

Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil

Using the microalgae *Chlorella* sp. live suspended in decoloration wastewater from a textile factory

Víctor A. Vacca Jimeno¹, Edgardo R. Angulo Mercado², Diana M. Puentes Ballesteros³, José G. Torres Yépez⁴, Martín E. Plaza Vega⁵

¹Mg. Ingeniería Ambiental, Universidad del Atlántico, Grupo de Investigación en Biotecnología de Microalgas, Físicoquímica Aplicada y Estudios Ambientales, Barranquilla, Colombia.

²M.Sc. Universidad del Atlántico, Grupo de Investigación en Biotecnología de Microalgas, Físicoquímica Aplicada y Estudios Ambientales, Barranquilla, Colombia.

³Químico, Hada International, Barranquilla, Colombia.

⁴Químico, ACI Proyectos, Barranquilla, Colombia.

⁵Ingeniero de Materiales, Universidad Autónoma del Caribe, Grupo Interdisciplinario e Interinstitucional de Ingeniería Mecánica con Énfasis en la Preservación del Medio Ambiente, Barranquilla, Colombia

Email: vaccavictor@mail.uniatlantico.edu.co.

Recibido 08/09/2016
Aceptado 10/11/2016

Cite this article as: V. Vacca, E. Angulo, D. Puentes, J. Torres, M. Plaza "Using the microalgae *Chlorella* sp. live suspended in decoloration wastewater from a textile factory", *Prospect*, Vol 15, N° 1, 93-99, 2017.

RESUMEN

Esta investigación evaluó la capacidad de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión para remover el color del efluente de una empresa textil en el departamento del Atlántico (Colombia). La metodología empleada consistió inicialmente en cultivar la microalga en un biorreactor de 2,5 L de capacidad efectiva, empleando un fertilizante comercial como medio de cultivo bajo aireación continua a la temperatura del laboratorio, con fotoperiodos de luz/oscuridad de 12 horas. Luego el agua residual se sometió a tratamiento usando diferentes concentraciones de microalga equivalentes a 0,10, 0,20 y 0,30 en absorbancia con sus respectivos controles. Los resultados muestran que el bioensayo de 0,30 en absorbancia removió el 97,2% del colorante presente y disminuyó en un 94,6% la DQO y 95,4% la DBO₅, entre otros parámetros de caracterización antes y después del tratamiento, mostrando la mejor bioremovición en este estudio. Estos resultados permiten sugerir que el tratamiento biológico con la microalga *Chlorella* sp. del agua residual es un método eficiente.

Palabras clave: Microalga *Chlorella* sp.; Colorante; Biodegradación; Absorbancia; Bioensayo.

ABSTRACT

This research evaluated the ability of the life suspended microalgae *Chlorella* sp. to remove the color from the effluent of a textile company in the department of Atlantic (Colombia). The microalgae was cultured in a bioreactor of 2,5 L of effective capacity, using a commercial fertilizer as growth medium under continued aeration at laboratory temperature, in light/dark photoperiods of 12 hours each. Then the wastewater was treated using different concentrations of microalgae equivalent to 0,10, 0,20 and 0,30 absorbance units, with their respective controls. The results show that at the absorbance 0,30 bio-test, it was removed 97,2% of the dye originally present, COD decreased by 94,6% and BOD₅ by 95,4%. These results suggest that the biological treatment with microalgae *Chlorella* sp. in wastewater is an efficient method.

Key words: Microalgae *Chlorella* sp.; Dye; Biodegradation; Absorbance; Bio-test.

1. INTRODUCCIÓN

Los problemas ambientales creados por la industria textil han recibido mayor atención en las últimas décadas porque es una de las industrias que más genera efluentes contaminados [1]. Las aguas residuales resultantes de estos procesos tienen impactos negativos en términos del carbono orgánico total (COT), la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), sólidos en suspensión, salinidad, color, una amplia gama de pH (5-12) y la persistencia de compuestos orgánicos, tales como los colorantes azoicos [2, 3, 4, 5].

