



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIRIQUÍ

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**ESTUDIO DE BACTERIAS AUTÓCTONAS EN SIMBIOSIS CON *Chlorella vulgaris*
PARA LA DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES**

ESTUDIANTE

GUERRA SALGUERA, MELANIE JAIRLENE

ASESOR PRINCIPAL

MSc. LUIS GONZALEZ

COASESORES

DRA. ARIADNA BATISTA

MSc. VIRGILIO ESPINOZA

TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA CON ÉNFASIS EN MICROBIOLOGÍA

DAVID, CHIRIQUÍ, REPÚBLICA DE PANAMÁ

2025

DEDICATORIA

“A Dios, por la fortaleza y sabiduría concedida en todo momento, a mis padres, familia, pareja y amigos, por su amor, comprensión y apoyo incondicional.”

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a **Dios**, por darme la fortaleza, la salud y la sabiduría necesaria para culminar esta etapa.

De manera especial quiero agradecer a mi madre **Ana Salguera**, y mi padre **Marcos Guerra**, quienes fueron un pilar fundamental en este proceso, gracias por su esfuerzo, por creer en mí y su apoyo incondicional, por acompañarme en cada paso, no solo con respaldo económico, sino con motivación constante.

A mi pareja **Diego Acosta**, por su paciencia, por creer en mis capacidades, brindarme su apoyo, amor, por escucharme, aconsejarme y estar presente en cada etapa de este camino.

A mi asesor M.Sc **Luis González**, por su valiosa orientación, paciencia y dedicación durante el desarrollo de este trabajo. Sus conocimientos y consejos no solo enriquecieron esta investigación, también fueron una fuente constante de motivación y aprendizaje.

De igual manera a mi co-asesora, la Dra. **Ariadna Batista**, por su guía, tiempo, acompañamiento, observaciones oportunas y su constante disposición para apoyarme en cada etapa de este proceso, por compartirme sus conocimientos, experiencias y consejos.

A mi co-asesor, Msc. **Virgilio Espinoza**, por su valiosa orientación en la realización de esta investigación. Su apoyo, claridad y disposición para ayudarme en todo este proceso fueron de gran importancia.

Agradezco también al Centro de Investigaciones de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) y al grupo de Biotecnología de Microalgas (BIOMI), por brindarme el espacio, los recursos y el apoyo necesario para llevar a cabo esta investigación. Al laboratorio de microbiología L-15, por el espacio, equipos y materiales brindados para desarrollar esta investigación.

A **Miguel Vega**, quien fue un apoyo invaluable durante todo el proceso de investigación. Gracias por su disposición, por compartir sus conocimientos, por ayudarme a superar las dificultades y por estar siempre presente cuando se necesitó.

Su colaboración y compromiso fueron de gran importancia para mí en todo este proceso, y sigo agradecida por su apoyo constante hasta el día de hoy. A mis compañeros de laboratorio del grupo BIOMI, Andrea, Dionicio, Byron, José, María y Yuri por su apoyo, por sus conocimientos y por la disposición y ayuda mostrada a lo largo de todo este proceso de investigación los cuales fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A la Lcda. **Dayra Icaza**, por sus conocimientos prácticos y apoyo, por guiarme con paciencia y por enseñarme con disposición en todo momento.

A mis **amigos y familiares** que, de una u otra forma, aportaron su granito de arena en la realización de este proyecto, mi más sincero agradecimiento.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
INDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1. MARCO INTRODUCTORIO	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Aspectos generales del problema	3
1.2. Hipótesis	5
1.3. Objetivo general	5
1.4. Objetivos específicos	5
1.5. Alcance del trabajo.....	6
1.6. Limitaciones	6
1.7. Justificación.....	7
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	9
2. MARCO TEORICO	10
2.1. Aguas residuales industriales.....	10
2.2. Microalgas.....	11
2.3. Microalgas en la depuración de aguas residuales	12
2.4. Mecanismo de captación de nutrientes en las aguas residuales por las microalgas	13
2.4.1. Nitrógeno	13
2.4.2. Fósforo	14
2.5. <i>C. vulgaris</i>	15
2.6. Consorcio Microalga-Bacteria	16
2.7. Normativas Ambientales vigentes en Panamá.....	18
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22

3.1. Población	22
3.1.1. Muestra.....	22
3.1.2. Tipo de muestreo	22
3.2. Métodos e instrumentos de investigación.	22
3.2.1. Microalgas	22
3.2.2. Bacterias:.....	27
3.3. Análisis estadístico.....	29
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.1. Crecimiento de inóculo de <i>Chlorella vulgaris</i>	31
4.2. Crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en control (tratamiento sin bacterias) y R1, R2 y R3 (tratamiento con bacterias).	31
4.3. Remoción de <i>C. vulgaris</i> en control (tratamiento sin bacterias) y R1, R2 y R3 (tratamiento con bacterias).	41
4.4. Comparación de los parámetros evaluados de los ensayos experimentales frente a la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000.....	53
4.5. Identificación de las bacterias presentes en las muestras de agua residual utilizadas, antes y después.....	55
CAPÍTULO V. CONSIDERACIONES FINALES	63
5. CONSIDERACIONES FINALES.....	64
5.1. Conclusiones.....	64
5.2. Recomendaciones.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	67
ANEXOS	80
6. ANEXOS.....	81
6.1. Crecimiento celular-curva de Absorbancia vs Concentración	81
6.2. Selección del medio BG-11 para el crecimiento del inóculo de <i>C. vulgaris</i> ..	82
6.3. Montaje de los ensayos.....	82
6.4. Determinación de la concentración de nitratos y fosfatos en los cultivos con agua residual.	82
6.5. Determinación de la concentración de amonio y demanda química de oxígeno.	83
6.6. Evaluación de parámetros de los cultivos.	83
6.7. Análisis microbiológico de agua residual.....	84

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros con el máximo permisible para ser vertidos a los cuerpos de agua receptores.....	19
Tabla 2. Características del ensayo preliminar empleado como base metodológica...	27
Tabla 3. Promedios de parámetros pH, temperatura e intensidad lumínica en el E1.....	36
Tabla 4. Promedios de parámetros pH, temperatura e intensidad lumínica en el E2.....	37
Tabla 5. Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO (mg/L) del agua residual inicia y final, tratamiento del E1 siete días.....	42
Tabla 6. Remoción (%) de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO del E1.....	43
Tabla 7. Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO (mg/L) del agua residual inicia y final, tratamiento del E2 nueve días.....	43
Tabla 8. Remoción (%) de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO del E2.....	44
Tabla 9. Comparación del cumplimiento de los parámetros fisicoquímicos de los ensayos con la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000.....	54
Tabla 10. Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales antes de tratamiento, E1.....	57
Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales después de tratamiento, E1.....	58
Tabla 12. Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales antes de tratamiento, E2.....	60

Tabla 13. Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales después de tratamiento, E2.....	60
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de asimilación de nutrientes en las aguas residuales por la microalga.....	14
Figura 2. <i>Chlorella vulgaris</i>	15
Figura 3. Posibles interacciones establecidas entre microalgas y bacterias.....	17
Figura 4. Crecimiento del inóculo de <i>C. vulgaris</i> en medio BG-11.....	31
Figura 5. Ensayo preliminar, crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en control (tratamiento sin bacterias) (tratamiento con bacterias, réplicas R1, R2 y R3).....	31
Figura 6. E1, crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en control (tratamiento sin bacterias) (tratamiento con bacterias, réplicas R1, R2 y R3).....	32
Figura 7. E2, crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en control (tratamiento sin bacterias) (tratamiento con bacterias, réplicas R1, R2 y R3).....	33
Figura 8. Actividad fotosintética para <i>C. vulgaris</i> , E1.....	39
Figura 9. Actividad fotosintética para <i>C. vulgaris</i> , E2.....	40
Figura 10. Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} y NH_4^+ (mg/L) del agua residual inicia y final del tratamiento del E1 siete días.....	42
Figura 11. Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} y NH_4^+ (mg/L) del agua residual inicia y final, tratamiento del E2 nueve días.....	44
Figura 12. Tinciones de Gram, Gram positiva (A) y Gram negativa (B) de algunas de las colonias aisladas.....	56
Figura 13. Estriado en placa con Agar MacConkey (A y C) y agar EMB (B).....	56

Figura 14. Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las presuntas especies bacterianas presentes en las aguas residuales antes y después de tratamiento.....	57
Figura 15. Curva de calibración para análisis de crecimiento celular.....	81
Figura 16. Montaje del ensayo, crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en condiciones axénicas (control) y crecimiento de <i>C. vulgaris</i> con bacterias autóctonas del agua residual (tratamiento).....	82
Figura 17. Determinación de la concentración de fosfatos y nitratos en los cultivos con agua residual, método de azul de ácido ascórbico (A) y método de reducción por cadmio (B).....	82
Figura 18. Determinación de la concentración de Amoniaco (A) y demanda química de oxígeno (B).....	83
Figura 19. Evaluación de crecimiento microalgal, pH, temperatura y actividad fotosintética.....	83
Figura 20. Diluciones seriadas de la muestra de agua residual.....	84
Figura 21. Sembrado en agar recuento.....	84
Figura 22. Recuento de las colonias bacterianas.....	85
Figura 23. Sembrado de las colonias en agar MacConkey y EMB.....	85
Figura 24. Sembrado de las colonias en pruebas bioquímicas	85

RESUMEN

El tratamiento de aguas residuales industriales mediante métodos biológicos y procesos bioquímicos con FBRs representa una alternativa sostenible frente a los procesos convencionales. El objetivo de este estudio fue evaluar la simbiosis entre bacterias autóctonas con *C. vulgaris* para la depuración de aguas residuales, con el propósito de determinar su eficiencia en la remoción de nutrientes y materia orgánica. Inicialmente la microalga *C. vulgaris* fue inoculada y cultivada en agua residual industrial, el diseño experimental contempló un control axénico (microalga en ausencia bacteriana) y el tratamiento (microalgas con bacterias presentes en las aguas residuales). Además, se analizó la remoción de nutrientes en ambos tratamientos y se evaluaron las condiciones de los cultivos de temperatura, pH, intensidad lumínica y actividad fotosintética. Los resultados de crecimiento microalgal obtenidos, para el control fue de 8.22 g/L y en el tratamiento entre 4.18 – 6.53 g/L para el ensayo 1. Para el ensayo 2 se obtuvieron resultados de 11.48 g/L para el tratamiento control y de 11.73 – 12.31 g/L para el tratamiento con presencia de bacterias. Las condiciones evaluadas para ambos ensayos se obtuvieron valores de T entre 23°C-24.5°C, pH entre 8-9 y para la intensidad lumínica suministrada fue entre 299.22 - 376.15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$. El porcentaje de remoción obtenido para ambos ensayos fue superior a 60% tanto de NH_4^+ como de PO_4^{3-} , y para el NO_3^- , la remoción de ambos ensayos se mantuvo entre 34.3%-70.0%. La identificación microbiológica de bacterias reveló la presencia de los géneros *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* y *Bacillus spp.*, los cuales han sido reportados en la literatura a procesos de biorremediación, así como también a posibles interacciones con microalgas. Estos resultados demuestran que *C. vulgaris* es capaz de crecer y remover eficientemente nutrientes presentes en las aguas residuales industriales, incluso en interacción con bacterias autóctonas, ya que permite que el efluente tratado, los nutrientes como NH_3 y NO_3^- , cumplan con los límites permisibles por la norma DGNTI-COPANIT 35-2000, mejorando su calidad, reduciendo los riesgos sanitarios y ambientales asociados a su vertido.

Palabras Claves: agua residual, bacterias, microalga, nutrientes, simbiosis.

ABSTRACT

The treatment of industrial wastewater through biological methods and biochemical processes using FBRs represents a sustainable alternative to conventional processes. The aim of this study was to evaluate the symbiosis between autochthonous bacteria and *C. vulgaris* for the purification of wastewater, in order to determine their efficiency in the removal of nutrients and organic matter. Initially, the microalga *C. vulgaris* was inoculated and cultivated in industrial wastewater. The experimental design included an axenic control (microalgae in the absence of bacteria) and a treatment condition (microalgae with bacteria present in the wastewater). Additionally, nutrient removal was analyzed in both treatments, and culture conditions such as temperature, pH, light intensity, and photosynthetic activity were assessed. Microalgal growth results showed that, for the control, biomass reached 8.22 g/L, while in the treatment condition values ranged from 4.18 to 6.53 g/L in Trial 1. In Trial 2, biomass values were 11.48 g/L for the control and between 11.73 and 12.31 g/L for the treatment with bacterial presence. For both trials, evaluated conditions ranged between 23°C–24.5°C for temperature, pH values of 8–9, and light intensity between 299.22–376.15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. Nutrient removal percentages for both trials exceeded 60% for NH_4^+ and PO_4^{3-} , while NO_3^- removal ranged between 34.3% and 70.0%. Microbiological identification revealed the presence of *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., and *Bacillus* spp., which have been reported in the literature as involved in bioremediation processes and potential interactions with microalgae. These results demonstrate that *C. vulgaris* is capable of growing and efficiently removing nutrients present in industrial wastewater, even in interaction with autochthonous bacteria. This allows the treated effluent to meet the permissible limits for nutrients such as NH_3 and NO_3^- established by the DGNTI-COPANIT 35-2000 standard, improving its quality and reducing the environmental and sanitary risks associated with its discharge.

Keywords: wastewater, bacteria, microalgae, nutrients, symbiosis.

CAPÍTULO 1. MARCO INTRODUCTORIO

1. INTRODUCCIÓN

El manejo y disposición inadecuada de los vertidos generados por actividades antropogénicas, especialmente aquellas asociadas al uso del agua para consumo humano e industrial, contribuyen significativamente a la contaminación de los recursos hídricos (Pereira et al., n.d.) Lo que puede generar impactos negativos en ecosistemas acuáticos y en la salud humana. Además, el rápido crecimiento poblacional incrementa la demanda de agua y hace necesaria la implementación de métodos sostenibles, así como el desarrollo de nuevas tecnologías para el tratamiento de aguas residuales (Humanante et al., 2021)

Dentro de estas tecnologías, en investigaciones actuales se ha destacado el uso de microalgas, los cuales son organismos fotosintéticos que poseen la capacidad de remover nutrientes y compuestos contaminantes presentes en las aguas residuales. La microalga *C. vulgaris*, en particular ha sido la especie de alga más estudiada en el tratamiento de aguas residuales, debido a que es una cepa robusta, con una tasa de crecimiento rápida y posee la capacidad de tolerar diferentes condiciones ambientales, además de su alta eficiencia en la remoción de nitrógeno y fósforo (Wirth et al., 2020).

Sin embargo, esta eficiencia puede verse influenciada por la presencia de bacterias asociadas que pueden interactuar de manera simbiótica con la microalga, afectando de esta manera el proceso de depuración de estas aguas. Las interacciones que se pueden dar entre bacterias y microalgas comprenden desde el mutualismo, competencia o antagonismo, ya que ambos microorganismos pueden producir compuestos que podrían inhibir o favorecer el crecimiento de la otra parte (Aditya et al., 2022). Por lo tanto, saber cuáles son las bacterias autóctonas en las aguas residuales, comprender su influencia en *C. vulgaris* para su depuración, es de importancia para optimizar los procesos de tratamiento.

El presente estudio, tiene como objetivo, evaluar la relación entre las bacterias presentes en aguas residuales industriales y su influencia en la eficiencia depurativa de *C. vulgaris*. Para ello, se determinará la tasa de crecimiento de la microalga, se identificarán las bacterias autóctonas presentes en las aguas residuales y se evaluará

la remoción de nutrientes como nitrato, amonio, fosfatos y se determinará la demanda química de oxígeno (DQO).

El desarrollo de esta investigación aporta conocimientos relevantes sobre las interacciones entre microalga-bacteria aplicados a la biorremediación, ofreciendo una alternativa ecológica y sostenible para el tratamiento de aguas residuales industriales perteneciente al sector de procesamiento de productos de origen animal. Además, permite comparar la calidad del efluente tratado en ambas condiciones con los parámetros establecidos en el Reglamento Técnico DGNTI-COPANIT 35-200.

1.1. Aspectos generales del problema

El agua es un recurso indispensable para la vida y una necesidad esencial para el ser humano. Sin embargo, la contaminación del agua por actividades domésticas, agrícolas e industriales se ha convertido en uno de los factores más preocupantes en la actualidad, ya que desencadena una problemática de difícil control: la generación y vertido de aguas residuales (Vargas-Perdomo et.al., 2018).

Estas aguas contienen una gran cantidad de contaminantes que ejercen un impacto negativo sobre el medio ambiente, afectando diversos ecosistemas. Pese a ello, con frecuencia no se garantiza que reciban un tratamiento eficiente para su reutilización y aprovechamiento sostenible (Vargas-Perdomo et.al., 2018). El problema es más crítico en los centros urbanizados, donde la alta concentración poblacional y la intensa actividad industrial generan volúmenes significativamente mayores de descarga (Autoridad Nacional de Ambiente, 2011).

En Panamá, las tecnologías tradicionales de tratamiento registradas en el Instituto Nacional de Acueductos y Alcantarillados Nacionales (IDAAAN) incluyen lagunas de oxidación y estabilización, tanques sépticos y tanques de Imhoff (Fábrega et al., 2015). No obstante, diversos informes muestran que estos sistemas presentan limitaciones de eficiencia y operación. Según Silva (2015), Panamá enfrenta un problema significativo en la gestión de aguas residuales, lo que afecta directamente la disponibilidad y calidad de este recurso hídrico. En la ciudad de Panamá, se descargan aproximadamente 280,000 m³ diarios de aguas residuales, la mayoría sin tratamiento, hacia los ríos y la Bahía de Panamá, debido a un alcantarillado sanitario que solo cubre

al 70% de la ciudad. En el Informe del Estado del Ambiente (GEO) (Ministerio de Ambiente, 2024), señalan que las descargas de aguas servidas sin tratamiento adecuado afectan negativamente las zonas costeras, deteriorando tanto la calidad de agua como el ecosistema marino. Un caso destacado, es la Bahía Manzanillo, donde se ha presentado una alta contaminación que ha impactado la fauna y flora debido al incremento de descargas domésticas e industriales, incrementado por el crecimiento poblacional y al vertido no controlado de estas aguas.

La provincia de Chiriquí no escapa a esta realidad, donde el Ministerio de Ambiente (MiAmbiente) ha reportado reiteradamente descargas de aguas residuales a ríos y quebradas, asociadas a fallas en plantas de tratamiento y a manejos inadecuados de sistemas locales. En octubre de 2024, autoridades ambientales reconocieron públicamente la creciente preocupación por los afluentes contaminados debido al vertido de aguas residuales y servidas (Ministerio de Ambiente, 2025). Esta situación evidencia la necesidad urgente de contar con tecnologías más sostenibles y efectivas para el manejo de las descargas.

En este contexto, los métodos biológicos han emergido como una alternativa innovadora y sostenible. Entre ellos, la biorremediación con microalgas, conocida como ficorremediación, ha demostrado ser eficaz en la eliminación de nutrientes, metales pesados y patógenos. Las microalgas no solo contribuyen a la depuración al absorber nitrógeno y fósforo, sino que además proporcionan oxígeno a bacterias aeróbicas heterotróficas, favoreciendo la mineralización de contaminantes orgánicos, mientras aprovechan el CO₂ producido en la respiración bacteriana (Muñoz & Guieysse, 2006).

En años recientes He et al. (2013) mencionan que múltiples investigaciones han evidenciado la relevancia de las interacciones simbióticas entre microalgas y bacterias para optimizar la depuración de aguas residuales, un ejemplo notable es en su investigación donde usó la microalga *C. vulgaris* en consorcio con bacterias autóctonas de las aguas residuales, alcanzando remociones de hasta 97% de amonio y 98% de fosfatos.

En Panamá, la literatura científica en esta área aún es escasa. En la Universidad Autónoma de Chiriquí (UNACHI), Vega Quiel 2022 evaluó el crecimiento de microalgas *Chlorella sorokiniana* en aguas residuales de distinta procedencia, analizando su capacidad depuradora. Sin embargo, este es uno de los pocos estudios nacionales reportados, lo que contrasta con la amplia evidencia internacional.

En consecuencia, la presente investigación se centra en las bacterias simbióticas asociadas a *C. vulgaris* en el proceso de depuración de aguas residuales industriales. El objetivo principal es caracterizar estas bacterias y determinar su influencia en la eficiencia de depuración, aportando evidencia científica local que contribuya al desarrollo de alternativas sostenibles para el manejo de las aguas residuales en Panamá.

1.2. Hipótesis

Ho: No existe diferencia significativa en los parámetros de NO_3^- , NH_3 , PO_4^{3-} y DQO entre el tratamiento con *C. vulgaris* asociada a bacteria autóctonas y el grupo control.

Ha: Existe diferencia significativa en los parámetros de NO_3^- , NH_3 , PO_4^{3-} y DQO entre el tratamiento con *C. vulgaris* asociada a bacteria autóctonas y el grupo control.

1.3. Objetivo general

- Evaluar la simbiosis entre bacterias autóctonas con *C. vulgaris* para la depuración de aguas residuales.

1.4. Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de crecimiento de la microalga *C. vulgaris* en aguas residuales.
- Identificar las bacterias autóctonas presentes en las aguas residuales.
- Evaluar la remoción (%) de los nutrientes (nitrato, fosfato y amonio) y materia orgánica (DQO) presentes en las aguas residuales.

- Monitorear parámetros de crecimiento como pH, temperatura, actividad fotosintética y luz durante el ensayo de depuración.
- Comparar los resultados obtenidos con la normativa panameña DGNTI-COPANIT 35-2000.

