los cultivos de *T. suecica* (Fig. 2) cuyos porcentajes de asimilación disminuyen notoriamente con la concentración de P (Tabla 5), debido a la mayor precipitación extracelular del P y aumento del pH. Estos resultados son comparables con el 60 % obtenidos con cultivos usando

aguas residuales de pescadería con *Chlorella pyrenoidosa* (Andrade *et al.*, 2009).

Cabe señalar que, la asimilación del P considera dos procesos fundamentales: 1) precipitación extracelular resultante de interacción química entre el ion y la superficie de la célula mediante interacciones electrostáticas: fuerzas de Van der Waals, enlace covalente, interacción redox, biomineralización, formación de complejos por coordinación electrostática o por covalencia (Tien, 2002) y 2) activa asimilación interna con participación de fitoquelatinas, polipéptidos de cadena corta, y proteínas codificados por genes (Perales-Vela *et al.*, 2006) con acumulación irreversible intracelular en gránulos o vesículas.

Asimismo, la precipitación extracelular del P en altas dosificaciones induce una reducción en su asimilación por unidad de biomasa, y/o ejerce un efecto de cáscara resultando en menor asimilación específica por unidad de biomasa. Por otro lado, las menores concentraciones de P, al no ejercer un efecto de precipitación, aumentan la relación P/biomasa algal, coincidiendo con nuestros resultados en donde la mayor asimilación se presenta en los controles (77.83 %) disminuyendo hasta 36.20 % en los dosificados con 94.2 mg L⁻¹ de P (Tabla 5).

Consumo diario de P

El consumo individual diario de las células de *T. suecica* fue mayor en los cultivos dosificados con 75.9 mg L⁻¹ de P (0.292 mg x10⁷ cel⁻¹) en relación al de 23 mg L⁻¹ de P (0.101 mg x10⁷ cel⁻¹) considerado como control (Tabla 6), demostrando que la capacidad de asimilación intracelular del P no afecta las tasas de crecimiento por ser un proceso independiente de la concentración del ion en el medio acuático. Contrariamente, se considera que la remoción depende de las concentraciones del P, condiciones de cultivo y estado fisiológico de las células, no obstante, la formación de gránulos o vesículas intracelulares ha demostrado ser un factor que disminuye el área fotosintética con el aumento de la dosificación del P, considerado como un mecanismo de protección o desintoxicación (Monteiro *et al.*, 2012).

Parámetros del cultivo

Por las condiciones de laboratorio, las variaciones de la temperatura y pH se mantienen dentro de los rangos adecuados que no afectan el crecimiento de los cultivos algales; Sin embargo, los menores valores (7.63) de los cultivos dosificados con 100 mg L⁻¹ de P se relacionaría con la mayor precipitación extracelular y disponibilidad de iones fosfatos que afectaría la asimilación de iones metálicos (Monteiro *et al.*, 2012). El fósforo es vital para la formación del ATP fotosintético por fosforilación cíclica y acíclica y participa en la síntesis de los ácidos nucleicos, fosfolípidos, coenzimas y proteínas y su asimilación es en forma de fosfatos, orgánico o inorgánico, mediante fosfomonoesterasa no específica con la actividad óptima a pH alcalino (Hernández *et al.*, 2002).

CONCLUSIONES

Los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de P mostraron estadísticamente similares tasas de crecimientos por ser importante nutriente para la reproducción y crecimiento algales con valores de 0.74; 0.69; 0.68 y 0.67 (día⁻¹) para los cultivos dosificados con 23, 44.8, 75.9 y 94.2 mg L⁻¹ de P, respectivamente.

T. suecica es capaz de asimilar activamente el P presente en altas concentraciones en el medio acuático marino mediante la formación de gránulos y vesículas intracelulares, cuya capacidad de remoción es inversamente proporcional a su concentración de 77.25, 61.38, 52.04 y 36.20 % en los cultivos dosificados con 23, 44.8, 75.9 y 94.2 mg L⁻¹ de P, respectivamente.