Hasta la fecha se conocen más de 100.000 tipos de colorantes con una producción anual mayor a los 7×10^5 ton.año⁻¹ [6]. El consumo total de colorante en la industria textil en todo el mundo es aproximadamente de 10.000 ton.año⁻¹, los datos exactos sobre la cantidad de colorantes descargados a los cuerpos de agua se desconocen, pero se estima que pueden ser alrededor de 100 ton.año⁻¹ [7]. En la coloración de fibras celulósicas los tintes tina (índigo) y tintes sulfurosos representan una gran parte del mercado mundial (alrededor del 31%); el índigo ocupa un 7%, representando cerca de las 120.000 ton de tintes tina usadas anualmente. En el año 2002, se produjeron 17.000 toneladas de índigo sintético [8].

Las principales preocupaciones de los efectos adversos de los colorantes azoicos en el medio ambiente, incluyen su acción inhibitoria de la fotosíntesis acuática, la capacidad de agotar el oxígeno disuelto y la toxicidad para la flora, la fauna y los seres humanos [9]. Estos compuestos aromáticos complejos con diversidad estructural se han mejorado para proporcionar un alto grado de estabilidad química, estabilidad biológica, fotocatalítica y resistencia al paso del tiempo, la exposición a la luz solar, los microorganismos, agua y jabón, de manera que sean cada vez más resistentes a la degradación [2, 10].

Los tratamientos biológicos han sido reconocidos como métodos efectivos para la decoloración y degradación de colorantes en aguas residuales industriales altamente contaminadas, adicionalmente se consideran muy efectivos y amigables con el medio ambiente, de baja producción de lodos y competitivos en cuanto a los costos requeridos [11]. Actualmente son utilizados sistemas aerobios y anaerobios, con hongos, bacterias y microalgas para la decoloración de aguas residuales. Durante estos tratamientos biológicos, los contaminantes pueden ser metabolizados por los microorganismos por reacciones bioquímicas redox, aunque también se pueden establecer reacciones de hidroxilación, hidrólisis, deshalogenación y desalquilación [12].

Las microalgas son ampliamente utilizadas en el tratamiento de diversos tipos de efluentes (doméstico, agrícola, industrial, etc.) ya que estos desechos son un

medio adecuado que favorece la proliferación rápida, gracias a su tolerancia a elevadas concentraciones de nutrientes (N y P), y materia orgánica. Las microalgas también son empleadas para la eliminación de sustancias tóxicas, como pesticidas, herbicidas, metales pesados, etc., debido a su resistencia y capacidad de acumular importantes concentraciones de compuestos tóxicos, sin afectar su actividad biológica.

A nivel industrial se han patentado diversos procesos biotecnológicos para el tratamiento de efluentes industriales, procedentes de textileras, o bien utilizados para la recuperación de metales preciosos (oro y plata), mediante el empleo de los sistemas enzimáticos de las microalgas [13].

En este estudio se evaluó la capacidad de la microalga *Chlorella sp.*, en la eliminación del colorante índigo presente en el agua residual de una industria textil.

2. EXPERIMENTACIÓN

2.1 Obtención de biomasa y condiciones de cultivo

La microalga utilizada en este estudio fue suministrada por el Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos de la Universidad del Zulia, Maracaibo (Venezuela). Se cultivó en recipientes de vidrio de 3,0 L con un volumen efectivo de 2,5 L, empleando agua potable previamente esterilizada y, como medio de cultivo el fertilizante comercial "Nutrifoliar", el cual suministra los macronutrientes K, Mg, S, P, Cl y los micronutrientes Fe, Cu, Zn, Mn, B y Mo, necesarios para un normal crecimiento celular. Los bioreactores se mantuvieron bajo iluminación superficial mediante tubos fluorescentes de 125 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Philips TL 65W 25, luz blanca) sometidos a un ciclo de 12h luz/12h oscuridad y con aireación permanente con el objeto de proporcionarles suficiente oxígeno disuelto. El crecimiento de la microalga se evaluó midiendo la absorbancia de la clorofila a una longitud de onda (λ) igual a 647 nm. La temperatura promedio de los bioensayos fue de 25°C.

Diariamente se tomó una alícuota del cultivo y se realizó la medición del crecimiento con un espectrofotómetro UV-vis (Genesis 20 Thermo Spectronic), en donde se midió la absorbancia que es proporcional a la concentración de las microalgas en el cultivo.