1.5. Alcance del trabajo

Este estudio se llevó a cabo en el Centro de Investigación de Productos Naturales y Biotecnología (CIPNABIOT) y en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad Autónoma de Chiriquí, ubicada en el distrito de David, provincia de Chiriquí, Panamá. El muestreo consistió en tres muestras de aguas residuales. La finalidad principal de esta investigación fue evaluar cuales eran las bacterias presentes en las aguas residuales y su simbiosis con *C. vulgaris* en la depuración de aguas residuales.

Esta investigación contribuye a la búsqueda de una alternativa sostenible para el tratamiento de aguas residuales, ayudando a la reducción de contaminantes que afectan a la salud pública y calidad de recursos hídricos. Además, representa una oportunidad, a las empresas generadoras de aguas residuales, para explorar métodos biológicos de depuración, más accesibles y amigables con el ambiente.

Fortalece las líneas de estudio en biotecnología de microalgas de la universidad, contribuyendo a la base de conocimientos que podrán ser utilizada como referencia para futuros proyectos e investigaciones, también permite fortalecer la formación de profesionales en el manejo sostenible del agua, desarrollando competencias en diversas áreas como microbiología y tratamiento biológico de efluentes.

También, fomenta el desarrollo de nuevos métodos y técnicas, desarrollando sistemas experimentales basados en consorcios microalga-bacteria, las cuales pueden optimizarse y adaptarse a distintos tipos de agua residual.

1.6. Limitaciones

Durante el desarrollo de esta investigación se presentaron diversas limitaciones que influyeron en el tiempo, recursos y ejecución de los experimentos. La identificación y aislamiento de las bacterias que pueden establecer una simbiosis con *C. vulgaris*

presenta su complejidad debido a que algunas bacterias pueden ser difíciles de cultivar o requieren de condiciones más específicas para su desarrollo en el laboratorio.

Además, la identificación de las bacterias se realizó mediante pruebas bioquímicas, debido a la carencia de equipos para análisis moleculares lo cual permitiría de esta manera una identificación más precisa. No obstante, las pruebas bioquímicas empleadas, a pesar de sus limitaciones, permitieron obtener una aproximación útil de la diversidad bacteriana presente en las muestras obtenidas.

Otra de las limitaciones estuvo relacionada con los cultivos microalgales, ya que el desarrollo de *C. vulgaris* en aguas residuales industriales no siempre fue uniforme, requiriendo un control riguroso de luz, temperatura y nutrientes. También la generación de un inóculo adecuado, puesto que fue necesario alcanzar concentraciones celulares estables antes de iniciar los ensayos, demandando tiempo adicional y un monitoreo frecuente.

El acceso al agua residual industrial también presentó ciertas dificultades, debido a que fue necesario coordinar con la empresa generadora de estas aguas para el ingreso a sus instalaciones y para obtener las muestras en cantidades suficientes para la investigación.

En cuanto al aspecto económico, el costo de los reactivos y equipos utilizados en los análisis fisicoquímicos y microbiológicos constituyó una limitante ya que algunos insumos específicos no están disponibles localmente y debían adquirirse con tiempos de entrega prolongados, retrasando de esta manera el cronograma planteado.

1.7. Justificación

El aumento de la población y el crecimiento industrial generan un mayor volumen de aguas residuales, cuya descarga sin tratamiento adecuada amenaza la calidad de las fuentes de agua (Delvalle-Borrero et al., 2022; Kulzhanova et al., 2024). Entre las alternativas de tratamiento, las microalgas destacan por su capacidad de absorber nitrógeno y fósforo, aprovechando los nutrientes presentes en estos efluentes (Gonçalves et al., 2017).

La interacción de microalgas con bacterias autóctonas favorece procesos de mutuo beneficio, ya que estos pueden estimular su crecimiento mediante la provisión de nutrientes, vitaminas o dióxido de carbono, contribuyendo a una mayor eficiencia en la depuración (Moronta et al. 2006; Wang et al. 2014). Sin embargo, los estudios que caracterizan estas interacciones y las poblaciones bacterianas en aguas residuales son aún limitadas (Ferrero et al., 2012; Unnithan et al., 2014).

La gestión inadecuada del agua en el país repercute directamente en la salud pública, la biodiversidad y el desarrollo sostenible. La aplicación de sistemas biológicos innovadores, como el uso de microalgas y bacterias, ofrece una alternativa sustentable y de bajo costo. Ante este panorama, esta investigación busca aportar una alternativa e información sustentada en el uso de microalgas (*Chlorella vulgaris*) en asociación con bacterias autóctonas presentes en las aguas residuales, como una estrategia de depuración.

Es una propuesta que ofrece una solución viable para reducir cargas contaminantes como nitrógeno, fósforo y materia orgánica de las aguas residuales industriales y que, al ser implementada, contribuye a la mejora de la calidad de los efluentes tratados, así como minimiza los impactos ambientales que puedan ocasionar.

En Panamá, la investigación en biorremediación con microalgas es aún escasa, lo que dificulta la generación de estrategias efectivas de tratamiento. Este estudio busca aportar información científica y práctica sobre el uso de microalgas en simbiosis con bacterias autóctonas de las aguas, proponiendo de esta manera una alternativa sostenible y ambientalmente responsable, con el fin de contribuir a la gestión de los recursos hídricos en el país.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2. MARCO TEORICO

2.1. Aguas residuales industriales

Las aguas residuales son generadas por diversas actividades antropogénicas que pueden afectar su calidad, produciendo efectos negativos en el ambiente y la salud humana, cuando estas son vertidas sin ser tratadas adecuadamente (Medrano et al., 2024); presentan una mezcla de componentes, como compuestos orgánicos e inorgánicos y sintéticos (Kumar et al., 2022; Manasa & Mehta, 2020).

La composición de las aguas residuales puede variar en función de su ubicación como de la actividad que se realice, desde áreas como la agricultura, industrial y granjas (Acién et al., 2016). Los principales contaminantes son el nitrógeno y el fósforo, contribuyendo de esta manera a la eutrofización de lagos y ríos, si no se tratan y vierten de manera adecuada (Liu et al., 2016).

Estas aguas pueden ser generadas por residenciales, comercios, industrias que incluyen cualquier tipo de contaminante o desechos, su composición varía ampliamente dependiendo de su origen, los cuales pueden contener desde virus, bacterias patógenas y no patógenas, así como parásitos (Sonune & Garode 2015).

Las aguas residuales industriales van a variar en cantidad, composición y fuerza, debido a la fuente industrial específica. Estos efluentes, además de los contaminantes típicos de las aguas residuales domésticas, pueden incluir otros compuestos peligrosos, entre ellas los metales pesados (Oladimeji et al., 2024).

Las aguas residuales producidas por las actividades industriales pueden clasificarse en cinco grandes grupos: aquellos con efluentes orgánicos, generadas por mataderos y lecherías, efluentes inorgánicos como las refinerías, efluentes mezclados con ambos compuestos como en las refinerías; efluentes con sólidos en suspensión producidos en lavaderos de minerales y los efluentes de refrigeración que provienen de centrales térmicas y nucleares (Candela Orduz, 2016).

La liberación de estas aguas residuales representa una amenaza significativa para aquellos cuerpos de agua que actúan como receptores, debido a que estos efluentes

suelen contener altas concentraciones de compuestos orgánicos e inorgánicos, dando lugar a la eutrofización (Rawat et al., 2011).

2.2. Microalgas

Las microalgas son organismos fotosintéticos que se pueden encontrar en ambientes acuáticos, desde aguas dulces y marinas como corrientes de diversas fuentes de aguas residuales, incluso existen especies que pueden crecer en rocas o suelos, o en asociaciones simbióticas con plantas, animales y hongos (Liu et al., 2016, Santaefemia Sánchez, 2019). Para su desarrollo y crecimiento, requieren principalmente de carbono (principalmente CO₂), magnesio, hierro, fósforo, calcio, nitrógeno, potasio, azufre, también de otras moléculas orgánicas e inorgánicas complejas (Santaefemia Sánchez, 2019).

Son microorganismos fundamentales en la producción primaria de los ecosistemas acuáticos y desempeñan un papel importante dentro de la cadena trófica, poseen un tamaño promedio de 5-50 µm, contienen clorofila a, pigmento que les confiere su característico color verde. Además, son fuente de diversos compuestos utilizados de interés industrial, como carotenoides, lípidos, polisacáridos, entre otros (Candela Orduz, 2016).

Son microorganismos que pertenecen al Reino Protista, organismos de vida libre donde su metabolismo es fotoautótrofo, aunque algunas especies pueden ser mixotróficas o heterótrofas. Poseen cloroplastos, comparten características similares con plantas terrestres y macroalgas, como la presencia de membrana tilacoidal, clorofila a y b, pigmentos como B-caroteno y xantofilas (Barreiro Vescovo, 2019.)

Las microalgas desempeñan un papel de importancia tanto en el mantenimiento como en la sostenibilidad de cualquier ecosistema, debido a su capacidad de poder adaptarse a los cambios ambientales y a su deterioro. Según Santaefemia Sánchez (2019), las microalgas pueden biodegradar o biotransformar aquellos contaminantes orgánicos a través de su acción metabólica, y los mecanismos de eliminación que incluyen desde la acumulación, la degradación y la transformación o mineralización.

2.3. Microalgas en la depuración de aguas residuales

Estas aguas residuales pueden ser usadas para la producción de microalgas como también para la purificación de las mismas, esto es debido a que contienen carbono, nitrógeno y fósforo como otros nutrientes en menor cantidad, dando como resultado a una composición de aguas similar a los medios de cultivo utilizados para la producción microalgal (Acién et al., 2016).

Generalmente las aguas residuales utilizadas como medio de cultivo para las microalgas son aguas que ya han sido pretratadas de manera parcial o total, y se utilizan para mejorar las características del agua antes de ser vertidas a los cuerpos de agua (Medrano et al., 2024).

Las microalgas se han consolidado como unos organismos prometedores para la biorremediación en etapas terciarias del tratamiento de aguas residuales, gracias a su versatilidad metabólica. Estos microorganismos no solo generan subproductos con baja o nula toxicidad, sino que además producen biomasa, la cual puede aprovecharse para la elaboración de productos como los bioestimulantes o biocombustibles (Sousa et al., 2024). Además, su capacidad para poder realizar metabolismo, heterótrofo y mixotrófico, fotoautótrofo, convirtiéndolos en organismos flexibles para el tratamiento de aguas residuales desde industriales, hasta municipales (Aldrin Alberca et al., 2023).

Según Gonçalves et al. (2017), el utilizar a las microalgas para la eliminación de los nutrientes de las aguas residuales, presentaría varios beneficios:

- ✓ El N y P asimilado por estos microorganismos se podrían reciclar mediante la producción de biofertilizantes a partir de la biomasa producida por la misma.
- ✓ La biomasa puede ser utilizada para la elaboración de otros productos como alimentos, productos farmacéuticos.
- ✓ Además, que se vierte un efluente oxigenado a los cuerpos de agua.

Los sistemas basados en microalgas pueden estar conformados por comunidades celulares que incluyen cultivos puros, que son de una sola especie (Monocultivo), hasta asociaciones de diversas especies de microalgas (Policultivos), o consorcios

mixtos en los que interactúan microalgas con otros microorganismos como las bacterias de manera simbiótica (Sousa et al., 2024).

Especies de microalgas como *C. vulgaris* ha demostrado un efecto positivo en la eliminación de los principales elementos inorgánicos que se encuentran presentes en las aguas residuales (Fathi et al., 2013) La especie *Scenedesmus obliquus* según, Ji et al. (2013), también demuestra ser bastante prometedora en la biorremediación de aguas residuales provenientes de las granjas porcinas.

Vega Quiel (2022), en su investigación evaluó el crecimiento y la capacidad depuradora de la microalga *Chlorella sorokiniana*, cultivada en cinco aguas residuales de distintas procedencias, obtuvo como resultado una eliminación favorable de nitratos como de fosfatos que sobrepasó el 50% para los ensayos de agua residual de distinta procedencia.

Los sistemas basados en microalgas permiten la eliminación simultánea de materia orgánica y nutrientes con costes energéticos mínimos (fotobiorreactores alimentados por energía solar) basándose en una relación mutuamente beneficiosa que se establece entre microalgas y bacterias durante el tratamiento de aguas residuales (Ferrero et al., 2012)

2.4. Mecanismo de captación de nutrientes en las aguas residuales por las microalgas

2.4.1. Nitrógeno

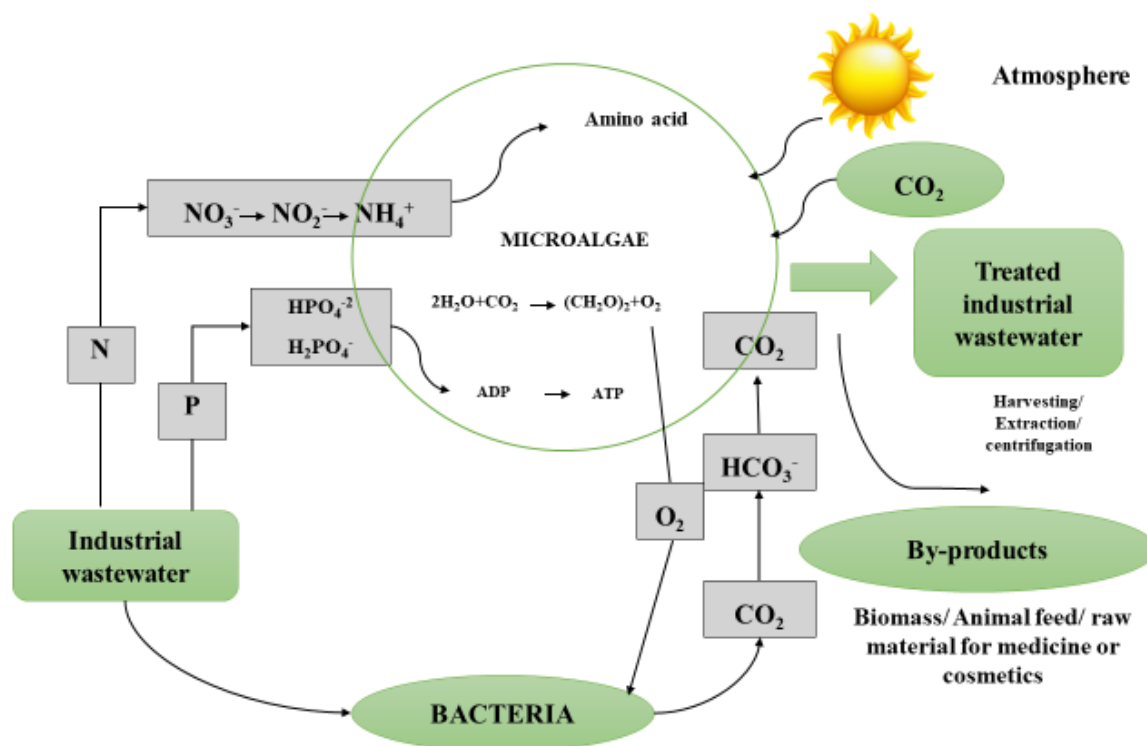
El nitrógeno de acuerdo con Umamaheswari & Shanthakumar, (2016) es un nutriente esencial para el sistema de crecimiento de las microalgas. Las microalgas desempeñan un papel vital en la conversión del nitrógeno inorgánico a su forma orgánica mediante un proceso de asimilación que pueden realizar todas las microalgas eucariotas, las cuales requieren nitrógeno inorgánico en forma de nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), amoníaco (NH_3) e ion amonio (NH_4^+). En general, la transformación del nitrógeno inorgánico se produce a través de la membrana plasmática de las microalgas, seguida de la reducción de NO_3^- a NO_2^- y posteriormente a NH_4^+ , que posteriormente se integra en aminoácidos.

2.4.2. Fósforo

El fósforo también es un factor clave en el metabolismo energético y el crecimiento de las microalgas. Según Umamaheswari & Shanthakumar, (2016) durante el metabolismo, los fosfatos, en forma de dihidrogenofosfato (H_2PO_4^-) y monohidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), se asimilan a los orgánicos componentes mediante el proceso denominado fosforilación. Este proceso libera adenosín difosfato (ADP) y adenosín trifosfato (ATP) en presencia de un aporte energético que posiblemente se obtiene de la oxidación del sustrato en el sistema o de la luz en el caso de la fotosíntesis.

Figura 1

Mecanismo de asimilación de nutrientes en las aguas residuales por la microalga



Nota. Adpatada de (Umamaheswari & Shanthakumar, 2016).

2.5. *C. vulgaris*

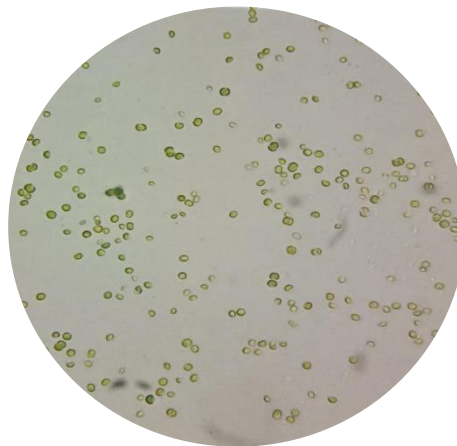
Las microalgas del género *Chlorella* spp. son un gran grupo de microorganismos eucariotas, unicelulares y fotosintéticos que están ampliamente distribuidos en ambientes de agua dulce. *Chlorella* spp. puede crecer de forma fotoautótrofa y ha sido usada como modelo en diversas investigaciones. Se encuentran entre los pocos grupos de microalgas capaces de usar C orgánico para el crecimiento heterótrofo, lo cual dota a *Chlorella* spp. de una flexibilidad metabólica en respuesta a la perturbación ambiental (Santaeufemia Sánchez, 2019).

Este género debido a estas características y a su gran capacidad metabólica ha despertado interés como una potencial microalga para la producción industrial de biomasa, para la obtención de lípidos a partir de su biomasa (Vega Ayala, 2022) de biodiesel (Sánchez-Borroto et al., 2018) entre otros.

C. vulgaris es una microalga fotosintética que fue descubierta por primera vez por el microbiólogo y botánico holandés Martinus Willen Beijerinck en 1980, pertenece al reino Protista, su división es *Chlorophyta*, orden *Chlorococcales*, familia *Chlorellaceae*, del género *Chlorella*, se caracteriza por su color verde brillante y por su forma esférica con un diámetro de 2-10 µm. Es una de las especies de microalgas más estudiadas experimentalmente, debido a su gran adaptabilidad a diferentes ambientes, desde aguas residuales, frescas hasta en el suelo (Medrano, 2024).

Figura 2

Chlorella vulgaris



Posee una alta velocidad de crecimiento además de exhibir un gran potencial para el tratamiento de aguas residuales, ya que puede tolerar condiciones ambientales rigurosas que son encontradas en estas aguas y asimila de manera eficiente el nitrógeno y fósforo presentes en estas aguas (Prieto Márquez et al., 2020)

Fathi et al. (2013), estudió la ficorremediación y el potencial de la producción sostenible de biocombustibles de algas específicamente *C. vulgaris* utilizando aguas residuales, ya que tienen el potencial para generar cantidades significativas de biomasa y aceites aptos para la conversión a biodiesel. Los resultados obtenidos indican que el cultivo de *C. vulgaris* en aguas residuales posee un efecto positivo en la eliminación de aquellos principales compuestos inorgánicos que se encuentran presentes en las aguas residuales, además que con la producción de biomasa resultante se puede utilizar como una fuente de energía renovable.

2.6. Consorcio Microalga-Bacteria

Los sistemas de microalgas-bacterias proporcionan una eliminación eficiente de los nutrientes presentes en las aguas residuales de diferentes fuentes e incluso pueden promover su desinfección (Sousa et al., 2024). Las microalgas y las bacterias interactúan de varias maneras, de manera simbiótica, es decir mutualismo, a la competencia, o sea antagonismo (Aditya et al., 2022).

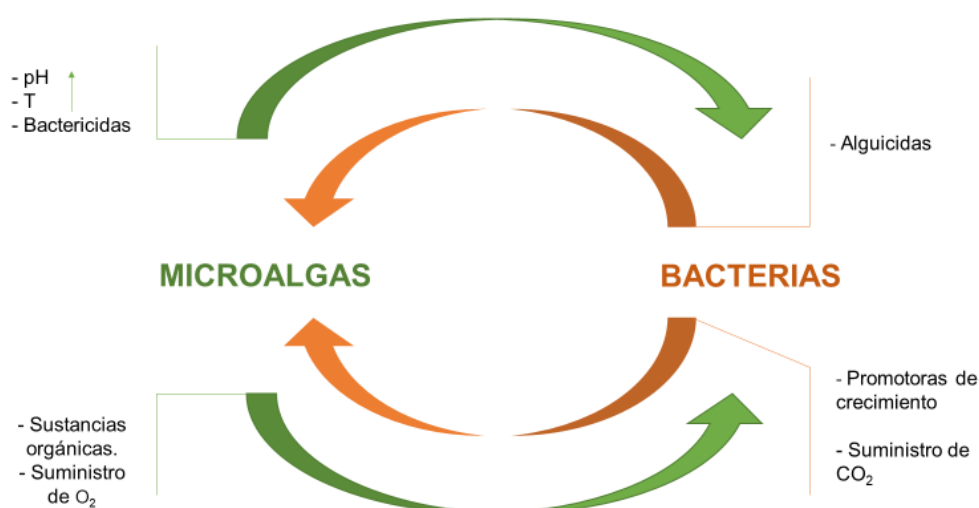
Estos microorganismos están en el equilibrio de la composición atmosférica, desde la fijación del carbono y el rechazo de oxígeno, contribuyendo de esta manera a la vida animal y vegetal. Son capaces de colonizar todo tipo de ambientes, desde aguas saladas, salobres, hasta las aguas residuales, esto es debido a su capacidad para adaptarse a estos ambientes y sobrevivir (Al-Mayah et al., 2018).

