

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano**  
**Departamento de Ambiente y Desarrollo**  
**Ingeniería en Ambiente y Desarrollo**



Proyecto Especial de Graduación  
**Evaluación de la capacidad de remoción de nutrientes a partir de  
cultivos mixtos de microalgas de Zamorano**

Estudiante

Simón Giraldo Trujillo

Asesores

Victoria A. Cortés Matamoros, Dra.

Erika A. Tenorio Moncada, M.Sc.

Honduras, agosto 2022

**Autoridades**

**TANYA MÜLLER GARCÍA**

Rectora

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**ERIKA A. TENORIO MONCADA**

Directora Departamento Ambiente y Desarrollo

**HUGO ZAVALA MEMBREÑO**

Secretario General

### **Agradecimientos**

Agradezco a mis asesoras Dra. Victoria Cortes y M.Sc. Erika Tenorio por su conocimiento para el desarrollo de estudio. Igualmente, a las personas del departamento de Ambiente y Desarrollo como Xiomara Barrientos, la ing. Lourdes Espinal, Víctor Trejo y el equipo del laboratorio de bioenergía por su apoyo durante todo el proceso de investigación.

## Contenido

Agradecimientos .....	3
Índice de Cuadros .....	6
Índice de Figuras .....	7
Índice de Anexos .....	8
Resumen .....	9
Abstract .....	10
Introducción.....	11
Metodología .....	17
Sitio del Estudio .....	17
Identificación de Especies Mayoritarias de Microalgas en Lagunas de Estabilización .....	18
Recolección de Muestras Para Obtención de Cultivos Mixtos de Microalgas .....	18
Identificación de Especies de Microalgas.....	19
Protocolo para el Mantenimiento y Escalamiento de Cultivos Mixtos de Microalgas .....	20
Remoción de Nutrientes en los Cultivos Mixtos .....	22
Recolección de Muestras de Efluentes Agrícolas.....	22
Resultados y Discusión.....	25
Identificación de Especies de Microalgas.....	25
Parámetros Físicoquímicos de las Lagunas .....	25
Especies de Microalgas en las Lagunas de Oxidación.....	27
Implementación de Protocolo de Inoculación y Escalamiento de Cultivos Mixtos .....	32
Conclusiones.....	43
Recomendaciones.....	44

Referencias ..... 45

Anexos ..... 55

## Índice de Cuadros

Cuadro 1 Procedimiento de Análisis de Muestras.....	19
Cuadro 2 Composición del Medio Solución A .....	21
Cuadro 3 Parámetros fisicoquímicos de la laguna de Monte Redondo.....	26
Cuadro 4 Parámetros Fisicoquímicos de la Laguna de Oxidación .....	26
Cuadro 5 Especies de microalgas Identificadas en el Estudio .....	28
Cuadro 6 Selenastrum sp. en la laguna de Monte Redondo. ....	28
Cuadro 7 Oscillatoria sp. en la laguna de Monte Redondo .....	29
Cuadro 8 Micocystis sp. en la laguna de Monte Redondo. ....	29
Cuadro 9 Coelastrum sp. en la laguna de Monte Redondo.....	30
Cuadro 10 Scenedesmus obliquus en la laguna de oxidación 5 .....	30
Cuadro 11 Scenedesmus sp. en la laguna de Oxidación 5.....	31
Cuadro 12 Chlorella sp. en la laguna de Oxidación 5 .....	31
Cuadro 13 Aphanocapsa sp. en la laguna de Oxidación 5.....	32
Cuadro 14 Crecimiento de Microalgas en Sólidos Suspendidos Totales, Laguna de Monte Redondo	34
Cuadro 15 Crecimiento de Microalgas en Sólidos Suspendidos Totales, Laguna de Oxidación .....	35
Cuadro 16 Caracterización del Efluente Agrícola del Invernadero de Tomate.....	37
Cuadro 17 Remoción de Fosfatos con Inóculo de Laguna Monte Redondo .....	39
Cuadro 18 Remoción de Nitratos con Inóculo de Laguna de Monte Redondo .....	39
Cuadro 19 Remoción de Fosfatos con Inóculo de Laguna de Oxidación .....	41
Cuadro 20 Remoción de nitratos con inóculo de laguna de Oxidación .....	41