2.2 Muestra del agua residual

La muestra de agua residual fue colectada en un punto localizado antes del vertimiento final de una empresa textil ubicada en el municipio de Juan de Acosta, departamento del Atlántico, dedicada al teñido de prendas de vestir tipo jean. Se tomó una muestra representativa y se guardó en un envase plástico para la realización de los bioensayos y las respectivas caracterizaciones sin ningún tipo de tratamiento

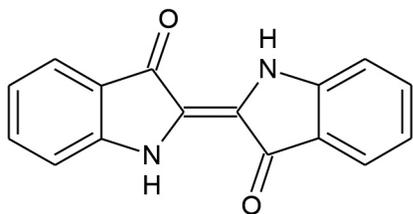
preliminar. La muestra de agua residual, se caracterizó antes y después del tratamiento con microalga *Chlorella* sp., determinando los parámetros DBO_5 , DQO, nitrógeno total, fosfatos y concentración del colorante.

2.3 Colorante

El colorante precursor del utilizado en esta investigación es el color índigo (CI Vat Blue I) o índigo tina, con fórmula química $C_{12}H_{10}O_2N_2$, (figura 1), que es un polvo cristalino azul oscuro. La estructura del color producido es un sistema conjugado o grupo H-cromóforas que consiste de un enlace doble entre carbonos sustituidos por dos donadores NH y dos aceptores CO. Su principal aplicación es en la industria de los blue jeans y otros productos del Denim azul [8]. El colorante índigo fue suministrado por la empresa textil cuyo nombre se mantendrá en reserva.

Figura 1. Estructura química del colorante índigo.

Figure 1. Chemical structure of indigo dye.



2.4 Curva de calibración del colorante

Para la elaboración de la curva de calibración, se preparó por duplicado soluciones del colorante a diferentes concentraciones (1, 10 y 100 mg.dm⁻³), a cada una de ellas se le midió la absorbancia a la longitud de onda (λ) de máxima absorción, previamente determinada por un barrido completo en el espectrofotómetro UV-vis.

2.5 Bioensayos de decoloración del agua residual con la microalga *Chlorella* sp.

Para los bioensayos de crecimiento biológico de la microalga viva y en suspensión se trabajó con el cultivo "stock" adaptado de la *Chlorella* sp. Bajo el sistema de estudio en "batch" se colocaron en diferentes frascos de vidrio previamente esterilizados 250 cm³ de agua residual y biomasa algal a 0,10, 0,20 y 0,30 de absorbancia medidos a una λ igual a 647 nm, en presencia de nutrientes a la temperatura del laboratorio de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, con agitación constante a través de bombas de aire y fotoperiodos de luz día/noche de 12 h. Simultáneamente se realizó un control de crecimiento con un cultivo de *Chlorella* sp. en un medio estéril a los mismos valores de absorbancia de los bioensayos. El seguimiento de la evolución del proceso de bioremediación consistió en tomar alícuotas de los biorreactores, luego se centrifugaron a 3.000 rpm por 10 segundos. Al líquido sobrenadante se le midió su absorbancia por espectrofotometría y se calculó el

porcentaje de colorante removido, reemplazando los valores correspondientes en la ecuación 1 [14, 15].

$$\text{Porcentaje de decoloración}(\%) = \frac{A_o - A_e}{A_o} * 100 \quad (1)$$

Donde A_o es la absorbancia inicial del medio y A_e es la absorbancia del medio decolorizado.

Todos los bioensayos se realizaron por triplicado y se trabajaron a las mismas condiciones de laboratorio.

