

## Production of metabolites from *Scenedesmus* sp. and a microalgal consortium cultured in unconventional media

## Producción de metabolitos de *Scenedesmus* sp. y un consorcio microalgal cultivados en medios no convencionales

Kevin A González-Falfán, Claudia Guerrero-Barajas, Jesús A Badillo-Corona,  
Luis C Fernández-Linares\*

Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología–Instituto Politécnico Nacional, Av. Acueducto s/n,  
Col. Barrio la Laguna Ticomán, 07340, Mexico City, Mexico

\* Corresponding author. E-mail: lfemand36@gmail.com

**ABSTRACT.** Growth comparisons were made between a microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. cultivated in treated wastewater (TWw) enriched with 1 mL·L<sup>-1</sup> Bayfolan Forte fertilizer (BM), TWw enriched with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PAM), TWw enriched with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (BCAM), tap water with piggery wastewater (PEM), tap water with piggery wastewater digestate (PDM), and raw wastewater (Ww). Nitrogen (N) content in the media, except for TWw, was adjusted to 80 mg·L<sup>-1</sup> N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N). Unconventional low-cost media with lower nutrient contents (BM and TWw) showed adequate productions of biomass and lipids. PEM was the most advantageous medium, showing the highest biomass productivity with the consortium (191.25 ± 6.25 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) and a lipid productivity of 36.75 ± 9.90 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. The fatty acid profile was composed mainly of C16 and C18. PAM, PEM, and PDM showed a higher proportion of saturated fatty acids (60%–69%), whereas the composition of unsaturated fatty acids was in the range of 31% to 38%. In PEM and PDM the removal of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was 100%; however, there were NH<sub>4</sub><sup>+</sup> losses (as NH<sub>3</sub>) due to volatilization (46%). Unconventional media, especially Ww, are an option for growing microalgae.

**Key words:** fertilizer, microalgae-bacteria consortium, *Scenedesmus* sp., wastewater.

**RESUMEN.** Se comparó el crecimiento de un consorcio de microalgas y de *Scenedesmus* sp. cultivados en aguas residuales tratadas (ART) enriquecidas con 1 mL·L<sup>-1</sup> de fertilizante Bayfolan Forte (MB), ART enriquecidas con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MPA), ART enriquecidas con NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (MBCA), agua del grifo con aguas residuales porcinas (MEP), agua del grifo con digestato de aguas residuales porcinas (MDP) y aguas residuales sin tratar (AR). El contenido de nitrógeno (N) de los medios, excepto el medio AR, se ajustó a 80 mg·L<sup>-1</sup> de N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N). Los medios no convencionales con menor contenido de nutrientes y costo (MB y AR) presentaron buenas producciones de biomas y lípidos. MEP fue el medio más ventajoso al presentar la mayor productividad de biomasa con el consorcio (191.25 ± 6.25 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>) y una productividad de lípidos de 36.75 ± 9.90 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. El perfil de ácidos grasos estuvo constituido principalmente de C16 y C18. MPA, MEP y MDP mostraron una mayor proporción de ácidos grasos saturados (60%–69%), mientras que la composición de los ácidos grasos insaturados osciló entre 31% y 38%. En MEP y MDP, la eliminación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue del 100%; sin embargo, hubo pérdidas de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> debido al arrastre por aire (46%). Los medios no convencionales, específicamente las AR, son una opción para el cultivo de microalgas.

**Palabras clave:** fertilizante, consorcio de microalgas-bacterias, *Scenedesmus* sp., aguas residuales.

### INTRODUCTION

The production of biofuels from microalgae is promising because microalgae do not compete for food crops or arable land, present high growth rates, and are capable of fixing CO<sub>2</sub> through photosynthesis and releasing O<sub>2</sub> into the atmosphere. Nitrogen (N) is a key nutrient for the growth and biochemical composition of microalgae, and the accumulation of lipids and carbohydrates increases under N limitation (Liu et al. 2017, Huy et al. 2018).

One of the main problems of large-scale microalgal biomass production is the supply of N and phosphorous (P). N fertilizers require enormous amounts of fossil energy (Metz et al. 2007), the main contributor to the carbon footprint (Hillier et al. 2009). Moreover, the use of fertilizers for culturing microalgae competes

### INTRODUCCIÓN

La producción de biocombustibles a partir de microalgas es prometedora, debido a que las microalgas no compiten por cultivos alimenticios ni por tierras arables, presentan altas tasas de crecimiento y son capaces de fijar CO<sub>2</sub> mediante fotosíntesis y liberar O<sub>2</sub> a la atmósfera. El nitrógeno (N) es un nutriente clave para el crecimiento y la composición bioquímica de las microalgas, y la acumulación de lípidos y carbohidratos aumenta en condiciones de limitación de N (Liu et al. 2017, Huy et al. 2018).

Uno de los principales problemas en la producción a gran escala de biomasa microalgal es el suministro de N y fósforo (P). Los fertilizantes de N requieren de una enorme cantidad de energía fósil (Metz et al. 2007), el principal contribuyente a la huella de carbono (Hillier et al. 2009).

with their use in agriculture (Chisti 2013). One of the obstacles to large-scale production of microalgae for energy purposes is still the high cost of production, especially the availability and cost of feedstock (Acíén et al. 2012).

The use of organic fertilizers such as animal excreta, sludge from wastewater, and anaerobic digestate with high nutrient contents has been proposed as an economical alternative for microalgae culture (Nayak et al. 2016, Wang et al. 2016a, El Shimi and Moustafa 2017, Liu et al. 2017, Huy et al. 2018). The use of wastewater (Gonçalves et al. 2017, Ho et al. 2019, Rodríguez-Mata et al. 2019) and wastewater enriched with inorganic fertilizers, composed of N, P, and potassium (K), is an economical alternative for large-scale cultivation (Nayak et al. 2016).

Microalgae can remove N and P from municipal wastewater, leaving very low concentrations, while converting these nutrients into biomass (Boelee et al. 2011). The microalgae genera *Chlorella* and *Scenedesmus* are the most studied in regards to their culture in wastewaters, particularly the species *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* (Park et al. 2010, Ji et al. 2013, Xu et al. 2015, Wang et al. 2016b). *Scenedesmus obliquus* has been used to treat wastewater and to obtain valuable biomass in bubble-column photobioreactors. *Scenedesmus obliquus* grown in a culture medium supplemented with 40% of piggery wastewater effluent showed biomass and lipid productivities of 15.5 and 0.13 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectively, and removals of 96.1 mg total N and 2.48 mg total P were observed (Ji et al. 2013). Removal of 79% of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and 43% of PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> from a mixture of wastewater (containing 145.2 mg·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and 21.1 mg·L<sup>-1</sup> PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) and 7% of landfill leachate was achieved with *S. obliquus*, which accumulated 12%–16% of lipids in cells (Hernández-García et al. 2019). When *Scenedesmus* sp. AMDD was grown in treated municipal wastewater in chemostats under different dilution rates or hydraulic retention times, biomass composition was strongly controlled by the rate of wastewater nutrient removal, and total fatty acids were only accumulated when growth rates were very low or when a prolonged nutrient starvation regime was imposed (Dickinson et al. 2013). Microalgae production using secondary treated wastewater decreases process costs by minimizing the use of freshwater and fertilizers while contributing to the water purification process, greatly enhancing process sustainability (Gómez et al. 2013).

The present work compares the effect of 6 unconventional media (3 inorganic and 3 organic), some of which were used and compared for the first time, on the growth and productivity of a microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. and proposes different media for scaling microalgae culture in a sustainable way.

Asimismo, el uso de fertilizantes para el cultivo de microalgas compete con su utilización en la agricultura (Chisti 2013). Uno de los obstáculos para la producción de microalgas a gran escala con fines energéticos sigue siendo el alto costo de producción, especialmente la disponibilidad y el costo de la materia prima (Acíén et al. 2012).

Se ha propuesto la utilización de fertilizantes orgánicos como excretas animales, lodos de aguas residuales y digestatos anaerobios con alto contenido de nutrientes como una alternativa económica para el cultivo de microalgas (Nayak et al. 2016, Wang et al. 2016a, El Shimi y Moustafa 2017, Liu et al. 2017, Huy et al. 2018). La utilización de aguas residuales (Gonçalves et al. 2017, Ho et al. 2019, Rodríguez-Mata et al. 2019) y aguas residuales enriquecidas con fertilizantes inorgánicos, compuestos por N, P y potasio (K), es una alternativa económica para el cultivo a gran escala (Nayak et al. 2016).

Las microalgas pueden remover N y P de las aguas residuales municipales hasta dejar concentraciones muy bajas, al tiempo que convierten estos nutrientes en biomasa (Boelee et al. 2011). Los géneros de microalgas *Chlorella* y *Scenedesmus* son los más estudiados en cuanto a su cultivo en aguas residuales, particularmente las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus obliquus* (Park et al. 2010, Ji et al. 2013, Xu et al. 2015, Wang et al. 2016b). *Scenedesmus obliquus* se ha utilizado para el tratamiento de aguas residuales y la obtención de biomasa en fotobiorreactores de columna de burbujeo. El cultivo de esta especie en un medio suplementado con 40% de efluente de aguas residuales de porqueriza mostró productividad de biomasa y lípidos de 15.5 y 0.13 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectivamente, y se observó una remoción de 96.1 mg de N total y 2.48 mg de P total (Ji et al. 2013). La remoción del 79% de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 43% de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de una mezcla de aguas residuales (contenido de 145.2 mg·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y 21.1 mg·L<sup>-1</sup> de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) y 7% de lixiviado de relleno se logró con *S. obliquus*, que acumuló del 12% al 16% de lípidos en las células (Hernández-García et al. 2019). Al cultivar *Scenedesmus* sp. AMDD en aguas residuales municipales tratadas en quimiostatos con diferentes tasas de dilución o tiempos de retención hidráulica, la composición de la biomasa estuvo fuertemente relacionada con la tasa de eliminación de los nutrientes de las aguas residuales, y los ácidos grasos totales solo se acumularon cuando las tasas de crecimiento fueron muy bajas o cuando se impuso un régimen prolongado de privación de nutrientes (Dickinson et al. 2013). La producción de microalgas utilizando aguas residuales con tratamiento secundario permite disminuir los costos del proceso, al minimizar la utilización de agua dulce y fertilizantes, y contribuye al proceso de purificación del agua, lo que mejora, en gran medida, la sostenibilidad del proceso (Gómez et al. 2013).

