

ARTÍCULO

Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae)

Growth and bioremediation capacity of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivated in wastewater generated in the fish farming of the yellowtail amberjack *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae)

Roberto Ramos^{1*} y Roberto Pizarro¹

¹Departamento de Ciencias Acuáticas y Ambientales, Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Av. Angamos 601, Antofagasta, Chile. Autor para correspondencia: *roberto.amos@uantof.cl

Abstract.- Growth of microalgae *Chlorella vulgaris* and its efficiency in dissolved nutrients removal from effluent generated by yellowtail amberjack hatchery production were studied under laboratory scale conditions. This research evaluated indoor and outdoor conditions during 8 days, using filtered and UV light disinfected effluent, inoculated with an initial concentration of $2.06 \cdot 10^6$ cells mL⁻¹ of *Chlorella vulgaris*. In the determination of the growth and removal of nutrients, 12 transparent cylindrical-conical ponds with a capacity of 50 L were used. Three ponds were used for each experimental condition, indoor (3) and outdoor (3), with effluent water from the dorado culture, the remaining six ponds were controls using 1 μ m filtered seawater, disinfected and enriched with general culture medium F/2, in indoor (3) and outdoor (3), respectively. The result of growth under indoor condition reached a maximum value of $4.17 \cdot 10^6 \pm 7.57 \cdot 10^5$ cells mL⁻¹ after 6 days. Similar growth was achieved in control tanks $4.75 \cdot 10^6 \pm 2.29 \cdot 10^5$ cells mL⁻¹, whereas in outdoor experimental condition the maximum growth obtained was $2.81 \cdot 10^6 \pm 2.69 \cdot 10^5$ cells mL⁻¹ reached on day 2, compared with controls that showed a maximum growth of $1.83 \cdot 10^7 \pm 2.29 \cdot 10^5$ cells mL⁻¹. The best nutrient removal results recorded as nitrite removal were values of 91.67 and 88.41% indoor and outdoor conditions, respectively. Nitrate removed reach a 57.47% (indoor) and 29.31% (outdoor) and a similar ammonia removal of 42.22% for both experimental conditions. Finally, high phosphate removal of 65.78% (indoor) and 75.78% (outdoor) were observed. The results show that the use of the microalga *Chlorella vulgaris* for the absorption of nutrients and growth in wastewater is feasible, which opens up encouraging perspectives for its application in purification processes in the fish farming activity or another industry that generates effluents with these characteristics.

Key words: Microalgae, *Chlorella vulgaris*, wastewater, growth, removal nutrient

Resumen.- Se evaluó el crecimiento y la eficiencia de remoción de nutrientes disueltos por la microalga *Chlorella vulgaris* utilizando el efluente generado por la producción de *Seriola lalandi*. En un periodo de estudio de 8 días se evaluaron condiciones experimentales indoor y outdoor utilizando una concentración inicial de *Chlorella vulgaris* de $2,06 \cdot 10^6$ células mL⁻¹. En la determinación del crecimiento y remoción de nutrientes se utilizaron 12 estanques cilíndrico-cónicos transparentes de 50 L de capacidad. Se emplearon tres (3) estanques para cada condición experimental, indoor (3) y outdoor (3), con agua efluente del cultivo de dorado, los restantes seis (6) estanques fueron los controles utilizando agua de mar filtrada a 1 μ m, desinfectada y enriquecida con medio de cultivo general F/2, en la condición indoor (3) y outdoor (3), respectivamente. El resultado de crecimiento en la condición indoor alcanzó un valor máximo de $4,17 \cdot 10^6 \pm 7,57 \cdot 10^5$ células mL⁻¹ en el día 6, crecimiento similar se alcanzó en los estanques controles que obtuvieron $4,75 \cdot 10^6 \pm 2,29 \cdot 10^5$ células mL⁻¹, mientras que en la condición experimental outdoor el crecimiento máximo obtenido fue de $2,81 \cdot 10^6 \pm 2,69 \cdot 10^5$ células mL⁻¹ alcanzado en el día 2, en comparación con los estanques controles que tuvieron un crecimiento máximo de $1,83 \cdot 10^7 \pm 2,29 \cdot 10^5$ células mL⁻¹. Los mejores resultados de remoción de nutrientes se registraron con nitrato, alcanzando valores de 91,67 y 88,41%, en las condiciones indoor y outdoor, respectivamente. Por su parte, el nitrato fue removido en un 57,47 y 29,31% para las condiciones indoor y outdoor. En cuanto a la remoción de amonio el valor fue similar con 42,22% para ambas condiciones experimentales. Finalmente, el fosfato registró una remoción del 65,78% en indoor y 75,78% en outdoor. Los resultados demuestran que la utilización de la microalga *Chlorella vulgaris* para la absorción de nutrientes y crecimiento en aguas residuales es factible, lo que abre perspectivas alentadoras para su aplicación en procesos depurativos en la actividad piscícola u otra industria que genere efluentes con estas características.

Palabras clave: Microalga, *Chlorella vulgaris*, aguas residuales, crecimiento, remoción de nutriente

INTRODUCCIÓN

La acuicultura a escala comercial es una actividad productiva que puede ser calificada de reciente en Chile, dado que su historia apenas excede los 30 años. Desde entonces, ha tenido un crecimiento sostenido. En la actualidad, Chile es uno de los países acuicultores más importantes del mundo, siendo el segundo productor de salmónidos y de mitílidos (Fuentes 2014).

A pesar del desarrollo alcanzado, se reconocen pocos avances en el uso sustentable de los recursos naturales y equidad en el acceso a la actividad, para lograr el desarrollo de la actividad en armonía con el ambiente (Buschman & Pizarro 2001).

Como cualquier otra actividad productiva, la acuicultura no deja de generar impactos en el ambiente (Vinatea 1999, Fuentes 2014). Dentro de esta realidad, el cultivo de peces y camarones son los que más impacto provocan en el ambiente, debido a las características de los efluentes generados en el proceso productivo (Paniagua-Michael & García 2003). Entre los contaminantes más significativos se encuentran la liberación de excretas, los medicamentos, los productos nitrogenados liberados por los animales y la descomposición del alimento no consumido (Pardo *et al.* 2006), siendo este último el causante principal del deterioro de la calidad de agua.

El aporte de nutrientes en los estanques, proveniente del alimento, no es del todo aprovechado y en el momento de la cosecha gran parte de estos nutrientes son lanzados a los cuerpos de agua naturales (Preston *et al.* 2003)¹. En muchos sistemas de producción en estanques, por ejemplo en la carcinocultura, solamente el 20% de los nutrientes suministrado son asimilados, el resto permanece en los sedimentos o es liberado en el efluente (Costanzo *et al.* 2004).

Por lo tanto, los efectos que tiene el efluente en el ambiente se pueden resumir en la disminución en la concentración de oxígeno disuelto, aumento en la concentración de sólidos, aumento en la demanda biológica de oxígeno, aumento en la demanda química de oxígeno, aumento de nitrógeno en sus diferentes formas químicas (amonio, nitrito y nitrato) y fósforo, crecimiento exagerado de algas y eutrofización (Souza 2003).