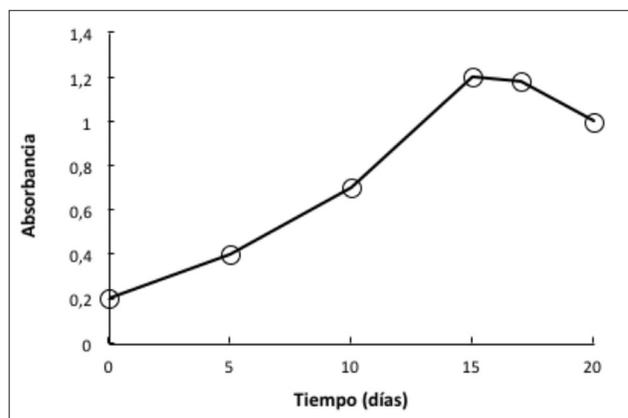
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. se muestra en la figura 2. Teniendo en cuenta las fases de una curva típica de crecimiento no se observa la fase de latencia, esto es posible porque la microalga que se tomó para el estudio se encontraba en fase de crecimiento exponencial y al colocarse en un medio de cultivo similar en presencia de nutrientes como el nitrógeno y el carbono que influyen en la composición bioquímica, permitió que su adaptación fuera más fácil. Posteriormente entre los días 13, 14 y 15 se presenta la fase estacionaria, alcanzando su máximo crecimiento el día 15. En esta fase se muestra un desarrollo pausado atribuido al agotamiento de nutrientes por el aumento de la población algal. Finalmente el crecimiento disminuye apreciablemente entre los días 17 y 18, lo cual se conoce como la fase de muerte.

Figura 2. Curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp.

Figure 2. Growth curve of the microalgae *Chlorella* sp.

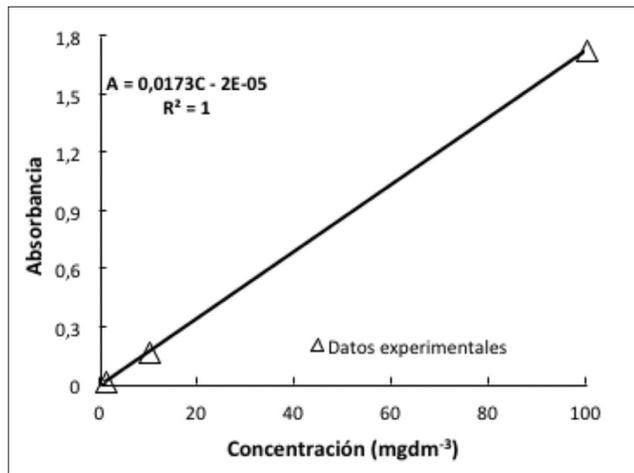


3.2 Curva de calibración del colorante

A una solución patrón del colorante se le realizó un barrido entre 400 y 700 nm alcanzando su máxima absorción a los 493 nm, tomándose este valor para medir la absorbancia del colorante en los bioensayos posteriores. La figura 3 muestra el ajuste de los datos experimentales a una línea recta. El factor de correlación (R^2) de 1, muestra la relación directa entre la concentración del colorante y su absorbancia.

Figura 3. Curva de calibración del colorante.

Figure 3. Colorant calibration curve.



3.3 Análisis del crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* en el agua residual coloreada

La figura 4 muestra las diferentes curvas de crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* a diferentes absorbancias iniciales y sus respectivos controles. Al comparar las curvas de crecimiento se observa una notoria inhibición de la *Chlorella sp.* en el agua residual debido a los niveles de toxicidad y contaminación a los cuales se ven sometidas. Mientras los bioensayos de 0,1, 0,2 y 0,3 de absorbancia inicial llegan a alcanzar valores de 0,84, 1,16 y 1,54 de absorbancia máxima respectivamente, para los mismos días las lecturas de los controles fueron de 1,73, 2,03 y 2,37. Estos resultados muestran la importancia del efecto de la luz en la productividad del cultivo.

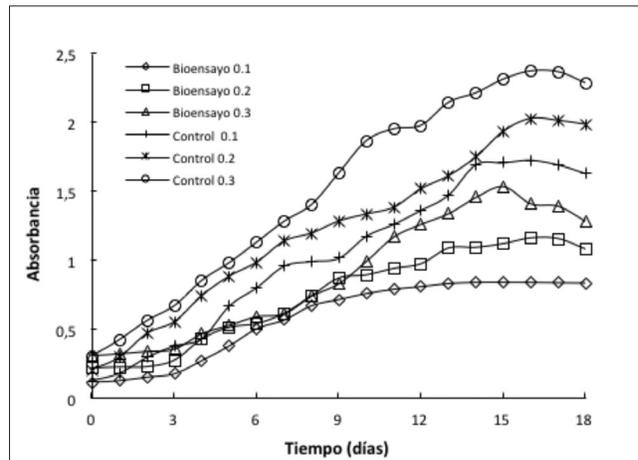
Los colorantes disueltos en el agua actúan como compuestos xenobióticos que interfieren en el metabolismo de la microalga, reduciendo notablemente la penetración de la luz al medio y en consecuencia, se disminuye la actividad fotosintética y la velocidad de crecimiento [16]. Además, se ha reportado que esta inhibición puede ser causada por la interacción de los colorantes con las paredes de la célula de la *Chlorella sp.* interfiriendo en su actividad enzimática y celular [17].