El presente trabajo compara el efecto de 6 medios no convencionales (3 inorgánicos y 3 orgánicos), algunos de ellos utilizados y comparados por primera vez, sobre el

## MATERIALS AND METHODS

### Pretreatment and characterization of treated water, wastewater, and piggery wastewater

The wastewater (Ww) and the secondary treated wastewater (TWw) were obtained from the “San Juan Ixhuatepec” treatment plant located in Tlalnepantla, Mexico (19°31'13.8" N, 99°07'27.8" W). Ww and TWw were not filtered or sterilized. Piggery wastewater and piggery wastewater digestate were obtained from Productora Porcina Nopaltepec, located in Nopaltepec, Mexico (19°47'03.5" N, 98°43'41.6" W). Both piggery wastewater and piggery wastewater digestate were centrifuged at 6,000 rpm for 5 min to remove the solids, and the supernatant was used as substrate. The compositions of the TWw, piggery wastewater, piggery wastewater digestate, and Bayfolan fertilizer used to prepare the culture media are described in Table 1.

### Culture media

The 6 proposed media used in this work for culturing were (1) Bayfolan medium (BM), formulated with 1 mL of Bayfolan Forte per liter of TWw; (2) TWw enriched with 0.3303 g·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (PAM); (3) TWw supplemented with 0.1977 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (BCAM); (4) tap water with 23.5% of piggery wastewater (PEM); (5) tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate (PDM); and (6) Ww. N content in BM, PAM, and BCAM was adjusted to 80 mg·L<sup>-1</sup> N (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N and NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), according to conventional media BBM and BG 11 with 500 mg·L<sup>-1</sup> of sodium nitrate. N sources for BCAM and PAM were chosen based on their availability on the market, and NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> served as sources of carbon (C) and P, respectively. For PEM and PDM, tap water treated in a purification plant was used instead of Ww or TWw because when scaling

crecimiento y la productividad de un consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp., y propone diferentes medios para escalar el cultivo de microalgas de forma sostenible.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Pretratamiento y caracterización de aguas tratadas, aguas residuales y aguas residuales porcinas

Las aguas residuales sin tratar (AR) y las aguas residuales tratadas secundarias (ART) se obtuvieron de la planta de tratamiento San Juan Ixhuatepec ubicada en Tlalnepantla, México (19°31'13.8" N, 99°07'27.8" W). Las AR y las ART no se filtraron ni esterilizaron. Las aguas residuales porcinas y los digestatos de aguas residuales porcinas se obtuvieron de la Productora Porcina Nopaltepec, ubicada en Nopaltepec, México (19°47'03.5" N, 98°43'41.6" W). Tanto las aguas residuales porcinas como los digestatos de aguas residuales porcinas se centrifugaron a 6,000 rpm/5 min para eliminar los sólidos, y se utilizó el sobrenadante como sustrato. Las composiciones de ART, aguas residuales porcinas, digestato de aguas residuales porcinas y Bayfolan empleadas para la preparación de los medios de cultivo se describen en la Tabla 1.

### Medios de cultivo

Los 6 medios propuestos en este trabajo y utilizados para los cultivos fueron (1) medio Bayfolan (MB), formulado con 1 mL de Bayfolan Forte por litro de ART; (2) ART enriquecidas con 0.3303 g·L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (MPA); (3) ART suplementadas con 0.1977 g·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (MBCA); (4) agua del grifo con 23.5% de aguas residuales porcinas (MEP); (5) agua del grifo con 39.75% de digestatos de aguas residuales porcinas (MDP); y (6) AR. El contenido de N en MB, MPA y MBCA

**Table 1.** Composition of the wastewater, treated wastewater, piggery wastewater, and Bayfolan fertilizer used for culture media formulation. Data are presented as mean values and standard errors.

**Tabla 1.** Composición de las aguas residuales, las aguas residuales tratadas, las aguas residuales porcinas y el medio Bayfolan utilizados para la formulación de los medios de cultivo. Los datos se presentan como la media y el error estándar.

Parameter	TWw (mg·L <sup>-1</sup> )	Ww (mg·L <sup>-1</sup> )	PEM (mg·L <sup>-1</sup> )	PDM (mg·L <sup>-1</sup> )	BM (g·L <sup>-1</sup> )
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	3.10 ± 0.14	37.53 ± 0.18	2,605.80 ± 67.26	1,540.82 ± 43.49	44.75 ± 0.30
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	6.10 ± 0.46	0.20 ± 0.06	7.82 ± 2.72	25.95 ± 4.63	14.41 ± 0.73
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	15.81 ± 0.05	15.45 ± 0.18	851.28 ± 0.61	259.30 ± 5.22	10.60 ± 0.17
COD	17.00 ± 4.15	239.00 ± 5.50	16,877.30 ± 397.61	2,368.67 ± 186.23	92.36 ± 1.67
TSS	0.00 ± 0.00	198.00 ± 14.00	50,000.80 ± 560.32	3,000.50 ± 420.25	0.00 ± 0.00
pH	7.80	8.42	7.13	8.22	7.01

TWw, treated wastewater; Ww, raw wastewater; PEM, tap water with 23.5% of piggery wastewater; PDM, tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate; BM, Bayfolan medium formulated with 1 mL of Bayfolan Forte per liter of TWw; COD, chemical oxygen demand; TSS, total suspended solids.

to 2,000 L or higher, water transportation from the closest treatment plant implied logistic issues and higher operational costs. Piggery wastewater and the piggery wastewater digestate were selected because of their high  $\text{NH}_4^+$  content (Hu et al. 2013, Luo et al. 2016) and low cost.

### Microorganisms and pre-culture conditions

The microalgae *Scenedesmus* sp. was obtained from the microalgae collection of the Center for Scientific Research and Higher Education at Ensenada, Baja California, Mexico. The microalgal consortium was obtained from treated water and was mainly composed of *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. The consortium was obtained by growing the native microflora of the treated water from the plant in a 1-L photobioreactor under the conditions described below. The culture was maintained and reinoculated in treated water. Cultures were carried out in 1-L cylindrical photobioreactors (101 mm diameter  $\times$  203 mm height), with working volume of 0.9 L, illuminated on one side by cold-cathode fluorescent lamps ( $127 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) under a 12:12 (light:dark) photoperiod, with aeration of 0.4 vvm and a temperature of  $24 \pm 1$  °C. Water losses due to evaporation were amended daily by adding sterile distilled water.

Prior to the experimentation, the consortium and *Scenedesmus* sp. were cultured in the 6 media. To synchronize the pre-cultures, 3 consecutive cultures were carried out during 13 d each, and the last one was used as the inoculum of the experiments. All the pre-inocula were adjusted to an oxygen demand of 0.8 (600 nm) and all the photobioreactors were inoculated at 10%, with the corresponding pre-inoculum.

### Culture conditions

Microalgae were cultivated for 13 d in BM, PAM, BCAM, and Ww. In PEM and PDM media, microalgae were cultivated during 8 d because they grew faster in these media.  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and  $\text{NO}_3^-$  contents in the supernatant and productions of biomass, carbohydrates, and proteins were determined every 3 d; pigments, lipids, and the lipid profile were determined at the end of the culture. In addition, the chemical oxygen demand (COD) was determined at the beginning and at the end of the PEM and PDM cultures.  $\text{NH}_4^+$  losses by volatilization (as  $\text{NH}_3$ ) in PEM and PDM were quantified by passing the outlet of the gas stream from the photobioreactors through a 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  solution, and dissolved  $\text{NH}_3$  was determined by a colorimetric method (APHA 1998).

### Analytical methods

#### Determination of biomass, metabolites, and media composition

Biomass was determined by measuring absorbance at 750 and 600 nm with a spectrophotometer (DR3000 UV/Vis Spectrophotometer, HACH; USA). Biomass (dry weight

se ajustó a  $80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de N ( $\text{NH}_4^+\text{-N}$  y  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ), según medios convencionales BBM y BG 11 con  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrato de sodio. Las fuentes de N para MBCA y MPA se eligieron en función de su disponibilidad en el mercado, y  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  sirvieron como fuentes de carbono (C) y P, respectivamente. Para los medios MEP y MDP, se usó agua del grifo tratada en una planta de purificación en lugar de AR o ART porque cuando se escalan a 2,000 L o más, el transporte de agua desde la planta de tratamiento más cercana implica problemas logísticos y mayores costos operativos. Las aguas residuales y el digestato de aguas residuales porcinas fueron seleccionados por su alto contenido de  $\text{NH}_4^+$  (Hu et al. 2013, Luo et al. 2016) y bajo costo.

### Microorganismos y condiciones de precultivo

La microalga *Scenedesmus* sp. se obtuvo de la colección de microalgas del Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, México. El consorcio de microalgas se obtuvo a partir de agua tratada, y estuvo compuesto, principalmente, por *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. Este consorcio se obtuvo cultivando la microflora nativa del agua tratada de la planta en un fotobiorreactor de 1 L en las condiciones que se describen a continuación. El cultivo se mantuvo y reinoculó en agua tratada. Los cultivos se realizaron en fotobiorreactores cilíndricos de 1 L (101 mm de diámetro  $\times$  203 mm de altura), con volumen de trabajo de 0.9 L, iluminados de un lado por lámparas fluorescentes de luz fría ( $127 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) en fotoperiodo de 12:12 (luz:oscuridad), con aireación de 0.4 vvm y una temperatura de  $24 \pm 1$  °C. Las pérdidas de agua por evaporación se restituyeron diariamente adicionando agua destilada estéril.

Antes de la experimentación, el consorcio y *Scenedesmus* sp. se cultivaron en los 6 medios. Para sincronizar los precultivos, se realizaron 3 cultivos consecutivos durante 13 d cada uno, y el último se utilizó como inóculo de los experimentos. Todos los preinóculos se ajustaron a una densidad óptica de 0.8 (600 nm), y todos los fotobiorreactores se inocularon al 10%, con el preinóculo correspondiente.