### Índice de Figuras

Figura 1 Ubicación de Lagunas del Estudio .....	18
Figura 2 Arreglo Experimental, Fase de Tratamiento del Efluente Agrícola .....	23
Figura 3 Crecimiento de microalgas, Laguna de Monte Redondo (mg/L) .....	33
Figura 4. Crecimiento de Microalgas, Laguna de Oxidación (mg/L) .....	34
Figura 5 Crecimiento de Microalgas Durante el Tratamiento .....	38

**Índice de Anexos**

Anexo A Composición del Medio de Cultivo BG-11.....	55
Anexo B Diseño Experimental Fase de Escalamiento .....	56
Anexo C Metodo de Recolección del Lixiviado.....	57

## Resumen

La contaminación proveniente de las prácticas agrícolas afecta los cuerpos de agua generando condiciones de hipoxia y anoxia como resultado de la eutrofización. Las microalgas se asocian con este fenómeno, sin embargo, su metabolismo fotosintético representa un potencial en procesos de biorremediación, incluyendo aplicaciones como la remoción de nutrientes en agua residual. La Escuela Agrícola Panamericana, genera diversidad de efluentes agrícolas como resultado de sus actividades de producción y cuenta con cuerpos de agua con presencia de diferentes especies de microalgas con alto potencial biotecnológico. En este estudio se evaluó la capacidad de cultivos mixtos de microalgas para la remoción de nutrientes presentes en el efluente de un invernadero destinado a la producción de tomate. Se identificaron las especies mayoritarias de estos microorganismos en muestras de agua recolectadas de lagunas utilizadas para tratamiento de efluentes y producción acuícola. Posteriormente, se cuantificó el crecimiento de biomasa utilizando dos medios de cultivo diferentes en fotobiorreactores operados a condiciones controladas. Seguidamente se evaluó la remoción de nitratos y fosfatos presentes en un efluente agrícola luego de combinar con un inóculo obtenido de los reactores que reportaron mejor reproducción. Se obtuvo un crecimiento de biomasa del cultivo mixto de la laguna de oxidación de hasta 36.6 mg/L SST con el medio de cultivo a base de fertilizante y de hasta 17.9 mg/L SST utilizando el inóculo de Monte Redondo y el medio BG-11. Ambos cultivos mixtos reportaron remociones del 36 y 30% para los fosfatos presentes en el efluente residual al utilizar los cultivos de Monte Redondo y laguna de oxidación respectivamente. No se registró una reducción superior a 10% en la concentración de nitratos con ninguno de los dos cultivos mixtos.

*Palabras clave:* Biotecnología, efluente Agrícola, ficorremediación, fosfato, nitrato.

### **Abstract**

Pollution from agricultural practices affects water bodies generating hypoxic and anoxic conditions due to eutrophication. Microalgae are associated with this phenomenon, however, their photosynthetic metabolism represents potential in bioremediation processes, including applications such as nutrient removal in wastewater. The Escuela Agrícola Panamericana generates several agricultural effluents due to its production activities, and it also has water bodies with the presence of different species of microalgae with high biotechnological potential. In this study, the capacity of mixed microalgae cultures for the removal of nutrients present in the effluent of a greenhouse destined for tomato production was evaluated. The majority species of these microorganisms were identified in water samples collected from lagoons used for effluent treatment and aquaculture production. Subsequently, biomass growth was quantified using two different culture media in photobioreactors operated under controlled conditions. The removal of nitrates and phosphates present in an agricultural effluent after combining with an inoculum obtained from the reactors that reported better reproduction was also evaluated. A biomass growth up to 36.6 mg/L TSS was obtained from the mixed culture of the oxidation pond when using the fertilizer-based culture medium and up to 17.9 mg/L TSS using the Monte Redondo inoculum and the BG-11 medium. Both mixed cultures reported removals of 36 and 30% for the phosphates present in the residual effluent when using the Monte Redondo and oxidation pond cultures, respectively. Nitrate reduction was less than 10% with both mixed cultures.

*Keywords:* Agricultural effluent, biotechnology, phycoremediation, phosphate, nitrate.