3.4 Remoción del color en el agua residual por la microalga *Chlorella sp.*

La figura 5 muestra los resultados de los bioensayos para remover el color del agua residual, comparando la variación de la concentración del colorante en el tiempo. De la figura se observa que en los primeros días de los bioensayos la microalga en su fase de latencia elimina gran parte del color, es así como al tercer día se había removido el 19,5, 35,6 y 48,3% de la concentración inicial de colorante (87 mgdm⁻³), para las absorbancias de 0,1, 0,2 y 0,3 respectivamente. A partir del día 18 no se registraron modificaciones en la concentración de colorante alcanzando valores finales de 8,67, 5,14

Figura 4. Curvas de crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* en el agua residual y sus respectivos controles.

Figure 4. Growth curves of the microalgae *Chlorella sp.* in wastewater and their respective controls.

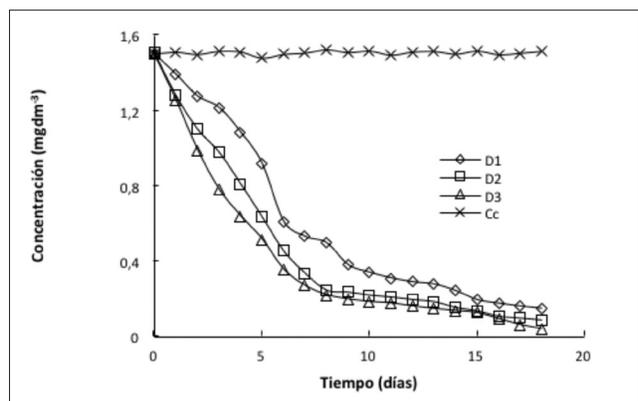


y 2,4 mgdm⁻³, para cada una de las absorbancias estudiadas. El bioensayo con absorbancia inicial de 0,3 logró remover el mayor porcentaje de colorante del agua residual correspondiente al 97,2%. Sin embargo, las absorbancias de 0,1 y 0,2 lograron remover el 90,0 y 93,1% del colorante respectivamente.

A pesar que la presencia del colorante inhibe el crecimiento normal de la microalga, se observa en los bioreactores la disminución paulatina del color.

Figura 5. Variación de la concentración del colorante en el agua residual en presencia de la microalga *Chlorella sp.* D1, D2 y D3 representan los bioensayos a 0,1, 0,2 y 0,3 de absorbancia inicial y, Cc es el bioensayo de control.

Figure 5. Variation of the dye concentration in the waste water in the presence of the microalgae *Chlorella sp.* D1, D2 and D3 represent bio-test at 0.1, 0.2 and 0.3 of initial absorbance and Cc is the control bio-test.



Se sugiere que la degradación del colorante índigo se debe al proceso oxidativo realizado por la enzima lacasa

[18]. La oxidación implica la transferencia de electrones hasta obtener isatina que luego por descarboxilación produce el ácido antranílico como producto estable final de la oxidación (figura 6). La degradación procede por vía deshidroíndigo como una reacción intermedia donde la función de la lacasa consiste en incrementar la susceptibilidad del colorante hacia el ataque hidrolítico del agua [8, 18]. Posteriormente es posible realizar la mineralización del colorante a CO₂ y H₂O por medio de la degradación del anillo benzénico obteniendo intermediarios como benceno dihidrodio, catecol,

hasta obtener acetaldehído y piruvato entrando al ciclo de Krebs [19].

Por otro lado, es posible que en los últimos días de la fase de declinamiento en la microalga *Chlorella* sp. se establecieran procesos de remoción mediante la adsorción y absorción de los colorantes por la pared celular. La figura 5 en su curva de control muestra que el colorante no sufre proceso de fotodegradación al mantenerse constante la absorbancia durante los días que duró el experimento.