Las microalgas y bacterias coexisten en diversos ecosistemas acuáticos, desde columnas de agua hasta sedimentos, en ambientes dulceacuícolas como marinos. Además de su metabolismo fotosintético, donde producen biomasa, diversas especies microalgales pueden utilizar compuestos orgánicos mediante la mixotrofia o heterotrofia (Perez-Garcia et al., 2011; Ñañez et al., 2024). Por su parte, las bacterias también participan en la degradación de materia orgánica y en conjunto su diversidad aporta beneficios simbióticos y alto valor ambiental (Aditya et al., 2022).

El intercambio de nutrientes es la base del mutualismo entre microalgas y bacterias, el cual es una interacción biológica existente entre dos o más organismos de diferentes especies donde se benefician mutuamente (Fuentes et al., 2016). Durante la fotosíntesis, las microalgas liberan O_2 , que las bacterias emplean como aceptor de electrones para degradar materia orgánica, generando CO_2 que posteriormente es asimilado por las microalgas (Zhang et al., 2020). Asimismo, la microalga puede beneficiarse de compuestos esenciales suministrados por las bacterias, como vitamina B, nitrógeno fijado, lo que favorece un crecimiento microalgal mejorado (Fuentes et al., 2016).

Figura 3

Posibles interacciones establecidas entre microalgas y bacterias



Nota. Adaptada de Barreiro Vescovo, 2019.

Asimismo, algunas bacterias asociadas facilitan la biofloculación de microalgas mediante la producción de polisacáridos y proteínas, mejorando la eficiencia y reduciendo los costos del proceso de cosecha (Zhang et al., 2020).

Además de las relaciones mutualistas presentes entre microalgas y bacterias, también están las relaciones antagónicas sobre la fisiología y el metabolismo de los mismos. Las bacterias pueden producir metabolitos tóxicos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento excesivo de microalgas (Zhang et al., 2020). También pueden inhibir su

crecimiento modificando el microambiente en el que ambas se encuentran y compitiendo entre ellas por los nutrientes disponibles en las aguas residuales (Wang et al., 2014)

Además, las microalgas son capaces de liberar moléculas bactericidas, inhibiendo de esta manera el crecimiento de las bacterias, tal es el caso del género *Chlorella* sp., produce la clorelina, molécula con actividad antibacteriana en especies como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Barreiro Vescovo 2019). Las microalgas también pueden ser beneficiosas para las bacterias, ya que pueden liberar metabolitos extracelulares cooperando con su crecimiento, además de ofrecerle un hábitat donde las protegen de condiciones ambientales adversas (Gonçalves et al., 2017).

Comprender las interacciones entre las microalgas y bacterias es clave para optimizar el rendimiento en la eliminación de nutrientes en las aguas residuales. Estas interacciones entre los microorganismos pueden variar desde relaciones simbióticas como competitivas, las cuales se pueden basar en el intercambio de energía y de nutrientes (Aditya et al., 2022).

Según Zhang et al. (2020) las interacciones entre microalgas y bacterias pueden mejorar el rendimiento del tratamiento de aguas residuales, tanto municipales como las industriales:

- ✓ Permite el intercambio de metabolitos y soporta periodos de limitación de nutrientes.
- ✓ Resiste la contaminación por otras especies.
- ✓ Le proporciona robustez al medio ambiente.
- ✓ Mejora la absorción general de nutrientes presentes en las aguas residuales.

2.7. Normativas Ambientales vigentes en Panamá

El Ministerio de Ambiente (MiAmbiente), es la entidad encargada de regular y supervisar las fuentes hídricas del territorio panameño. Sus controles han evidenciado que la principal fuente de contaminación del agua en el país es el vertido de aguas residuales en los cauces superficiales, tanto de ríos como de quebradas (Rodríguez & Zarraonandia, 2016).

La descarga de aguas residuales representa una fuente significativa de nutrientes, principalmente de fósforo y nitrógeno, en cuerpos de agua, contribuyendo de esta manera a la eutrofización y al deterioro ambiental (Aditya et al., 2022).

La concentración de contaminantes y nutrientes de las aguas residuales tratadas se encuentran reguladas por leyes, decretos y normas, estableciendo su calidad apropiada para su vertido en aguas superficiales o su posterior uso (Rodríguez & Zarraonandia, 2016).

El reglamento técnico DGNTI-COPANIT 35-2000, establece los límites permisibles que deben cumplir los vertidos de efluentes líquidos provenientes de actividades, domésticas, comerciales e industriales, las cuales son descargadas a cuerpos de agua y masas de agua superficiales y subterráneas. En la **Tabla 1** se encuentran algunos de los parámetros con el máximo permisible que deben cumplir los vertidos de efluentes líquidos.

Tabla 1

Parámetros con el máximo permisible para ser vertidos a los cuerpos de agua receptores

Parámetros	Unidad	Expresión	Límite máximo permisible
Fósforo total	mg/L	P	5
Demanda Química de Oxígeno	mgO ₂ /L	DQO	100
Nitratos	mg/L	NO ₃ ⁻	6
Nitrato orgánico	mg/L	N	10
Nitrógeno amoniacal	mg/L	N-NH ₃	3
Olor	-	-	No perceptible
pH	-	pH	5,5-9,0
Temperatura	°C	-	3°C de la T.N.

Nota. Fuente adaptada de Dirección General de Normas y Tecnología Industrial, 2000. Las concentraciones se refieren a valores totales. T.N: Temperatura normal del sitio.

Por medio de este reglamento técnico, se protege la salud de la población, el medio ambiente, y se preservan los recursos hídricos de la contaminación derivadas de las actividades industriales, comerciales y domésticas.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Población

3.1.1. Muestra

- **Microorganismo:** La microalga de estudio fue *C. vulgaris*, muestreada, número de permiso de muestreo ARB-111-2023, por miembros del grupo BIOMI-CIPNABIOT en Barú-Chiriquí y aislada por Andrea Polo y Byron Álvarez. La identificación fue realizada en colaboración con miembros del CIMAR Universidad de Costa Rica, esta microalga reposa en el área de investigación del grupo BIOMI-CIPNABIOT.
- **Agua Residual:** La muestra de agua residual fue recolectada directamente del último punto de efluente del sistema de tratamientos de aguas residuales de la empresa seleccionada, antes de pasar por el proceso de desinfección con luz ultravioleta y antes de ser vertida. Se realizaron tres muestreos, uno para ensayo preliminar y otros dos para los ensayos finales, se recolectaron tres litros de agua residual utilizando recipientes estériles y fueron transportadas en condiciones de refrigeración a 4°C y luego transportadas al laboratorio para sus análisis.

3.1.2. Tipo de muestreo

- Diseño completamente al azar.

3.2. Métodos e instrumentos de investigación.

3.2.1. Microalgas

- **Crecimiento del inóculo**

Los materiales, como vasos químicos (KIMAX Kimble de 100, 250 y 400 mL), pipetas (DISPOSABLE Kimble de 5 mL), Erlenmeyer (KIMAX Kimble de 500 y 1000 mL) probetas (ValueWare Kimble 100 y 500 mL), fueron esterilizados en la autoclave ALP CL-40LDP (ALP Co., Ltd.) a una temperatura 135°C y a una presión de 1 atm. Una vez esterilizados los materiales, el inóculo de la microalga *C. vulgaris* se hizo crecer libre de contaminantes en medio BG-11, en un periodo de 20 días. En este crecimiento

se utilizó el sistema de cultivo batch (estático) utilizando un volumen de 1 litro, a temperatura de 22-24 °C, agitación constante, rango de pH 7-8 e iluminación PAR (Radiación Fotosintéticamente Activa, 400-700 nm), el crecimiento celular se evaluó mediante técnicas espectrofotométricas (ABS: 680nm) y por conteo celular.

- **Crecimiento con agua residual esterilizada (Control)**

Se utilizaron 400 mL de agua residual previamente esterilizada mediante autoclave (121°C, 15 minutos). Se le añadió el inóculo de *Chlorella vulgaris*, previamente centrifugada Hermle Z287-A a 5000 rpm por 5 minutos para separar el medio en el que se encontraba y la microalga, correspondiente al 20% de volumen total, es decir 80 mL de cultivo de la microalga. Esta agua residual estéril fue inoculada únicamente con la microalga *C. vulgaris* lo que permite evaluar su capacidad de remoción de nutrientes en ausencia de bacterias.

Se utilizaron 400 mL de agua residual previamente esterilizada en autoclave (121°C, 15 min). Se tomaron 80 mL de cultivo de *C. vulgaris* y se distribuyeron en dos tubos de 40 mL cada uno, los cuales se centrifugaron a 5000 rpm por 5 minutos en un equipo Hermle Z287-A. Una vez obtenido el pellet este se añadió a los 400 mL de agua residual estéril, constituyendo a un inóculo equivalente al 20% del volumen total. La mezcla obtenida consistió en agua residual estéril inoculada únicamente con *C. vulgaris* en ausencia de bacterias.

- **Crecimiento en agua residual**

En una botella de vidrio de borosilicato (KIMAX) de 2000 mL, se agregaron 1200 mL de agua residual, al cual se le añadió 240 mL del inóculo de *C. vulgaris*. Se agito constantemente, luego se colocó 400 mL, en tres Erlenmeyer (KIMAX Kimble de 500 mL), las muestras se trabajaron por triplicado.

Cada crecimiento en agua residual fue evaluado frente al tratamiento control, con análisis de pH, temperatura y actividad fotosintética (F_v/F_m), todos los cultivos fueron mantenidos en condiciones controladas de laboratorio, con exposición de 24 horas luz y agitación constante.

Para el análisis de pH se utilizó el phmetro OAKTON pH 150 Waterproof, para medir la temperatura se empleó el POWLAKEN digital thermometer y para el análisis de actividad fotosintética fue usado el AQUAPEN-C AP110/C.

- **Crecimiento celular**

La cinética de crecimiento de la microalga se evaluó empleando la técnica de espectrofotometría, de acuerdo a la productividad de biomasa generada por día. Para este análisis se realizó un gráfico de ABS a una λ de 680 nm vs Concentración (g/Ld).

Para realizar el gráfico se prepararon 5 patrones con concentraciones (%) de 20, 40, 60, 80 y 100 del inóculo microalgal, a estos patrones se le evaluaron los sólidos suspendidos (mg/L), utilizando el sistema de filtración al vacío (KIMBLE), donde se filtró 10 mL de cada patrón, utilizando filtros secos (Glass Microfiber Filter Media, Grado F, THOMAS SCIENTIFIC) donde se realizaron 5 veces hasta llegar a un peso constante, los cuales posteriormente fueron secados a 105°C por 24 horas en un horno. Seguidamente a cada uno de los patrones se le evaluó la absorbancia a una longitud de onda de 680 nm, utilizando el espectrofotómetro HACH DR3900.

- **Evaluación del consumo de nutrientes**

La evaluación de consumo de nutrientes de nitratos, fosfatos y amonio se realizó a través de técnicas espectrofotométricas. La concentración de nitrato se analizó mediante el método de reducción de cadmio, empleando almohadillas HACH, (0,3-30,00 mg/L)-Nitruver 5; para el consumo de fosfatos, se utilizó el método de azul de ácido ascórbico, con almohadillas HACH (0,02-2,50 mg/L)-PhosVer 3; para el amonio se utilizó el método de salicilato HACH (2-47 mg/L)- TNT plus 832 y para la Demanda Química de Oxígeno se usó el método de digestión del reactor DQO HR 20-1500 mg/L. La concentración se evaluó al inicio y al final del ensayo según cada tratamiento.

Demanda química de oxígeno (20-1500 mg/L)-Método 8000, Extraído de HACH Company (1992)

- Se procedió a encender el reactor HACH DRB200 y precalentar a 150°C. Luego se destaparon los tubos de reactivo de digestión de DQO.

- Para la preparación del blanco, se tomó un tubo a 45° y con una micropipeta se le agregó 2 mL de agua destilada. Para la preparación de la muestra, se realizó el mismo procedimiento, donde se le agregó 2 mL de la muestra a analizar.
- Se taparon los tubos y se mezcló suavemente varias veces, teniendo precaución ya que los viales se calentaban mucho durante la mezcla, luego se colocaron los viales en el reactor y se cerró la tapa.
- Estos viales se calentaron por dos horas a 150°C y luego se dejaron enfriar en una rejilla para tubos a temperatura ambiente, para proceder a su análisis en el espectrofotómetro a una longitud de 620 nm.

**Determinación de fosfatos con almohadilas HACH (Phosver 3 0,02-2,50 mg/L)-
Método 8048**, Extraído de HACH Company (1992)

- Se inició con el programa P, se preparó la muestra llenando una celda con 10 mL de la misma, luego se le añadió el contenido de reactivo de Phosver en polvo, y se agitó vigorosamente durante 30 segundos para mezclar y se dejó reposar por dos minutos.
- Para el blanco, se llenó otra cubeta con 10 mL de agua destilada, luego se le añadió el contenido de reactivo de Phosver en polvo, y se agitó vigorosamente durante 30 segundos para mezclar y se dejó reposar por dos minutos a temperatura ambiente.
- Luego del tiempo de reposo, se limpió el exterior de la cubeta (blanco), se colocó en el porta cubetas y se seleccionó **Cero** en la pantalla, marcando 0.00 mg/L PO_4^{3-} a una longitud de 880 nm.
- Luego del tiempo de reposo, se limpió el exterior de la cubeta (muestra), se colocó en el porta cubetas y se seleccionó **Medición** en la pantalla, marcando el resultado en mg/L PO_4^{3-} a una longitud de 880 nm.

**Determinación de Nitratos con almohadilas HACH (Nitraver 5 0,3-30,00 mg/L)-
Método 8039**, Extraído de HACH Company (1992)

- Se inició con el programa 355 N, se preparó la muestra llenando una cubeta con 10 mL de la misma, luego se le añadió el contenido de reactivo de Nitraver en polvo, y se

agitó vigorosamente durante 1 minuto para mezclar y se dejó reposar por cinco minutos a temperatura ambiente.

- Para el blanco, se llenó otra cubeta con 10 mL de agua destilada, luego se le añadió el contenido de reactivo de Nitraver en polvo, y se agito vigorosamente durante 1 minuto para mezclar y se dejó reposar por cinco minutos.

- Luego del tiempo de reposo, se limpió el exterior de la cubeta (blanco), se colocó en el porta cubetas y se seleccionó **Cero** en la pantalla, marcando 0.00 mg/L NO₃⁻-N.

- Luego del tiempo de reposo, se limpió el exterior de la cubeta (muestra), se colocó en el porta cubetas y se seleccionó **Medición** en la pantalla, marcando el resultado en mg/L NO₃⁻-N a una longitud de 500 nm.

Determinación de Nitrógeno amoniacal TNT plus 832 (2-47 mg/L)-Método 10205,
Extraído de HACH Company (1992)

- Se quitó con cuidado la tapa de lámina protectora del DosiCap Zip, luego se desenroscó la tapa de la cubeta y se le agregó 0.2 mL de la muestra a analizar. Luego se volteó el DosiCap Zip para que el lado del reactivo apunte hacia la cubeta y se vuelve a enroscar.

- Se agitó la cubeta ya tapada 2-3 veces para que el reactivo del tapón se disuelva adecuadamente y se espera 15 minutos. Luego del tiempo de espera, se agitó un poco la cubeta y se limpió por el exterior.

- Se colocó la cubeta preparada en el soporte porta cubetas del espectrofotómetro, el cual leyó el código de barras y llevará a su análisis, marcando su resultado en mg/L NH₃-N a una longitud de 694 nm.

La eficiencia de eliminación en porcentajes se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Remoción} = \frac{\text{Conc. inicial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) - \text{Conc. final} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)}{\text{Conc. inicial} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right)} * 100$$

- **Ensayo Preliminar**

Tabla 2

Características del ensayo preliminar empleado como base metodológica

Aspecto	Descripción
Punto de muestreo	Último punto de efluente del sistema de tratamientos de aguas residuales.
Inóculo microalgal	<i>C. vulgaris</i> , 20% volumen total, con biomasa inicial de 2.5 g/L.
Agua residual utilizada	Agua residual de tipo industrial, sin diluir y se utilizó un volumen de 1600 mL.
Duración del estudio (d)	Nueve días
Variables	T (°C), pH, Fv/Fm, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} y DQO.

3.2.2. Bacterias:

- **Aislamiento de bacterias**

El aislamiento de bacterias se realizó antes del proceso de depuración y al final del proceso, con el objetivo de saber cuáles eran las bacterias presentes al inicio y al final de todo el ensayo.

Se realizó una dilución seriada de la muestra, se tomó 1 mL y se llevó a un tubo de ensayo con tapa rosca que contenía 9 mL de Agua Peptonada Estéril (APE) de la empresa SCHARLAU 07-489-500g y se homogenizó. Esta dilución se llevó hasta $1/10^{-40}$, debido a que la muestra de agua obtenida contuvo un alto contenido de bacterias. Luego se realizó la técnica vertida en placa, de cada dilución, se extrajo 1 mL y se colocó en un plato Petri, se le añadió 2 gotas de tetrazolio y posteriormente el agar de recuento de la empresa HIMEDIA M091 500g, el cual se preparó como medio de cultivo para el crecimiento de los microorganismos, se dejó en incubación durante 24 horas a 37°C en una incubadora THERMO SCIENTIFIC Heratherm IGS60.

Pasado el periodo de incubación, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias. El cual se calcula con la siguiente ecuación:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{\text{Número de colonias por placa} * \text{factor de dilución}}{mL \text{ de la muestra}}$$

- **Caracterización morfológica de las bacterias**

Se estudio la morfología de las colonias obtenidas, donde se observaron características como forma, color, mucosidad, bordes y elevación de las colonias. Se realizaron tinciones de Gram en las colonias que mostraban el mejor aislamiento, las cuales fueron seleccionadas para su identificación mediante pruebas bioquímicas obtenidas a partir del agar recuento.

Estas colonias aisladas serán sembradas, posteriormente por medio del método de agotamiento por estría con asas, en placas Petri con Medio Agar MacConkey de la empresa HIMEDIA M081 500g, Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) de la empresa HIMEDIA M317 500g y Agar Sangre. Estas placas se incubaron a 37°C durante 24-48 horas.

- **Identificación de las bacterias mediante pruebas bioquímicas**

Las colonias aisladas de los medios MacConkey y EMB se le realizaron las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias. Las pruebas bioquímicas utilizadas se prepararon en tubos de vidrio con rosca y se llevaron a cabo una vez por muestra. Se inoculó una porción de la colonia seleccionada en cada tubo con su respectiva prueba bioquímica, con un asa de inoculación esterilizada al rojo vivo.

Las pruebas realizadas para la identificación bacteriana fueron: Agar Triple Azúcar Hierro (TSI), Agar Citrato de Simmons, Sulfuro Indol Movilidad (SIM), Ureasa, Voges Proskauer (VP) cuya descripción y fundamentos se encuentra en Macfaddin, (2003). Estas luego de ser inoculadas, se incubaron por 24 horas a 37°C.

Para la caracterización morfológica y la realización de las pruebas bioquímicas de las bacterias aisladas, se trabajó en condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo laminar NUAIRE UN-201-430.

3.3. Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, se aplicó la prueba T de student para muestras independientes. Esta prueba permitió comparar los valores de crecimiento microalgal y los porcentajes de remoción obtenidos entre los grupos evaluados. El nivel de significancia establecido fue de $p < 0,05$ y todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software Microsoft Excel.

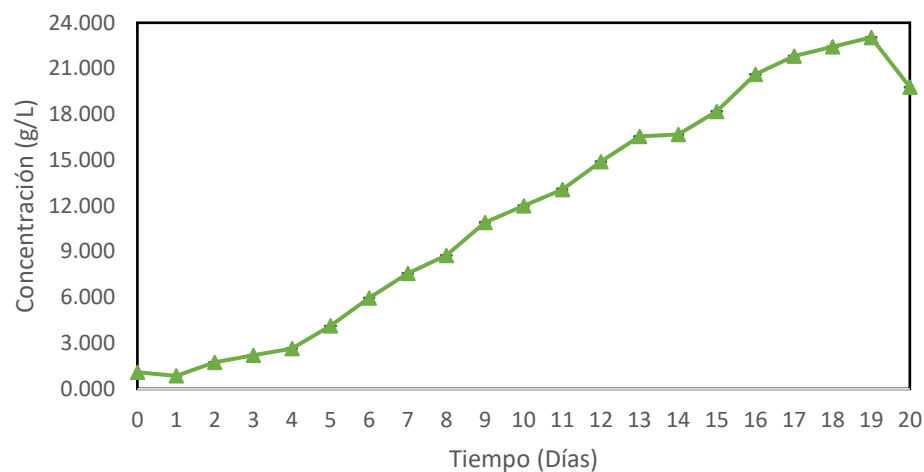
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Crecimiento de inóculo de *Chlorella vulgaris*

Figura 4

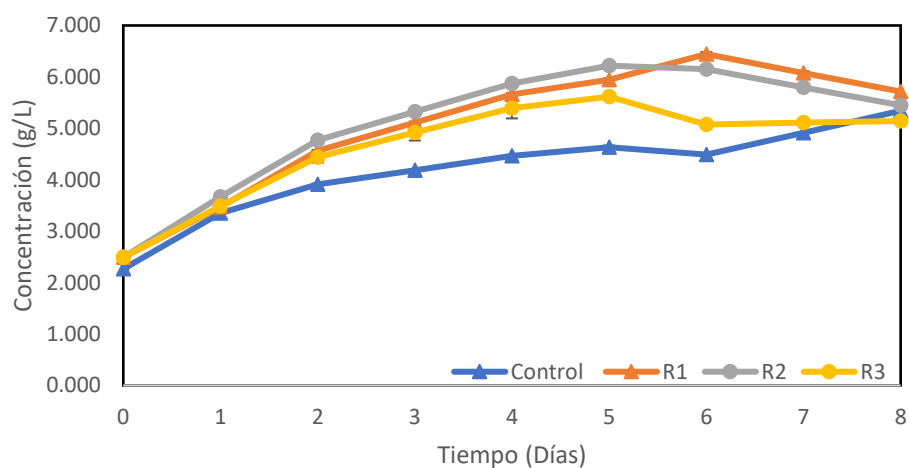
Crecimiento del inóculo de C. vulgaris en medio BG-11



4.2. Crecimiento de *C. vulgaris* en control (tratamiento sin bacterias) y R1, R2 y R3 (tratamiento con bacterias).

Figura 5

Ensayo preliminar, crecimiento de C. vulgaris en control (tratamiento sin bacterias) (tratamiento con bacterias, réplicas R1, R2 y R3).