### Condiciones de cultivo

Las microalgas se cultivaron durante 13 d en MB, MPA, MBCA y AR. En MEP y MDP se cultivaron durante 8 d debido a que crecieron más rápido en estos medios. Cada 3 d se determinó el contenido de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{NO}_3^-$  en el sobrenadante y la producción de biomasa, carbohidratos y proteínas; los pigmentos, los lípidos y el perfil lipídico se determinaron al final del cultivo. Adicionalmente, se determinó la demanda química de oxígeno (DQO) al inicio y al final de los cultivos en MEP y MDP. Las pérdidas de  $\text{NH}_4^+$  por volatilización (como  $\text{NH}_3$ ) en MEP y MDP se

basis) was determined in a moisture analyzer thermobalance using a glass microfiber membrane (Ahlstrom, 4.7 cm diameter, 1.1  $\mu\text{m}$  pore size). Cells were counted using a Neubauer cell chamber. Protein contents were determined following the Lowry method (Lowry et al. 1951); carbohydrates, by the Dubois method (DuBois et al. 1956); and pigments, by the Wellburn method (Ritchie 2006).  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and COD were determined following APHA methods (1998) in APHA (1998), and total suspended solids were measured according to standard methods (APHA 2005).  $\text{NO}_3^-$  was analyzed according to the modified method reported by Keeney and Nelson (1982).

#### *Determination of lipids and fatty acid methyl esters*

Lipid extraction was performed as described by Ramírez-López et al. (2016). The composition of fatty acid methyl esters (FAMES) was determined in an Agilent gas chromatograph (Technologies 7890B; Santa Clara, CA, USA) coupled to mass spectrometry (Agilent Technologies 5977A Series GC/MSD System; Santa Clara, CA, USA). A VF-MAXms column (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.50  $\mu\text{m}$ ) was used and Helium was the carrier gas at a flow rate of 2.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Injector temperature was maintained at 230  $^\circ\text{C}$ . Oven temperature was adjusted to 140  $^\circ\text{C}$  for 5 min and gradually increased 8  $^\circ\text{C}$  every minute to 250  $^\circ\text{C}$  for 15 min. The temperature of the transfer line (MSD) was maintained at 180  $^\circ\text{C}$ . The temperatures of the source and the quadrupole were 230 and 150  $^\circ\text{C}$ , respectively. Each peak of FAME was identified and quantified with the standard Supelco 37 Component FAME Mix.

#### **Data analysis**

Factor analysis (analysis of variance,  $P \leq 0.05$ ) and the Tukey HSD test were used to compare differences between treatment mean values. All the experiments were performed in triplicate.

## **RESULTS**

### **Effect of the medium on the production and productivity of biomass**

The culture medium that yielded the highest biomass concentration (dry weight) of the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. was BM with  $1.79 \pm 0.05$  and  $1.77 \pm 0.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. These concentrations were significantly higher than those obtained in the other 5 culture media. The media that yielded the highest biomass concentrations after BM were Ww and PEM, and there was a significant difference in biomass concentrations with respect to BCAM, PAM, and PDM (Fig. 1). Therefore, given the significant differences in biomass production and the increasing trend in biomass productivity, the media can be grouped as follows:  $\text{BM} > (\text{Ww and PEM}) > (\text{BCAM, PAM,}$

quantificaron pasando la corriente de gas de la salida de los fotobiorreactores a través de una solución 0.5 M de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , y el  $\text{NH}_3$  disuelto se determinó por el método colorimétrico (APHA 1998).

#### **Métodos analíticos**

##### *Determinación de biomasa, metabolitos y composición de los medios*

La biomasa se determinó por absorbancia a 750 y 600 nm con un espectrofotómetro (DR3000 UV/Vis, HACH; EUA). La biomasa (con base en el peso seco) se determinó en una termobalanza analizadora de humedad utilizando una membrana de microfibras de vidrio (Ahlstrom, 4.7 cm de diámetro, 1.1  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro). El recuento de células se realizó utilizando una cámara de Neubauer. El contenido de proteínas se determinó siguiendo el método de Lowry (Lowry et al. 1951); el de carbohidratos, mediante el método de Dubois (DuBois et al. 1956); y el de los pigmentos, mediante el método de Wellburn (Ritchie 2006). El  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y DQO se determinaron siguiendo los métodos de APHA (1998), y los sólidos suspendidos totales se midieron de acuerdo con los métodos estándar (APHA 2005). El  $\text{NO}_3^-$  se analizó de acuerdo con el método modificado reportado por Keeney y Nelson (1982).

##### *Determinación de lípidos y ésteres metílicos de ácidos grasos*

La extracción de lípidos se realizó según lo descrito por Ramírez-López et al. (2016). La composición de los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) se determinó en un cromatógrafo de gases Agilent (Technologies 7890B; Santa Clara, CA, EUA) acoplado a espectrometría de masas (Sistema GC/MSD Agilent Technologies 5977A Series; Santa Clara, CA, EUA). Se utilizó una columna VF-MAXms (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.50  $\mu\text{m}$ ) y el gas portador fue el helio a una velocidad de flujo de 2.4  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . La temperatura del inyector se mantuvo en 230  $^\circ\text{C}$ . La temperatura del horno se ajustó a 140  $^\circ\text{C}$  durante 5 min y se incrementó gradualmente 8  $^\circ\text{C}$  cada minuto hasta 250  $^\circ\text{C}$  durante 15 min. La temperatura de la línea de transferencia (MSD) se mantuvo a 180  $^\circ\text{C}$ . Las temperaturas de la fuente y del cuadrupolo fueron de 230 y 150  $^\circ\text{C}$ , respectivamente. Cada pico de EMAG se identificó y cuantificó con la mezcla estándar de EMAG de 37 componentes de Supelco.

#### **Análisis de los datos**

Se utilizó el análisis factorial (análisis de varianza,  $P \leq 0.05$ ) y la prueba de Tukey HSD para comparar las diferencias entre las medias de los tratamientos. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

and PDM), BM being the medium that yielded the highest biomass productivity.

### Effect of the medium on lipid productivity and fatty acid methyl esters

The content of lipids in biomass in both the consortium and *Scenedesmus* sp. was 15%–16% in BCAM, 16%–22% in PAM, 9%–13% in BM, 21%–23% in Ww, 19%–32% PEM, and 30%–52% in PDM (Fig. 2). Lipid productivity in both cases, the consortium and *Scenedesmus* sp., fluctuated between 34.25 and 36.75 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> in PEM, 32.83 and 38.67 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> in PDM, and 24.87 and 26.41 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> in Ww, all significantly higher than the lipid productivities obtained in BM, BCAM, and PAM (Table 2). In Ww, BCAM, PAM, PEM, and PDM, 90%–100% of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was removed from day 3 and, consequently, there was N limitation.

The fatty acid profiles for the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. in the different media consisted of palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1), linoleic acid (C18:2), and linolenic acid (C18:3) (Table 3), which are suitable for the production of biodiesel (Anand et al. 2018, May-Cua 2019). The culture media PAM, PEM, and PDM exhibited a higher proportion of saturated fatty acids (60%–69% of total FAMES) than BCAM, BM, and Ww (39%–48% of total FAMES).

### Effect of the medium on the productivity of proteins, carbohydrates, and total pigments

The productivities of proteins in the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. cultures with BM and PEM

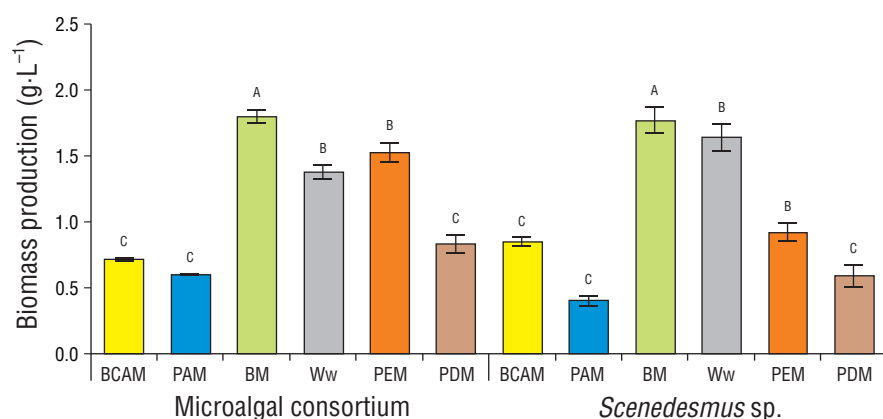
## RESULTADOS

### Efecto del medio de cultivo en la producción y la productividad de biomasa

El medio de cultivo con la mayor concentración de biomasa (peso seco) del consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp. fue MB con 1.79 ± 0.05 y 1.77 ± 0.10 g·L<sup>-1</sup>, respectivamente. Estas concentraciones fueron significativamente superiores a las obtenidas en los otros 5 medios de cultivo. Los medios que dieron la mayor concentración de biomasa después de MB fueron AR y MEP, con una diferencia significativa en la concentración de biomasa respecto a MBCA, MPA y MDP (Fig. 1). Por tanto, dadas las diferencias significativas en la producción de biomasa y la tendencia del aumento de la productividad de la biomasa, los medios se pueden agrupar de la siguiente forma: MB > (AR y MEP) > (MBCA, MPA y MDP), con MB como el medio que produjo la mayor productividad de biomasa.