Figura 6. Posible mecanismo de degradación del colorante índigo por la enzima lacasa. Tomado y adaptado de la referencia [18].

Figure 6. Possible mechanism of degradation of indigo dye by laccase enzyme. Taken and adapted from reference [18].

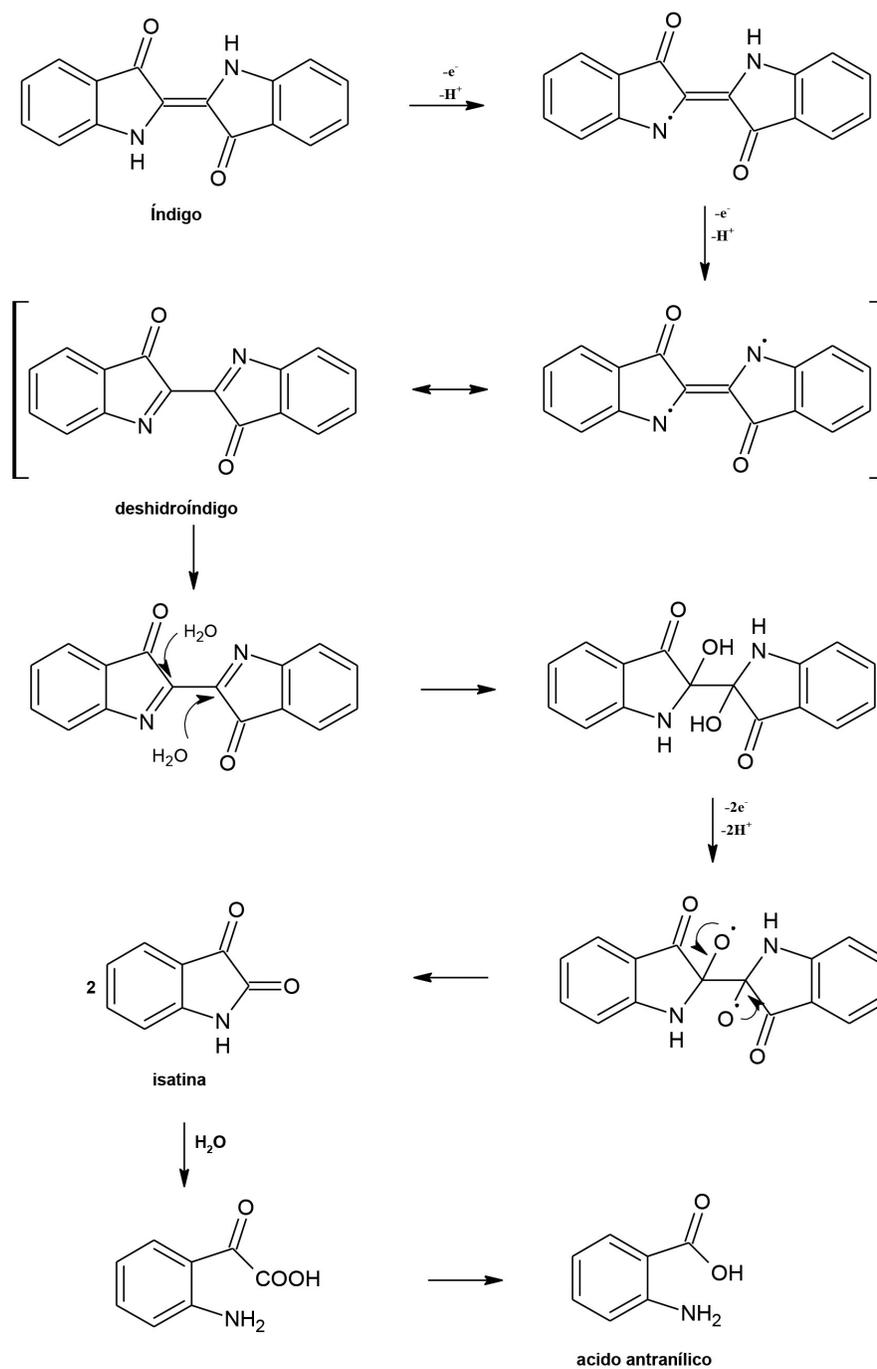


Tabla 1. Análisis fisicoquímico del agua residual antes y después del tratamiento con *Chlorella sp.*