Los resultados obtenidos muestran las posibilidades de utilizar cultivos masivos de *T. suecica* como una estrategia ecoamigable para retirar excesos del P sin recurrir al uso de sustancias químicas que podrían causar contaminación secundaria en el ambiente acuático marino.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su más profundo agradecimiento al estudiante Gustavo E. Olivos-Ramirez por sus perlas de sabiduría brindadas para la realización de este trabajo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd Elfata, R., & Wagih Abou, G. (2017). Influence of Various Concentrations of Phosphorus on the Antibacterial, Antioxidant and Bioactive Components of Green Microalgae *Scenedesmus obliquus*. *International Journal of Pharmacology*, 14(1), 99-107. <https://doi.org/10.3923/ijp.2018.99.107>
- Aguirre-Velarde, A., Thouzeau, G., Jean, F., Mendo, J., Cueto-Vega, R., Kawazo-Delgado, M., Vásquez-Spencer, J., Herrera-Sanchez, D., Vega-Espinoza, A., & Flye-Sainte-Marie, J. (2019). Chronic and severe hypoxic conditions in Paracas Bay, Pisco, Peru: Consequences on scallop growth, reproduction, and survival. *Aquaculture*, 512, 734259. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734259>
- Andrade, C. E., Vera, A. L., Cárdenas, C. H., & Morales, E. D. (2009). Producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp. utilizando aguas residuales de pescadería. *Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia*, 32(2), 126-134. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S025407702009000200005
- Borowitzka, M. A. (2018). Chapter 3—Biology of Microalgae. En I. A. Levine & J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23-72). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Doering, P., Oviatt, C., Nowicki, B., Klos, E., & Reed, L. (1995). Phosphorus and nitrogen limitation of primary production in a simulated estuarine gradient. *Marine Ecology Progress Series*, 124, 271-287. <https://doi.org/10.3354/meps124271>
- Fabris, M., Abbriano, R. M., Pernice, M., Sutherland, D. L., Commault, A. S., Hall, C. C., Labeeuw, L., McCauley, J. I., Kuzhiuparambil, U., Ray, P., Kahlke, T., & Ralph, P. J. (2020). Emerging Technologies in Algal Biotechnology: Toward the Establishment of a Sustainable, Algae-Based Bioeconomy. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00279>
- Guerra-Renteria, A. S., García-Ramírez, M. A., Gómez-Hermosillo, C., Gómez-Guzmán, A., González-García, Y., & González-Reynoso, O. (2019). Metabolic Pathway Analysis of Nitrogen and Phosphorus Uptake by the Consortium between *C. vulgaris* and *P. aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1978. <https://doi.org/10.3390/ijms20081978>
- Guillard, R. (1973). Division Rates. In: J. R. Stein (ed). *Handbook of phycological methods and grow measurement*. Cambridge University Press. London. 290-311 pp.
- Hernández, I., Niell, F. X., & Whitton, B. A. (2002). Phosphatase activity of benthic marine algae. An overview. *Journal of Applied Phycology*, 14(6), 475-487. <https://doi.org/10.1023/A:1022370526665>
- Kim, I., Yang, H.-M., Park, C. W., Yoon, I.-H., Seo, B.-K., Kim, E.-K., & Ryu, B.-G. (2019). Removal of radioactive cesium from an aqueous solution via bioaccumulation by microalgae and magnetic separation. *Scientific Reports*, 9(1), 10149. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46586-x>
- Laws, E. A., Pei, S., Bienfang, P., & Grant, S. (2011). Phosphate-limited growth and uptake kinetics of the marine prasinophyte *Tetraselmis suecica* (Kylin) Butcher. *Aquaculture*, 322-323, 117-121. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.09.041>
- Lei, Y.-J., Tian, Y., Zhang, J., Sun, L., Kong, X.-W., Zuo, W., & Kong, L.-C. (2018). Microalgae cultivation and nutrients removal from sewage sludge after ozonizing in algal-bacteria system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 165, 107-114. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.096>
- López-Rodas, V., Marvía, F., Costas, E., & Flores-Moya, A. (2008). Microalgal



- adaptation to a stressful environment (acidic, metal-rich mine waters) could be due to selection of pre-selective mutants originating in non-extreme environments. *Environmental and Experimental Botany*, 64(1), 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.01.001>
- Merino, J. F. (2000). Informe de Año Sabático. Universidad Nacional del Santa.
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28(2), 299-311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Novák, Z., Harangi, S., Baranyai, E., Gonda, S., B-Béres, V., & Bácsi, I. (2020). Effects of metal quantity and quality to the removal of zinc and copper by two common green microalgae (*Chlorophyceae*) species. *Phycological Research*, 68(3), 227-235. <https://doi.org/10.1111/pre.12422>
- Pacheco, D., Rocha, A. C., Pereira, L., & Verdelhos, T. (2020). Microalgae Water Bioremediation: Trends and Hot Topics. *Applied Sciences*, 10(5), 1886. <https://doi.org/10.3390/app10051886>
- Páez-Osuna, F. (2005). Retos y perspectivas de la camaronicultura en la zona costera. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 1, 21-31.
- Pandey, A., Singh, M. P., Kumar, S., & Srivastava, S. (2019). Phycoremediation of Persistent Organic Pollutants from Wastewater: Retrospect and Prospects. En S. K. Gupta & F. Bux (Eds.), *Application of Microalgae in Wastewater Treatment* (pp. 207-235). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-13913-1_11
- Pavasant, P., Ritcharoen, W., Sriouam, P., Nakseedee, P., Sang, P., Powtongsook, S., & Kungvansaichol, K. (2014). Cultivation options for indoor and outdoor growth of *Chaetoceros gracilis* with airlift photobioreactors. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 8(01), 100-113. <https://doi.org/10.14456/mijst.2014.9>
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Sarker, N. K., & Salam, P. A. (2019). Indoor and outdoor cultivation of *Chlorella vulgaris* and its application in wastewater treatment in a tropical city—Bangkok, Thailand. *SN Applied Sciences*, 1(12), 1645. <https://doi.org/10.1007/s42452-019-1704-9>
- Solovchenko, A. E., Ismagulova, T. T., Lukyanov, A. A., Vasilieva, S. G., Konyukhov, I. V., Pogosyan, S. I., Lobakova, E. S., & Gorelova, O. A. (2019). Luxury phosphorus uptake in microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 31(5), 2755-2770. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-01831-8>
- Tien, C.-J. (2002). Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry*, 38(4), 605-613. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00183-8)
- Tirok, K., & Scharler, U. M. (2014). Influence of variable water depth and turbidity on microalgae production in a shallow estuarine lake system—A modelling study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 146, 111-127. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.05.011>
- Ummalyma, S. B., Pandey, A., Sukumaran, R. K., & Sahoo, D. (2018). Bioremediation by Microalgae: Current and Emerging Trends for Effluents Treatments for Value Addition of Waste Streams. En S. J. Varjani, B. Parameswaran, S. Kumar, & S. K. Khare (Eds.), *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges* (pp. 355-375). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7434-9_19



Wollmann, F., Dietze, S., Ackermann, J.-U., Bley, T., Walther, T., Steingroewer, J., & Krujatz, F. (2019). Microalgae wastewater treatment: Biological and technological approaches. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 860-871. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900071>