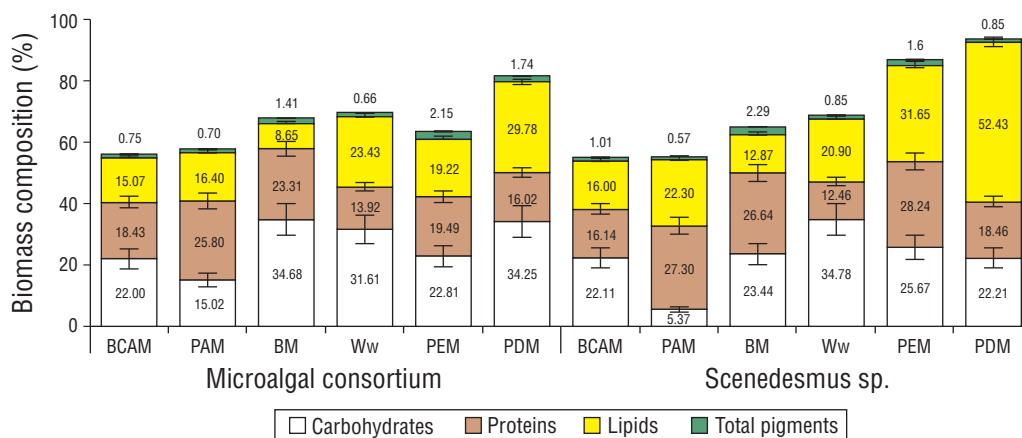
### Efecto del medio sobre la productividad lipídica y los ésteres metílicos de ácidos grasos

El contenido de lípidos en la biomasa tanto en el consorcio como en *Scenedesmus* sp. fue del 15%–16% en MBCA, 16%–22% en MPA, 9%–13% en MB, 21%–23% en AR, 19%–32% en MEP y 30%–52% en MDP (Fig. 2). La productividad de los lípidos en ambos casos, el consorcio y *Scenedesmus* sp., fluctuó entre 34.25 y 36.75 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en MEP, 32.83 y 38.67 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en MDP y 24.87 y 26.41 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> en AR, cantidades significativamente superiores a las productividades lipídicas en MB, MBCA y MPA



**Figure 1.** Biomass production with the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. cultured in different media. BCAM, secondary treated wastewater added with 0.1977 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; PAM, secondary treated wastewater enriched with 0.3303 g·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; BM, Bayfolan medium; Ww, wastewater; PEM, tap water with 23.5% of piggery wastewater; PDM, tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate.

**Figura 1.** Producción de biomasa con el consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp. cultivadas en diferentes medios. BCAM, aguas residuales tratadas secundarias suplementadas con 0.1977 g·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; PAM, aguas residuales tratadas secundarias enriquecidas con 0.3303 g·L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; BM, medio Bayfolan; Ww, aguas residuales sin tratar; PEM, agua del grifo con 23.5% de aguas residuales porcinas; PDM, agua del grifo con 39.75% de digestatos de aguas residuales porcinas.



**Figure 2.** Biochemical composition of the biomass (percent yield) of the microalgal consortium and *Scenedesmus sp.* cultured in different media. BCAM, secondary treated wastewater added with  $0.1977 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4\text{HCO}_3$ ; PAM, secondary treated wastewater enriched with  $0.3303 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; BM, Bayfolan medium; Ww, raw wastewater; PEM, tap water with 23.5% of piggery wastewater; PDM, tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate.

**Figura 2.** Composición bioquímica de la biomasa (porcentaje de rendimiento) del consorcio de microalgas y *Scenedesmus sp.* cultivadas en diferentes medios. BCAM, aguas residuales tratadas secundarias suplementadas con  $0.1977 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; PAM, aguas residuales tratadas secundarias enriquecidas con  $0.3303 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; BM, medio Bayfolan; Ww, aguas residuales sin tratar; PEM, agua del grifo con 23.5% de aguas residuales porcinas; PDM, agua del grifo con 39.75% de digestatos de aguas residuales porcinas.

were significantly higher with respect to those obtained with BCAM, PAM, Ww, and PDM (Table 2). The protein productivities obtained with the microalgal consortium and *Scenedesmus sp.* were, respectively,  $32.34 \pm 2.36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and  $36.32 \pm 2.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  in BM and  $37.28 \pm 5.33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  and  $32.68 \pm 5.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  in PEM, and while they were significantly lower in BCAM, PAM, Ww, and PDM, the productivity in PAM was 4 times lower than that obtained in PEM and BM.

The highest productivity of carbohydrates from the microalgal consortium was obtained in BM ( $48.13 \pm 3.38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and that from *Scenedesmus sp.* was obtained in Ww ( $43.95 \pm 3.32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), both significantly higher than those in BCAM, PAM, PEM, and PDM (50% lower than BM) (Table 2). In BM, Ww, and PDM, up to 35% of carbohydrates were obtained in the biomass (Fig. 2).

Regarding the productivities of total pigments, no significant differences were observed between the microalgal consortium and *Scenedesmus sp.* in the BM and PEM. On the other hand, in BCAM, PAM, Ww, and PDM, the production of total pigments was up to 18 times lower than in BM (Table 2).

### Nutrient removal

In BCAM, PAM, and Ww,  $\text{NH}_4^+$  removal was 60% and 95% on the third and sixth day, respectively, whereas in PEM and PDM, 100% of  $\text{NH}_4^+$  had already been removed by day three. In BCAM,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , and  $\text{PO}_4^{3-}$  removals were higher than 92%. The initial concentration of  $\text{PO}_4^{3-}$  was  $12\text{--}14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  with a removal percentage of 92%, whereas in BM, 93% removal was achieved (Table 4). In

(Tabla 2). En AR, MBCA, MPA, MEP y MDP se eliminó el 90%–100% del  $\text{NH}_4^+$  desde el día 3 y, en consecuencia, hubo una limitación de N.

Los perfiles de ácidos grasos para el consorcio de microalgas y *Scenedesmus sp.* en los diferentes medios consistieron en ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoleico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3) (Tabla 3), que son aptos para la producción de biodiesel (Anand et al. 2018, May-Cua et al. 2019). Los medios de cultivo MPA, MEP y MDP exhibieron una mayor proporción de ácidos grasos saturados (60%–69% del total de EMAG) que MBCA, MB y AR (39%–48% del total de EMAG).

### Efecto del medio sobre la productividad de proteínas, carbohidratos y pigmentos totales

Las productividades de proteínas obtenidas en los cultivos del consorcio de microalgas y *Scenedesmus sp.* con MB y MEP fueron significativamente mayores con respecto a aquellas obtenidas con MBCA, MPA, AR y MDP (Tabla 2). Las productividades proteicas obtenidas con el consorcio de microalgas y *Scenedesmus sp.* fueron, respectivamente,  $32.34 \pm 2.36 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  y  $36.32 \pm 2.10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  en MB y  $37.28 \pm 5.33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  y  $32.68 \pm 5.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  en MEP, y mientras que en MBCA, MPA, AR y MDP fueron significativamente menores, la productividad en MPA fue 4 veces menor que la obtenida en MEP y MB.

La mayor productividad de carbohidratos del consorcio de microalgas se obtuvo en MB ( $48.13 \pm 3.38 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) y la de *Scenedesmus sp.* se obtuvo en AR ( $43.95 \pm 3.32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ), ambas significativamente más altas que las encontradas en

BCAM,  $\text{NO}_3^-$  removal was 99%, whereas in PAM it was only 59% with the microalgal consortium and null with *Scenedesmus* sp. In BM,  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{PO}_4^{3-}$  removals were 90% and 93%–94% with the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp., respectively, whereas the removal of  $\text{NO}_3^-$  with *Scenedesmus* sp. was 30% lower than that obtained with the consortium (Table 4). Regarding COD, in PEM, 1,043  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of COD were removed with *Scenedesmus* sp. (86%), whereas in PDM only 26  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of COD (10%) were removed.

### $\text{NH}_4^+$ losses by stripping

The highest loss of  $\text{NH}_4^+$  by volatilization (as  $\text{NH}_3$ ) was recorded in PDM, that is, 33% ( $8.70 \pm 1.78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} \text{ NH}_4^+$ ) for the consortium and 46% ( $11.53 \pm 0.32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} \text{ NH}_4^+$ ) for *Scenedesmus* sp. at pH of 9.93 and 10.03, respectively, with no significant difference between them. In PEM the loss was significantly lower than in PDM, with 2% ( $2.24 \pm 0.58 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} \text{ NH}_4^+$ ) for the consortium and 7% ( $0.56 \pm 0.42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1} \text{ NH}_4^+$ ) for *Scenedesmus* sp. at an average pH of 9.68.

## DISCUSSION

Biomass production in Ww was 15.33% lower with the microalgal consortium compared with that obtained with *Scenedesmus* sp., whereas in PEM, biomass production with *Scenedesmus* sp. was 40% lower than that obtained with the microalgal consortium. Lam et al. (2017) cultured *C. vulgaris* in non-sterilized wastewater (2.70 and 24.19  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of total N and P, respectively), obtaining 40.76  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (dry weight) of biomass; this productivity was 3 times lower than that obtained in Ww in the present study (initial concentration of 32.20 and 8.84  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of total N and P, respectively). Unlike in the other 5 media, in BM, which was formulated with the commercial fertilizer Bayfolan, the main source of N was  $\text{NO}_3^-$ ; moreover, P contents varied significantly between media (Table 4). Since the main goal of the present work was to identify a nonconventional medium that could be used at large scale, the C/P and COD/N/P ratios were not adjusted. However, particular care was given to N concentrations during the preparation of the media. The results obtained from the experimentation with all the media showed that the 2 best options to produce biomass were Ww and PEM, both of which involve residue treatment and are available at low cost.

Nayak et al. (2016) reported the growth of *Scenedesmus* sp. in a 500-mL Erlenmeyer flask with 200 mL of medium, prepared with 1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of a NPK fertilizer (10:26:26) and 0.10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of urea, obtaining a biomass productivity of 45  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (peso seco). A 2-fold biomass production and 2.8 times higher productivity were obtained in the present study with *Scenedesmus* sp. and the consortium in BM. The Bayfolan fertilizer (N:P:K, 11:1:1) is a foliar fertilizer that contains micronutrients, vitamins, and indoleacetic acid

MBCA, MPA, MEP y MDP (50% más bajas que en MB) (Tabla 2). En MB, AR y MDP se obtuvo hasta un 35% de carbohidratos en la biomasa (Fig. 2).

Con respecto a las productividades de los pigmentos totales, no hubo diferencias significativas entre el consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp. en MB y MEP. Por otro lado, en MBCA, MPA, AR y MDP, la producción de pigmentos totales fue hasta 18 veces menor que en MB (Tabla 2).