En la **figura 5** se observa la curva de crecimiento obtenida durante el ensayo preliminar, la cual permitió evaluar la respuesta inicial de *C. vulgaris* en el agua residual seleccionada. Se observó un crecimiento sostenido, indicando que las características del agua residual industrial eran adecuadas para mantener el cultivo microalgal. Esto permitió validar la viabilidad del cultivo y establecer parámetros claves para ensayos posteriores. Por lo tanto, esta información fue fundamental para validar el uso de este efluente como medio de cultivo, de modo que el ensayo preliminar sirvió como soporte metodológico para los ensayos (E1 y E2) se desarrollarán bajo condiciones previamente evaluadas.

Figura 6

E1, crecimiento de C. vulgaris en control (tratamiento sin bacterias) (tratamiento con bacterias, réplicas R1, R2 y R3).

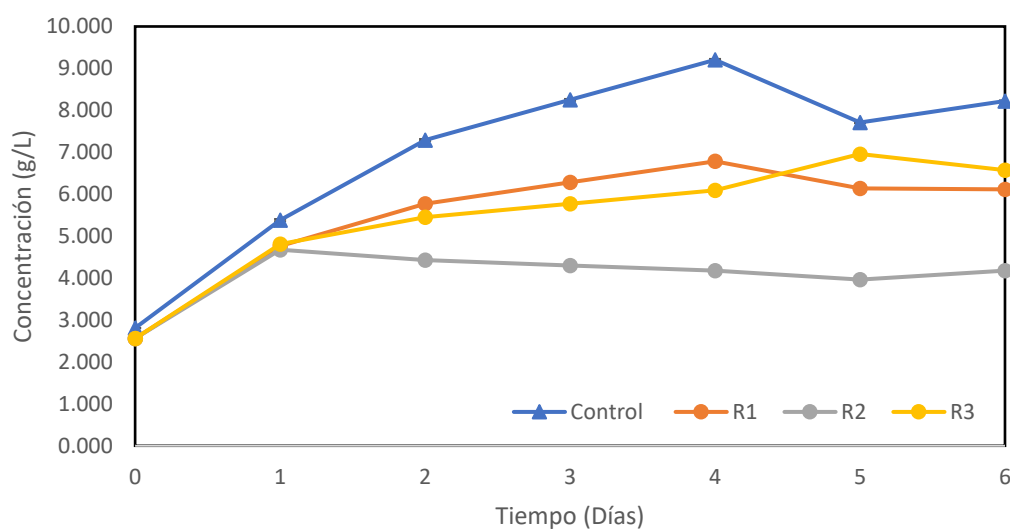
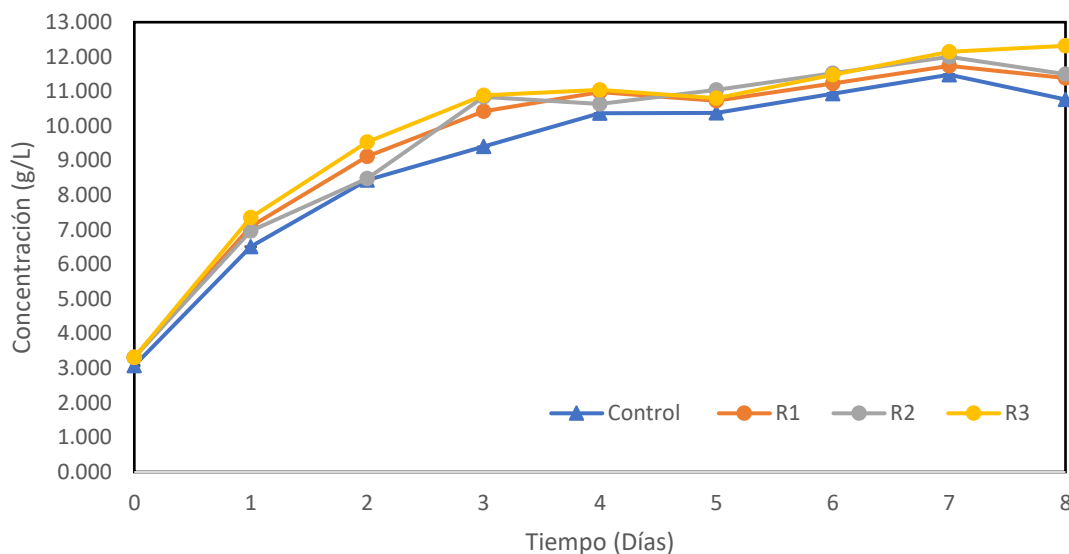


Figura 7

E2, crecimiento de C. vulgaris en control (tratamiento sin bacterias) (tratamiento con bacterias, réplicas R1, R2 y R3).



Se realizaron dos ensayos (E1 y E2) experimentales independientes para evaluar la eficiencia del sistema microalga y microalga-bacteria en la remoción de los nutrientes presentes en las aguas residuales utilizadas. El primer ensayo tuvo una duración de siete días, mientras que el segundo ensayo se extendió a nueve días, finalizando ambos al alcanzar la fase estacionaria del crecimiento de *C. vulgaris* y la estabilización de los parámetros de remoción.

En estos ensayos se evaluó el comportamiento del crecimiento de *C. vulgaris* tanto medio autoclavado, que son definidos como aquellos cultivos en que solo se encuentra presente un único organismo, en este caso *C. vulgaris* (control), como en asociación con las bacterias presentes en el agua residual utilizada, según método ver página 22.

En la **figura 6** se observa la dinámica de crecimiento de *C. vulgaris*, bajo condiciones controladas (autoclavada) y en los tratamientos con bacterias (R1, R2, R3) durante un periodo de siete días. El cultivo control presentó la mayor tasa de crecimiento, alcanzando una concentración máxima de 9.20 g/L en el día 5, mostrando un

comportamiento típico de fase exponencial seguido de una estabilización en su crecimiento, ya que para los días siguientes se mostró una concentración menor, siendo para el último día de 8.22 g/L.

En contraste, los tratamientos con bacterias mostraron un crecimiento más limitado. En las réplicas 1 y 3, se tuvo un crecimiento exponencial de aproximadamente 6.53 g/L y 6.0 g/L respectivamente, para la réplica 2 se presentó el menor rendimiento, para el día cinco, tuvo un incremento de 4.18 g/L, que a comparación de la réplica 1 y 3 su concentración fue menor, evidenciando una menor capacidad de proliferación algal bajo estas condiciones.

Como se observa en la **figura 7**, el crecimiento de *C. vulgaris* mostró un comportamiento diferente respecto al E1. El cultivo control alcanzó una concentración máxima de biomasa de 11.48 g/L en el día ocho. Sin embargo, los tratamientos con bacterias (R1, R2 y R3) presentaron un incremento superior en la acumulación de biomasa. En réplica 1, la concentración máxima obtenida fue de 11.73 g/L, en la réplica 2 fue de 11.99 g/L en el día ocho del cultivo, en la réplica 3 fue de 12.31 g/L para el día nueve, siendo esta última la que presentó mayor rendimiento.

De acuerdo con la prueba t de Student aplicada, el análisis estadístico de ambos ensayos, evidenció que las réplicas 1, 2 y 3 presentaron valores de significancia menores a 0,05 ($P < 0,05$), respecto al control, confirmando de esta manera la existencia de diferencias significativas entre el tratamiento y el control de ambos ensayos. Sugiriendo que la asociación de *C. vulgaris* con las bacterias autóctonas de las aguas residuales, influyó de manera relevante en el crecimiento de la microalga, diferenciándose claramente del comportamiento observado en control. La presencia de bacterias autóctonas no mostró un efecto uniforme sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, ya que en algunas réplicas no se observaron efectos notables, mientras que en otras pudo favorecer su desarrollo. Esta diferencia puede deberse a distintos factores, desde los nutrientes, concentraciones de nutrientes condiciones ambientales ($T^{\circ}C$, pH, DQO), como la dinámica que presentan ambos microorganismos.

Estos resultados podrían estar relacionados con los diversos efectos que las bacterias ejercen sobre la microalga, los cuales pueden ser tanto positivas como negativas.

Según Fuentes et al. (2016), las interacciones entre ambos microorganismos son específicas para cada uno, desde hormonas excretadas por bacterias capaces de promover el crecimiento algal, como vitaminas y el intercambio de macronutrientes. Oruganti et al. (2022) menciona que la mayoría de las bacterias pueden afectar negativamente a las microalgas ya sea por la competencia de nutrientes esenciales disponibles dando como resultado una tasa de crecimiento más lenta de una de las especies, como la síntesis de compuestos alquicidas por parte de las bacterias que afectarían a la microalga (Wirth et al., 2020)

También, la diferencia que se puede observar entre las réplicas de ambos ensayos, puede deberse a que el crecimiento de microalgas está determinado por diversos factores, desde la disponibilidad de nutrientes como carbono, nitrógeno y fósforo y su proporción en el medio, variables como intensidad lumínica, temperatura y pH y hasta la densidad celular microalgal (Medrano-Barboza et al., 2021). También, en el tratamiento se encuentran otros microorganismos como las bacterias, además de la microalga utilizada, el cual puede afectar en gran medida el crecimiento microalgal, debido a que se pueden encontrar en mayores y diferentes proporciones en los cultivos o a la competencia de nutrientes entre los microorganismos. Según, Abate et al. (2024), los factores anteriormente mencionados, pueden influir en la interacción presente entre algas-bacterias, debido a que el intercambio de nutrientes es fundamental para esta sinergia y los factores ambientales que alteren el equilibrio del intercambio de nutrientes afectaran en gran medida el tipo de interacción.

Los resultados difieren a lo reportado por Ma et al. (2014), donde evaluaron el efecto de las bacterias transmitidas por el concentrado de aguas residuales sobre el crecimiento de las microalgas en diferentes concentraciones, donde indicaron que los efectos de las bacterias en la biomasa algal obtenida al final no fueron significativos. También en otras investigaciones como los de Medrano-Barboza et al. (2021) obtuvieron mayor crecimiento de microalgas en aguas residuales de porcicultura y faenamiento tratadas con autoclave, con valor de $0,22 \pm 0,03$ g/L, los cuales fueron estadísticamente superiores a la biomasa generada en el agua sin tratamiento (control) $0,11 \pm 0,05$ g/L. Estos resultados son semejantes a los del presente estudio, ya que el

control para el ensayo 1 presentó una mayor generación de biomasa, de 9.20 g/L en comparación del tratamiento, que mostró una biomasa generada entre 4,18-6,53 g/L. Para el ensayo 2, si difieren debido a que la biomasa generada en el control fue de 11.48 g/L y para el tratamiento fue de 11,73 y 12,31 g/L, siendo la biomasa del tratamiento mayor comparada con la del control.

Otros estudios como el de Zhou et al. (2025), con *B. licheniformis* y *C. vulgaris* incrementó el rendimiento de la microalga, produciendo un impacto positivo en el crecimiento y la productividad algal, además en este sistema se encontraron fitohormonas como auxinas y giberelinas las cuales pueden estimular significativamente el crecimiento algal, estas fitohormonas estuvieron ausentes en aguas residuales sin tratar. Además, se demostró una mejor eliminación de contaminantes por parte de los cultivos de *B. licheniformis* y *C. vulgaris* en aguas residuales municipales superando significativamente el tratamiento con *C. vulgaris* sola.

Cada ensayo fue realizado bajo condiciones similares de luz, temperatura, agitación y proporciones de inóculo, sin embargo, su comportamiento fue distinto, ésto por la disponibilidad de nutrientes existentes en las aguas residuales utilizadas. Se realizaron análisis diarios de pH, temperatura y actividad fotosintética para cada ensayo, los cuales se muestran promediados en las **tablas 3 y 4** y la actividad fotosintética de cada ensayo en las **figuras 8 y 9**.

Tabla 3

Promedios de parámetros pH, temperatura e intensidad lumínica en el E1

Parámetros	Control (n=3)	R1 (n=3)	R2 (n=3)	R3 (n=3)
pH	8.58	8.60	8.73	8.78
Temperatura (°C)	24.5	23.3	23.1	23.4
Intensidad lumínica (μmol/m²s)	299.22			

Tabla 4

Promedios de parámetros pH, temperatura e intensidad lumínica en el E2

Parámetros	Control	R1	R2	R3
	(n=3)	(n=3)	(n=3)	(n=3)
pH	8.43	8.57	8.55	8.52
Temperatura (°C)	24.3	24.2	24.2	24.0
Intensidad lumínica (μmol/m²s)	376.15			

Tanto el crecimiento de las microalgas como la depuración de aguas residuales utilizadas en consorcios microalgas-bacterias dependen de múltiples factores, uno de ellos son la biodisponibilidad de nutrientes, la temperatura, el pH, la intensidad lumínica utilizada, entre otros (Medrano-Barboza et al., 2021). La temperatura es uno de los parámetros más influyentes en el crecimiento de microalgas, para el caso de especies de algas verdes del género *Chlorella sp.*, el rango de temperatura a la que puede desarrollarse está entre los 15-35°C, siendo 25°C el óptimo para su desarrollo (Barreiro Vescovo 2019). En el presente estudio, las temperaturas oscilaron entre los 23 y 24°C tanto para el control como para el tratamiento de ambos ensayos, valores que se encuentran dentro del rango establecido en investigaciones anteriores, confirmando que las condiciones experimentales fueron las adecuadas para el crecimiento microalgal.

En investigaciones como el de Delgadillo-Mirquez et al. (2016), donde evaluaron el efecto de la temperatura y fotoperiodo del crecimiento de microalgas y la eliminación de contaminantes de las aguas residuales mediante el uso de consorcios microalga-bacterias nativas de estas aguas, el valor más alto de biomasa obtenida fue de 2,6 mg/L a 25°C en un fotoperiodo de 12:12 h, en comparación del otro cultivo, que fue de aproximadamente 1,5 mg/L a 15°C en un fotoperiodo de 12:12 h, demostrando así, que la temperatura tuvo un efecto en la productividad de biomasa microalgal. También, se observó que la temperatura y fotoperiodo puede influir en la eliminación de contaminantes como nitrógeno y fósforo presentes en las aguas residuales.

Las condiciones ambientales como la temperatura, el tipo y disponibilidad de nutrientes, influyen directamente en la relación entre algas y bacterias. Según Abate

et al. (2024), fuentes de nutriente de nitrógeno inorgánico, ya sea nitrato, amonio o una combinación, puede afectar la cantidad de compuestos orgánicos extracelulares entre bacterias y algas. También Cao et al. (2020), menciona que la proporción existente de N:P puede determinar si la interacción es mutualista o competitiva entre ambos microorganismos, ya que demostraron que un exceso de fósforo y una relación optima de N:P fomenta interacciones mutualistas entre las bacterias y algas y que al agregarle un aporte excesivo de carbono orgánico provoca una competencia de nutrientes entre algas y bacterias.

La disponibilidad de luz es también considerada otro de los parámetros que pueden afectar el rendimiento de la depuración de aguas residuales, la luz es esencial para los procesos de fotosíntesis, además, afecta la composición química de las microalgas. Esta iluminación según su intensidad puede restringir el desarrollo de las microalgas, mantenerse dentro de un rango de saturación o generar foto inhibición en las mismas (Béchet et al., 2013 & Ru et al., 2020). Según Dinh et al. (2022), el nivel óptimo de intensidad lumínica puede variar según especie de microalga a utilizar, pero generalmente se suele establecer entre los 200-400 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$, estos datos equiparables al presente estudio, donde los datos de intensidad lumínica se presentaron para ambos ensayos a 299.2 y 376.15, se encuentran entre los reportados en la literatura.

En investigaciones como las de Liang et al. (2013), determinaron que la regulación del pH es un aspecto importante en el proceso de estos sistemas de cultivos combinados *C. vulgaris* y *B. licheniformis*, tanto para la eliminación de nutrientes como NH_4^+ donde al regular el pH a 7 hubo un aumento del 78% al 86% de eliminación de N en comparación al sistema sin pH regulado, como para el crecimiento microalgal, en donde se muestra que hubo un contenido más alto de clorofila al final de la prueba del sistema combinado regulado a pH 7 en comparación de los otros sistemas. Los pH básicos que se encuentran superiores a 8,3 son característicos de los efluentes tratados con microalgas debido a la actividad fotosintética, estos datos son equiparables a los del presente estudio, donde el pH obtenido en ambos ensayos entre los controles y réplicas oscilaron entre los 8,50-8,78, sin embargo Barreiro Vescovo

(2019), menciona que estos pH, pueden disminuir la actividad bacteriana típica del tratamiento de agua y por lo tanto, el pH también afectaría la eliminación de nutrientes.

La estabilización de pH es fundamental para mantener un crecimiento óptimo de microbios-microalgas en los tratamientos de aguas residuales. En otros estudios donde también utilizaron *C. vulgaris* y *B. licheniformis* Zhou et al. (2025), observaron que, en el sistema combinado, hubo un efecto de estabilización que probablemente se deba a la producción de ácido orgánico por parte de la bacteria, que en comparación con el tratamiento solitario de *C. vulgaris* hubo un aumento de pH; en el tratamiento combinado hubo menos fluctuaciones de pH. Sugiriendo que este efecto estabilizador de pH producido por la bacteria, y puede crear un mejor entorno para el crecimiento de algas.

Figura 8

Actividad fotosintética para C. vulgaris, E1

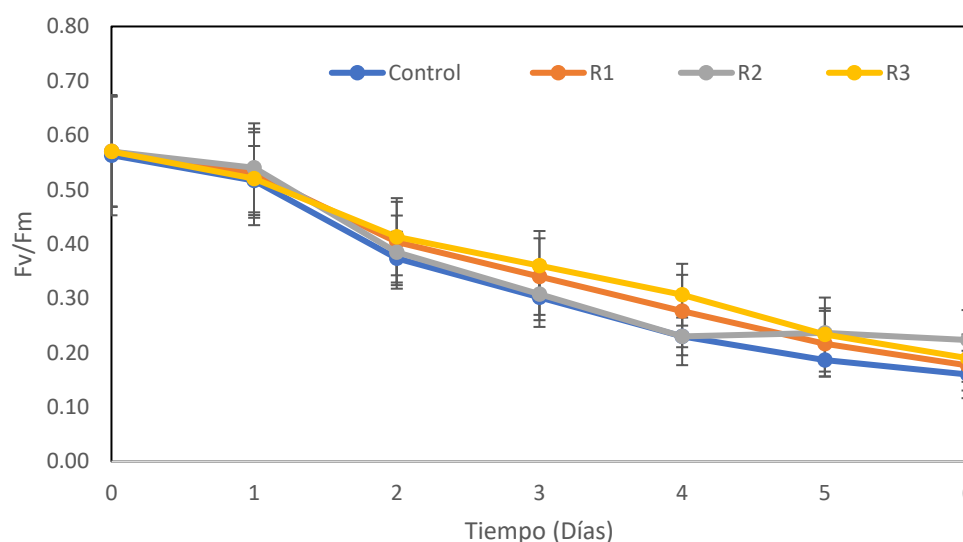
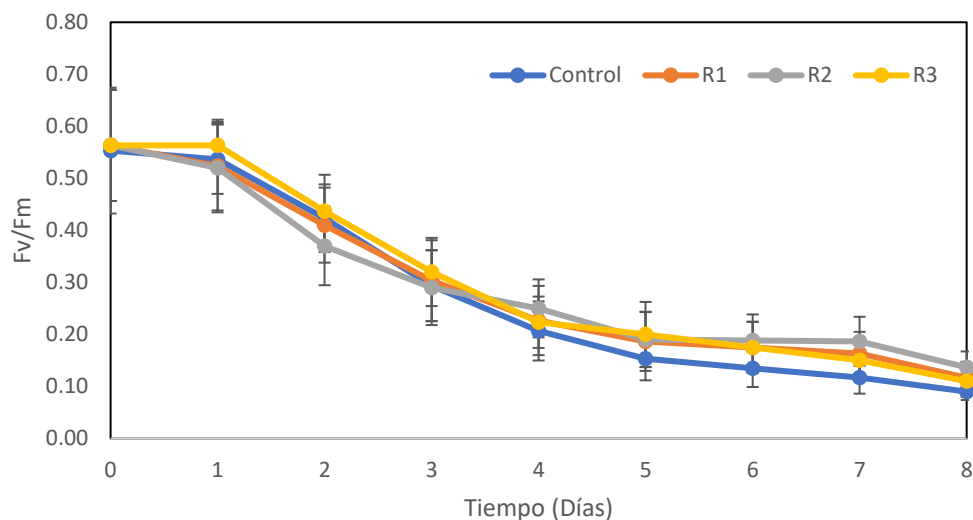


Figura 9

Actividad fotosintética para C. vulgaris, E2



En las figuras 8 y 9 se observan la variación del parámetro F_v/F_m durante los ensayos E1 y E2 de *C. vulgaris* respectivamente cultivada en aguas residuales, tanto en el control (medio autoclavado) como en los tratamientos R1, R2 y R3 con bacterias autóctonas. La fluorescencia de clorofila (F_v/F_m), representa el rendimiento de los procesos fotoquímicos de PS II, reflejando de esta manera la eficiencia general de la fotosíntesis de la microalga (Masojídek et al., 2013, Yan et al., 2024).