Al respecto, entre los diversos modos de tratar los efluentes y disminuir su impacto ambiental, se incluye como piedra angular de una acuicultura responsable, la utilización de buenas prácticas en la producción de especies acuáticas, además de procesos físico-químicos y aplicaciones biológicas. Boyd (1992) recomienda entre las aplicaciones de buenas prácticas, usar tasas de siembra y de alimentación no superiores a la capacidad de carga del sistema de producción. También, mejorar la calidad de dietas artificiales con fuentes de nitrógeno y fósforo de alta digestibilidad, fertilizar solamente lo necesario para promover el fitoplancton; reducir el recambio de agua tanto como sea posible; cosechar sin drenar el estanque y pasar el efluente por un estanque de sedimentación antes de la descarga final, para asegurar la reducción de los sólidos disueltos.

Las aplicaciones biológicas propuestas consisten en el uso de humedales artificiales para la remoción de nutrientes (Sánchez-Carrillo & Alvarez-Yepiz 2008), remoción de materia orgánica e inorgánica mediante la utilización de moluscos filtradores (Jones *et al.* 2001, 2002; Mugg & Rice 2003), remoción de nutrientes por macroalgas y microalgas (Wong *et al.* 1995, Abalde *et al.* 1999, Pagand *et al.* 2000, Nelson *et al.* 2001). Así como tratamientos combinados, utilizando procesos de sedimentación, moluscos filtradores, macroalgas y microalgas para la absorción de nutrientes (Neori *et al.* 1998, Jones *et al.* 2001, 2002; Preston *et al.* 2003¹, Gallardo 2008, Ramos *et al.* 2008).

En la actualidad, el tratamiento de efluentes representa un costo y un proceso que no genera ganancia para las empresas de acuicultura. Por lo tanto, las investigaciones sobre este tema se deben centrar en el desarrollo de tecnologías eficientes y de bajo costo. Entre estas tecnologías, los cultivos de microalgas adquieren un gran protagonismo, al ser considerados eco-amigables, ya que reciclan eficientemente contaminantes desde medios líquidos y gaseosos, incorporándolos a su metabolismo para generación de biomasa (Hernández & Labbé 2014).

¹Preston N, C Jackson & M Buford. 2003. Recent advances towards minimizing and managing waste nutrients from intensive from intensive shrimp farms in Australia. In: World Aquaculture Society (ed). Realizing the potential: responsible aquaculture for a secure future. Book of abstract: World Aquaculture 2003, Salvadore, Brazil. May 19-23, p. 947. <<https://www.was.org/meetingabstracts/ShowAbstract.aspx?Id=6092>>

De esta forma, el desarrollo del cultivo microalgal en altas densidades tiene múltiples aplicaciones, que van desde suplementos alimenticios, tratamiento de enfermedades, obtención de pigmentos, aplicaciones biotecnológicas como la obtención de biodiesel y el tratamiento de aguas residuales, entre otros (Richmond 2004, Salazar 2005).

La aplicación de microalgas en el tratamiento de aguas residuales data aproximadamente desde 1940, cuando se reportan los primeros estudios sobre la posibilidad de cultivos masivos de microalgas para tratar efluentes industriales (Salazar 2005). El objetivo fundamental de la aplicación de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es la utilización y biotransformación de los nutrientes a biomasa. Además, de la remoción de amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, el aumento del pH lo que favorece la precipitación de los fosfatos, la oxigenación del agua y la oxidación de la materia orgánica, reduce los organismos patógenos y la recuperación del O₂ liberado en el proceso fotosintético, entre otros beneficios (Salazar 2005).

La selección de la cepa de microalga es un aspecto muy importante si se quiere tener un crecimiento adecuado y una óptima capacidad de remoción de los nutrientes. Existen estudios sobre abundancia de microalgas en aguas residuales, por ejemplo, Escorihuela *et al.* (2007) en una laguna de estabilización de efluentes reportó que las microalgas con mayor abundancia en dicha laguna fueron de las divisiones Chlorophyta y Cyanophyta, encontrando valores de abundancia entre 99,5 y el 98,11%, respectivamente. Por su parte, Chacón *et al.* (2002) evaluó la eficiencia de las microalgas Chlorophytas, *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO en aguas residuales, alcanzando resultados de remoción de nitrógeno y fosfato, entre 44,0 y 48,7% respectivamente. En la remoción de la DQO alcanzó valores entre 54,8 y 55,8%, respectivamente, concluyendo que el uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. presenta un potencial para el tratamiento de aguas residuales.

Con la finalidad de desarrollar tecnologías eficientes y de bajo costo para el tratamiento de los efluentes generados en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Valenciennes, in Couvier y Valenciennes, 1813) se evaluó la capacidad de crecimiento y de biorremediación de la microalga Chlorophyta *Chlorella vulgaris* en condiciones indoor y outdoor.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las dependencias del Laboratorio de Cultivo de Microalgas de la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta. La microalga *Chlorella vulgaris* Beyerinck, fue obtenida del cepario que mantiene el laboratorio de cultivos de microalgas.

En la primera etapa del estudio, se realizó el crecimiento de las microalgas en condiciones de laboratorio, hasta llegar a la concentración de $2,06 \cdot 10^6$ células mL⁻¹, partiendo desde cepa hasta bidón de 20 L de capacidad.

Para alcanzar la concentración de microalga deseada, se inoculó la cepa de *Chlorella vulgaris* en matraces de 2 L con agua de mar filtrada a 1 μm, autoclavada y enriquecida con medio de cultivo general F/2 (Guillard *vide*: Stein 1979), posteriormente, se siguió el crecimiento durante 10 días, finalizando cuando los matraces alcanzaron el crecimiento exponencial con una concentración de $2,06 \cdot 10^6$ células mL⁻¹ aproximadamente. Posteriormente, las microalgas fueron inoculadas en bidones de 20 L con agua procesada de la misma forma y enriquecida con F/2. Durante todo este proceso de crecimiento en bidones de 20 L, se mantuvo constante la aireación y la intensidad lumínica en $15,7 \pm 1,1$ μmol m⁻² s⁻¹.

En la etapa experimental, se evaluó la capacidad de crecimiento y eficiencia de eliminación de nutrientes de *Chlorella vulgaris* en condiciones de laboratorio (indoor) y en condiciones exteriores (outdoor).

El efluente utilizado en esta etapa, se obtuvo a partir del cultivo de reproductores del pez dorado *Seriola lalandi* localizado en la Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos. En el cultivo se mantenían 12 reproductores con un peso promedio 15 kg en estanque de tipo australiano de 180 m³, alimentados con pellet comercial para salmones. El efluente fue obtenido de la cámara de drenaje de los estanques de cultivo mediante una bomba sumergible y almacenado en un estanque de 2.500 L. Desde allí se bombearon 264 L de efluente, el cual fue filtrado a 1 μm, desinfectado con cloro y posteriormente tratado con tiosulfato de sodio para neutralizar el cloro, antes de ser empleado en el estudio.

En la determinación del crecimiento y remoción de nutrientes se utilizaron 12 estanques cilíndrico-cónicos de acrílico transparente de 50 L de capacidad, utilizando un volumen de 44 L. El crecimiento y la remoción de nutrientes por la microalga *Chlorella vulgaris* se evaluó

en 6 estanques, para lo cual se utilizaron 3 estanques para cada condición experimental, indoor (3) y outdoor (3), con efluente del cultivo de dorado. Los 6 estanques restantes corresponden a los controles, utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*, agua de mar procesada y enriquecida con medio de cultivo general F/2, en la condición indoor (3) y outdoor (3).