### Eliminación de nutrientes

En MBCA, MPA y AR, la remoción de  $\text{NH}_4^+$  fue del 60% y 95% al tercer y sexto día, respectivamente, mientras que en MEP y MDP, al tercer día, ya se había eliminado el 100% de  $\text{NH}_4^+$ . En MBCA, las remociones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  fueron superiores al 92%. La concentración inicial de  $\text{PO}_4^{3-}$  fue de 12–14  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , con un porcentaje de remoción del 92%, mientras que en BM se logró una remoción del 93% (Tabla 4). En MBCA, la remoción de  $\text{NO}_3^-$  fue del 99%, mientras que en MPA fue solo del 59% con el consorcio de microalgas y nulo con *Scenedesmus* sp. En MB, la remoción de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{PO}_4^{3-}$  fue del 90% y 93%–94% con el consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp., respectivamente, mientras que la remoción de  $\text{NO}_3^-$  con *Scenedesmus* sp. fue 30% menor que la obtenida con el consorcio (Tabla 4). En cuanto a la DQO, en MEP, se eliminaron 1,043  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de DQO con *Scenedesmus* sp. (86%), mientras que en MDP solo se eliminaron 26  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de DQO (10%).

### Pérdidas de $\text{NH}_4^+$ por stripping

La mayor pérdida de  $\text{NH}_4^+$  por volatilización (como  $\text{NH}_3$ ) se registró en MDP, es decir, 33% ( $8.70 \pm 1.78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ ) para el consorcio y 46% ( $11.53 \pm 0.32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ ) para *Scenedesmus* sp., a pH de 9.93 y 10.03, respectivamente; no hubo diferencia significativa entre estos dos. En MEP la pérdida fue significativamente menor que en MDP, con 2% ( $2.24 \pm 0.58 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ ) para el consorcio y 7% ( $0.56 \pm 0.42 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$ ) para *Scenedesmus* sp. a un pH promedio de 9.68.

## DISCUSIÓN

La producción de biomasa con el consorcio de microalgas en AR fue 15.33% menor con el consorcio de microalgas en comparación con la obtenida con *Scenedesmus* sp., mientras que en MEP, la producción de biomasa con *Scenedesmus* sp. fue 40% menor que la obtenida con el consorcio de microalgas. Lam et al. (2017) cultivaron *C. vulgaris* en aguas residuales no esterilizadas (2.70 y 24.19  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de N total y P, respectivamente) y obtuvieron 40.76  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$  (peso seco) de biomasa; esta productividad fue 3 veces menor que la obtenida en AR en el presente estudio (concentración inicial de 32.20 y 8.84  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de N total y P, respectivamente). A diferencia de los otros 5 medios, en MB, que fue formulado



**Table 2.** Effect of culture media on metabolite productivity of *Scenedesmus* sp. and the microalgal consortium. Data are presented as mean values and standard errors; the same letter denotes no significant differences (Tukey HDS-test,  $P \leq 0.05$ ).  
**Tabla 2.** Efecto de los medios de cultivo sobre la productividad de metabolitos de *Scenedesmus* sp. y del consorcio de microalgas. Los datos se presentan como la media y el error estándar; las misma letra indica que no hay diferencia significativa (prueba HDS de Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Microorganism	Medium	Biomass ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Carbohydrates ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Proteins ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Lipids ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )	Pigments ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )
Microalgal consortium	BCAM	54.61 ± 0.77 <sup>c</sup>	12.13 ± 0.40 <sup>b</sup>	10.16 ± 0.05 <sup>b</sup>	8.31 ± 0.71 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.01 <sup>c</sup>
	PAM	45.38 ± 0.56 <sup>c</sup>	6.91 ± 0.14 <sup>b</sup>	11.86 ± 1.07 <sup>b</sup>	7.54 ± 2.94 <sup>b</sup>	0.32 ± 0.03 <sup>c</sup>
	BM	138.46 ± 3.85 <sup>a</sup>	48.13 ± 3.38 <sup>a</sup>	32.34 ± 2.36 <sup>a</sup>	12.01 ± 1.87 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.09 <sup>b</sup>
	Ww	106.15 ± 2.31 <sup>b</sup>	33.56 ± 2.26 <sup>c</sup>	14.78 ± 0.74 <sup>b</sup>	24.87 ± 6.20 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.08 <sup>c</sup>
	PEM	191.25 ± 6.25 <sup>a</sup>	43.63 ± 1.43 <sup>c</sup>	37.28 ± 5.33 <sup>a</sup>	36.75 ± 9.90 <sup>a</sup>	4.12 ± 0.08 <sup>a</sup>
	PDM	102.50 ± 2.50 <sup>c</sup>	35.53 ± 0.25 <sup>b</sup>	16.62 ± 1.52 <sup>b</sup>	32.83 ± 10.88 <sup>a</sup>	1.81 ± 0.12 <sup>b</sup>
<i>Scenedesmus</i> sp.	BCAM	65.38 ± 0.77 <sup>c</sup>	14.46 ± 0.47 <sup>a</sup>	10.55 ± 0.03 <sup>b</sup>	10.46 ± 2.40 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.05 <sup>c</sup>
	PAM	30.00 ± 0.28 <sup>c</sup>	1.65 ± 0.99 <sup>c</sup>	8.41 ± 2.33 <sup>b</sup>	6.87 ± 0.62 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>d</sup>
	BM	136.15 ± 7.69 <sup>a</sup>	31.96 ± 6.01 <sup>b</sup>	36.32 ± 2.10 <sup>a</sup>	17.54 ± 5.51 <sup>b</sup>	3.12 ± 0.15 <sup>a</sup>
	Ww	125.38 ± 5.38 <sup>b</sup>	43.95 ± 3.32 <sup>a</sup>	15.74 ± 1.22 <sup>b</sup>	26.41 ± 5.20 <sup>a</sup>	1.08 ± 0.01 <sup>b</sup>
	PEM	115.00 ± 6.25 <sup>b</sup>	29.53 ± 2.08 <sup>b</sup>	32.68 ± 5.18 <sup>a</sup>	34.25 ± 3.93 <sup>a</sup>	1.84 ± 0.16 <sup>b</sup>
	PDM	118.75 ± 7.50 <sup>b</sup>	16.38 ± 1.02 <sup>b</sup>	13.62 ± 4.17 <sup>b</sup>	38.67 ± 1.53 <sup>a</sup>	0.63 ± 0.13 <sup>c</sup>

BCAM, treated wastewater added with 0.1977  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ; PAM, treated wastewater enriched with 0.3303  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; BM, Bayfolan medium formulated with 1 mL of Bayfolan Forte per liter of treated wastewater; Ww, raw wastewater; PEM, tap water with 23.5% of piggery wastewater; PDM, tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate.

**Table 3.** Composition of fatty acid profiles of the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. in different culture media (percentage of total fatty acid methyl esters).  
**Table 3.** Composición de los perfiles de ácidos grasos del consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo (porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos).

Fatty Acid	Microalgal consortium (%)										<i>Scenedesmus</i> sp. (%)									
	BCAM	PAM	BM	Ww	PEM	PDM	BCAM	PAM	BM	Ww	PEM	PDM	BCAM	PAM	BM	Ww	PEM	PDM		
C16:0	36.76 <sup>a</sup>	42.26 <sup>a</sup>	33.39 <sup>a</sup>	32.30 <sup>a</sup>	43.57 <sup>a</sup>	44.23 <sup>a</sup>	32.12 <sup>AB</sup>	41.07 <sup>AB</sup>	34.03 <sup>B</sup>	32.70 <sup>AB</sup>	47.76 <sup>A</sup>	46.00 <sup>AB</sup>	3.97 <sup>B</sup>	7.28 <sup>A</sup>	4.55 <sup>B</sup>	3.00 <sup>B</sup>	3.13 <sup>B</sup>	4.46 <sup>B</sup>		
C16:1	7.25 <sup>a</sup>	5.34 <sup>ab</sup>	5.62 <sup>ab</sup>	3.27 <sup>ab</sup>	4.34 <sup>ab</sup>	4.19 <sup>ab</sup>	9.31 <sup>BC</sup>	22.07 <sup>A</sup>	7.05 <sup>C</sup>	7.12 <sup>C</sup>	21.33 <sup>A</sup>	19.16 <sup>AB</sup>	17.90 <sup>ab</sup>	18.93 <sup>ab</sup>	6.50 <sup>c</sup>	3.78 <sup>c</sup>	5.09 <sup>D</sup>	5.47 <sup>D</sup>		
C18:0	11.60 <sup>b</sup>	19.95 <sup>a</sup>	6.65 <sup>b</sup>	7.15 <sup>b</sup>	18.93 <sup>ab</sup>	17.90 <sup>ab</sup>	17.63 <sup>B</sup>	17.65 <sup>BC</sup>	11.84 <sup>CD</sup>	35.04 <sup>A</sup>	5.09 <sup>D</sup>	5.47 <sup>D</sup>	20.40 <sup>b</sup>	8.94 <sup>bc</sup>	14.32 <sup>bc</sup>	34.77 <sup>a</sup>	6.50 <sup>c</sup>	3.78 <sup>c</sup>		
C18:1	20.40 <sup>b</sup>	8.94 <sup>bc</sup>	14.32 <sup>bc</sup>	34.77 <sup>a</sup>	6.50 <sup>c</sup>	6.58 <sup>c</sup>	8.64 <sup>A</sup>	7.16 <sup>AB</sup>	11.29 <sup>A</sup>	5.80 <sup>AB</sup>	3.18 <sup>B</sup>	3.54 <sup>B</sup>	9.12 <sup>ab</sup>	7.49 <sup>ab</sup>	12.01 <sup>a</sup>	6.17 <sup>abc</sup>	4.07 <sup>bc</sup>	3.78 <sup>c</sup>		
C18:2	9.12 <sup>ab</sup>	7.49 <sup>ab</sup>	12.01 <sup>a</sup>	6.17 <sup>abc</sup>	4.07 <sup>bc</sup>	3.78 <sup>c</sup>	28.33 <sup>A</sup>	10.76 <sup>B</sup>	31.23 <sup>A</sup>	16.33 <sup>AB</sup>	19.52 <sup>AB</sup>	21.37 <sup>AB</sup>	14.87 <sup>a</sup>	16.02 <sup>a</sup>	28.02 <sup>a</sup>	16.35 <sup>a</sup>	22.59 <sup>a</sup>	23.3 <sup>a</sup>		
C18:3n3	14.87 <sup>a</sup>	16.02 <sup>a</sup>	28.02 <sup>a</sup>	16.35 <sup>a</sup>	22.59 <sup>a</sup>	23.3 <sup>a</sup>	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
C16-C18	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
Unsaturated	51.64 <sup>a</sup>	37.79 <sup>a</sup>	59.96 <sup>a</sup>	60.55 <sup>a</sup>	37.50 <sup>a</sup>	37.87 <sup>a</sup>	58.57 <sup>A</sup>	36.86 <sup>A</sup>	58.92 <sup>A</sup>	60.18 <sup>A</sup>	30.91 <sup>A</sup>	34.84 <sup>A</sup>	48.36 <sup>c</sup>	62.21 <sup>a</sup>	40.04 <sup>a</sup>	39.45 <sup>a</sup>	62.50 <sup>a</sup>	62.13 <sup>a</sup>		
Saturated	48.36 <sup>c</sup>	62.21 <sup>a</sup>	40.04 <sup>a</sup>	39.45 <sup>a</sup>	62.50 <sup>a</sup>	62.13 <sup>a</sup>	41.43 <sup>AB</sup>	63.14 <sup>AB</sup>	41.08 <sup>B</sup>	39.82 <sup>B</sup>	69.09 <sup>A</sup>	65.16 <sup>AB</sup>	100	100	100	100	100	100		