En ambos ensayos los valores iniciales de F_v/F_m se mantuvieron entre 0.57-0.55, indicando de esta manera que la microalga se encontraba en un buen estado fisiológico, debido a que según Sanchez-Zurano et al. (2025), el valor óptimo de fluorescencia para las clorofilas, se encuentra entre 0.6-0.8 para la mayoría de las microalgas, datos cercanos a los obtenidos en el inicio del presente estudio. A lo largo del tiempo, se observó una disminución progresiva de F_v/F_m en todos los tratamientos, reflejando un descenso en la eficiencia fotoquímica del fotosistema II, debido al estrés generado. Malapascua et al. (2014), explica que valores por debajo de este rango podría indicar que las microalgas están experimentando algún tipo de estrés desde

exposición intensa de luz como temperaturas extremas, deficiencia de nutrientes o alta concentración de oxígeno disuelto.

En el estudio realizado por Baldisserotto et al. (2023), se observaron comportamientos similares a los del presente trabajo. Estos autores evaluaron la eficiencia fotoquímica del fotosistema II (Fv/Fm) en cultivos de *Chlorella* sp. autóctona, utilizando diferentes concentraciones de agua residual (80%, 70%, 60% y 50%). Los resultados partieron de Fv/Fm en 0.48, y mostraron que el rendimiento fotoquímico de PSII disminuyó progresivamente con el tiempo, evidenciando un daño en el centro de reacción del fotosistema II cuando las microalgas fueron expuestas a condiciones estresantes. Asimismo, se registró una menor tasa de crecimiento en los cultivos con concentraciones del 70% y 80%, asociada a una reducción sostenida de los valores de Fv/Fm, indicando un aumento del estrés celular proporcional al nivel del concentrado del efluente.

4.3. Remoción de *C. vulgaris* en control (tratamiento sin bacterias) y R1, R2 y R3 (tratamiento con bacterias).

A fin de evaluar si la interacción de microalga-bacteria, también influyó en la eficiencia del sistema para la depuración de las aguas residuales tratadas, se analizaron los niveles de remoción de nutrientes en ambas condiciones, los cuales se presentan en la **tabla 5 y 7**. Se evaluó la eficiencia del sistema microalga-bacteria en la remoción de nutrientes presentes en el agua residual, específicamente nitrógeno-nitrato-amoniaco, fósforo y demanda química de oxígeno (DQO).

Tabla 5

Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO (mg/L) del agua residual inicia y final, tratamiento del E1 siete días

Parámetro	Control (n=3)		R1 (n=3)		R2 (n=3)		R3 (n=3)	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida
[N- NO_3^- mg/L]	2.4	0.7	2.4	1.30	2.4	1.03	2.4	1.6
[NO_3^- mg/L]	10.6	2.9	10.6	5.30	10.6	4.60	10.6	6.7
[P- PO_4^{3-} mg/L]	13.9	1.6	13.9	3.97	13.9	4.60	13.9	4.0
[PO_4^{3-} mg/L]	42.7	2.0	42.7	12.07	42.7	14.00	42.7	12.5
[N- NH_4^+ mg/L]	3.8	0.2	3.8	0.00	3.8	0.00	3.8	0.0
[NH_4^+ mg/L]	4.6	0.2	4.6	0.00	4.6	0.00	4.6	0.0
DQO mg/L	154.7	211	154.7	388.00	154.7	327.67	154.7	318.0

Figura 10

Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} y NH_4^+ (mg/L) del agua residual inicia y final del tratamiento del E1 siete días

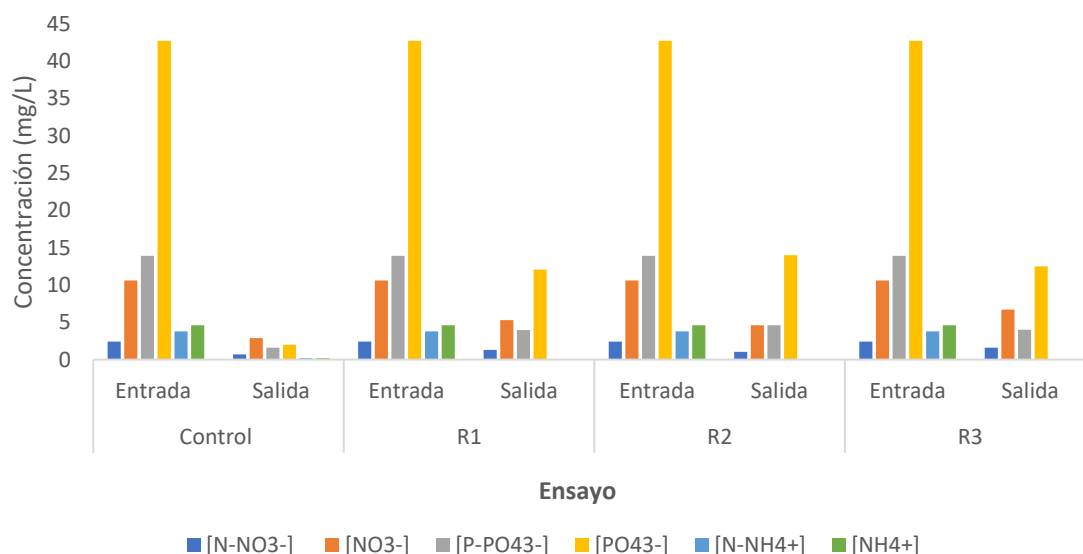


Tabla 6

Remoción (%) de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO del E1

Parámetro	Remoción (%)	Remoción (%)
	Control (n=3)	Tratamiento (n=3)
[N- NO_3^- mg/L]	70.4 ± 4.22	41.3 ± 12.8
[NO_3^- mg/L]	72.8 ± 2.9	46.9 ± 10.5
[P- PO_4^{3-} mg/L]	88.8 ± 1.9	69.9 ± 2.5
[PO_4^{3-} mg/L]	95.4 ± 0.6	69.9 ± 2.4
[N- NH_4^+ mg/L]	95.2 ± 0.04	100 ± 0
[NH_4^+ mg/L]	94.9 ± 0.05	100 ± 0
DQO mg/L	-36.6	-124.0

Tabla 7

Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO (mg/L) del agua residual inicia y final, tratamiento del E2 nueve días

Parámetro	Control		R1		R2		R3	
	(n=3)		(n=3)		(n=3)		(n=3)	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida
[N- NO_3^- mg/L]	2.1	1.4	2.1	0.9	2.1	1.63	2.1	1.0
[NO_3^- mg/L]	9.5	6.33	9.5	4.43	9.5	6.9	9.5	4.2
[P- PO_4^{3-} mg/L]	1.5	0.1	1.5	0.05	1.5	0.1	1.5	0.07
[PO_4^{3-} mg/L]	4.4	0.2	4.4	0.18	4.4	0.21	4.4	0.2
[N- NH_4^+ mg/L]	8.3	0.0	8.3	0.0	8.3	0.17	8.3	0
[NH_4^+ mg/L]	10.1	0.0	10.1	0.0	10.1	0.2	10.1	0.0
DQO mg/L	176.0	167	176.0	114	176.0	219.3	176.0	284

Figura 11

Concentración de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} y NH_4^+ (mg/L) del agua residual inicia y final, tratamiento del E2 nueve días

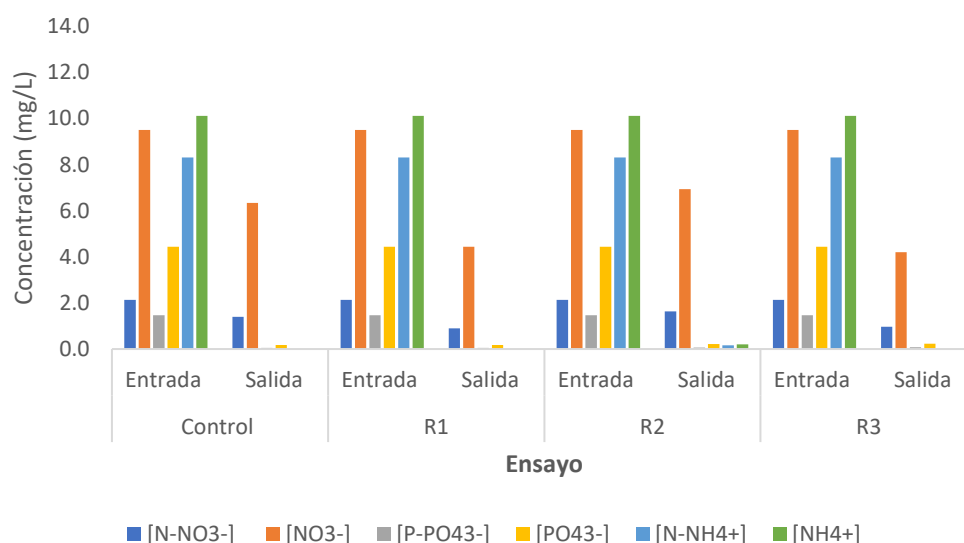


Tabla 8

Remoción (%) de los nutrientes NO_3^- , PO_4^{3-} , NH_4^+ y DQO del E2

Parámetro	Remoción (%)	Remoción (%)
	Control	Tratamiento
	(n=3)	(n=3)
[N- NO_3^- mg/L]	34.3 ± 5	45.3 ± 18.9
[NO_3^- mg/L]	33.4 ± 7.38	45.4 ± 15.9
[P- PO_4^{3-} mg/L]	96.3 ± 0.5	95.6 ± 0.7
[PO_4^{3-} mg/L]	96.1 ± 0.4	95.3 ± 0.6
[N- NH_4^+ mg/L]	100 ± 0	99.3 ± 1.2
[NH_4^+ mg/L]	100 ± 0	99.3 ± 1.2
DQO mg/L	5.1	-17.1

En la **tabla 5** se muestran las concentraciones de los nutrientes (mg/L) del agua residual inicial, y final del tratamiento y en la **tabla 6** se encuentra la remoción (%) que hubo entre el control vs tratamiento del E1; estos muestran que la eliminación de NH_4^+ , PO_4^{3-} en esta experiencia sobrepasan el 50% para todos los ensayos en agua residual. Para todos los nutrientes analizados se comprobó bajo pruebas estadísticas, que nos muestra que no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la remoción de compuestos con nitrógeno (N- NO_3^- , NO_3^- , N- NH_4^+ y NH_4^+), y fósforo (P- PO_4^{3-} y PO_4^{3-}) entre los cultivos en agua residual esterilizada (control) y aquellos en agua residual sin esterilizar (tratamiento con bacterias autóctonas).

El nitrógeno presente en los desechos de aguas residuales, es resultado de interconversiones metabólicas de compuestos extra derivados, este se puede encontrar en formas como NH_4^+ , NO_2^- y NO_3^- , y el fósforo se encuentra en su mayoría como PO_4^{3-} (Mondal et al., 2022 & Abdel-Raouf et al., 2012).

El nitrógeno desempeña un papel vital en el crecimiento celular y la producción de lípidos. Para microalgas como *C. vulgaris* prefieren el NH_4^+ al NO_3^- , degradándolo primero cuando ambos compuestos se encuentran presentes en el medio utilizado (Ru et al., 2020). La preferencia por NH_4^+ a menudo se atribuye a su menor requerimiento de energía para su metabolización, ya que se encuentra en su forma reducida, permitiendo que sea utilizado directamente por la microalga para la producción de ácido glutámico u otros compuestos que contienen nitrógeno, al contrario de NO_3^- ya que primero debe reducirse a NO_2^- en el citoplasma y luego a NH_4^+ en el cloroplasto, bajo la acción de nitrato reductasa a nitrito y de esta por acción de la nitrito reductasa a amonio para ser metabolizado por la microalga. Este nitrógeno amoniacal se asimila a aminoácidos mediante la acción de la glutamina sintetasa y la glutamina oxoglutarato amidotransferasa (Liu & Hong, 2021). El NH_4^+ derivado del NO_2^- o si fue absorbido directamente como NH_4^+ , se combina con el ácido 2-cetoglutarico para formar ácido glutámico u otros compuestos en una reacción catalizada por la glutamina sintetasa/glutamato sintasa en el cloroplasto. El nitrógeno amoniacal también se transporta a la mitocondria, donde se combina con el 2- cetoglutarico (2-OG) para producir glutamato en una reacción catalizada por el glutamato deshidrogenasa (Chen

& Wang, 2020). Este es un comportamiento que se puede observar en el presente estudio en ambos ensayos, donde se ve una remoción superior de 50% para NH_4^+ e inferior del 50% para NO_3^- tanto para el control como para el tratamiento. Esta preferencia también puede ser observada en el estudio de Sousa et al. (2025), en donde utilizaron *C. vulgaris* y la asimilación de NH_4^+ fue más rápida que la captación de NO_3^- , siendo esta la que se consumió primero cuando ambas estaban en el medio.

Otro de los macronutrientes esenciales para el metabolismo de la microalga, es el fósforo, esencial para la síntesis de ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos y proteínas. Se encuentra principalmente en forma de fosfatos (PO_4^{3-}) en donde su disponibilidad puede generar un gran impacto en la fotosíntesis de las microalgas (Wirth et al., 2020) Su deficiencia puede reducir la división celular y afectar procesos biológicos como la síntesis de proteínas, transcripción y ciclo de carbono. En caso de escasez de fosfato inorgánico, las microalgas pueden mineralizar el fosfato orgánico en ortofosfato a través de la fosfatasa presente en la superficie celular. Por el contrario, cuando existe un exceso de fosfato, las células de las microalgas pueden utilizarlo y convertirlo en gránulos de polifosfato al mismo tiempo, bajo la acción de la polifosfato quinasa, que se almacena en las células para mantener la viabilidad de las microalgas en ausencia de fósforo (Liu & Hong, 2021).

Para el P- PO_4^{3-} y PO_4^{3-} , tanto el control como el tratamiento presentaron porcentajes de remoción elevados, lo que podría sugerir que la eliminación de nutrientes se debió a mecanismos no dependientes de la presencia de bacterias, como la rápida asimilación inicial por las microalgas. En el NH_4^+ , la remoción fue casi completa en ambas condiciones, sugiriendo de esta manera que la microalga por sí sola es altamente eficiente en la asimilación de esta fuente de nitrógeno, sin importar la microbiota.

En la **tabla 7** y **8** se muestran las concentraciones y porcentajes de remoción de los nutrientes del E2, igual que para el anterior ensayo se muestran remoción de nutrientes como el NH_4^+ y el P- PO_4^{3-} y PO_4^{3-} superior a un 50%. En este ensayo si se observaron diferencias significativas en la remoción de PO_4^{3-} y NH_4^+ , siendo el control más eficiente que el tratamiento.

El estudio como de Ma et al., 2014, observaron que, en medios esterilizados en autoclave, una mayor concentración de inóculo algal resultó en una mayor tasa de eliminación de nutrientes durante el cultivo, lo que sugiere que la eliminación de nutrientes se atribuyó en gran medida a la absorción y degradación por las algas.

Para ambos ensayos en la eliminación de DQO, se obtuvo un incremento en la concentración de este nutriente, donde se encontraron valores superiores a los iniciales tanto para el control (211 frente a los 154.7 iniciales) y tratamiento (344.5 frente a los 154.7 iniciales), resultando en un rendimiento negativo de eliminación, control (-36.6%) y tratamiento (-124.0). A diferencia de los resultados obtenidos por Barreiro Vescovo (2019), donde obtuvo una mejor eliminación de DQO en los cultivos que contenían bacterias con fango activo, con niveles de 77,4 y 88,5%. Y en el cultivo con sólo microalga se obtuvo un incremento en la concentración de este nutriente de hasta un -16,4%, lo explica que este aumento en la concentración de componentes orgánicos en el cultivo se puede deber a la producción por parte de la microalga de sustancias poliméricas extracelulares (SPE); existe referencia bibliográfica que explica sobre la capacidad de algunas especies del género *Chlorella* sp. de sintetizar SPE y aumentar el contenido de DQO en los efluentes del tratamiento de aguas.

Resultados similares obtuvo Otondo et al. (2018), donde la concentración de DQO, tanto en aguas residuales crudas, como las clarificadas, disminuyeron en los primeros días, aproximadamente 25 mg/L por día, los cuales al día siguiente aumentaron hasta una concentración de 225 mg/L y se mantuvieron constante durante el resto de los días, donde explican que la concentración de DQO disminuyó los primeros días, debido a que este carbono se utilizaba para la fotosíntesis de la microalga, sin embargo la liberación de otros productos metabólicos, como sustancias poliméricas extracelulares y productos microbianos solubles aumentaron el DQO en los últimos días de análisis.

Otros estudios como el de Wang et al. (2010), tratan como la eficiencia de eliminación de DQO varió considerablemente entre las diferentes aguas residuales estudiadas, algunas alcanzaron tasas de eliminación del 50,9%, 56,5% y 83,0% para las aguas residuales 1, 2 y 4, respectivamente, la tasa de eliminación para el agua residual 3 es

un número negativo, indicando de esta manera que la materia orgánica fue excretada en lugar de ser absorbida por las algas que crecían en el efluente. Estos resultados podrían indicar dos vías metabólicas diferentes, crecimiento heterótrofo y autótrofo de las algas en diferentes condiciones de cultivo. Estos datos difieren de investigaciones como el de Foladori et al. (2018), donde obtuvieron un porcentaje de remoción eficiente de DQO del 86%, donde optimizaban la remoción total de nitrógeno de aguas residuales municipales en un reactor discontinuo, operado con un consorcio mixto de microalgas y bacterias. Resultados similares obtuvo He et al. (2013) donde en su estudio, la concentración de DQO en agua residuales esterilizadas mostró una eficiencia de remoción diferente a la de las aguas residuales sin esterilizar siendo 0,059 mg/L la tasa de eliminación más alta, indicando que las microalgas no hicieron uso de la materia orgánica presente en las aguas residuales, sugiriendo de esta manera que las bacterias fueron las responsables de la disminución de DQO en las aguas residuales sin esterilizar.

También en otras investigaciones, como la de Arango et al. (2016), se obtuvieron altos porcentajes de eliminación de DQO, en los reactores que se encontraban iluminados con presencia bacteriana y no presentaban microalgas, 74% de remoción para aguas residuales municipales y 84% para aguas residuales de la porcicultura.

En la **tabla 6 y 8**, se reportan las concentraciones de N-NH_4^+ y NH_4^+ , donde se observa que ambos ensayos presentaron una eliminación de casi el 100%, tanto para el control como para el tratamiento. Estos datos concuerdan a los obtenidos por Su et al. (2011), donde evaluaron la remoción de N-NH_4^+ por parte del consorcio microalga-bacteria en aguas residuales domésticas, donde obtuvieron una remoción de este nutriente cercano a 100% en los cuatro lotes analizados. En estudios como el de He et al. (2013), obtuvieron datos similares a los del presente estudio, donde el porcentaje de remoción de N-NH_4^+ fue de 100% en algunas de las aguas residuales, combinadas con diferentes concentraciones de nitrógeno durante un periodo de 8 días, fueron similares tanto en el cultivo de agua residual esterilizada con *C. vulgaris*, como en los cultivos sin esterilizar con *C. vulgaris*.

Los datos obtenidos en este estudio coinciden con los de (Wang et al., 2016) donde explicó que el mejor rendimiento dentro de sus grupos de estudio lo obtuvo, *Chlorella* sp. cultivada con lodos activados en luz, donde obtuvieron una remoción de 99,2% de N-NH_3 . En el estudio de Choi & Lee (2012) emplearon cultivos de *C. vulgaris* en diferentes concentraciones con condiciones axénicas, obtuvieron una eliminación de 96,90% para la prueba 1 y un 97,26% para la prueba 2, 3, 4 y 5, estos datos son bastantes similares al presente estudio, donde se alcanzaron valores cercanos al 100%, tanto en su control como en el tratamiento, sugiriendo que independientemente de la presencia bacteriana, la microalga tiene una alta capacidad para remover este nutriente.

En otras investigaciones Göncü et al. (2025), observaron que la eficiencia de eliminación promedio del N-NH_3 del cultivo axénico de *C. vulgaris* fue de 80,28%, durante la fase de crecimiento exponencial de los cultivos (10 días), datos equiparables a los del presente estudio. Resultados similares se encuentran en el estudio de Serrano Malagon (2015), donde obtuvieron remociones de N-NH_3 mayores al 70% en concentraciones iniciales de 55,6mg/L de N-NH_3 y 600 mg/L de biomasa *C. vulgaris*, del agua residual de un efluente anaerobio de una planta de tratamiento de agua residual.

Las concentraciones de N-NO_3^- y NO_3^- en este estudio en ambos ensayos se observaron diferencias en su remoción, como se observa en las **tablas 6 y 8**. Estas variaciones entre ensayos refleja la influencia de factores ambientales, en las **tablas 5 y 7** se muestran que las concentraciones de nutrientes en ambos ensayos son diferentes, además de la preferencia de las microalgas por asimilar el amoníaco sobre el nitrato, lo que podría explicar esa dinámica de eliminación observada.

En las **tablas 6 y 8** se observan que los valores de N-NO_3^- y NO_3^- apenas variaron tras el tratamiento. En el control se alcanzaron remociones de 70% y 34,4% para N-NO_3^- y de 73% y 33,3% de NO_3^- en los E1 y E2, valores comparables a los reportados por Göncü et al. (2025), quienes obtuvieron aproximadamente 50% de remoción en cultivos axénicos de *C. vulgaris*. Luego del tratamiento, las remociones alcanzaron

43,0% y 45,3% para N-NO_3^- y 46,9% y 45,4% para NO_3^- , mientras que las concentraciones de N-NH_4^+ y NH_4^+ se redujeron casi en un 100%.