Para el conteo de células se utilizó el método de recuento celular mediante la cámara de Neubauer. Las muestras para el recuento celular eran extraídas cada 2 días de cultivo en tubos Eppendorf de 50 mL. Una vez extraídas las muestras de las unidades experimentales se colocaba 1 mL en la cámara de Neubauer para realizar el conteo utilizando un microscopio óptico Olympus® modelo Cx 21 con un aumento de 40x. Para la cuantificación de la concentración celular (células mL⁻¹) se utilizó la siguiente relación:

$$\text{Concentración celular} = \frac{[S(c_1; c_2; c_3; c_4)]}{4} \cdot 1 \cdot 10^4,$$

donde, c= número de células por cuadro, 1 mm de medida por lado.

Para evaluar la eficiencia de remoción de nutrientes se utilizó la relación propuesta por Paniagua-Michel & García (2003):

$$ER(\%) = \left[\frac{(Ca - Ce)}{Ca} \right] \cdot 100$$

donde, Ca= Concentración del nutriente en el afluente y Ce= Concentración del nutriente en el efluente. Para la determinación de la eficiencia de remoción de nutrientes, se extrajeron muestras de 50 ml cada 2 días de cultivo, para luego ser centrifugadas a 2.000 G por 5 min en una centrifuga Eppendorf® modelo 5804, el sobrenadante se analizó en el Laboratorio de Análisis Químicos del Departamento de Ciencias Acuáticas y Ambientales, utilizando el espectrofotómetro Spectroquant Nova 60 (Merck®).

Los parámetros de temperatura (T°), salinidad, pH y oxígeno disuelto (OD), fueron medidos utilizando un equipo multiparámetro HANNA® Instruments modelo HI9828, para la medición de intensidad de luz se utilizó un Luxómetro HANNA® modelo HI97500.

Se aplicó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía para determinar diferencias significativas en los resultados de crecimiento y eficiencia de remoción de nutrientes. Cuando se verificó diferencias significativas

entre los tratamientos se aplicó el test de Tukey ($P < 0,05$). El análisis estadístico para los resultados de crecimiento y remoción de nutrientes se realizó comparando los resultados día a día, tanto en las condiciones indoor como en outdoor. En el análisis estadístico de los resultados fue utilizado el software Assistat versión 7.5 Beta (Silva & Azevedo 2006).

RESULTADOS

PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DEL EFLUENTE BRUTO

En el efluente bruto, antes de ser filtrado, desinfectado y neutralizado con tiosulfato de sodio Na₂S₂O₃, se midieron los parámetros físico químicos tales como: oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura (T°) y salinidad; registrando valores de 4,8 mgO₂ L⁻¹, 8,30, 27,26°C y 35,03, respectivamente.

PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS. CONDICIONES INDOOR Y OUTDOOR

Los parámetros físico-químicos medidos a las 11:00, 16:00 y 18:00 h, para ambas condiciones experimentales, se muestran en la Tabla 1.

En la condición indoor, se mantuvieron estables, sin variaciones a lo largo del experimento, mientras que en la condición outdoor se registraron fluctuaciones a lo largo tiempo.

Tabla 1. Parámetros físico-químicos del agua efluente en la condición indoor y outdoor / Physical-chemical parameters of effluent water in indoor and outdoor conditions

Parámetro	Horas	Outdoor	Indoor
Oxígeno disuelto (mg L ⁻¹)	11:00	5,40 ± 0,30	5,37 ± 0,16e
	16:00	4,28 ± 0,44	
	18:00	4,06 ± 0,57	
pH	11:00	8,35 ± 0,16	8,32 ± 0,06e
	16:00	8,14 ± 0,19	
	18:00	9,81 ± 0,14	
Temperatura (°C)	11:00	28,35 ± 0,43	27,26 ± 0,05e
	16:00	31,80 ± 0,69	
	18:00	39,53 ± 0,31	
Salinidad	11:00	36,27 ± 0,11	36,34 ± 0,05e
	16:00	36,29 ± 0,23	
	18:00	38,81 ± 0,14	

INTENSIDAD DE LUZ

La intensidad de luz registrada en la condición experimental indoor, muestra valores estables a lo largo de tiempo experimental, obteniendo un promedio de $15,79 \pm 0,09 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, (Fig. 1). En la condición experimental outdoor se registraron fluctuaciones a lo largo del experimento, los valores más elevados de intensidad de luz fueron a las 11:00 y 15:00 h, con $1.508,12 \pm 25,51$ y $1.672,25 \pm 22,69 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, respectivamente, mientras que los valores más bajos se registraron a las 18:00 y 20:00 h, con $755,17 \pm 69,92$ y $164,946 \pm 6,65 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ respectivamente (Fig. 2).

CRECIMIENTO

Los resultados de crecimiento en la condición experimental indoor, se muestran en la Tabla 2 y Figura 3. Con los datos de crecimiento se elaboró una ecuación de regresión entre la concentración celular y los días de cultivo. Verificándose que la relación entre las dos variables es lineal, siendo representada por la ecuación $Y=0,6x+2,0$ con un coeficiente de determinación $r^2=0,91$ para el cultivo control (cultivo con F/2), mientras que el cultivo con efluentes fue definido por la ecuación $Y=0,27x+1,9$ con un coeficiente de determinación $r^2=0,77$ (Fig. 3).

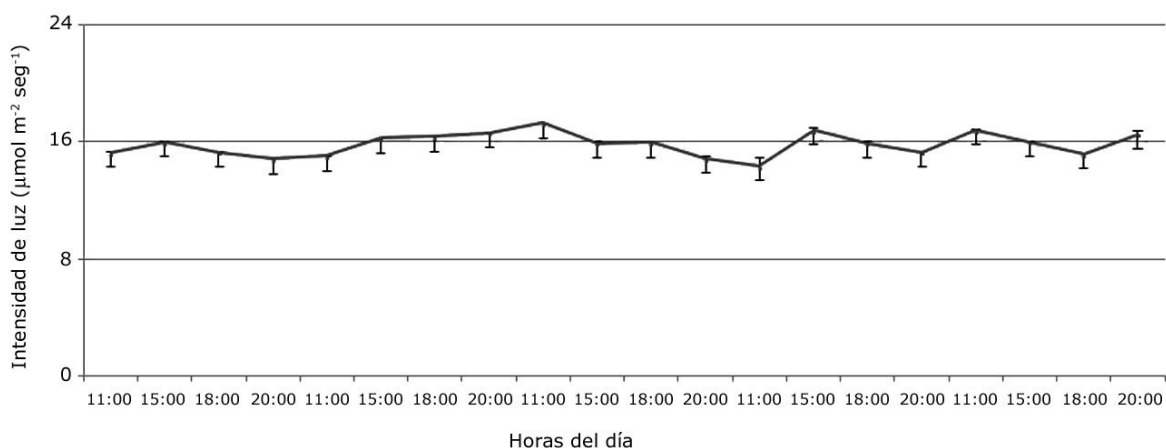


Figura 1. Valores promedios diarios de intensidad de luz en la condición indoor expresados en $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ / Daily average values of light intensity in indoor condition expressed in $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