## Introducción

El deterioro de los cuerpos de agua, como ríos, lagos y océanos, es una problemática creciente desde la década de los 90. La contaminación con fuentes no puntuales genera efectos adversos alrededor de todo el planeta, identificando que el grupo de contaminantes más frecuentes que llega a los cuerpos de agua es la carga de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo (UNESCO, 2018). Un claro ejemplo de los efectos de estos contaminantes, es la zona muerta ubicada en el Golfo de México, donde existe un área de alrededor de 22 mil kilómetros cuadrados, donde las condiciones de anoxia impiden el crecimiento de cualquier ser vivo (BBC News, 2021).

El servicio nacional de océanos de los Estados Unidos (NOAA) define la eutrofización como el enriquecimiento de ecosistemas acuáticos con nutrientes que aumenta la cantidad de algas y plantas en estuarios y zonas costeras. Este fenómeno afecta directamente la cantidad de oxígeno disuelto dentro de los ecosistemas acuáticos debido al exceso de organismos fotosintéticos y su posterior descomposición, creando un desequilibrio en la fauna y flora que habita estos lugares (National Oceanic and Atmospheric Administration [NOAA], 2017).

El fenómeno de hipoxia se define como el alcance de concentraciones de oxígeno disuelto por debajo de los 2 mg/L en un ambiente acuático. Esta condición se crea por razones tanto antropogénicas como naturales, cuando los microorganismos presentes en estos ambientes consumen el oxígeno a una mayor tasa de la que se produce en el medio por dinámicas como la fotosíntesis o el intercambio de este gas con la atmósfera. El consumo excesivo de oxígeno en zonas eutrofizadas se debe a la facilidad de degradación que tiene la materia orgánica proveniente de las microalgas en descomposición y en zonas como las desembocaduras de los ríos o lagos, se ve potenciada por la estratificación térmica (Middelburg y Levin, 2009; Turner et al., 2008). Entre los efectos más directos de esta condición en el ecosistema están la mortalidad directa de peces pelágicos, las alteraciones en las cadenas tróficas y pérdidas significativas en el potencial pesquero de la zona afectada (Aparicio Jiménez, 2013).

El origen de gran parte de los nutrientes que contaminan estos cuerpos de agua son los sistemas agrícolas. Por ejemplo, el 89% del nitrógeno que es depositado en el río Mississippi en los Estados Unidos, es proveniente de la escorrentía agrícola de los estados tradicionalmente productores de maíz como lo son Iowa, Illinois e Indiana (Good y Beatty, 2011). Compuestos como los nitratos contribuyen de manera crítica al desarrollo de zonas anóxicas en los cuerpos de agua. El exceso de este nutriente está directamente relacionado con el fenómeno de la eutrofización en las zonas costeras, a causa de las dinámicas de la producción primaria en estos ecosistemas (Paerl et al., 2002).

Los lagos y reservorios representan al menos el 90% del agua dulce que se encuentra en la superficie del planeta. Según Herschy et al. (2012) alrededor del 41% de los lagos en la región de Sudamérica y 28% en la región de Norte América presentan eutrofización acelerada a causa de las actividades antropogénicas. En este tipo de cuerpos de agua, el nutriente limitante es el fósforo para el crecimiento de las microalgas y que en exceso provee el ambiente idóneo para crecimientos tóxicos de estos organismos

La alternativa más utilizada para la remoción de nutrientes son los reactores biológicos. En estos se utilizan lodos activados proveniente de plantas de tratamiento de aguas residuales como inóculo de microorganismos (del Campo Vega, 2018). Estudios realizados por Carrasquero Ferrer et al. (2015), comprobaron la capacidad de remoción de nitratos en sistemas de este tipo para efluentes de una planta de cárnicos, obteniendo valores de hasta 88% en la remoción de este compuesto. Las bacterias desnitrificantes presentes en el lodo activado convierten a los nitritos y nitratos en nitrógeno gaseoso que pasa a la atmósfera (Moeller y Tomasini., 2004).

Las microalgas son organismos unicelulares fotosintéticos que habitan de forma natural en los cuerpos de agua continentales y oceánicos, demandando nutrientes presentes en el medio para sus procesos de mantenimiento y multiplicación (Ruane et al., 2010). En los últimos años, se ha identificado que el rol que cumplen las algas en los procesos de eutrofización se puede utilizar como alternativa de tratamiento si estas se retiran antes de que mueran y luego se aprovechan como fuente

de biomasa. De esta forma, se extraen los nutrientes del agua y no se consume el oxígeno que sería necesario para descomponer la materia orgánica si quedaran en el sedimento (Abdel-Raouf et al., 2012).