Table 1. Physicochemical analysis of wastewater before and after treatment with *Chlorella sp.*

Parámetro	Unidad	Valor inicial	Absorbancia 0,1		Absorbancia 0,2		Absorbancia 0,3	
			Valor final	% Remoción	Valor final	% Remoción	Valor final	% Remoción
DBO ₅	mg O ₂ dm ⁻³	425	62,8	85,2	37,6	91,1	19,6	95,4
DQO	mg O ₂ dm ⁻³	864	103,7	88,0	74,7	91,3	46,6	94,6
NKT	mgdm ⁻³	0,94	0,017	98,2	0,011	98,8	0,003	99,8
Fosfatos	mgdm ⁻³	74,0	25,4	65,6	20,4	72,4	16,0	78,3

3.5 Evaluación de los parámetros DBO, DQO₅, nitrógeno total y fosfatos

En la tabla 1, se resumen los datos obtenidos en la evaluación de algunos parámetros fisicoquímicos del agua residual de la empresa textil. Los resultados muestran una disminución de los parámetros analizados a todas las absorbancias estudiadas, pero el comportamiento indica que entre mayor es la concentración de *Chlorella sp.* en el medio, mayor es el porcentaje de remoción.

Los tratamientos biológicos son reconocidos para el tratamiento de efluentes por su capacidad de reducir DBO y DQO [20, 21], muestra de esto son los buenos resultados obtenidos en este estudio, alcanzado valores del 95,4% y 94,6% para la DBO₅ y DQO respectivamente para los experimentos con absorbancia 0,3. En el agua residual se encuentran presentes nutrientes que bien pueden estar en forma sencilla como CO₂, nitratos, etc., o como estructuras más complejas como los colorantes, que al ser degradados forman compuestos simples que suministran carbono y nitrógeno fundamentales para el crecimiento de la microalga, esto indica que la misma carga orgánica y mineral presente en el agua residual se convierte en fuente de alimento para las microalgas.

Los porcentajes de remoción de nitrógeno y fosfatos por la microalga en el agua residual fueron significativos, alcanzando valores superiores al 98% para el nitrógeno y del 65% para los fosfatos, teniendo en cuenta que normalmente para la remoción de estos nutrientes es preciso aplicar tratamientos terciarios. Esto se debe a que son nutrientes esenciales en la formación de biomasa [22], por lo que incorporan el amonio, nitrato y fósforo por absorción directa [23].

4. CONCLUSIONES

Esta investigación permitió evaluar el uso de la microalga *Chlorella sp.* en la eliminación del color del agua residual de una industria textil. Del análisis de los resultados se formulan las siguientes conclusiones:

- Debido a las limitaciones del medio, el crecimiento de la microalga *Chlorella sp.* en el agua residual sufrió una inhibición en comparación con los controles.
- El tratamiento del agua residual con distintas concentraciones equivalentes de microalga: 0,1, 0,2 y 0,3 de absorbancia, logró eliminar el 90,0, 93,1 y 97,2% del colorante presente respectivamente.
- La evaluación de los parámetros fisicoquímicos como el DBO, DQO₅, NKT y fosfatos, realizados antes y después del tratamiento biológico, mostraron una reducción significativa.

REFERENCIAS

- [1] T. Robinson, G. McMullan, R. Marchant, P. Nigam, "Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative", *Bioresource Technology*, 77(3), 247–255, 2001.
- [2] I.I. Savin, R. Butnaru, "Wastewater characteristics in textile finishing mills", *Environmental Engineering and Management Journal*, 7(6), 859–864, 2008.
- [3] J.C. Akan, F.I. Abdulrahman, J.T. Ayodele, V.O. Ogugbuaja, "Impact of tannery and textile effluent on the chemical characteristics of Challawa River, Kano State Nigeria", *Australian Journal of Basic Applied Sciences*, 3(3), 1933–1947, 2009.
- [4] T. Kuberan, J. Anburaj, C. Sundaravadivelan, P. Kumar, "Biodegradation of azo dye by *Listeria sp.*", *International Journal Environmental Science*, 1(7), 1760–1770, 2011.
- [5] R. Faryal, A. Hameed, "Isolation and characterization of various fungal strains from textile effluent for their use in bioremediation", *Pakistan Journal Botany*, 37(4), 1003–1008, 2005.
- [6] T.K. Sen, S. Afroze, H. Ang, "Equilibrium, kinetics and mechanism of removal of methylene blue from aqueous solution by adsorption onto pine cone biomass