BCAM, treated wastewater added with 0.1977 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; PAM, treated wastewater enriched with 0.3303 g·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; BM, Bayfolan medium formulated with 1 mL of Bayfolan Forte per liter of treated wastewater; Ww, raw wastewater; PEM, tap water with 23.5% of piggery wastewater; PDM, tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate. Mean values that do not share a letter are significantly different. The differences are between the media for each crop (consortium and *Scenedesmus* sp., separately).

**Table 4.** Initial and final composition and removal efficiency in the 6 culture media with the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp.  
**Tabla 4.** Composición inicial y final, y eficiencia de eliminación en los 6 medios de cultivo con el consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp.

Microorganism consortium	Media	Initial concentration (mg·L <sup>-1</sup> )						Final concentration (mg·L <sup>-1</sup> )						Removal (%)					
		NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	COD	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	COD	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	COD	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	COD		
Microalga consortium	BCAM	56.37 ± 0.81	23.69 ± 1.22	3.98 ± 0.49	-	1.74 ± 0.01	0.05 ± 0.07	0.30 ± 0.04	-	99.90	99.78	30.18	-	99.90	99.78	30.18	-		
	PAM	57.00 ± 0.87	20.24 ± 0.39	53.06 ± 0.13	-	1.67 ± 0.04	8.36 ± 7.89	21.21 ± 3.98	-	97.07	58.70	60.02	-	97.07	58.70	60.02	-		
	BM	20.66 ± 1.42	79.58 ± 5.01	40.70 ± 2.24	-	4.18 ± 0.11	31.30 ± 22.11	2.89 ± 0.73	-	79.76	60.66	92.90	-	79.76	60.66	92.90	-		
	Ww	40.90 ± 1.44	0.00 ± 0.00	5.97 ± 0.10	-	1.73 ± 0.05	0.34 ± 0.30	0.64 ± 0.05	-	95.80	*	89.29	-	95.80	*	89.29	-		
	PEM	90.61 ± 9.63	2.51 ± 1.04	14.05 ± 1.36	1,165.18 ± 73.20	0.00	5.27 ± 0.33	2.95 ± 0.71	169.12 ± 0.60	100	*	78.98	85,49	100	*	78.98	85,49		
	PDM	78.10 ± 8.44	2.78 ± 1.06	1.55 ± 0.09	79.47 ± 33.78	0.00	5.80 ± 1.25	0.57 ± 0.13	58.47 ± 15.27	100	*	63.11	26,43	100	*	63.11	26,43		
<i>Scenedesmus</i> sp.	BCAM	56.50 ± 0.36	23.80 ± 1.92	4.73 ± 0.04	-	1.84 ± 0.03	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.04	-	96.86	98.39	92.27	-	96.86	98.39	92.27	-		
	PAM	56.30 ± 0.91	21.95 ± 4.90	50.13 ± 0.53	-	2.75 ± 0.63	24.72 ± 2.71	13.58 ± 4.43	-	95.11	*	54.70	-	95.11	*	54.70	-		
	BM	21.03 ± 0.61	78.67 ± 2.58	40.06 ± 0.61	-	3.81 ± 0.29	53.93 ± 18.49	2.52 ± 0.81	-	89.97	31.38	93.70	-	89.97	31.38	93.70	-		
	Ww	41.54 ± 0.44	0.00	5.71 ± 0.42	-	1.77 ± 0.11	0.84 ± 0.87	0.62 ± 0.07	-	95.80	*	89.15	-	95.80	*	89.15	-		
	PEM	88.08 ± 15.32	2.89 ± 3.02	17.05 ± 0.50	1,218.93 ± 196.99	0.00	4.26 ± 0.53	1.84 ± 0.37	176.19 ± 25.91	100	*	89.23	85,55	100	*	89.23	85,55		
	PDM	77.66 ± 5.02	2.80 ± 0.36	1.31 ± 0.06	104.25 ± 19.99	0.00	4.51 ± 0.10	0.40 ± 0.10	77.65 ± 18.06	100	*	69.04	9,64	100	*	69.04	9,64		

COD, chemical oxygen demand; BCAM, treated wastewater added with 0.1977 g·L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>; PAM, treated wastewater enriched with 0.3303 g·L<sup>-1</sup> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; BM, Bayfolan medium formulated with 1 mL of Bayfolan Forte per liter of treated wastewater; Ww, raw wastewater; PEM, tap water with 23.5% of piggery wastewater; PDM, tap water with 39.75% of piggery wastewater digestate.

\*The results show a slight increase in nitrates.

(phytohormone). This auxin regulates growth in higher plants, and in several species of microalgae, it increases growth rate, stress tolerance, lipid content, and biomass productivity (Lu and Xu 2015). *Muriellopsis* sp. and *Pseudokirchneriella subcapitata* grown in 300-mL bubble-column glass bioreactors containing freshwater with 40%–50% concentrate from a wastewater treatment plant, under controlled conditions (temperature of 25 °C, aeration of 0.2 vvm, CO<sub>2</sub> injected on demand, artificial illumination under a 12:12 h light:dark cycle, 1,850 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), reached biomass productivity values up to 1.13 and 1.02 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectively (Morales-Amaral et al. 2015). Moreover, Gomez et al. (2013) cultured *Muriellopsis* sp. in the same bubble-column, using TWw as medium and controlled conditions (temperature of 23 ± 2 °C, 8.0 ± 0.1 pH, on-demand CO<sub>2</sub> injection into the airflow entering the reactors, and artificial illumination 12:12 h light:dark cycle, 800 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), and the maximum biomass productivity they obtained was 0.5 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. In the 2 latter reports, productivities were much higher than those obtained in the present study.

*Chlorella vulgaris* tolerates high NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentrations. However, when NH<sub>4</sub><sup>+</sup> exceeds 110–130 mg·L<sup>-1</sup>, cell growth inhibition occurs (Sanz-Luque et al. 2015). The inhibition of microalgal growth caused by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> becomes severe when the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> content reaches 1,030.36 mg·L<sup>-1</sup> (Park et al. 2010). In the present study, the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration in the medium was below 90.61 mg·L<sup>-1</sup> (Table 4).

Lipid concentrations in cells increase when the source of nitrogen is limited (Eroglu et al. 2015, May Cua et al. 2019). N is a critical factor for regulating algal cell lipid content; lipid accumulation increases when nitrogen becomes the growth limiting factor (Chen et al. 2011). However, N limitation minimizes algal growth; the 2 conditions of high lipid content and high algal productivity are mutually exclusive.

Nam et al. (2017) cultivated *C. vulgaris* in residual water of pig excreta with a total N concentration of 307.2 mg·L<sup>-1</sup> for 16 d, obtaining a biomass and lipid concentration of 3.96 and 1.072 g·L<sup>-1</sup>, respectively. In the present work, the production of biomass and lipids was approximately 61% and 72% lower in PEM, respectively, with total N concentration being ~5 times lower (Fig. 1). In the case of Ww, the concentration of biomass and lipids was of 58% and 68% lower, respectively, and the total N concentration was 9 times lower. Regarding BM, the production of biomass and lipids was 54% and 85% lower, respectively, having the same total N concentration as PEM.

The loss of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> can be caused by several factors, such as assimilation by microalgae, denitrification processes by bacteria, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> stripping at high pH levels in the medium. In the case of P, the removal is due to assimilation by microalgae and precipitation in the form of calcium phosphate at pH levels close to 9 (Walker 2015). In this study, the initial pH of Ww and BM was 8.5 and it increased during the growth of the consortium and *Scenedesmus* sp., reaching a value of 11.5.

con el fertilizante comercial Bayfolan, la principal fuente de N fue el NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; además, el contenido de P varió significativamente entre los medios (Tabla 4). Dado que el objetivo principal del presente trabajo era identificar un medio no convencional que pudiera utilizarse a gran escala, no se ajustaron las relaciones C/P y DQO/N/P. Sin embargo, se prestó especial atención a la concentración de N durante la preparación de los medios. Los resultados obtenidos de la experimentación con todos los medios mostraron que las 2 mejores opciones para producir biomasa fueron AR y MEP, que involucran el tratamiento de residuos y están disponibles a bajo costo.