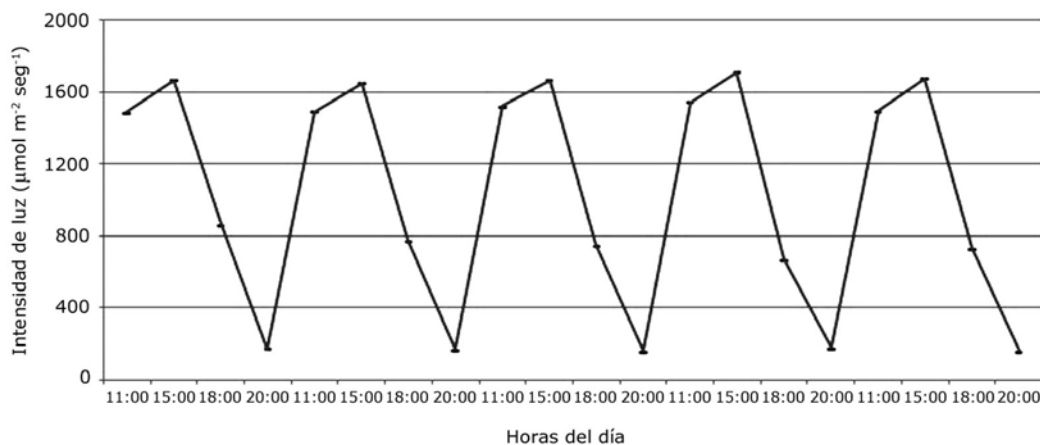


Figura 2. Valores promedios diarios de intensidad de luz en la condición outdoor expresados en $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ / Daily average values of light intensity in the outdoor condition expressed in $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$

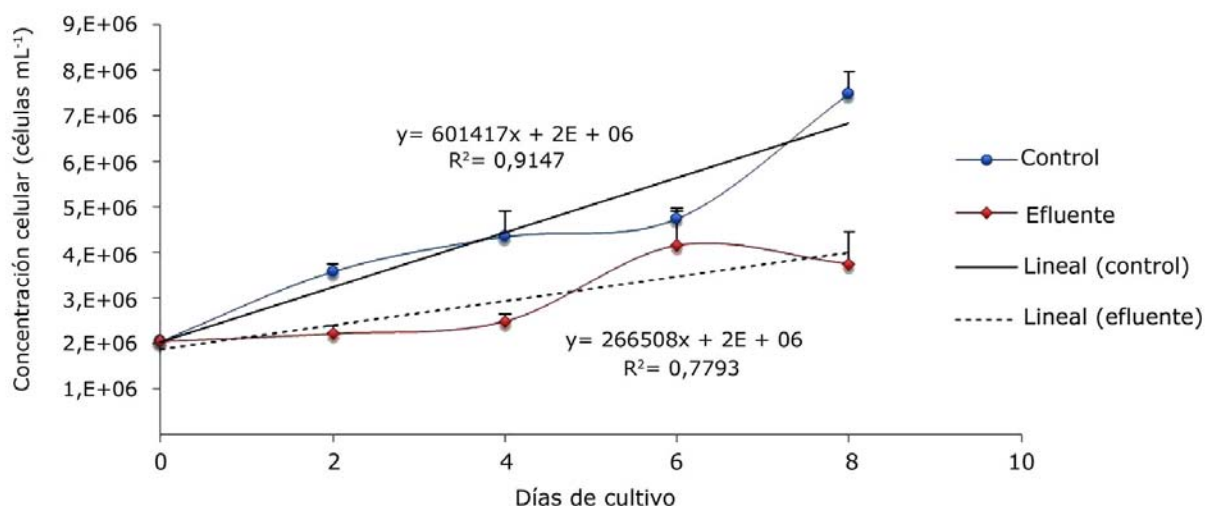


Figura 3. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en condición indoor para ambos medios de cultivo (EF= Efluente; Control= F/2) / Growth of *Chlorella vulgaris* in indoor condition for both culture media (EF= Effluent, Control = F/2)

Tabla 2. Crecimiento (células mL⁻¹) de *Chlorella vulgaris* cultivada en condiciones indoor / Growth (cells mL⁻¹) of *Chlorella vulgaris* cultivated under indoor conditions

Tratamiento	Días de cultivo				
	0	2	4	6	8
Efluente	2,06·10 ⁶ ± 4,1·10 ³ a	2,2·10 ⁶ ± 1,8·10 ⁵ b	2,5·10 ⁶ ± 1,6·10 ⁵ b	4,2·10 ⁶ ± 7,6·10 ⁵ a	3,7·10 ⁶ ± 6,9·10 ⁵ b
F/2 (control)	2,06·10 ⁶ ± 6,6·10 ³ a	3,6·10 ⁶ ± 1,8·10 ⁵ a	4,4·10 ⁶ ± 5,5·10 ⁵ a	4,8·10 ⁶ ± 2,3·10 ⁵ a	7,5·10 ⁶ ± 4,7·10 ⁵ a

Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0,05$)

El cultivo de *Chlorella vulgaris* con efluente y enriquecidos con F/2 (control), se inició con una concentración promedio de $2,06 \cdot 10^6$ células mL⁻¹. El crecimiento experimentado por *Ch. vulgaris* en ambos medios, fue gradual, se identificaron las fases de inicio y exponencial de crecimiento, que en el caso de *Ch. vulgaris* con efluentes fue hasta el día 6 de cultivo, mientras que los estanques con F/2 (controles) esta fase se extendió hasta el día 8. La fase estacionaria para el tratamiento con efluente se inició el día 6 hasta 7, mientras que el tratamiento con F/2, esta fase se verificó después del día 8. Por su parte, la fase de caída de la curva de crecimiento algal, en los estanques con efluentes se inicia al finalizar el día 7, mientras que en los estanques con medio F/2 fue el día 15.

El crecimiento de *Ch. vulgaris*, en ambos tratamientos, presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) en los días 2, 4 y 8, mientras que en el día 6 no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$), ambos tratamientos registraron valores de crecimiento similar, es decir, los estanques con efluente registraron $4,2 \cdot 10^6 \pm 7,6 \cdot 10^5$ células mL⁻¹ en comparación con el estanque control que registró un crecimiento de $4,8 \cdot 10^6 \pm 2,3 \cdot 10^5$ células mL⁻¹ (Tabla 2).

Los resultados de crecimiento de la condición experimental outdoor, se muestran en la Tabla 3 y Figura 4.

Con los datos de crecimiento se elaboró una ecuación de regresión entre la concentración celular y los días de cultivo. Verificándose que la relación entre las dos variables es lineal

Tabla 3. Crecimiento (células mL⁻¹) de *Chlorella vulgaris* cultivada en condiciones outdoor / Growth (cells mL⁻¹) of *Chlorella vulgaris* cultivated under outdoor conditions

Tratamiento	Días de cultivo				
	0	2	4	6	8
Efluente	2,06·10 ⁶ ± 3,27·10 ³ a	2,81·10 ⁶ ± 2,69·10 ⁵ b	2,65·10 ⁶ ± 3,98·10 ⁵ b	2,40·10 ⁶ ± 4,41·10 ⁴ b	1,99·10 ⁶ ± 1,01·10 ⁵ a
F/2 (control)	2,06·10 ⁶ ± 2,65·10 ³ a	3,55·10 ⁶ ± 8,39·10 ⁴ a	7,54·10 ⁶ ± 9,03·10 ⁴ a	1,80·10 ⁷ ± 2,32·10 ⁵ a	1,83·10 ⁶ ± 2,29·10 ⁵ a

Letras diferentes en la misma columna muestran diferencias significativas ($P < 0,05$)