Estos microorganismos fundamentan su dinámica de crecimiento bajo el concepto de la ley del mínimo de "Liebig", es decir, crecen hasta encontrarse con una condición limitante como puede ser la cantidad de un nutriente. En adición, su crecimiento óptimo en la naturaleza se encuentra asociado a condiciones limitadas por la ley de tolerancia de "Shelford", donde pueden soportar determinados rangos de un factor ambiental, por ejemplo, la luz que es entre 400 y 700 nm de longitud de onda (Abalde, DL 1995). Sin embargo, debido a su flexibilidad de adaptación en su estado natural, logran desarrollarse efectivamente en diferentes ecosistemas.

Existe una serie de factores que afectan directamente el crecimiento de las microalgas, especialmente las que se pueden usar en un sistema de ficorremediación (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). La intensidad de luz es el primer parámetro determinante para el cultivo, donde se ha identificado que valores entre 100-200  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{-S}$  son óptimos para el desarrollo de dichos organismos (Morales Amaral, María del Mar, 2016). Por otra parte, una temperatura ambiente entre los 28-35 °C favorece la reproducción apropiada dentro del reactor y un pH entre 6.5-7.5, proporciona a las microalgas las condiciones adecuadas para accionar sobre el efluente de la manera más eficiente (Qiu et al., 2017).

Otros componentes importantes para el crecimiento y desarrollo deseable de los ficorremediadores son los niveles suficientes de  $\text{CO}_2$  y la cantidad de nutrientes que necesitan para el desarrollo de las funciones biológicas, que en el caso de este estudio las proveerá el medio de cultivo en la primera fase y posteriormente el efluente agrícola. Debido a sus buenas capacidades de adaptación, las microalgas logran crecer en grandes rangos de los compuestos que utilizan para reproducirse como el nitrógeno y fósforo. El rango óptimo de fósforo en el medio para el crecimiento

es entre 0.001 g/L a 0.179 g/L (Roopnarain et al., 2014) . Por otro lado, Procházková et al. (2014) reporta que valores mayores de 0.45 mg/L de amonio en el medio, son tóxicos para estos organismos.

Por último, los niveles de oxígeno disuelto en el agua del cultivo deben ser idóneos para el crecimiento de las microalgas, obteniendo mejores resultados dentro del rango de 8 y 25 mg/L (Kazbar et al., 2019). Además de macronutrientes importantes, algunos micronutrientes esenciales para su crecimiento son el hierro y el manganeso (2.5-30 ppm), además de algunas trazas de cobalto, zinc y molibdeno (2.5-4.5 ppm) (Juneja et al., 2013). Estos últimos tres factores se determinan en función de las microalgas y el ambiente en el que vivan y son reconocidos más como posibles limitantes que como inhibidores.

Los reactores abiertos de microalgas son los más utilizados para su aplicación en procesos de remediación. En estos el cultivo de las microalgas está en contacto con la atmósfera y es difícil el control de las condiciones ambientales el óptimo crecimiento de estos (Contreras-Flores et al., 2003). Sin embargo, son una alternativa más accesible, manejable y económica que los fotobiorreactores cerrados donde se requiere altos niveles de inversión y conocimiento técnico para manejar de manera activa las condiciones que tiene el sistema de crecimiento (Narala et al., 2016). Del mismo modo, se han reportado rendimientos muy similares entre las eficiencias de remoción de fosfatos y nitratos de sistemas cerrados y abiertos. Una investigación realizada por García et al. (2018) obtuvo valores de remoción de 84 y 95% para la remoción de fósforo y nitrógeno respectivamente utilizando sistemas de tipo semicerrado operado con un cultivo mixto.

Asimismo, en un estudio realizado por Morales Amaral (2016), se comprobó la eficiencia del uso de reactores abiertos en la remediación de aguas residuales donde obtuvo resultados de remoción entre el 69 y 82% de depuración de DQO en reactores horizontales e inclinados. Además, se reportó la remoción total de nitrógeno y fósforo con valores menores a 2 mg/L de fósforo y de 1 mg/L de nitrógeno en el efluente resultante del reactor que tenían valores iniciales promedio de 16 mg/L y 79 mg/L respectivamente. Además, de su potencial de remediación, las microalgas representan un

recurso importante para la producción de biomasa por su capacidad de duplicarse entre 1 a 10 días y por su composición lipídica de alrededor de 50% que, las convierte en una fuente idónea de materia prima para Biodiesel (Santos-montes et al., 2014).