Este comportamiento coincide con diversos estudios que señalan una marcada preferencia microalgal por el amonio frente al nitrato. En general el NH_4^+ es consumido primero debido a que se encuentran en una forma más simple y directamente asimilable, requiriendo menor gasto energético para su incorporación celular en comparación con NO_3^- (Delgadillo-Mirquez et al. 2016; Göncü et al., 2025; Ruiz et al. 2011). De hecho, se ha reportado que cuando el amonio se encuentra disponible, la concentración de nitrato ejerce poca influencia sobre el crecimiento de *C. vulgaris*, ya que las microalgas priorizan el uso de la fuente nitrogenada más eficiente metabólicamente.

En este estudio, al igual que en los resultados de Ruiz et al. (2011), se observó que la biomasa microalgal continuó creciendo aun después de agotarse el NH_4^+ , probablemente debido a la disponibilidad residual de NO_3^- como macronutriente alternativo o al uso de reservas intracelulares de nitrógeno almacenadas previamente en las células.

En investigaciones como el de Delgadillo-Mirquez et al. (2016), donde se evaluó el efecto de la temperatura y el fotoperiodo en la producción de biomasa de microalgas y la eliminación de contaminantes mediante el uso de consorcios nativos de microalga-bacteria, se observó una tasa de eliminación de NH_4^+ en cultivos discontinuos aumento a temperaturas más altas y fotoperiodos más largos, en presencia de luz, se eliminó el 83% de NH_4^+ del medio a una temperatura de 15°C y a un fotoperiodo de 12h h, y el 100% de NH_4^+ , en condiciones a 25°C fotoperiodo de 12h y a 15°C fotoperiodo de 18h. Según, Pardo et al. (2021), el incremento de la temperatura favorece la actividad metabólica y fotosintéticas microalgal hasta un rango óptimo, ya que hay un aumento en la velocidad de reacciones intracelulares, incrementando a su vez la toma de nutrientes del medio para poder realizar sus procesos metabólicos.

La eficiencia de eliminación de fósforo reportada puede variar, según el tipo de medio que se esté utilizando, los factores ambientales, la intensidad lumínica, la concentración inicial de nutrientes, la relación N/P, o la especie de microalga utilizada

(Ahmad et al., 2025). Esta relación de las aguas residuales suele estar generalmente desequilibradas para las condiciones de crecimiento de las microalgas, afectando su biomasa y eliminación de nutrientes. El bajo contenido de nitrógeno en aguas residuales, reduce la eliminación de fósforo por las microalgas, pero esta eliminación de nitrógeno no se ve limitada por el contenido de fósforo (Liu & Hong, 2021).

Según L. Wang et al. (2010), la eficiencia en la eliminación de nutrientes depende tanto de su concentración inicial en el agua residual como de la capacidad de las microalgas para asimilarlos e incorporarlos a sus tejidos. Aunque el fósforo en el concentrado fue aproximadamente 30 veces mayor que en las aguas residuales tratadas, se obtuvo una remoción parcialmente similar. Sugiriendo que *C. vulgaris* posee una elevada capacidad de sintetizar y almacenar polifosfatos, incluso bajo concentraciones elevadas.

En estas condiciones, las microalgas pueden absorber más fósforo del necesario, proceso conocido como absorción de lujo, donde el exceso se almacena como polifosfato para ser utilizado posteriormente en periodo de limitación de nutrientes (Brown & Shilton, 2014). Este comportamiento indica una posible ventaja metabólica del sistema microalgal ante fluctuaciones en la disponibilidad de fósforo.

En este estudio, tanto el control como el tratamiento alcanzaron remociones de $P-PO_4^{3-}$ y PO_4^{3-} superiores al 70% en ambos ensayos (**tablas 6 y 8**), resultados similares a los obtenidos por Su et al., 2011, donde encontraron eficiencia de eliminación de $P-PO_4^{3-}$ entre el 54,5% y 72,6%. A comparación de estudios como el de Choi & Lee (2012), en cultivos axénicos de *C. vulgaris* a diferentes concentraciones, se obtuvieron valores inferiores al estudio presente, donde el valor máximo de eliminación en una de sus pruebas fue de 48,76% de $P-PO_4^{3-}$.

Datos similares se encontraron en estudios como el de Medrano-Barboza et al. (2021), donde se obtuvieron altas remociones de PO_4^{3-} en al agua residual pretratada y sin tratamiento, sugiriendo que *C. vulgaris* fue quien aportó de mayor manera en la remoción de este nutriente. En estudios como la de Porto et al. (2020), utilizaron *C. vulgaris* y se obtuvieron remociones del 54% de $P-PO_4^{3-}$, donde su concentración inicial fue de 12,3 mg/L, en cultivos diluidos de un efluente de la industria papelera. En

investigaciones como las de Su et al. (2011), donde evaluaron la remoción de nutrientes por parte del consorcio microalga-bacteria en aguas residuales domésticas, obtuvieron una remoción de $P-PO_4^{3-}$ que oscilaron entre el 54,4% y 72,6% en los cuatro lotes analizados. Estos sugieren que su eficiencia de eliminación fue relativamente más baja en comparación con las de NH_4^+ , debido a que el nitrógeno era un nutriente limitante en estas aguas residuales, no así el fosfato. En investigaciones de Arango et al. (2016), se obtuvo un mayor porcentaje de $P-PO_4^{3-}$, en los reactores iluminados, para las aguas residuales municipales fue de 74% y las aguas residuales de la porcicultura un 76%, esto independientemente de la presencia microalgal.

Estudio como el de Delgadillo-Mirquez et al. (2016), donde analizaron el crecimiento de la biomasa microalgal y su eliminación de contaminantes en aguas residuales con consorcios microalga-bacteria nativas a distintas temperaturas y fotoperiodos, se observaron remociones del 100% de PO_4^{3-} en el medio, luego de 100-150h de iniciado el cultivo, en todos los experimentos realizados a diferentes temperaturas 25°C y 15°C y fotoperiodos 12:12 h y 18:6 h respectivamente. En el cultivo que estuvo a 15°C se pudo observar que el crecimiento microalgal se ralentizó y se detuvo cuando no se detectó PO_4^{3-} en el medio, sugiriendo de esta manera que el agotamiento de este nutriente podría limitar su crecimiento.

Algo importante a destacar es la intensidad y calidad de la luz utilizada, la relación luz-oscuridad y temperatura, son solo algunos de los factores que podrían afectar la eliminación de nutrientes de las aguas residuales por parte de las microalgas. Según Liu & Hong (2021), a una mayor intensidad de luz y tiempo de exposición de los cultivos, se puede mejorar la tasa de eliminación de nutrientes por las microalgas. Al igual que la intensidad lumínica, también a medida que la temperatura aumenta hasta un rango óptimo que dependería de cada especie, se podría mejorar el metabolismo fisiológico de las microalgas, aumentando así su capacidad para eliminar nutrientes. En investigaciones como la de Hernández Ramírez, (2017), sus resultados mostraron que el crecimiento de *C. vulgaris* a temperaturas no óptimas puede afectar su producción de biomasa y remoción de nutrientes, donde comparó el cultivo de esta microalga a diferentes temperaturas, siendo la de 31°C siendo así la más favorable

para la producción de biomasa y para la remoción de NO_3^- y PO_4^{3-} , para el agua residual utilizada. Tanto la especie de microalga utilizada, como las características iniciales de las aguas residuales, la luz, pH y temperatura afectan la eficiencia de eliminación de contaminantes.

Además de los macronutrientes analizados como NO_3^- , NH_4^+ y PO_4^{3-} , es importante considerar la presencia de micronutrientes en las aguas residuales, los cuales, aunque no fueron analizados en el presente trabajo, estos podrían desempeñar un papel importante en el crecimiento de la microalga. Abdelfattah et al. (2023), menciona que los micronutrientes pueden ser aprovechados por la microalga, ya que junto con el carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) contribuyen a la síntesis de compuestos orgánicos. Según Vega Quiel, (2022), además de los macronutrientes principales, también se encuentran los micronutrientes y metales como el carbono (C), magnesio (Mg), manganeso (Mn), Zinc (Zn), Hierro (Fe) y otros., los cuales participan en procesos metabólicos y estructurales esenciales para la microalga. En investigaciones como la de Qiu et al. (2022), utilizaron hierro cerovalente para promover la actividad microalgal y la absorción de nutrientes de las aguas residuales, donde obtuvieron una mejora en la producción de biomasa de 113,3% y las tasas de remoción de NH_4^+ y PO_4^{3-} mejoraron un 32,2% y 75%, donde explican que el hierro cerovalente promovió la asimilación de amonio, el metabolismo del fosfato y generación de energía.

4.4.Comparación de los parámetros evaluados de los ensayos experimentales frente a la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000.

En la **tabla 9** se sintetiza el cumplimiento de los parámetros evaluados en los ensayos con respecto a la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000. Se observa que los valores de nitrato, amonio y pH se mantuvieron dentro de los límites establecidos por la norma, sin embargo, el DQO, no alcanzó los niveles permisibles, representando una limitante.

Tabla 9

Comparación del cumplimiento de los parámetros fisicoquímicos de los ensayos con la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000

Parámetro	Límite permisible	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
NO ₃ ⁻	≤ 6 mg/L	No cumplen	Cumplen
P	≤ 5 mg/L	No cumplen	--
N- NH ₃	≤ 3 mg/L	No cumplen	Cumplen
DQO	≤ 100 mg O ₂ /L	No cumplen	No cumplen
pH	5,5-9,0	Cumplen	Cumplen

Nota. se presentan únicamente los parámetros evaluados frente a la normativa. Los valores experimentales están detallados en las tablas 5 y 7.

Al comparar los resultados obtenidos de ambos ensayos con los límites establecidos por la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000 para la descarga de aguas residuales a cuerpos de aguas superficiales, se evidencia que tanto el sistema autoclavado (solo microalga) como el sistema microalga-bacterias, logró una alta eficiencia en la remoción de nutrientes inorgánicos, pero presentó limitaciones en la reducción de materia orgánica, la cual fue medida como demanda química de oxígeno (DQO).

En ambos ensayos, las concentraciones finales de NO₃⁻ estuvieron bastante cercano o por debajo del valor máximo permisible permitido (6 mg/L), confirmando de esta manera la capacidad de *C. vulgaris* por si sola y junto con bacterias autóctonas presentes en estas aguas residuales, para remover los compuestos nitrogenados oxidados. Para el N-NH₃, fueron removidos prácticamente en su totalidad; sugiriendo una transformación y asimilación altamente eficiente del nitrógeno reducido en cultivo autoclavado, como en cultivos microalga-bacteria. Para la demanda química de oxígeno (DQO), se obtuvo un comportamiento diferente que los parámetros anteriores, donde para ambos ensayos, se observó que las concentraciones finales obtenidas se encontraban fuera del rango permitido establecido por la normativa. Esto implica que la carga orgánica del efluente sigue siendo elevada, por lo que el tratamiento no logró una remoción de materia orgánica, en consecuencia, el agua tratada no cumple con la

normativa y no es apta para su descarga debido a que podría generar impactos ambientales.

En este estudio se midió fosfato y fósforo de fosfato, los cuales representan solo una de las formas en que puede encontrarse el fósforo en el agua residual. Aunque la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000 exige el parámetro de fósforo, los valores obtenidos para esta fracción especifican estuvieron dentro del límite permisible. Indicando, que aun evaluando únicamente una de las especies que componen el fósforo total, el fósforo evaluado se mantuvo dentro de los niveles aceptados por la normativa.

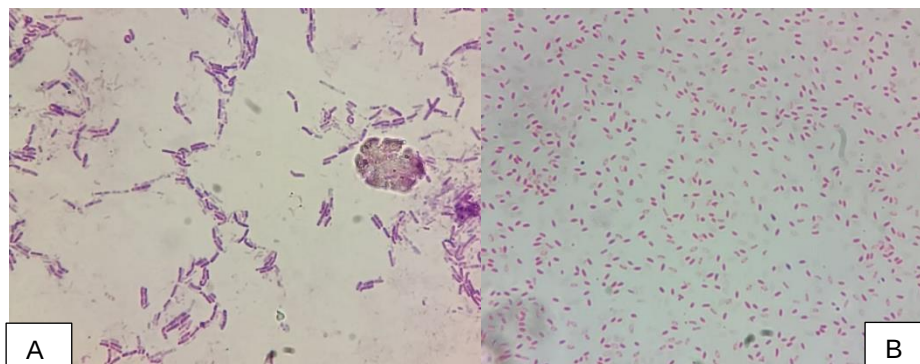
4.5. Identificación de las bacterias presentes en las muestras de agua residual utilizadas, antes y después.

La caracterización de las bacterias asociadas a las aguas residuales y al sistema con *C. vulgaris* se realizó mediante la observación de características morfológicas de las colonias en medios de cultivo, tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

La tinción de Gram aplicada a los aislamientos bacterianos reveló la presencia de bacterias Gram+ como de Gram- en las muestras de agua residual. Los aislamientos Gram+ presentaron forma de bacilos, característica morfológica que permitió identificar al género *Bacillus* sp., además del crecimiento característico de sus colonias presentado en el agar sangre, para los Gram- se observaron en igualmente en forma de bacilos. En la **figura 12**, se presentan algunas de las tinciones de Gram realizadas, donde se muestra la presencia de ambos grupos, Gram positivos **figura 12 (A)** y Gram negativos **figura 12 (B)**, confirmando de esta manera la diversidad microbiana presente en el sistema, donde coexisten bacterias de ambos tipos.

Figura 12

Tinciones de Gram, Gram positiva (A) y Gram negativa (B) de algunas de las colonias aisladas



Las colonias que crecieron en los medios selectivos se les realizó las pruebas bioquímicas para la identificación de las bacterias que crecieron previamente en las placas de recuento bacteriano de las muestras de agua residual utilizadas (**Figura 12** y **13**). Entre las pruebas bioquímicas empleadas, se encuentran TSI, utilización de Citrato, Voges-Proskauer, SIM y Urea (**Figura 14**). En las **tablas 10, 11, 12, 13**, se muestran las especies de bacterias identificadas, antes y después del tratamiento de cada ensayo, junto con las pruebas que se le realizaron. En la **figura 13**, se encuentran algunas de las colonias que crecieron en agar MacConkey y agar EMB.

Figura 13

Estriado en placa con Agar MacConkey (A y C) y agar EMB (B)

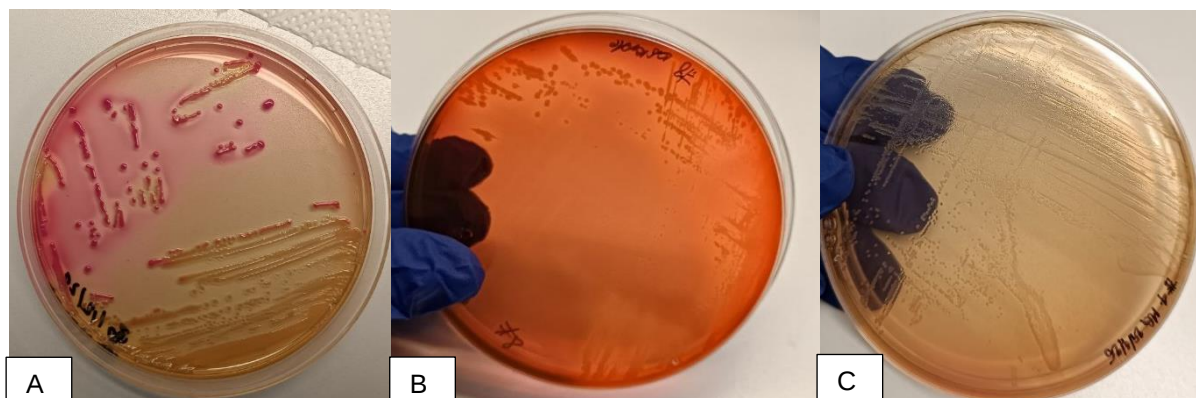


Figura 14

Pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales antes y después de tratamiento



Nota. orden de las pruebas, de izquierda a derecha: SIM, Urea, VP, TSI, Citrato.

Tabla 10

Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales antes de tratamiento, E1

	SIM	CITRATO	VP	UREA	TSI	BACTERIA
r1	S: -; I: -; M: +	+	-	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Providencia stuartii</i>
2	S: -; I: -; M: -	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Acinetobacter baumannii</i>
3	S: -; I: -/+; M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas spp.</i>
4	S: -; I: -/+; M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas spp.</i>
5	S: -; I: -; M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Burkholderia cepacia</i>
6	S: -; I: -; M: +	-	-	-	A/A G- H ₂ S -	<i>Escherichia vulneris</i>
7	S: -; I: -; M: -	V	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>
8	S: -; I: -; M: -/+	-	-	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Shigella spp.</i>

Nota. Variable (V).

Tabla 11

Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales después de tratamiento, E1

	SIM	CITRATO	VP	UREA	TSI	BACTERIA
1	S: -; I: -; M: -/+	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Acinetobacter spp.</i>
2	S: -; I: -; M: -/+	V	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Acinetobacter Iwoffii</i>
3	S: -; I: +; M: +	+	+	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Klebsiella spp.</i>
4	S: -; I: +; M: +	-	+	-	A/A G+ H ₂ S -	<i>Aeromonas hydrophila</i>
5	S: -; I: -; M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Burkholderia spp.</i>
6	S: -; I: -; M: -/+	-	-	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Shigella spp.</i>
7	S: -; I: -; M: +	-	-	-	A/A G- H ₂ S -	<i>Escherichia vulneris</i>
8	S: -; I: -; M: +	-	+	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Hafnia alvei</i>

Nota. Variable (V).

Se presentan y analizan los resultados obtenidos de la identificación bacteriana antes y después de los ensayos con *Chlorella vulgaris*. En la **tabla 10** se observa la composición inicial de las aguas residuales del E1, donde se identificaron en su mayoría bacterias Gram negativas. Inicialmente, en el agua residual se identificaron la posible presencia de géneros como *Pseudomonas* spp, *Acinetobacter* sp., géneros que coinciden con los encontrados por Barreiro Vescovo (2019), donde por medio de análisis moleculares, lograron encontrar que uno de los géneros más abundantes en sus cultivos fue *Pseudomonas*, el cual tuvo un incremento considerable al finalizar el cultivo, que, a comparación del estudio presente, este género de bacteria al finalizar el ensayo, no se logró identificar. La presencia de *Pseudomonas* spp., en estos sistemas puede atribuirse a su alta capacidad de adaptación, ya que puede crecer tanto en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, empleando oxígeno o nitrato como aceptores de electrones, permitiéndole participar simultáneamente en la degradación de materia orgánica y en procesos de transformación del nitrógeno durante el tratamiento de

aguas residuales (Barreiro Vescovo, 2019). Estos hallazgos coinciden con lo descrito por L. Wang et al. (2016), quienes identificaron *Pseudomonas* spp., en cultivos batch donde se utilizó cultivos mixtos de *Chlorella* sp. y lodos activados para tratar aguas residuales artificiales.

En estudios como el de Tavakol et al. (2025), donde han utilizado cocultivos de *C. vulgaris* y *Pseudomonas aeruginosa*, en condiciones mixotróficas, con inóculos 50% bacteria y 50% microalga, obtuvieron como resultado la eliminación de nutrientes del 43,6% de nitratos y 99,5% de fosfatos de las aguas residuales sintéticas, además mejoró los contenidos de lípidos con un 20,8% y de almidón un 10,9% superando de esta manera los monocultivos microalgal.

A diferencia de la *Pseudomonas* spp., el género *Acinetobacter* sp. se detectó en la caracterización inicial del agua residual como al finalizar los ensayos. Lo anterior se ve reforzado por el trabajo de Barreiro Vescovo (2019), donde *Acinetobacter* spp. también fue uno de los más abundantes en sus cultivos, su presencia puede explicarse por ser aeróbico, poseer una capacidad para degradar compuestos orgánicos y además de la capacidad de adaptación a los cultivos fotosintéticos. Este género se caracteriza por producir catalasas, enzimas que pueden neutralizar H_2O_2 , permitiéndole resistir ambientes acuáticos con alta concentración de oxígeno disuelto Barreiro Vescovo (2019). Esta bacteria, ha sido previamente descrita en estudios relacionados con cultivos de microalgas, cultivos mixtos y su uso en el tratamiento de aguas residuales (Ueda et al. (2009), Carney et al. (2014) & Lu et al., 2017). En el estudio de Lu et al. (2017), utilizaron *Acinetobacter* spp., para la eliminación de nutrientes de aguas residuales en cultivos mixtos con *Chlorella* sp., la cual mostraron que, de todos los nutrientes analizados, la eliminación del P en los cultivos mixtos fue de 96,6%, siendo de esta manera más eficiente, en comparación de los cultivos controles de solo *Acinetobacter* spp. y solo *Chlorella* sp., que fue de 48.75% y 83.43% respectivamente.

Además, según Lu et al. (2017) *Acinetobacter* sp., promovió el crecimiento la microalga, contribuyendo en la asimilación de fósforo. Durante los primeros días del proceso de tratamiento de aguas, tanto las microalgas como las bacterias mostraron un buen crecimiento, a lo que el autor sugiere que en las primeras etapas del

tratamiento no existe una competencia marcada por los nutrientes entre los microorganismos, creando mejores condiciones de crecimiento para ambos. Este planteamiento coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que la bacteria fue detectada antes y después del tratamiento, respaldando su papel en la dinámica de depuración.