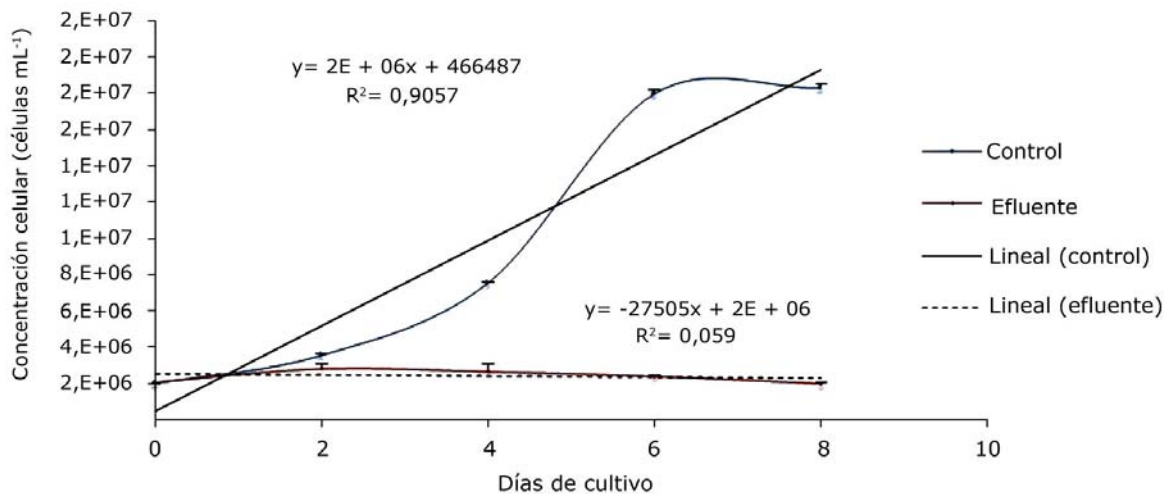


Figura 4. Crecimiento de *Chlorella vulgaris* en la condición outdoor para ambos medios de cultivo (EF= Efluente; Control= F/2) / Growth of *Chlorella vulgaris* in outdoor condition for both culture media (EF= Effluent, Control= F/2)

siendo representada por la ecuación $Y = 2,4x + 0,47$ con un índice de correlación positivo $r^2 = 0,90$ para el cultivo control (cultivo con F/2), mientras que el cultivo con efluentes fue definido por la ecuación $Y = -0,03x + 2,58$ con un índice correlación positivo $r^2 = 0,059$ (Fig. 4).

El cultivo de *Ch. vulgaris* en ambos tratamientos, estanques con efluente y estanques con F/2 (control) se inició con una concentración promedio de $2,06 \cdot 10^6$ células mL⁻¹. Se pudo observar que el crecimiento de *Ch. vulgaris* en los estanques con efluente y enriquecido con F/2, presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$) a lo largo del periodo de experimentación (Tabla 3).

El periodo de crecimiento de *Ch. vulgaris* fue relativamente corto en los estanques con efluentes, donde el máximo crecimiento registrado fue en el día 2 con una concentración de $2,8 \cdot 10^6 \pm 4,0 \cdot 10^5$ células mL⁻¹, mientras

que en los estanques con F/2 el máximo crecimiento se registró en el día 6 con una concentración de $1,8 \cdot 10^7 \pm 2,3 \cdot 10^5$ células mL⁻¹ (Fig. 3).

REMOCIÓN DE NUTRIENTES

Los valores de remoción de nutrientes en las condiciones indoor y outdoor se muestran en la Tabla 4 y Figuras 5, 6, 7 y 8.

Respecto al porcentaje de remoción de amonio NH₄⁺, en el día 2 en ambas condiciones experimentales presentaron diferencias significativas ($P < 0,05$), registrando la condición indoor un 21,48% de remoción y la condición outdoor un valor máximo de remoción de este nutriente de un 42,22%. Después del día 2 los valores no fueron registrados por el método analítico utilizado, puesto que el mínimo de lectura era 0,02 (mg·L⁻¹) (Fig. 5).

La remoción de nitrito NO_2 en ambas condiciones experimentales no presentaron diferencias significativas en el transcurso de los días de cultivo, logrando en indoor una remoción total de 91,67%, mientras que en outdoor presentó una remoción del 88,41%. Sin embargo, el inicio de la remoción en outdoor comienza después del día 2, al contrario de la condición indoor que en el día 2 ya registraba una remoción de nitrito de un 17,68% (Fig. 6).

En la remoción de nitrato NO_3 se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) a partir del día 3 en adelante, para ambas condiciones experimentales. Los niveles de nitrato en indoor registraron una baja significativa durante los

días de experimentación logrando una remoción total del 57,47%. Mientras que en outdoor, el comportamiento de la remoción fue oscilante, registrando una máxima remoción en el día 2 con 29,31%, luego en el día 3 baja a un 2,87% y finalmente en el día 6 logra una remoción del 22,41% (Fig. 7).

Por su parte, la remoción de fosfato PO_4 en ambas condiciones fue gradual y sin registrar diferencias significativas en el tiempo ($P > 0,05$). En la condición outdoor se alcanzó una remoción máxima de 75,78% en el día 6, mientras que en la condición indoor se alcanzó el mayor valor de remoción en el día 8 con un 65,78% (Fig. 8).

Tabla 4. Eficiencia de remoción (ER%) de nutrientes de *Chlorella vulgaris* en condiciones outdoor e indoor / Efficiency of removal (ER%) of nutrients of *Chlorella vulgaris* in outdoor and indoor conditions

Nutriente	Día	Condiciones experimentales			
		Indoor	ER %	Outdoor	ER %
Amonio (NH_4^+) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0,45	-	0,45	-
	2	$0,35 \pm 0,06b$	21,48	$0,26 \pm 0,00a$	42,22
	4	Nd	0	Nd	0
	6	Nd	0	Nd	0
	8	Nd	0	*	*
Nitrito (NO_2) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	1,64	-	1,64	-
	2	$1,35 \pm 0,50a$	17,68	$1,64 \pm 0,00a$	0
	4	$0,21 \pm 0,03a$	87,40	$0,26 \pm 0,00a$	87,40
	6	$0,17 \pm 0,02a$	89,63	$0,19 \pm 0,03a$	88,41
	8	$0,14 \pm 0,03$	91,67	*	*
Nitrato (NO_3) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	0,58	-	0,58	-
	2	$0,38 \pm 0,09a$	35,06	$0,41 \pm 0,07a$	29,31
	4	$0,38 \pm 0,02a$	33,91	$0,56 \pm 0,11b$	2,87
	6	$0,31 \pm 0,03a$	46,55	$0,45 \pm 0,07b$	22,41
	8	$0,25 \pm 0,05$	57,47	*	*
Fosfato (PO_4^-) ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0	3,4	-	3,4	-
	2	$2,83 \pm 0,31a$	16,67	$1,88 \pm 0,54a$	44,61
	4	$2,44 \pm 0,57a$	28,14	$1,84 \pm 0,40a$	45,88
	6	$1,29 \pm 0,13a$	62,16	$0,82 \pm 0,30a$	75,78
	8	$1,16 \pm 0,07$	65,78	*	*

Letras diferentes en la misma fila muestran diferencias significativas ($P < 0,05$)

Concentración expresada en ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

*Caída del cultivo antes de llegar al día 8

Día 0= Concentración inicial

Nd= Valores no detectados por el método analítico utilizado

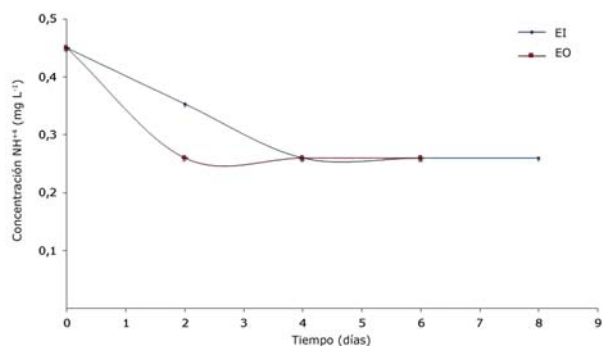


Figura 5. Remoción de amonio (NH_4^+) por *Chlorella vulgaris* en las condiciones indoor (EI) y outdoor (EO), valores expresados en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ / Removal of ammonium (NH_4^+) by *Chlorella vulgaris* in indoor (EI) and outdoor (EO) conditions expressed in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