- of *Pinus radiata*", *Water Air & Soil Pollution*, 218(1), 499–515, 2011.
- [7] M.T. Yagub, T.K. Sen, H. Ang, "Equilibrium, kinetics, and thermodynamics of methylene blue adsorption by pine tree leaves", *Water Air & Soil Pollution*, 223(8), 5267–82, 2012.
- [8] L. Quintero, S. Cardona, "Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín", *Dyna*, 77(162), 371-386, 2010.
- [9] M. Solís, A. Solís, H.I. Pérez, N. Manjarrez, M. Flores, "Microbial decolorization of azo dyes: A review", *Process Biochemistry*, 47(12), 1723–1748, 2012.
- [10] M. Yagub, T. Kanti Sen, F. Afroze, H. Ang, "Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review", *Advances Colloid and Interface Science*, 209, 172-184, 2014.
- [11] R. Cohen, Y. Hadar, "The roles of fungi in agricultural waste conversion". En: *Fungi in Bioremediation*, ed. G. M. Gadd; Cambridge University Press, p. 305.
- [12] D. Pant, A. Adholeya, "Biological approaches for treatment of distillery wastewater: a review", *Bioresource Technology*, 98(12), 2321-2334, 2007.
- [13] M. Salazar, "Sistemas integrales de tratamiento de aguas residuales, mediante el uso combinado de digestión anaerobia y microalgas", *Contactos*, 73, 16-22, 2009.
- [14] S. Saroj, K. Kumar, N. Pareek, R. Prasad, R.P. Singh, "Biodegradation of azo dyes Acid Red 183, Direct Blue 15 and Direct Red 75 by the isolate *Penicillium oxalicum* SAR-3", *Chemosphere*, 107, 240–248, 2014.
- [15] H. P. Gajera, R. P. Bambharolia, D. G. Hirpara, S. V. Patel, B. A. Golakiya, "Molecular identification and characterization of novel *Hypocrea koningii* associated with azo dyes decoloration and biodegradation of textile dye effluents", *Process Safety and Environmental Protection*, 98, 406-416, 2015.
- [16] E. Angulo, G. Castellar, E. Morales, M. Barrios, "Remoción de azul de metileno por la microalga *Chlorella* sp. viva", *Prospect*, 10(1), 53-60, 2012.
- [17] D.C. Kalyani, A.A. Telke, R.S. Dhanve, J.P. Jadhav, "Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1", *Journal Hazard Materials*, 163(2-3), 735–742, 2009.
- [18] R. Campos, A. Kandelbauer, K.H. Robra, A. Cavaco-Paulo, G.M. Gu'bitz, "Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*", *Journal of Biotechnology*, 89, 131–139, 2001.
- [19] S.E. Ruiz Balaguera, (2011). Evaluación de la remoción del colorante INDIGO utilizado en empresas dedicadas a la producción de telas tipo DENIM empleando a *pleutorus ostreatus* como modelo biológico. Trabajo de Pregrado. Universidad de la Sabana.
- [20] Y. Li, Y-F Chen, P. Chen, M. Min, W. Zhou, B. Martinez, J. Zhu, R. Ruan, "Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrate municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production", *Bioresource Technology*, 102, 5138-5144, 2011.
- [21] N. Abdel-Raouf, A.A. Al-Homaidan, I.B.M. Ibraheem, "Microalgae and wastewater treatment", *Saudi Journal Biological Sciences*, 19(3), 257-275, 2012.
- [22] G. Markou, D. Georgakakis, "Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro industrial wastes and wastewaters: A review", *Applied Energy*, 88(10), 3389-3401, 2011.
- [23] N.F.Y. Tam, Y.S. Wong, "Effect of ammonia concentrations on growth of *Chlorella vulgaris* and nitrogen removal from media", *Bioresource Technology*, 57(1), 45-50, 1996.