Tabla 12

Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales antes de tratamiento, E2

	SIM	CITRATO	VP	UREA	TSI	BACTERIA
1	S: -; I: -; M: +	+	+	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Hafnia alvei</i>
2	S: -; I: -; M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas spp.</i>
3	S: -; I: -; M: +	+	+	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas putida</i>
4	S: +; I: -; M: +	+	-	-	K/A G- H ₂ S +	<i>Salmonella spp.</i>
5	S: -; I: -; M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas spp.</i>
6	S: -; I: -; M: -	-	+	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Shigella spp.</i>
7	S: -; I: -; M: +	+	+	-	A/A G- H ₂ S -	<i>Enterobacter spp.</i>
8	S: -; I: -; M: +	+	+	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Serratia marcesens</i>

Tabla 13

Resultados de las pruebas bioquímicas utilizadas para la identificación de las especies bacterianas presentes en las aguas residuales después de tratamiento, E2

	SIM	CITRATO	VP	UREA	TSI	BACTERIA
1	S: - I: - M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas spp.</i>
2	S: - I: - M: +	+	-	-	K/K G- H ₂ S -	<i>Pseudomonas spp.</i>
3	S: - I: - M: +	+	+	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Hafnia alvei</i>
4	S: - I: - M: +	+	+	-	K/A G- H ₂ S -	<i>Serratia marcesens</i>

5	S: -	I: -	M: +	-	-	-	K/A G- H ₂ S +	<i>Salmonella spp.</i>
6	S: -	I: -	M: +	-	+	-	A/A G- H ₂ S -	<i>Enterobacter spp.</i>
7	S: -	I: -	M: +	-	-	-	A/A G- H ₂ S -	<i>Escherichia vulneris</i>

En la **tabla 12** observa la composición inicial de las aguas residuales del E2, donde se identificaron en su mayoría bacterias Gram negativas y Gram positiva (**Figura 12A**). Inicialmente en el agua residual se encontraron géneros de bacterias como *Pseudomonas* spp y *Acinetobacter* spp., lo que evidencia la consistencia en la composición microbiana presente en las aguas residuales. También se identificaron bacterias como *Pseudomonas putida*, la cual también ha sido reportada por L. Wang et al. (2016) y Carney et al. (2014). Autores como Shen et al. (2017), en su estudio evaluaron la simbiosis de microalgas *C. vulgaris* y bacterias *Pseudomonas putida* coinmovilizadas, este sistema mostro un mejor rendimiento de eliminación de DQO 97%, P-PO₄³⁻ del 100% y NH₄⁺-N del 100%, en condiciones de cultivo batch. Además, también se observó que el crecimiento de ambos microorganismos se ve potenciado, indicando de esta manera la existencia de interacciones simbióticas mutuas. *Pseudomonas putida* es clasificada como rizobacterias, las cuales pueden colonizar una amplia gama de plantas y proporcionar efectos promotores del crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y con la producción de fitohormonas como la giberelina y el ácido indol-3-acético (L. Wang et al., 2016)

Otras investigaciones como la Mujtaba et al. (2017), utilizando agua residual sintética y un consorcio artificial conformado por *C. vulgaris* y *P. putida*, observaron que en los cultivos mixtos donde la microalga estaba coinmovilizada y la bacteria suspendida, hubo una mejor remoción de N-NH₄⁺ de 85% en 5 días, el P-PO₄³⁻ fue de 66% en comparación de los otros cultivo, los cuales se alcanzaron eliminaciones en torno al 60-64%, además se mejoró el crecimiento de ambos microorganismos lo que indica una posible existencia de interacciones simbióticas mutuas entre ambas especies.

La bacteria Gram positiva encontrada en este segundo ensayo, como se muestra en la **figura 12 (A)**, presenta una morfología bacilar, característica indicativa de bacterias

del género *Bacillus* spp. Autores como Liang et al. (2013), utilizaron consorcios artificiales formados por *C. vulgaris* y *Bacillus licheniformis* para la eliminación de fósforo y amonio. Sus resultados mostraron que el sistema combinado eliminó un 78% de NH_4^+ y 92% de TP, siendo más eficiente en comparación de los sistemas individuales de microalga y bacterias, además, expusieron que *B. licheniformis* promovió el crecimiento de *C. vulgaris*, ya que hubo un aumento de biomasa en el sistema combinado de 3,57 g/L en el cuarto día, en comparación que en el sistema individual (2,53 mg/L) en el quinto día. Esta especie bacteriana *Bacillus licheniformis* según Liang et al. (2013) podría definirse como una bacteria promotora del crecimiento microalgal y aumenta la eliminación de amonio de las aguas residuales. En diversas investigaciones en las que se ha utilizado bacterias del género *Bacillus* sp., en consorcio artificiales con *C. vulgaris*, han demostrado que bacterias como *Bacillus pumilis* inmovilizadas (Hernandez et al., 2009) podría promover el crecimiento de *C. vulgaris* por medio de la fijación de nitrógeno en condiciones de privación severa de nitrógeno.

CAPÍTULO V. CONSIDERACIONES FINALES

5. CONSIDERACIONES FINALES

5.1. Conclusiones

La evaluación de la simbiosis entre bacterias autóctonas y *C. vulgaris*, mostro que ambos tratamientos fueron eficientes en la remoción de nutrientes como amonio, fosfato y nitrato. Sin embargo, no se observó que presentaran eficiencia en la remoción de materia orgánica. Indicando que la asociación mejora parcialmente el proceso de depuración, pero que se requieren estrategias complementarias para optimizar la remoción de materia orgánica.

Se determinó el crecimiento de la microalga *C. vulgaris* en aguas residuales, confirmando que las aguas residuales industriales utilizadas, le proveen nutrientes suficientes para su desarrollo. Sin embargo, en los ensayos se observó que las réplicas del tratamiento presentaron variabilidad, sugiriendo que la presencia bacteriana influyó en el crecimiento microalgal. Esto demuestra que *C. vulgaris* puede adaptarse y crecer en aguas residuales, sin embargo, la variabilidad observada entre réplicas sugiere que la interacción con las bacterias autóctonas puede influir en el crecimiento microalgal.

Se identificaron bacterias del género *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., y *Acinetobacter* spp, las cuales poseen la capacidad de participar en la remoción de nutrientes, contribuyendo de esta manera al funcionamiento del sistema microalga-bacteria. Además de producir compuestos que pueden ser beneficiosas para el crecimiento microalgal.

Se evaluó el porcentaje de depuración de *C. vulgaris*, evidenciando de esta manera la elevada eficiencia de remoción de nutrientes como amonio y fosfato por parte de la microalga como del sistema microalga-bacteria, demostrando su potencial uso para el tratamiento de aguas residuales.

Se monitoreo las condiciones de temperatura, pH e intensidad lumínica durante los ensayos, los resultados obtenidos fueron tanto para el control como para el tratamiento en ambos ensayos, los cuales se mantuvieron dentro del rango considerado óptimo, lo que permitió el crecimiento de la microalga *C. vulgaris* en ambos sistemas.

Se comparó los resultados obtenidos en los ensayos, demostrando que tanto el control como el sistema microalga-bacteria, lograron cumplir parámetros de nitratos, nitrógeno amoniacal y pH, manteniéndose dentro de los rangos establecidos por la normativa DGNTI-COPANIT 35-2000. Sin embargo, la demanda química de oxígeno se encuentra fuera de los rangos establecidos por la norma. Estos resultados, demuestran una alta eficiencia en la remoción de nutrientes inorgánicos, aunque la acumulación de materia orgánica expone la necesidad de un tratamiento complementario para cumplir con la normativa.

5.2.Recomendaciones

Se recomiendan que en futuras investigaciones se conformen consorcios artificiales entre *C. vulgaris* y especies bacterianas previamente aisladas e identificadas, para evaluar de manera más precisa las interacciones que ocurren en la asociación microalga-bacteria.

Realizar ensayos en condiciones controladas (cultivo autoclavado de microalgas y co-cultivos con bacterias previamente aisladas), para determinar el efecto de la bacteria en la microalga y su capacidad de remoción de nutrientes en aguas residuales.

Realizar análisis diario de los principales parámetros fisicoquímicos a investigar, con el fin de evaluar su dinámica, lo que permitirá correlacionar de manera más precisa la remoción de nutrientes con el crecimiento microalgal y actividad bacteriana.

Incluir en posteriores investigaciones análisis de micronutrientes y metales trazas, debido a que estos participan en el metabolismo de la microalga, permitiendo comprender de manera más integral el desempeño del sistema de depuración.

Se aconseja aislar cepas bacterianas autóctonas de aguas residuales y caracterizarlas a nivel morfológico, bioquímico y molecular, para seleccionar aquellas que posean un potencial sinérgico para su asociación con la microalga a utilizar.

Validar los resultados a escala piloto en sistemas de tratamiento de aguas residuales, para evaluar su estabilidad y eficiencia del consorcio microalga-bacteria en condiciones cercanas a un escenario real.

Caracterizar la biomasa obtenida para determinar su contenido lipídico, proteínas y carbohidratos, con el fin de evaluar su aprovechamiento en la producción de bioenergía o biofertilizante.

Determinar si la biomasa obtenida de los cultivos mixotróficos presentan cambios en su composición química, lo cual podría aportar información valiosa sobre la estabilidad y eficiencia de los consorcios en la depuración de aguas residuales.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abate, R., Oon, Y. L., Oon, Y. S., Bi, Y., Mi, W., Song, G., & Gao, Y. (2024). Diverse interactions between bacteria and microalgae: A review for enhancing harmful algal bloom mitigation and biomass processing efficiency. In *Heliyon* (Vol. 10, Issue 17). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e36503>
- Abdelfattah, A., Ali, S. S., Ramadan, H., El-Aswar, E. I., Eltawab, R., Ho, S. H., Elsamahy, T., Li, S., El-Sheekh, M. M., Schagerl, M., Kornaros, M., & Sun, J. (2023). Microalgae-based wastewater treatment: Mechanisms, challenges, recent advances, and future prospects. In *Environmental Science and Ecotechnology* (Vol. 13). Editorial Board, Research of Environmental Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.es.2022.100205>
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. In *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 19, Issue 3, pp. 257–275). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Acién, F. G., Gómez-Serrano, C., Morales-Amaral, M. M., Fernández-Sevilla, J. M., & Molina-Grima, E. (2016). Wastewater treatment using microalgae: how realistic a contribution might it be to significant urban wastewater treatment? In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 100, Issue 21, pp. 9013–9022). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7835-7>
- Aditya, L., Mahlia, I., Nguyen, L. N., Vu, H. P., & Nghiem, L. D. (n.d.). *Microalgae-bacteria consortium for wastewater treatment and biomass production*.
- Ahmad, I., Abdullah, N., Iwamoto, K., Yuzir, A., Kamyab, H., El-Sheekh, M., Chong, J. W. R., & Khoo, K. S. (2025). Efficient pollutant and nutrient removal from restaurant wastewater using *Chlorella vulgaris* in a bubble column photobioreactor. *Environmental Technology and Innovation*, 38. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2025.104138>
- Aldrin Alberca, L. D., Mae Arbilo, S. P., Irene Articon, L. C., Casisola, D. C., & Mae Panaglima, L. S. (n.d.). *Bioremediation by Chlorella vulgaris: potentials for treatment of municipal, agricultural, and industrial wastewater sources*.

- Alfaro Herrera, A. P., Blanco Morales, M. O., Germy Moreno, C. J., Orozco Alzate, J. V., & Gutiérrez Castañeda, C. (2019). Biorremediación de aguas residuales mediante *Eicchornia crassipes* y *Lemma minor*. *Micro Ciencia*, 56-63.
- Al-Mayah, A. M., Naeemah, M., & Al-Rikabey, M. N. (2018). Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in BG-11 Media Using Taguchi Method. In *Article in Journal of Advanced Research in Dynamical and Control Systems* (Vol. 10). <https://www.researchgate.net/publication/328841186>
- Arango, L., Cuervo, F. M., González-Sánchez, A., & Buitrón, G. (2016). Effect of microalgae inoculation on the start-up of microalgae-bacteria systems treating municipal, piggery and digestate wastewaters. *Water Science and Technology*, 73(3), 687–696. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.544>
- Baldisserotto, C., Demaria, S., Arcidiacono, M., Benà, E., Giacò, P., Marchesini, R., Ferroni, L., Benetti, L., Zanella, M., Benini, A., & Pancaldi, S. (2023). Enhancing Urban Wastewater Treatment through Isolated *Chlorella* Strain-Based Phytoremediation in Centrate Stream: An Analysis of Algae Morpho-Physiology and Nutrients Removal Efficiency. *Plants*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/plants12051027>
- Barreiro Vescovo, N. S. (2019). *Caracterización de los consorcios microalgas-bacterias en el tratamiento de agua residual urbana*. (Tesis Doctoral). Universidad complutense de Madrid.
- Béchet, Q., Shilton, A., & Guieysse, B. (2013). Modeling the effects of light and temperature on algae growth: State of the art and critical assessment for productivity prediction during outdoor cultivation. In *Biotechnology Advances* (Vol. 31, Issue 8, pp. 1648–1663). <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.014>
- Brown, N., & Shilton, A. (2014). Luxury uptake of phosphorus by microalgae in waste stabilisation ponds: Current understanding and future direction. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 13, Issue 3, pp. 321–328). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9337-3>

- Candela Orduz, R. (2016). *Monografía las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Una revisión bibliográfica*. Universidad Nacional Abierta y a Distancia.
- Cao, X., Li, H., Zhou, Y., & Song, C. (2020). The shift of mutualistic relationships among algae, free-living and attached bacteria through different nutrient addition mode: a mesocosm study. *Journal of Freshwater Ecology*, 35(1), 535–548. <https://doi.org/10.1080/02705060.2020.1858984>
- Carney, L. T., Reinsch, S. S., Lane, P. D., Solberg, O. D., Jansen, L. S., Williams, K. P., Trent, J. D., & Lane, T. W. (2014). Microbiome analysis of a microalgal mass culture growing in municipal wastewater in a prototype OMEGA photobioreactor. *Algal Research*, 4(1), 52–61. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.006>
- Chen, H., & Wang, Q. (2020). Microalgae-based nitrogen bioremediation. In *Algal Research* (Vol. 46). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101775>
- Choi, H. J., & Lee, S. M. (2012). Effects of microalgae on the removal of nutrients from wastewater: Various concentrations of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Engineering Research*, 17(S1), 3–8. <https://doi.org/10.4491/eer.2012.17.S1.S3>
- Delgadillo-Mirquez, L., Lopes, F., Taidi, B., & Pareau, D. (2016). Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports*, 11, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>
- Delvalle-Borrero, D. M., Medina, J. R., & Fuentes, K. (2022). Humedales artificiales flotantes y su valor paisajista en ríos urbanos - Ciudad de Panamá. *Prisma Tecnológico*, 13(1), 3–9. <https://doi.org/10.33412/pri.v13.1.2871>
- Dirección General de Normas y Tecnología Industrial. (2000). *Agua Descarga de efluentes líquidos directamente a cuerpos y masas de agua superficiales y subterráneas* (DGNTI-COPANIT 35-2000). Ministerio de Comercio e Industrias de Panamá.

- Dinh, N. T., Thu, L. P., Dat, N. T., Khanh Toan, N., & Le Anh, P. (2022). The roles of microalgae and bacteria in wastewater treatment. In *Vietnam Journal of Biotechnology* (Vol. 20, Issue 3).
- Fábrega, J. R., Moran, M., Flores E. L., Márquez de Rojas, I. I., Ying, A., Saavedra, C., Olmedo, B., & López, P. (2015). Aguas Urbanas. Panamá. *Desafíos del Agua Urbana en las Américas*, 466-491.
- Fathi, A. A., Azooz, M. M., & Al-Fredan, M. A. (2013). Phycoremediation and the potential of sustainable algal biofuel production using wastewater. *American Journal of Applied Sciences*, 10(2), 189–194. <https://doi.org/10.3844/ajassp.2013.189.194>
- Ferrero, E. M., de Godos, I., Rodríguez, E. M., García-Encina, P. A., Muñoz, R., & Bécares, E. (2012). Molecular characterization of bacterial communities in algal-bacterial photobioreactors treating piggery wastewaters. *Ecological Engineering*, 40, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.10.001>
- Foladori, P., Petrini, S., Nessenzia, M., & Andreottola, G. (2018). Enhanced nitrogen removal and energy saving in a microalgal-bacterial consortium treating real municipal wastewater. *Water Science and Technology*, 78(1), 174–182. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.094>
- Fuentes, J. L., Garbayo, I., Cuaresma, M., Montero, Z., González-Del-Valle, M., & Vilchez, C. (2016). Impact of microalgae-bacteria interactions on the production of algal biomass and associated compounds. In *Marine Drugs* (Vol. 14, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md14050100>
- Gonçalves, A. L., Pires, J. C. M., & Simões, M. (2017). A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. In *Algal Research* (Vol. 24, pp. 403–415). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- Göncü, S., Şimşek Uygun, B., & Atakan, S. (2025). Nitrogen and phosphorus removal from wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* microalgae with a batch bioreactor. *International Journal of Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s13762-025-06380-x>

- He, P. J., Mao, B., L-, F., Shao, L. M., Lee, D. J., & Chang, J. S. (2013). The combined effect of bacteria and *Chlorella vulgaris* on the treatment of municipal wastewaters. *Bioresource Technology*, 146, 562–568. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.111>
- Hernandez, J. P., de-Bashan, L. E., Rodriguez, D. J., Rodriguez, Y., & Bashan, Y. (2009). Growth promotion of the freshwater microalga *Chlorella vulgaris* by the nitrogen-fixing, plant growth-promoting bacterium *Bacillus pumilus* from arid zone soils. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 88–93. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.08.004>
- Hernández Ramírez. M, R. (2017). *Efecto de la temperatura en el crecimiento de microalgas y la remoción de nutrientes en agua de invernaderos*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro.
- Humanante, J., Deza, C., Moreno, L., & Grijalva, A. (2021). Biorecovery of wastewater with microorganisms. *Manglar*, 18(4), 346–356. <https://doi.org/10.17268/manglar.2021.044>
- Ji, M.-K., Abou-Shanab, R. A. I., Hwang, J.-H., Timmes, T. C., Kim, H.-C., Oh, Y.-K., & Jeon, B.-H. (2013). Removal of Nitrogen and Phosphorus from Piggery Wastewater Effluent Using the Green Microalga *Scenedesmus obliquus*. *Journal of Environmental Engineering*, 139(9), 1198–1205. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0000726](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0000726)
- Kevin Rodríguez Ing Génesis Zarraonandia, I. (2016). + + | | Reuso del agua residual tratada en la laguna de oxidación de la ciudad de David provincia de Chiriquí (Vol. 4, Issue 1).
- Kulzhanova, K., Tekebayeva, Z., Temirbekova, A., Bazarhankyzy, A., Temirkhanov, A., Bissenova, G., Mkilima, T., & Sarmurzina, Z. (2024). Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Organic-Degrading Potential for Municipal Wastewater Treatment. *Journal of Ecological Engineering*, 25(11), 55–69. <https://doi.org/10.12911/22998993/192683>

- Kumar, N., Banerjee, C., Chang, J. S., & Shukla, P. (2022). Valorization of wastewater through microalgae as a prospect for generation of biofuel and high-value products. *Journal of Cleaner Production*, 362. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132114>
- Liang, Z., Liu, Y., Ge, F., Xu, Y., Tao, N., Peng, F., & Wong, M. (2013). Efficiency assessment and pH effect in removing nitrogen and phosphorus by algae-bacteria combined system of *Chlorella vulgaris* and *Bacillus licheniformis*. *Chemosphere*, 92(10), 1383–1389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.014>
- Liu, X. ya, & Hong, Y. (2021). Microalgae-Based Wastewater Treatment and Recovery with Biomass and Value-Added Products: a Brief Review. In *Current Pollution Reports* (Vol. 7, Issue 2, pp. 227–245). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s40726-021-00184-6>
- Lu, Q., Ren, H., Min, M., Chen, P., & Ruan, R. (2017). Isolation of a bacterial strain, *Acinetobacter* sp. from centrate wastewater and study of its cooperation with algae in nutrients removal. *Bioresource Technology*, 235, 59–69. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.111>
- Macfaddin, J. F. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Editorial Médica Panamericana.
- Malapascua, J. R. F., Jerez, C. G., Sergejevová, M., Figueroa, F. L., & Masojídek, J. (2014). Photosynthesis monitoring to optimize growth of microalgal mass cultures: Application of chlorophyll fluorescence techniques. *Aquatic Biology*, 22, 123–140. <https://doi.org/10.3354/ab00597>
- Masojídek, J., Torzillo, G., & Koblížek, M. (2013). Photosynthesis in Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, 21-36.
- Ma, X., Zhou, W., Fu, Z., Cheng, Y., Min, M., Liu, Y., Zhang, Y., Chen, P., & Ruan, R. (2014). Effect of wastewater-borne bacteria on algal growth and nutrients removal in wastewater-based algae cultivation system. *Bioresource Technology*, 167, 8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.087>

- Medrano-Barboza, J., Aguirre-Bravo, A. A., Encalada-Rosales, P., Yerovi, R., & Ramírez-Iglesias, J. R. (2021). Slaughtering and piggery wastewater for cultivation and biomass generation of *Chlorella vulgaris*. *Bionatura*, 6(2), 1824–1831. <https://doi.org/10.21931/RB/2021.06.02.24>
- Medrano, J. L. (2024). *Biorrefinería de microalgas: una solución sostenible para el tratamiento de aguas residuales de origen industrial y la valorización energética de la biomasa obtenida*. Tesis doctoral. Universidad Rey Juan Carlos.
- Ministerio de Ambiente. (2024). *Informe del Estado del Ambiente 2024 GEO*.
- Ministerio de Ambiente. (2025). *Contaminación de afluentes preocupa en Chiriquí por fallas en plantas de tratamiento de aguas residuales*.
- Mondal, S., Bera, S., Mishra, R., & Roy, S. (2022). Redefining the role of microalgae in industrial wastewater remediation. In *Energy Nexus* (Vol. 6). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.nexus.2022.100088>
- Moronta R., Mora., R., & Morales, E. (2006). Respuesta de la microalga *Chlorella sorokiniana* al pH, salinidad y temperatura en condiciones axénicas y no axénicas. *Revista Facultad de Agronomía LUZ*, 23, 27-41.
- Mujtaba, G., Rizwan, M., & Lee, K. (2017). Removal of nutrients and COD from wastewater using symbiotic co-culture of bacterium *Pseudomonas putida* and immobilized microalga *Chlorella vulgaris*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 49, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.01.021>
- Muñoz, R., & Guieysse, B. (2006). Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review. In *Water Research* (Vol. 40, Issue 15, pp. 2799–2815). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.011>
- Ñañez Botero K., Rios Ramirez, K. D., Cordeiro de Oliveira, O. M., Reyes, C. Y., & Andrade Moreira, I. T. (2024). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from produced water using the microalgae *Chlorella vulgaris* cultivated in mixotrophic and heterotrophic conditions. In *Chemosphere* (Vol. 356). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.141931>