Nayak et al. (2016) reportaron el crecimiento de *Scenedesmus* sp. en matraz Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL de medio, preparado con 1 g·L<sup>-1</sup> de fertilizante NPK (10:26:26) y 0.10 g·L<sup>-1</sup> de urea, y la productividad de biomasa fue de 45 mg·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (peso seco). En el presente estudio se obtuvo una producción de biomasa 2.0 veces mayor y una productividad 2.8 veces mayor con *Scenedesmus* sp. y el consorcio en medio MB. El fertilizante Bayfolan (N:P:K, 11:1:1) es un fertilizante foliar que contiene micronutrientes, vitaminas y ácido indolacético (fitohormona). Esta auxina regula el crecimiento en plantas superiores y aumenta la tasa de crecimiento, la tolerancia al estrés, el contenido de lípidos y la productividad de la biomasa en varias especies de microalgas (Lu y Xu 2015). *Muriellopsis* sp. y *Pseudokirchneriella subcapitata* cultivadas en agua dulce con 40%–50% de un concentrado de una planta de tratamiento de aguas residuales en biorreactores de vidrio de columna de burbujas de 300 mL, bajo condiciones controladas (temperatura de 25 °C, aireación de 0.2 vvm, inyección de CO<sub>2</sub> a demanda, iluminación artificial bajo ciclo de 12:12 h luz:oscuridad, 1,850 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), alcanzaron valores de productividad de biomasa de hasta 1.13 y 1.02 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, respectivamente (Morales-Amaral et al. 2015). Además, Gomez et al. (2013) cultivaron *Muriellopsis* sp. en la misma columna de burbujeo utilizando como medio ART, bajo condiciones controladas (temperatura de 23 ± 2 °C, pH de 8.0 ± 0.1, inyección de CO<sub>2</sub> en el flujo de aire que ingresa a los reactores a demanda, iluminación artificial bajo ciclo de 12:12 h luz:oscuridad, 800 μE·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>), y la productividad máxima de biomasa que obtuvieron fue de 0.5 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. En estos 2 últimos informes, las productividades fueron muy superiores a las obtenidas en el presente trabajo.

*Chlorella vulgaris* tolera altas concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Sin embargo, por encima de 110–130 mg·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> hay una inhibición del crecimiento celular (Sanz-Luque et al. 2015). La inhibición del crecimiento de microalgas causada por NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se vuelve severa cuando el contenido de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> alcanza 1,030.36 mg·L<sup>-1</sup> (Park et al. 2010). En el presente trabajo, la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el medio estuvo por debajo de 90.61 mg·L<sup>-1</sup> (Tabla 4).

La concentración de lípidos en las células aumenta cuando existe una limitación de la fuente de N (Eroglu et al. 2015, May-Cua et al. 2019). El N es un factor crítico para regular el

The preference for the type of N source varies from one strain of microalgae to another.  $\text{NH}_4^+$  is the most easily assimilated N source, followed by  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NO}_2^-$ .  $\text{NH}_4^+$  is directly assimilated by the cell, whereas  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  are transported to the inner part of the cell and reduced to  $\text{NH}_4^+$  by nitrite and nitrate reductases (Liao et al. 2018). In Ww, PEM, and PDM the concentration of  $\text{NO}_3^-$  was up to twice the initial one (Table 4). The processes of N removal in wastewater and activated sludge, the nitrification of  $\text{NH}_4^+$ , which is oxidized to  $\text{NO}_3^-$ , and the denitrification of  $\text{NO}_3^-$ , which is reduced to  $\text{N}_2$ , have been widely studied (Larsdotter 2006). These processes involve nitrifying and denitrifying bacteria: the former are autotrophic, do not need organic carbon, and consume large amounts of oxygen; the latter are anaerobic heterotrophs or aerobic autotrophs and require a source of carbon. The first step in the nitrification process is the oxidation of  $\text{NH}_4^+$  to  $\text{NO}_2^-$  by bacteria belonging to the genus *Nitrosomonas*. In the second step, the oxidation of  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{NO}_3^-$  occurs by bacteria belonging to the genus *Nitrobacter*. In denitrification, bacteria reduce  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{NO}_2^-$  to  $\text{N}_2$  gas (Jia and Yuan 2016). In mixed cultures of microalgae and bacteria in wastewater, microalgae can produce organic compounds that bacteria can assimilate; on the other hand, some bacteria produce hormones that promote microalgal growth (Liu et al. 2017). Approximately 60% of  $\text{NH}_4^+$  is oxidized by nitrifying bacteria, while microalgae assimilate 40% (Vargas et al. 2016).

High pH levels can promote  $\text{NH}_3$  volatilization (removal of  $\text{NH}_4\text{-N}$ ) and P removal through  $\text{PO}_4^{3-}$  precipitation with ferric iron, calcium, and magnesium (Park et al. 2011). In PDM, a medium in which greater ammonium loss due to volatilization was observed, pH values were more basic than in PEM; in addition, PEM contained a higher quantity of organic matter that could have minimized  $\text{NH}_3$  losses. For example, Wu et al. (2017) reported losses of 5% of  $\text{NH}_4^+$  by stripping during 4 d in wastewater without microalgae (initial concentration of  $30.26 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ ).

The present study demonstrated that the cultivation of the microalgal consortium and *Scenedesmus* sp. with piggery wastewater as the medium is suitable to produce biodiesel given the productivity of biomass and lipids and the high content of saturated fatty acids that were obtained. These productivities were reached due to the nutrient supply attributed to piggery wastewater, which in addition is readily available. Furthermore, cultivation with PEM showed efficient nutrient removal within the first 3 d. As a whole, the results of the present study provide insight on low-cost alternatives to culture microalgae, coupled with valorization of waste as an approach to the eventual production of biodiesel.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Instituto Politécnico Nacional (SIP 20180825 and SIP 20195715-20195732) and

contenido de lípidos de las células de las algas; el aumento de la acumulación de lípidos se produce cuando N se convierte en el factor limitante del crecimiento (Chen et al. 2011). Sin embargo, la limitación de N minimiza el crecimiento de algas; las 2 condiciones de alto contenido de lípidos y alta productividad de algas son mutuamente excluyentes.

Nam et al. (2017) cultivaron *C. vulgaris* en agua residual de excretas porcinas con una concentración de N total de  $307.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  durante 16 d y obtuvieron concentraciones de biomasa y lípidos de  $3.96$  y  $1.072 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectivamente. En el presente trabajo, la producción de biomasa y lípidos fue aproximadamente 61% y 72% menor en MEP, respectivamente, con una concentración de N total ~5 veces menor (Fig. 1). En el caso de AR la concentración de biomasa y lípidos fue de 58% y 68% menor, respectivamente, y la concentración de N total fue 9 veces menor. Con respecto a MB, la producción de biomasa y lípidos fue 54% y 85% menor, respectivamente, con la misma concentración de N total que en MEP.

La pérdida de  $\text{NH}_4^+$  puede deberse a varios factores, como asimilación por microalgas, procesos de desnitrificación por bacterias y *stripping* de  $\text{NH}_4^+$  a pH elevado del medio. En el caso del P, la eliminación se debe a la asimilación por microalgas y la precipitación en forma de fosfato cálcico a pH cercano a 9 (Walker 2015). En este estudio, el pH inicial de AR y MB fue de 8.5 y aumentó durante el crecimiento del consorcio y *Scenedesmus* sp. hasta alcanzar un valor de 11.5.

La preferencia por el tipo de fuente de N varía de una cepa de microalgas a otra. El  $\text{NH}_4^+$  es la fuente de N de más fácil asimilación, seguida de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NO}_2^-$ . El  $\text{NH}_4^+$  es asimilado directamente por la célula, mientras que el  $\text{NO}_2^-$  y el  $\text{NO}_3^-$  se transportan al interior de la célula y se reducen a  $\text{NH}_4^+$  mediante la nitrito y nitrate reductasa (Liao et al. 2018). En AR, MEP y MDP, la concentración de  $\text{NO}_3^-$  fue hasta el doble de la inicial (Tabla 4). Los procesos de remoción de N en aguas residuales y lodos activados, la nitrificación de  $\text{NH}_4^+$ , que se oxida a  $\text{NO}_3^-$ , y la desnitrificación de  $\text{NO}_3^-$ , que se reduce a  $\text{N}_2$ , han sido ampliamente estudiados (Larsdotter 2006). Estos procesos involucran bacterias nitrificantes y desnitrificantes: las primeras son autótrofas, no necesitan carbono orgánico y consumen grandes cantidades de oxígeno; las segundas son heterótrofos anaeróbicos o autótrofos aeróbicos y requieren una fuente de carbono. El primer paso en el proceso de nitrificación es la oxidación del  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_2^-$  por bacterias pertenecientes al género *Nitrosomonas*. En el segundo paso, la oxidación de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$  ocurre por bacterias pertenecientes al género *Nitrobacter*. En la desnitrificación, las bacterias reducen el  $\text{NO}_3^-$  o el  $\text{NO}_2^-$  a gas  $\text{N}_2$  (Jia y Yuan 2016). En cultivos mixtos de microalgas y bacterias en aguas residuales, las microalgas pueden producir compuestos orgánicos que las bacterias pueden asimilar; por otro lado, algunas bacterias producen hormonas que promueven el crecimiento de microalgas (Liu et al. 2017). Aproximadamente el 60% del  $\text{NH}_4^+$  es oxidado por bacterias

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico; grant No. 247402).