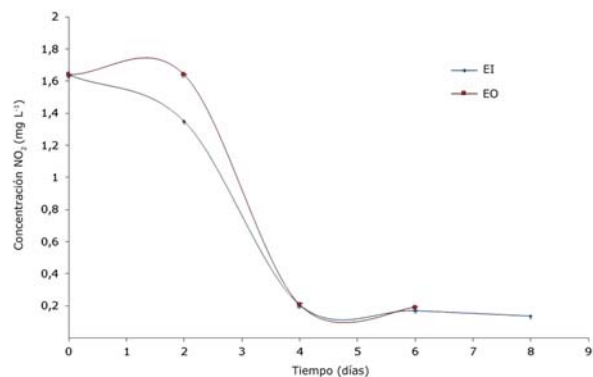


Figura 6. Remoción de nitrito (NO_2) por *Chlorella vulgaris* en condiciones indoor (EI) y outdoor (EO), valores expresados en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ / Removal of nitrite (NO_2) by *Chlorella vulgaris* in indoor (EI) and outdoor (EO) conditions expressed in $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

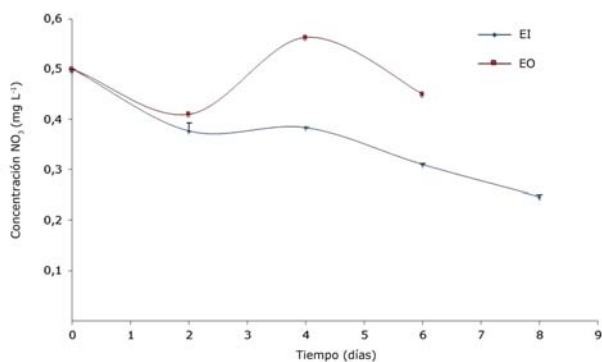


Figura 7. Remoción de nitrato (NO₃⁻) por *Chlorella vulgaris* en condiciones indoor (EI) y outdoor (EO), valores expresados en mg NO₃⁻ L⁻¹ / Removal of ammonium (NO₂⁻) by *Chlorella vulgaris* in indoor (EI) and outdoor (EO) conditions expressed in mg NO₃⁻ L⁻¹

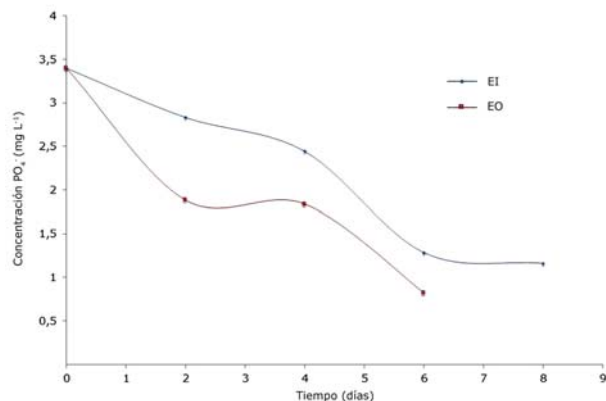


Figura 8. Remoción de fosfato (PO₄⁻) por *Chlorella vulgaris* en condiciones indoor (EI) y outdoor (EO), valores expresados en mg PO₄⁻ L⁻¹ / Removal of phosphate (PO₄⁻) by *Chlorella vulgaris* in indoor (EI) and outdoor (EO) conditions, values expressed in mg PO₄⁻ L⁻¹

DISCUSIÓN

El crecimiento de las microalgas en ambientes acuáticos está controlado por una variedad de factores ambientales y, para su cultivo, son necesarias condiciones adecuadas de nutrientes, temperatura, pH e iluminación (Abalde *et al.* 1995).

En este estudio, los parámetros físicos y químicos en la condición experimental indoor, se observó que los valores de temperatura, pH, OD y salinidad se mantuvieron constantes. Mientras que para los mismos parámetros, los valores en la etapa experimental outdoor registraron fluctuaciones durante el día. En el caso de la temperatura, su máximo valor fue de 39°C, el que excede al rango óptimo propuesto para el aumento en la tasa de crecimiento de las microalgas. Para la mayoría de las microalgas, el rango óptimo de temperatura se sitúa entre los 18° y 25°C y para las microalgas más resistentes como *Ch. vulgaris* estos valores llegan hasta los 36°C (Laing & Ayala 1990, Richmond 2004). Según Hernández & Labbé (2014), por encima de la temperatura óptima de cada especie, aumenta la respiración y la fotorrespiración reduce la productividad global, lo cual fue constatado por la reducción en el crecimiento del cultivo a partir del día 2 en la etapa experimental outdoor. Esta caída en el crecimiento algal no tiene una razón única ya que la temperatura e intensidad lumínica determinan marcadamente los resultados de crecimiento de *Ch. vulgaris* en condiciones outdoor.

Los valores de pH en la etapa experimental indoor se mantuvieron estables registrando un valor promedio de 8,32 ± 0,06 mientras que en la etapa experimental outdoor el valor del pH tuvo un valor mínimo de 8,25 ± 0,24 a las

11:00 h y un máximo de 9,81 ± 0,14 a las 18:00 h. El pH es uno de los factores más importantes en el cultivo, puesto que las microalgas muestran una dependencia respecto al pH del medio de cultivo variando su respuesta a este parámetro según la especie de microalga. Al respecto, cada microalga presenta un pH óptimo para su cultivo (entre 7 y 8). Un descenso de pH suele ser letal, en cambio suelen soportar mejor los incrementos del pH, hasta un cierto límite (Richmond 2004), así lo expone Mora *et al.* (2005) quienes concluyeron que los mayores crecimientos experimentados por *Ch. vulgaris* se encontraría en un rango de pH 8,0 y 9,0.

En el caso de la salinidad en la condición experimental indoor tuvo un comportamiento constante de 36,04 ± 0,18, mientras que en la condición outdoor la salinidad registró un valor máximo de 38,65 ± 0,36 a las 18:00 h, este valor se explica por las altas temperaturas registradas para esta condición, provocando evaporación del medio y así aumentando la concentración de sales. Los valores de salinidad en las 2 condiciones exceden al rango de salinidad para el crecimiento óptimo de las microalgas, que van desde 25-35, por lo que es deducible que *Ch. vulgaris* es una especie que presentó una buena capacidad adaptación a las variaciones de salinidad durante el periodo experimental.

El nivel de OD en la condición experimental indoor registró un valor constante de 5,37 ± 0,16 mgO₂ L⁻¹, lo que constituye un valor normal según Neori *et al.* (1998), considerando que tanto el cultivo de microalgas como de macroalgas hacen aportes de oxígeno disuelto al sistema. Por su parte, los valores en la condición experimental outdoor presentaron variaciones, registrando un valor mínimo de

$4,06 \pm 0,57 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ a las 18:00 h y un valor máximo de $5,40 \pm 0,30 \text{ mgO}_2 \text{ L}^{-1}$ a las 11:00 h, esto se explica por las altas intensidades de luz que se registraron en esta condición experimental, ayudando a la producción de oxígeno a través de la fotosíntesis, mientras que la disminución de oxígeno al finalizar el día se explica por el proceso de respiración, que experimentan las microalgas durante la fase oscura del proceso de fotosíntesis (Borowitzka & Borowitzka 1988, Abalde *et al.* 1995).