La mayor parte de fotobiorreactores utilizados en las investigaciones y avances en el rubro de las microalgas se han desarrollado utilizando monocultivos, para analizar las dinámicas de crecimiento y potenciales de remediación, producción de biomasa o biodiesel de una especie específica de microalga. Esta metodología ha presentado diferentes dificultades debido a que las relaciones naturales que existen entre diferentes cepas en un ambiente natural donde las capacidades enzimáticas se potencian debido a la sinergia que existe entre diferentes individuos para lograr sobrevivir, reproducirse y crecer, no se obtienen al cultivar una cepa de manera individual (Pradana et al., 2017).

El uso de cultivos mixtos de microalgas ha demostrado ser una de las maneras más económicas y productivas para las iniciativas de ficorremediación. Este tipo de cultivos evitan problemáticas adicionales, como la posible contaminación con organismos perjudiciales que puedan afectar el crecimiento de estas. Además, han demostrado una gran productividad pues el equilibrio en el que se encontraban inicialmente en la naturaleza, se mantiene al momento de incursionar el inóculo a un reactor para la depuración de un residuo (Fallahi et al., 2020).

En la Escuela Agrícola Panamericana existen diversas unidades productivas que generan efluentes con concentraciones importantes de nutrientes como la unidad de oleicultura intensiva. Igualmente existen diversidad de cuerpos de agua que son posibles fuentes de cultivos mixtos de microalgas con potencial de remoción de nutrientes (Guerrón Navarrete, 2015). El contar con estas herramientas, se pretende contribuir al ODS 12, con enfoque en la producción y consumo responsable, documentando alternativas de biorremediación que pueden ser utilizadas para la producción conjunta de biomasa.

A través de este estudio se recopila evidencia sobre la capacidad de remoción de nutrientes en efluentes agrícolas aplicando cultivos mixtos de microalgas provenientes de lagunas de estabilización de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, planteando los siguientes objetivos: Identificar las especies mayoritarias de microalgas presentes en dos lagunas de la Escuela Agrícola Panamericana; asimismo, adaptar el protocolo de mantenimiento y escalamiento de cepas de microalgas para la reproducción y preparación de un cultivo mixto obtenido a partir de lagunas seleccionadas y comparar el potencial de remoción de nitratos y fosfatos presentes en efluentes agrícolas a partir de cultivos mixtos de microalgas.

## Metodología

### Sitio del Estudio

El estudio se realizó a partir de cultivos mixtos de microalgas recolectados en dos lagunas artificiales utilizadas para fines productivos y tratamiento de efluentes residuales de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, en el municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán, Honduras. Los dos sitios seleccionados tienen una temperatura ambiental promedio anual de 24°C de y una humedad relativa de 70%. Las muestras obtenidas de estos sitios fueron analizadas y procesadas en el laboratorio de microbiología ambiental del Departamento de Ambiente y Desarrollo de Zamorano, en donde paralelamente se desarrollaron los ensayos de reproducción de los cultivos de microalgas.

La laguna de oxidación es la quinta y última unidad de tratamiento de aguas residuales domésticas y forma parte del sistema de lagunas en serie de la Escuela Agrícola Panamericana. Esta se encuentra diseñada para fungir como un sistema de estabilización facultativo, pues cuenta con 1.8 metros de profundidad y un área aproximada de 21.395 m<sup>2</sup> (Carias, 2013). En este sentido, las microalgas proveen el oxígeno necesario a las bacterias facultativas para cumplir su papel de estabilizar la materia orgánica de los efluentes. Por otra parte las bacterias proveen el CO<sub>2</sub> que utilizan las microalgas en sus procesos fotosintéticos (US EPA et al., 2002).