- Oladimeji, T. E., Oyedemi, M., Emeteri, M. E., Agboola, O., Adeoye, J. B., & Odunlami, O. A. (2024). Review on the impact of heavy metals from industrial wastewater effluent and removal technologies. In *Heliyon* (Vol. 10, Issue 23). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e40370>
- Oruganti, R. K., Katam, K., Show, P. L., Gadhamshetty, V., Upadhyayula, V. K. K., & Bhattacharyya, D. (2022). A comprehensive review on the use of algal-bacterial systems for wastewater treatment with emphasis on nutrient and micropollutant removal. In *Bioengineered* (Vol. 13, Issue 4, pp. 10412–10453). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056823>
- Otondo, A., Kokabian, B., Stuart-Dahl, S., & Gude, V. G. (2018). Energetic evaluation of wastewater treatment using microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3213–3222. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.064>
- Pardo Ruiz, D. F. (2021). *Optimización de las condiciones de ph y temperatura de un sistema coinmovilizado Bacillus pumilus-Chlorella sorokiniana para el tratamiento de aguas residuales*. (Tesis de licenciatura). Universidad El Bosque.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. In *Water Research* (Vol. 45, Issue 1, pp. 11–36). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.037>
- Autoridad Nacional de Ambiente (2011). *Plan Nacional de Gestión Integrada de Recursos Hídricos de la República de Panamá 2010-2030*.
- Porto, B., Gonçalves, A. L., Esteves, A. F., de Souza, S. M. A. G. U., de Souza, A. A. U., Vilar, V. J. P., & Pires, J. C. M. (2020). Microalgal growth in paper industry effluent: Coupling biomass production with nutrients removal. *Applied Sciences (Switzerland)*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/app10093009>
- Prieto Márquez, I. (2020). *Estudio del crecimiento de la microalga Chlorella vulgaris y su capacidad de depuración de agua residual*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Almería

- Qiu, S., Wu, Z., Chen, Z., Abbew, A. W., Li, J., & Ge, S. (2022). Microalgal Activity and Nutrient Uptake from Wastewater Enhanced by Nanoscale Zerovalent Iron: Performance and Molecular Mechanism. *Environmental Science and Technology*, 56(1), 585–594. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c05503>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. In *Applied Phycology* (Vol. 1, Issue 1, pp. 2–11). Informa UK Ltd. <https://doi.org/10.1080/26388081.2020.1715256>
- Ruiz, J., Álvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barragán, J., & Perales, J. A. (2011). Effect of nitrogen and phosphorus concentration on their removal kinetic in treated urban wastewater by *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation*, 13(9), 884–896. <https://doi.org/10.1080/15226514.2011.573823>
- Sánchez-Borroto, Y., Tobío-Pérez, I., De, T., Romero-López, J., Díaz-Domínguez, Y., Melo-Espinosa, E. A., & Piloto-Rodríguez, R. (n.d.). *Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción de biomasa a partir de la microalga Chlorella vulgaris* Assessment of basic experimental conditions for biomass production from *Chlorella vulgaris* microalgae Avaluació de les condicions experimentals bàsiques per a la producció de biomassa a partir de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Sanchez-Zurano, A., Vilaró-Cos, S., Figueiredo, D., Melkonyan, L., Ferreira, A., Acién, F. G., Lafarga, T., & Gouveia, L. (2025). Optimizing *Chlorella vulgaris* production and exploring its impact on germination through microalga-N₂-fixing bacteria consortia. *Journal of Biotechnology*, 408, 244–253. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2025.09.018>

- Santaeufemia Sánchez, S. (2019). *Aplicación de técnicas de biorremediación para la eliminación de contaminantes mediante el uso de biomasa microalgal*. (Tesis Doctoral). Universidad de Coruña.
- Serrano-Malagon, J, C. (2015). Evaluación de la eficiencia de remoción de nutrientes de un efluente anaerobio mediante una cepa de *Chlorella vulgaris*. (Tesis de Ingeniería). Universidad Pontificia Bolivariana.
- Shen, Y., Gao, J., & Li, L. (2017). Municipal wastewater treatment via co-immobilized microalgal-bacterial symbiosis: Microorganism growth and nutrients removal. *Bioresource Technology*, 243, 905–913. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.041>
- Silva, H. (2015). Evaluación de Línea Base Gestión de Aguas Residuales Panamá. *Caribbean Regional Fund for Wastewater Management*.
- Sousa, J. F., Amaro, H. M., Ribeirinho-Soares, S., Esteves, A. F., Salgado, E. M., Nunes, O. C., & Pires, J. C. M. (2024). Native Microalgae-Bacteria Consortia: A Sustainable Approach for Effective Urban Wastewater Bioremediation and Disinfection. *Microorganisms*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071421>
- Sousa, S. A., Machado, C. A., Esteves, A. F., Salgado, E. M., Dias, J. M., Vilaça, J. S., & Pires, J. C. M. (2025). Microalgae-based wastewater remediation: Linking N:P ratio and nitrogen sources to treatment performance by *Chlorella vulgaris* and biomass valorisation. *Chemical Engineering Journal*, 518. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.164701>
- Su, Y., Mennerich, A., & Urban, B. (2011). Municipal wastewater treatment and biomass accumulation with a wastewater-born and settleable algal-bacterial culture. *Water Research*, 45(11), 3351–3358. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.03.046>
- Tavakol, M., & Naeimpoor, F. (2025). Single and co-cultivation of *Chlorella vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa*: Efficient nutrient removal and lipid/starch formation by

- photoperiodic co-culture. In *Bioresource Technology*, (Vol. 436). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132983>
- Ueda, H., Otsuka S., & Senoo, K. (2009). Community composition of bacteria co-cultivated with microalgae in non-axenic algal cultures. *Microbiol. Cult*, 25, 21-25.
- Umamaheswari, J., & Shanthakumar, S. (2016). Efficacy of microalgae for industrial wastewater treatment: a review on operating conditions, treatment efficiency and biomass productivity. In *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* (Vol. 15, Issue 2, pp. 265–284). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11157-016-9397-7>
- Unnithan, V. V., Unc, A., & Smith, G. B. (2014). Mini-review: A priori considerations for bacteria-algae interactions in algal biofuel systems receiving municipal wastewaters. In *Algal Research* (Vol. 4, Issue 1, pp. 35–40). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.11.009>
- Vargas Perdomo C. M., Oviedo Salazar, A., Velásquez Montañez, M. N., & Polania Patiño, A. (2018). Estado del arte, del uso de la *Eichhornia crassipes* en la fitorremediación de aguas residuales industriales. *Ingenio Magno* 9, 105-130.
- Vega Ayala, A., S. (2022). *Obtención de lípidos a partir de biomasa microalgal de Chlorella vulgaris cultivada en agua residual de origen acuícola*. (Tesis de ingeniería). Universidad Internacional SEK.
- Vega Quiel, J, M. (2022). *Evaluación de crecimiento y capacidad depuradora de la microalga Chlorella sorokiniana, cultivada en aguas residuales de distintas procedencias*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Chiriquí.
- Wang, H., Hill, R. T., Zheng, T., Hu, X., & Wang, B. (2016). Effects of bacterial communities on biofuel-producing microalgae: Stimulation, inhibition and harvesting. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 341–352). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.961402>
- Wang, L., Liu, J., Zhao, Q., Wei, W., & Sun, Y. (2016). Comparative study of wastewater treatment and nutrient recycle via activated sludge, microalgae and combination

- systems. *Bioresource Technology*, 211, 1–5.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.048>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., & Ruan, R. (2010). Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wirth, R., Pap, B., Böjti, T., Shetty, P., Lakatos, G., Bagi, Z., Kovács, K. L., & Maróti, G. (2020). *Chlorella vulgaris* and Its Phycosphere in Wastewater: Microalgae-Bacteria Interactions During Nutrient Removal. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.557572>
- Yan, X., Shan, S., Li, X., Xu, Q., Yan, X., Ruan, R., & Cheng, P. (2024). Carbon and energy metabolism for the mixotrophic culture of *Chlorella vulgaris* using sodium acetate as a carbon source. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1436264>
- Zhang, B., Li, W., Guo, Y., Zhang, Z., Shi, W., Cui, F., Lens, P. N. L., & Tay, J. H. (2020). Microalgal-bacterial consortia: From interspecies interactions to biotechnological applications. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 118). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109563>
- Zhou, X., Li, Y., Yang, P., Xu, G., & Wang, H. (2025). *Bacillus licheniformis* enhances *Chlorella vulgaris* biomass and biodiesel production in wastewater treatment. *Desalination and Water Treatment*, 322. <https://doi.org/10.1016/j.dwt.2025.101150>

ANEXOS

6. ANEXOS

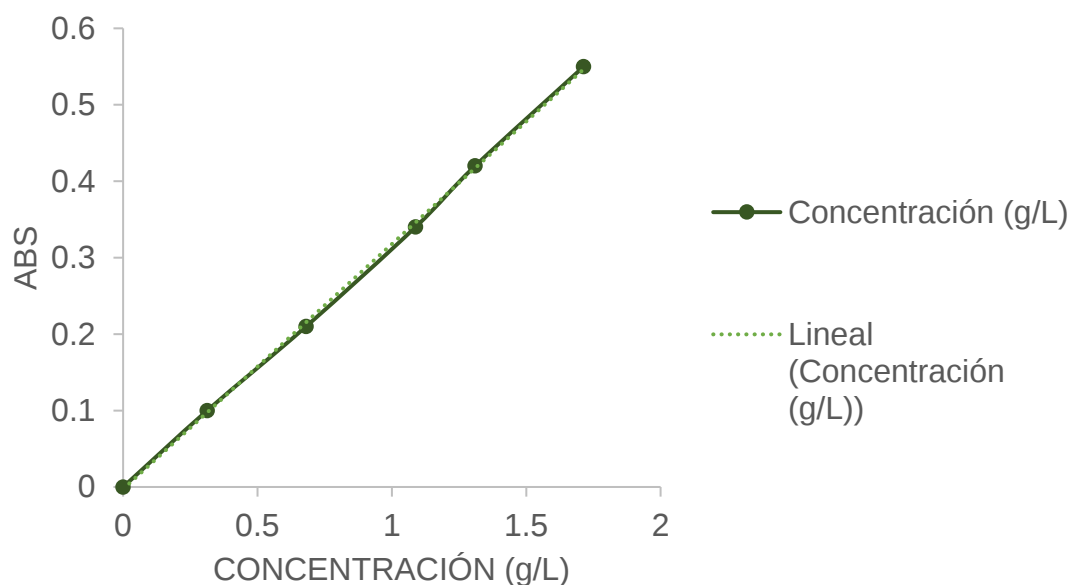
6.1. Crecimiento celular-curva de Absorbancia vs Concentración

La cinética de crecimiento de la microalga se evaluó de acuerdo a la cantidad de biomasa generada por día. Para este análisis se realizó un gráfico de ABS vs Concentración.

Para realizar el grafico se prepararon 5 patrones con concentraciones de 20%, 40%, 60%, 80% y 100% del inóculo microalgal, a estos patrones se le evaluó los sólidos suspendidos (concentración), utilizando el sistema de filtración al vacío (KIMBLE), se filtraron 10 mL de cada patrón, utilizando filtros a peso constante los cuales posteriormente se secaron a 105°C por 24 horas. Seguidamente a los patrones se le evaluó la absorbancia a una longitud de onda de 680 nm, utilizando el espectrofotómetro HACH DR3900.

Figura 15

Curva de calibración para análisis de crecimiento celular



6.2. Selección del medio BG-11 para el crecimiento del inóculo de *C. vulgaris*.

Se utilizó el medio BG-11 para el cultivo del inóculo de *C. vulgaris* debido a que este es un medio que contiene los nutrientes esenciales requeridos para su crecimiento. BG-11 aporta nitrógeno, fósforo, magnesio, hierro y oligoelementos en proporciones óptimas para el desarrollo de la microalga, lo que permitió obtener cultivos estables y adecuados.

6.3. Montaje de los ensayos.

Figura 16

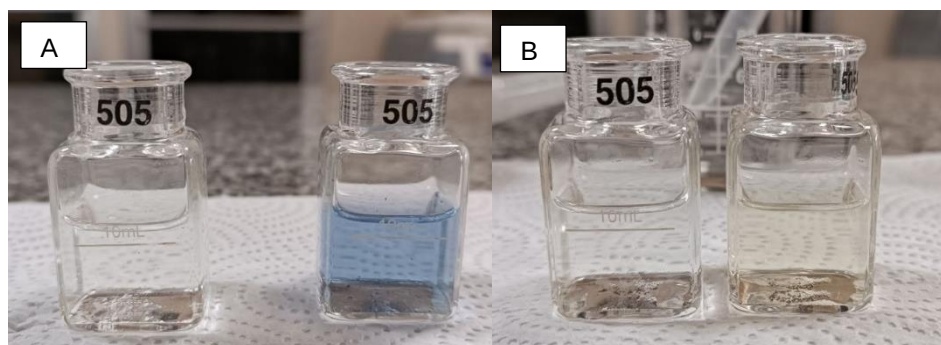
Montaje del ensayo, crecimiento de C. vulgaris en condiciones axénicas (control) y crecimiento de C. vulgaris con bacterias autóctonas del agua residual (tratamiento)



6.4. Determinación de la concentración de nitratos y fosfatos en los cultivos con agua residual.

Figura 17

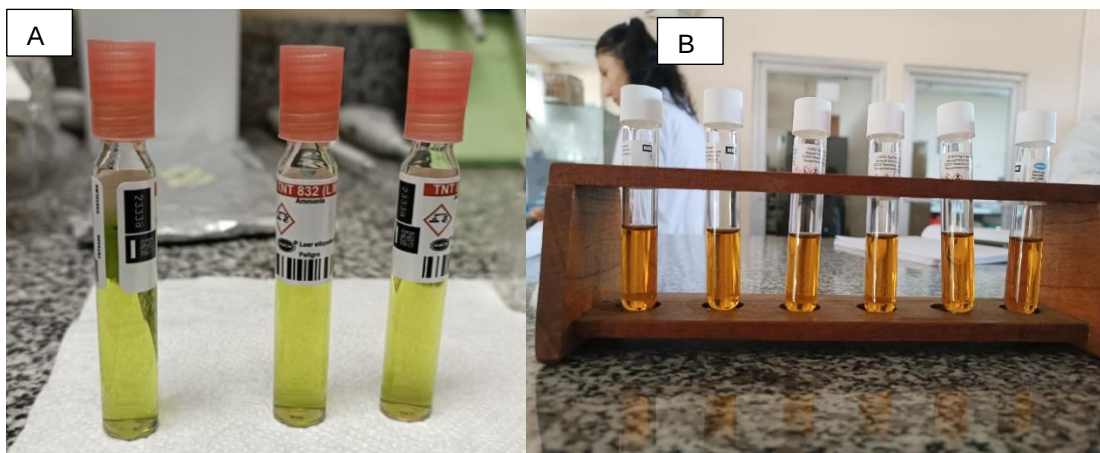
Determinación de la concentración de fosfatos y nitratos en los cultivos con agua residual, método de azul de ácido ascórbico (A) y método de reducción por cadmio (B)



6.5. Determinación de la concentración de amonio y demanda química de oxígeno.

Figura 18

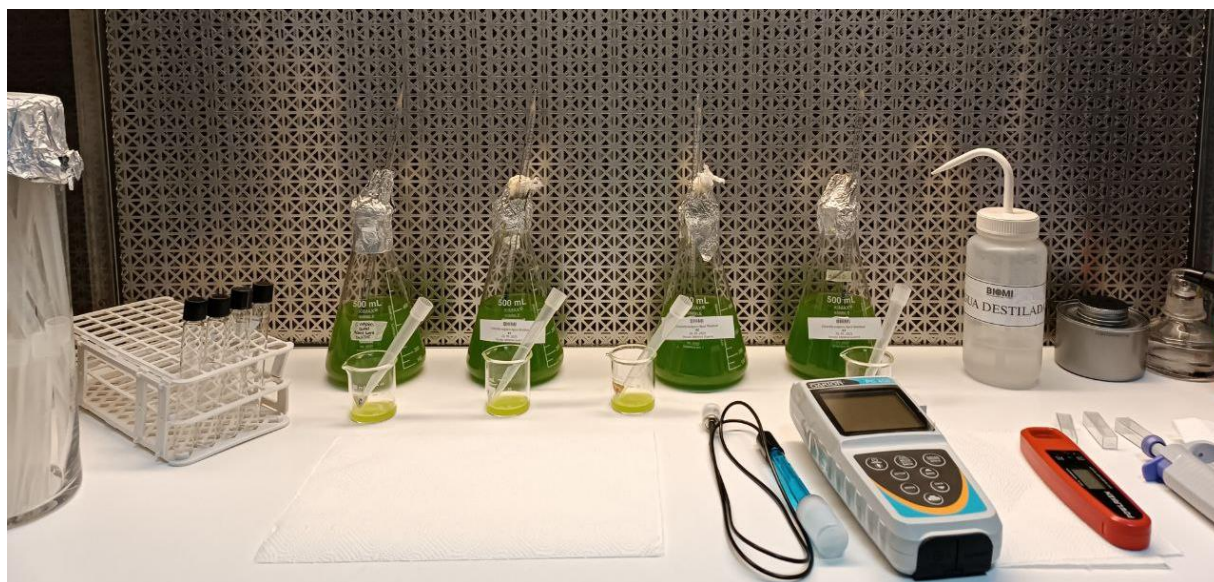
Determinación de la concentración de amonio (A) y demanda química de oxígeno (B)



6.6. Evaluación de parámetros de los cultivos.

Figura 19

Evaluación de crecimiento microalgal, pH, temperatura y actividad fotosintética



6.7. Análisis microbiológico de agua residual.

Figura 20

Diluciones seriadas de la muestra de agua residual

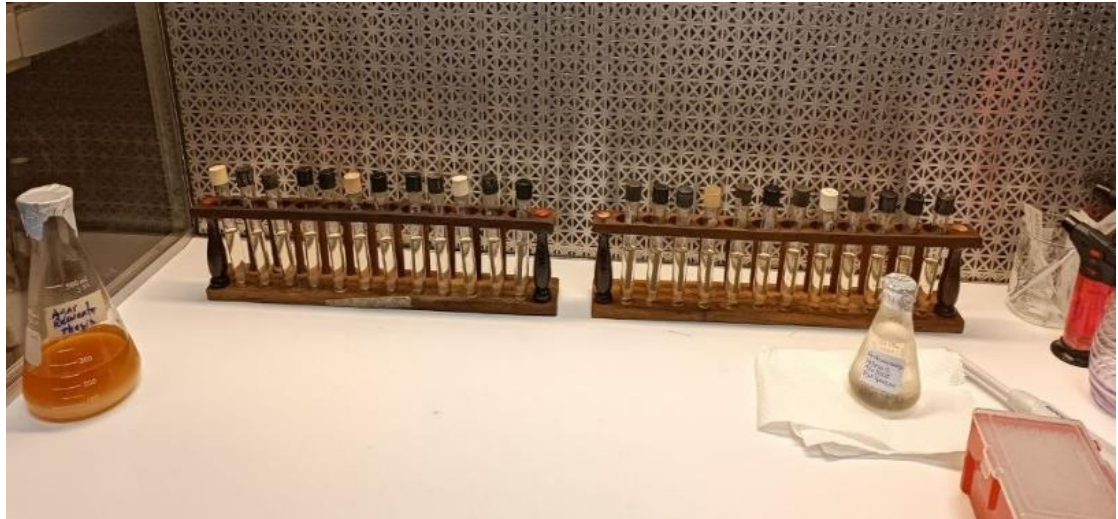


Figura 21

Sembrado en agar recuento



Figura 22

Recuento de las colonias bacterianas



Figura 23

Sembrado de las colonias en agar MacConkey y EMB

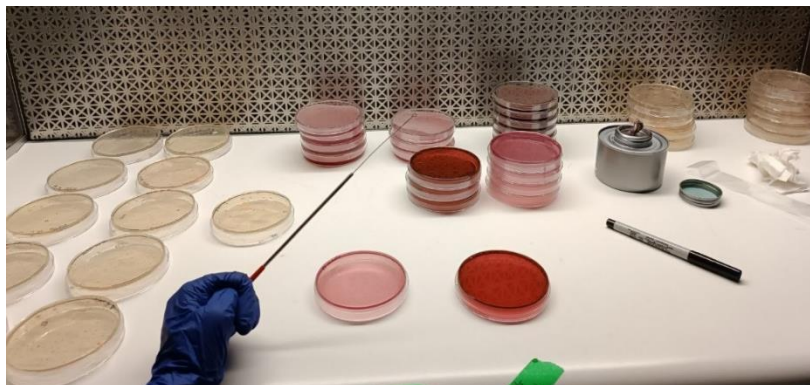


Figura 24

Sembrado de las colonias en pruebas bioquímicas