En la etapa experimental indoor, la intensidad de luz siempre se mantuvo estable en todos los horarios (11:00, 15:00 y 18:00) con un promedio de $15,79 \pm 0,09 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$ mientras que en la etapa experimental outdoor los valores máximos de intensidad fueron a las 11:00 y 15:00 h, con $1.580,12 \pm 25,51$ y $1.672 \pm 22,69 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$, respectivamente. La diferencia en las intensidades de luz, entre las condiciones experimentales evaluadas, reflejó que la densidad microalgal también presentara diferencias, registrando valores de $4,20 \cdot 10^6 \pm 7,57 \cdot 10^5$ células mL^{-1} para el cultivo indoor en el día 6 y $2,81 \cdot 10^6 \pm 3,98 \cdot 10^5$ células mL^{-1} para outdoor en el día 2 de cultivo.

Mora *et al.* (2002, 2005), observaron que *Ch. vulgaris* fue capaz de crecer en un rango de intensidad de luz de 58 y $576 \mu\text{mol m}^2 \text{ s}^{-1}$, sin embargo, agregan que a bajas intensidades de luz la especie tiene un mejor rendimiento fotosintético que a intensidades de luz altas, lo que explica que en la condición experimental indoor *Ch. vulgaris* tuvo un crecimiento superior. En la condición experimental outdoor, la microalga experimenta un proceso de inhibición del proceso fotosintético o fotoinhibición, que según Darley (1987), están relacionados con la detención del crecimiento debido a intensidades de luz supra óptimas, lo cual se reflejó que el rendimiento en crecimiento de la microalga desde el día 4 al 8 fuera declinando. Pasado el punto de saturación de la luz, se alcanza el punto de fotoinhibición, con resultados perjudiciales para la misma célula e incluso la muerte, implicando pérdida de eficiencia fotosintética y productividad del cultivo (Park *et al.* 2011 a *vide* Hernández & Labbé 2014). Según Martínez (2008 *vide* Hernández & Labbé 2014) los cultivos microalgales exteriores suelen sufrir fotoinhibición en las principales horas del día debido a la alta intensidad lumínica. Por lo tanto, la intensidad luminosa, como la longitud de onda y el fotoperiodo afectan al crecimiento y metabolismo microalgal (Lips & Avissar 1986).

Entre los factores más importantes que ayudan al proceso de absorción de las microalgas, sin duda que está la concentración microalgal y la intensidad de luz (Richmond 2004). También existen otros factores que

incluyen el periodo de adaptación por parte de la microalga; composición del efluente y tratamiento del efluente (Hernández 2010).

Al respecto, el proceso de remoción de nutrientes se evidenció desde las primeras horas de cultivo, logrando remover gran parte de la concentración de los nutrientes. Hernández (2010), concluyó que al usar un efluente bruto, es decir sin tratamiento, la microalga *Ch. vulgaris*, precisa de un proceso de adaptación para realizar la absorción de nutrientes. Este autor, indica un periodo de adaptación de 13 días para iniciar la absorción de nutrientes. Mientras que al utilizar un efluente filtrado y desinfectado *Ch. vulgaris* comienza la absorción de nutrientes a partir del segundo día de cultivo, como se observa en el presente experimento.

La remoción de las diferentes formas de nitrógeno, es decir, como amonio, nitrito y nitrato, en un cultivo microalgal tiene un comportamiento secuencial, el nitrito (producto intermedio e inestable en el proceso de nitrificación) y nitrato no son absorbidos por las microalgas hasta que el amonio en su gran mayoría es consumido (Abalde 1995, Kim *et al.* 2010).

En el tratamiento outdoor, la eliminación de nitrito o transformación de este a nitrato solo comenzó en el día 3, mientras que la remoción del nitrato comenzó en el día 2. En la condición indoor, la reducción de nitrito y nitrato comenzó a partir del día 2, con valores de 17,68% para el nitrito y 35,06% para el nitrato, inferiores a los alcanzados en la remoción de amonio que registró un 42,22% en el día 2. Posteriormente, la eliminación de nitrito y nitrato en ambas condiciones experimentales aumentó, registrando valores finales de 91,67% para el nitrito en indoor en el día 8 y un 88,41% en el día 6 en la condición outdoor. Por su parte, el nitrato en la condición indoor registró una remoción final de 57,47% en el día 8, por el contrario, en la condición outdoor la máxima disminución se registró en el día 2 con un 29,31%, en los días 4 y 6 se alcanzaron valores menores de eliminación.

La eliminación de fosfato se inició dentro los primeros días llegando a una remoción final del 65,78% en el día 8 en la condición indoor, mientras que para condiciones outdoor alcanzó un valor de 75,78% en el día 6. Estos resultados se diferencian a lo presentado por Hernández (2010) que en 20 días de cultivo en la condición experimental indoor, la remoción de fosfato por *Ch. vulgaris* alcanzó un valor final de 24%.

Según De-Bashan *et al.* (2002), la absorción de fosfato por *Ch. vulgaris* asociada con *Azospirillum brasilense*

logra un valor de absorción del 65% después de dos días de cultivo, sin aumentar después de ese periodo. En el presente estudio, los valores de remoción de fosfato fueron en aumento al transcurrir el periodo de experimentación, logrando valores máximos de 65,78 y 75,78%, en los días 8 y 6 en condiciones indoor y outdoor, respectivamente.

Si bien lo expuesto por Hernández (2010) y Chacón *et al.* (2002) en el sentido que los mejores resultados de crecimiento y remoción se obtienen con un efluente filtrado y desinfectado, también hay otros aspectos que deben ser considerados en la asociación microalgas/efluentes, como el tipo de cultivo y la interacción microalgas/bacterias, lo que constituye un consorcio microbiano. Esta interacción microalga/bacteria no fue evaluada en el presente trabajo, pero por la importancia que reviste este tipo de asociaciones, desde una mirada más holística de la problemática estudiada, deberá ser abordado en investigaciones futura.

Finalmente, los resultados alcanzados en el presente estudio permiten concluir que la aplicación de microalgas para la absorción de nutrientes fue eficaz, presentando incluso mayor velocidad de remoción de nutrientes que las macroalgas, esto si se compara con los resultados alcanzados por Ramos *et al.* (2008) y Gac & Virreira (2008), siendo que estas últimas presentan diferencias tanto estructurales como fisiológicas con las microalgas. Coincidiendo con lo planteado por Hernández & Labbé (2014) que consideran que las microalgas poseen un potencial en ficorremediación, más los múltiples usos que se le da a su biomasa, sin duda que los resultados obtenidos incentiva a la utilización de *Ch. vulgaris* en la remoción de nutrientes originados en la actividad piscícola o de otras industrias que generen efluentes con estas características, permitiendo minimizar el impacto ambiental que estos provocan en los sistemas hídricos naturales, además de otras posibles aplicaciones tecnológicas.

LITERATURA CITADA

Abalde J, A Cid, J Fidalgo, E Torres & C Herrero. 1995. Microalgas: Cultivos y medios de cultivos, 210 pp. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de La Coruña, La Coruña.