## REFERENCES

- Acién FG, Fernández JM, Magán JJ, Molina E. 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol Adv.* 30(6):1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
- Anand G, Pandey JK, Rana S. 2018. *Nanotechnology for Energy and Water: Proceedings of the International Conference NEW-2017; 2017; Dehradun (India)*. Cham (Switzerland): Springer International Publishing AG.
- [APHA] American Public Health Association. 1998. *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: APHA. p. 5–16.
- [APHA] American Public Health Association. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington, DC: APHA.
- Boelee NC, Temmink H, Janssen M, Buisman CJN, Wijffels RH. 2011. Nitrogen and phosphorus removal from municipal wastewater effluent using microalgal biofilms. *Water Res.* 45(18):5925–5933. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.08.044>
- Chen M, Tang H, Ma H, Holland TC, Ng KYS, Salley SO. 2011. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour Technol.* 102(2):1649–1655. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.062>
- Chisti Y. 2013. Constraints to commercialization of algal fuels. *J Biotechnol.* 167(3):201–214. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.07.020>
- Dickinson KE, Whitney CG, McGinn PJ. 2013. Nutrient remediation rates in municipal wastewater and their effect on biochemical composition of the microalga *Scenedesmus* sp. *AMDD. Algal Res.* 2(2):127–134. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.01.009>
- DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 28(3):350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- El Shimi HI, Moustafa SS. 2017. Biodiesel production from microalgae grown on domestic wastewater: Feasibility and egyptian case study. *82(3):4238–4244*. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.073>
- Eroglu E, Smith SM, Raston CL. 2015. Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses. In: Moheimani NR, McHenry MP, de Boer K, Bahri PA (eds.), *Biofuel and Biorefinery Technologies 2—Biomass and Biofuels from Microalgae*. Switzerland: Springer International Publishing. p. 19–44.
- Gómez C, Escudero R, Morales MM, Figueroa FL, Fernández-Sevilla JM, Acién FG. 2013. Use of secondary-treated wastewater for the production of *Muriellopsis* sp. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(5):2239–2249. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4634-7>
- Gonçalves AL, Pires JCM, Simões M. 2017. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 24(B):403–415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
- Hernández-García A, Velásquez-Orta SB, Novelo E, Yáñez-Noguez I, Monje-Ramírez I, Orta-Ledesma MT. 2019. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production. *Ecotox Environ Safe.* 174:435–444. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.052>
- nitrificantes, mientras que las microalgas asimilan el 40% (Vargas et al. 2016).
- El pH elevado puede promover la volatilización del NH<sub>3</sub> (la eliminación de NH<sub>4</sub>-N) y la eliminación del P a través de la precipitación de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> con hierro férrico, calcio y magnesio no quelados (Park et al. 2011). En MDP, medio en el cual se observó una mayor pérdida de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por volatilización, los valores de pH fueron más básicos que en MEP; además, MEP contenía una mayor cantidad de materia orgánica que pudo haber minimizado las pérdidas de NH<sub>3</sub>. Por ejemplo, Wu et al. (2017) reportaron pérdidas del 5% de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por stripping durante 4 d en aguas residuales sin microalgas, a una concentración inicial de 30.26 mg·L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.
- El presente estudio demostró que el cultivo del consorcio de microalgas y *Scenedesmus* sp. en medio con aguas residuales porcinas es apto para producir biodiesel debido a la productividad de biomasa y lípidos y al alto contenido de ácidos grasos saturados que se obtuvieron. Estas productividades se alcanzaron gracias al aporte de nutrientes atribuido a las aguas residuales porcinas, que además están fácilmente disponibles. Además, el cultivo con MEP presentó una remoción eficiente de nutrientes dentro de los primeros 3 d. Considerando los resultados en conjunto, el presente trabajo proporciona información sobre alternativas de cultivo de microalgas en medios de bajo costo, acoplada a la valorización de residuos como un enfoque para la eventual producción de biodiesel.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el Instituto Politécnico Nacional (SIP 20180825 y SIP 20195715-20195732) y por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (México, subvención No. 247402).

- Hillier J, Hawes C, Squire G, Hilton A, Wale S, Smith P. 2009. The carbon footprints of food crop production. *Int J Agr Sustain.* 7(2):107–118. <https://doi.org/10.3763/ijas.2009.0419>
- Ho S-H, Chen Y-D, Qu W-Y, Liu F-Y, Wang Y. 2019. Algal culture and biofuel production using wastewater. In: Pandey A, Chang JD, Chisti Y (eds.), *Biofuels from Algae*. 2nd ed. Amsterdam (Netherlands): Elsevier B.V. 603 p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64192-2.00008-1>
- Hu B, Zhou W, Min M, Du Z, Chen P, Ma X, Liu Y, Lei H, Shi J, Ruan R. 2013. Development of an effective acidogenically digested swine manure-based algal system for improved wastewater treatment and biofuel and feed production. *Appl Ener.* 107:255–263. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.02.033>
- Huy M, Kumar G, Kim H-W, Kim S-H. 2018. Photoautotrophic cultivation of mixed microalgae consortia using various organic waste streams towards remediation and resource recovery. *Bioresour Technol.* 247:576–581. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.108>

- Ji M-K, Abou-Shanab RAI, Hwang J-H, Timmes TC. 2013. Removal of nitrogen and phosphorus from piggery wastewater effluent using the green microalga *Scenedesmus obliquus*. J Environ Eng. 139(9):1198–1205. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)ee.1943-7870.0000726](https://doi.org/10.1061/(asce)ee.1943-7870.0000726)
- Jia H, Yuan Q. 2016. Removal of nitrogen from wastewater using microalgae and microalgae–bacteria consortia. Cogent Environmental Science. 2(1):1275089. <https://doi.org/10.1080/23311843.2016.1275089>
- Keeney DR, Nelson DW. 1982. Nitrogen-Inorganic Forms. In: Page AL (ed.), Methods of Soil Analysis, Agronomy Monograph 9, Part 2: Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Madison (WI): American Society of Agronomy. 643–698.
- Lam MK, Yusoff MI, Uemura Y, Lim JW, Khoo CG, Lee KT, Ong HC. 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* using nutrients source from domestic wastewater for biodiesel production: Growth condition and kinetic studies. Renew Energ. 103:197–207. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.11.032>
- Larsdotter K. 2006. Wastewater treatment with microalgae—A literature review. Vatten. 62:31–38.
- Liao Q, Chang J-S, Herrmann C, Xia A. 2018. Bioreactors for microbial biomass and energy conversion. Singapore: Springer Nature. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-7677-0>
- Liu J, Wu Y, Wu C, Muylaert K, Vyverman W, Yu H-Q, Muñoz R, Rittmann B. 2017. Advanced nutrient removal from surface water by a consortium of attached microalgae and bacteria: A review. Bioresource Technol. 241:1127–1137. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.054>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1):265–275.
- Liu Y, Xu J. 2015. Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? Trends Plant Sci. 20(5):273–282. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2015.01.006>
- Luo L, He H, Yang C, Wen S, Zeng G, Wu M, Zhou Z, Lou W. 2016. Nutrient removal and lipid production by *Coelastrum* sp. in anaerobically and aerobically treated swine wastewater. Bioresource Technol. 216:135–141. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.059>
- May-Cua ER, Toledano-Thompson T, Alzate-Gaviria LM, Barahona-Perez LF. 2019. A cylindrical-conical photobioreactor and a sludge drying bed as an efficient system for cultivation of the green microalgae *Coelastrum* sp. and dry biomass recovery. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 18(1):1–11. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/may>
- Metz B, Meyer L, Bosch P. 2007. Climate Change 2007: Mitigation of Climate Change. New York (NY): Cambridge University Press.
- Morales-Amaral MM, Gómez-Serrano C, Ación FG, Fernández-Sevilla JM, Molina-Grima E. 2015. Production of microalgae using centrate from anaerobic digestion as the nutrient source. Algal Res. 9:297–305. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2015.03.018>
- Nam K, Lee H, Hoe S-W, Chang YK, Han JI. 2017. Cultivation of *Chlorella vulgaris* with swine wastewater and potential for algal biodiesel production. J Appl Phycol. 29(3):1171–1178. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0987-0>
- Nayak M, Thirunavoukkarasu M, Mohanty RC. 2016. Cultivation of freshwater microalga *Scenedesmus* sp. using a low-cost inorganic fertilizer for enhanced biomass and lipid yield. J Gen Appl Microbiol. 62(1):7–13. <https://doi.org/10.2323/jgam.62.7>
- Park J, Jin H-F, Lim B-R, Park K-Y, Lee K. 2010. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. Bioresource Technol. 101(22):8649–8657. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.142>
- Park JBK, Craggs RJ, Shilton AN. 2011. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. Bioresource Technol. 102(1):35–42. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.158>
- Ramírez-López C, Chairez I, Fernández-Linares L. 2016. A novel culture medium designed for the simultaneous enhancement of biomass and lipid production by *Chlorella vulgaris* UTEX 26. Bioresour Technol. 212:207–216. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.051>
- Ritchie RJ. 2006. Consistent sets of spectrophotometric chlorophyll equations for acetone, methanol and ethanol solvents. Photosynth Res. 89(1):27–41.
- Rodríguez-Mata AE, Flores-Colunga G, Rangel-Peraza JG, Lizardi-Jiménez MA, Amabilis-Sosa LE. 2019. Estimation of states in photosynthetic systems via chained observers: Design for a tertiary wastewater treatment by using *Spirulina maxima* on photobioreactor. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 18(1):273–87. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/rodriguez>
- Sanz-Luque E, Chamizo-Ampudia A, Llamas A, Galvan A, Fernandez E. 2015. Understanding nitrate assimilation and its regulation in microalgae. Front Plant Sci. 6:899. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00899>
- Vargas G, Donoso-Bravo A, Vergara C, Ruiz-Filippi G. 2016. Assessment of microalgae and nitrifiers activity in a consortium in a continuous operation and the effect of oxygen depletion. Electron J Biotechnol. 23:63–68. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.08.002>
- Walker HW. 2015. Harmful Algae Blooms in Drinking Water: Removal of Cyanobacterial Cells and Toxins. Boca Raton (FL): CRC Press.
- Wang M, Yang Y, Chen Z, Chen Y, Wen Y, Chen B. 2016a. Removal of nutrients from undiluted anaerobically treated piggery wastewater by improved microalgae. Bioresource Technol. 222:130–38. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.128>
- Wang Y, Ho S-H, Cheng C-L, Guo W-Q, Nagarajan D, Ren N-Q, Lee D-J, Chang J-S. 2016b. Perspectives on the feasibility of using microalgae for industrial wastewater treatment. Bioresource Technol. 222:485–497. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.106>
- Wu K-C, Yau Y-H, Ho K-C. 2017. Capability of microalgae for local saline sewage treatment towards biodiesel production. IOP Conf Series. Earth Env Sci. 82:012008. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/82/1/012008>
- Xu J, Zhao Y, Zhao G, Zhang H. 2015. Nutrient removal and biogas upgrading by integrating freshwater algae cultivation with piggery anaerobic digestate liquid treatment. Appl Microbiol Biotechnol. 99(15):6493–6501. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6537-x>

Received 13 April 2020,  
accepted 25 September 2020.