Boyd C. 1992. Shrimp pond bottom soil and sediment management In: Wyban J (ed). World aquaculture, 92-special session on shrimp farming, Anais. The World Aquaculture Society Baton Rouge, pp. 166-181.

Borowitza MA & LJ Borowitza. 1988. Micro-algal biotechnology, 476 pp. Cambridge University Press. Cambridge.

Buschman A & R Pizarro. 2001. El costo ambiental de la salmonicultura en Chile. Publicaciones Terram, 'Análisis de Políticas Públicas' 5, Fundación Terram Chile. <<http://www.terram.cl/wp-content/uploads/2016/08/app5-El-costos-ambiental-de-la-salmonicultura-en-Chile.pdf>>

Chacón C, C Andrade & C Cárdenas. 2002. Uso de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 38(2): 94-98.

Costanzo S, M O'Donohue & M Dennison. 2004. Assessing the influence and distribution of shrimp pond effluent in a tidal mangrove creek in north-east Australia. Marine Pollution Bulletin 48: 514-525.

Darley W. 1987. Biología de las algas. Enfoque fisiológico, 236 pp. Limusa, México.

De-Bashan L, M Moreno, J Hernández & Y Bashan. 2002. Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* coimmobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. Water Research 36: 2941-2948.

Escorihuela A, M Núñez, N Rosales, R Mora & E Morales. 2007. Microalgas presentes en una laguna para pulimento de efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales urbanas. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia 1(24): 225-230.

Fuentes J. 2014. Evolución del régimen ambiental de la acuicultura en Chile. Revista de Derecho, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso 42: 441-477.

Gac F & J Virreira. 2008. Proceso de sedimentación y filtración por moluscos bivalvos *Crassostrea gigas* (Lamarck, 1819), *Choromytilus chorus* (Molina, 1782) y *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) en el tratamiento de aguas residuales de instalaciones de cultivo de dorado *Seriola lalandi* (Cuvier & Valenciennes, 1833). Seminario de Título, Ingeniería en Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, 36 pp.

Gallardo S. 2008. Tratamientos de los efluentes de la producción de dorado *Seriola lalandi* (Valenciennes, 1833) mediante procesos de sedimentación y absorción por macroalgas para la minimización del impacto ambiental. Seminario de Título, Ingeniería en Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar y de Recursos Biológicos, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, 48 pp.

Hernández B. 2010. Remoción de ortofosfato y amonio de agua residual municipal por tres cultivos libres e inmovilizados de microalgas. Tesis de Especialidad en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 57 pp.

- Hernández A & J Labbé. 2014.** Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 49: 157-173.
- Jones A, W Dennison & N Preston. 2001.** Integrated treatment of shrimp effluent by sedimentation, oyster filtration and macroalgal absorption: a laboratory scale study. *Aquaculture* 193: 155-178.
- Jones A, N Preston & W Dennison. 2002.** The efficiency and condition of oyster and macroalgae used as biological filters of shrimp pond effluent. *Aquaculture Research* 33: 1-19.
- Kim J, B Lingaraju, R Rheume, J Lee & K Siddiqui. 2010.** Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. *Tsinghua Science and Technology* 15: 391-396.
- Laing I & F Ayala. 1990.** Commercial mass culture techniques for producing microalgae. In: Akatsuka I (ed). *Introduction to Applied Phycology*, pp. 447-477. SPB Academic Publishing, The Hague.
- Lips SH & YJ Avisar. 1986.** Photosynthesis and ultrastructure in microalgae. In: Richmond A (ed). *Handbook of microalgal mass culture*, pp. 43-67. CRC Press, Boca Raton.
- Mora R, N Ortiz, Y Clemente, J Bermúdez, D Avendaño & E Morales. 2002.** Efecto del nitrato, irradiación y salinidad sobre la producción de clorofila *a* de microalgas cultivadas y aisladas en la región noroccidental de Venezuela. *Oceánidos* 17(2): 73-83.
- Mora R, N Ortiz, R Moronta, J Ortega & E Morales. 2005.** Crecimiento y producción de pigmentos de la microalga nativa *Chlorella* sp. aislada de la represa de Tulé, Municipio Mara, Estado de Zulia, Venezuela. *Revista Ciencia* 12: 1-9.
- Mugg J & M Rice. 2003.** The impacts of aquacultured oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791) on water column nitrogen and sedimentation: results of a mesocosm study. *Aquaculture* 220: 407-422.
- Nelson S, E Glenn, J Conn, D Moore, T Walsh & M Akutagawa. 2001.** Cultivation of *Gracilaria parvispora* (Rhodophyta) in shrimp-farm effluent ditches and floating cages in Hawaii: a two-phase polyculture system. *Aquaculture* 193: 239-248.
- Neori A, N Ragg & M Shpigel. 1998.** The integrated culture of seaweed, abalone, fish and clams in modular intensive land-based systems: II. Performance and nitrogen partitioning within an abalone (*Haliotis tuberculata*) and macroalgae culture system. *Aquacultural Engineering* 17: 215-239.
- Pagand P, J Blancheton, J Lemoalle & C Casellas. 2000.** The use of high rate algal ponds for the treatment of marine effluent from a recirculating fish rearing system. *Aquaculture Research* 31(10): 729-736.
- Paniagua-Michael J & O García. 2003.** *Ex-situ* bioremediation of shrimp culture effluent using constructed microbial mats. *Aquacultural Engineering* 28: 131-139.
- Pardo S, H Suárez & E Soriano. 2006.** Tratamiento de efluentes: una vía para la acuicultura responsable. *Revista: Medicina Veterinaria y Zootecnia (MVZ)*, Universidad de Córdoba 11: 20-29
- Ramos R, L Vinatea & R da Costa. 2008.** Tratamiento de efluentes del cultivo *Litopenaeus vannamei* por sedimentación y filtración por la ostra *Crassostrea rhizophorae*. *Latin American Journal of Aquatic Research* 36: 235-244
- Richmond A. 2004.** *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, 566 pp. Blackwell Science, Oxford.
- Salazar M. 2005.** Aplicación e Importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. Laboratorio de Microbiología Ambiental y Tratamiento de Aguas Residuales, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), México. <<http://www.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n59ne/algas.pdf>>
- Sánchez-Carrillo S & J Alvarez-Yepiz. 2008.** Viabilidad de los manglares artificiales como sistemas de tratamiento de los efluentes camaronícolas en Latinoamérica. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 4: 17-30.
- Silva A & AC Azevedo. 2006.** A new version of the statistical assistance software. In: *World Congress on Computers in Agriculture*, 4, Orlando-FL-USA. American Society of Agricultural Engineers, Orlando, pp. 393-396.
- Souza W. 2003.** Tratamento de efluentes de carcinicultura por dois wetland artificiais pilotos, com e sem *Spartina alterniflora*. Perspectivas de aplicação. Dissertação, Mestrado em Aqüicultura, Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agraria, Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis. <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/86132/195525.pdf>>
- Vinatea L. 1999.** Aqüicultura e desenvolvimento sustentável, Aqüicultura e desenvolvimento sustentável, subsídios para a formulação de políticas de desenvolvimento da aqüicultura brasileira, 310 pp. Editora UFSC, Florianópolis.
- Wong M, YH Chueng, F Leungs & PS Wong. 1995.** Reclamation of polluted river water for aquaculture: removal of nutrients by microalgae. *Water Science and Technology* 32(3): 271-280.

Recibido el 22 de noviembre de 2016 y aceptado el 4 de abril de 2018

Editor: Claudia Bustos D.