Por otra parte, la laguna de Monte Redondo también ubicada en la Escuela Agrícola Panamericana es utilizada para fines productivos y las prácticas de la unidad de acuicultura, tales como el cultivo de tilapia y los recambios de agua para los estanques artificiales de producción de peces. Las microalgas han sido identificadas como un componente importante en las producciones acuícolas, ya que incluyen la alimentación de algunos estados larvales de las especies en explotación y contribuyen al equilibrio ecosistémico de los estanques. Además, cumplen su función como purificadores de agua ya que logran convertir el exceso de nitrógeno, en proteínas que incorporan en su crecimiento (Catarina y Xavier, 2012). En un estudio realizado por Guerrón Navarrete (2015) se

encontró un gran variedad de especies de organismos fotosintéticos que convierte este sitio en un lugar de interés para la obtención de un inóculo mixto de microalgas.

## Figura 1

### *Ubicación de Lagunas del Estudio*



## Identificación de Especies Mayoritarias de Microalgas en Lagunas de Estabilización

### *Recolección de Muestras Para Obtención de Cultivos Mixtos de Microalgas*

Se recolectó una muestra de cada sitio de estudio en recipientes de 20 litros de color transparente. Se realizaron tres muestreos para cada sitio entre los meses de marzo y abril durante los cuales se experimenta la época seca en la región. Se tomó la fracción superficial de la columna de agua ubicada en los primeros 20 cm y considerando un horario entre las 11:00 a.m. y la 1:00 p.m., en donde se espera contar con la mayor actividad fotosintética debido a la alta irradiancia. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio del Departamento de Ambiente y Desarrollo, y fueron preservadas en una temperatura ambiente y en la luz natural, mientras se realizaba el montaje de los

fotobiorreactores en periodos menores a una hora. Una fracción de 300 mL fue preservada bajo condiciones de refrigeración de 4 °C para su posterior análisis (Cuadro 1).

### Cuadro 1

#### *Procedimiento de Análisis de Muestras*

Parámetro	Metodología
Nitratos (NO <sub>3</sub> -)	Espectrofotometría UV (4-127)
Fosfatos (PO <sub>4</sub> 3-)	Ácido ascórbico (4-164)
Sólidos Suspendidos totales	Sólidos totales suspendidos secos 103-105°C (2-70)
pH	Multiparámetro
Temperatura	Multiparámetro
Sólidos Totales Disueltos	Multiparámetro
Conductividad	Multiparámetro

*Nota.* Metodologías adaptadas de (American Public Health Association, 2012)

### Identificación de Especies de Microalgas

La identificación de las especies predominantes de los cultivos mixtos de cada laguna se realizó para conocer a partir de revisión de literatura sus potenciales biotecnológicos, especialmente de remoción de nutrientes. Al mismo tiempo, en la determinación de requerimientos específicos para la reproducción de estos mediante sus curvas de crecimiento, comprendiendo de manera más completa los comportamientos de los cultivos mixtos en las siguientes fases del experimento.

A partir de las muestras recolectadas en las diferentes lagunas, se tomó una alícuota para la separación de la fracción suspendida, utilizando tubos volumétricos de 50 mL que fueron centrifugados a 10,800 rpm durante 5 minutos para concentrar los sólidos en suspensión de la muestra. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se recolectó una muestra del precipitado con hazas de inoculación, introduciendo la misma en los tubos de centrifugado ya drenados para ubicarla en un portaobjetos utilizando la misma haza con la que se retiró de los tubos que seguidamente se fijó con yodo de Lugol. Luego de un minuto, se retiró el exceso y proporcionó el tiempo de espera para su secado. La muestra procesada se observó utilizando el microscopio con el lente de aumento a 100X, agregando previamente unas gotas de aceite de inmersión (Guerrón Navarrete, 2015). Este procedimiento se repite para los dos sitios de estudio, donde se observaron 5 placas por laguna luego

de 2 diferentes rondas de centrifugación. Se tomaron fotos con la cámara del microscopio para identificar las especies presentes con la ayuda de las guías de clasificación de microalgas.

Los resultados de la identificación fueron representados en una tabla con las especies encontradas en cada laguna y cuadros comparativos que describen individualmente 4 especies por laguna. En estos se incluye su descripción y una imagen de referencia de las guías, adicional a la imagen identificada en el cultivo mixto del estudio. Igualmente se hizo un análisis observacional de las especies más abundantes en cada sitio.

Las características morfológicas de las especies registradas en las imágenes del microscopio fueron comparadas con datos de literatura para su investigación. Algunos de los documentos consultados fueron el Atlas de Organismos planctónicos Presentes en los Humedales Andaluces descrito por Junta de Andalucía (2010), el Atlas de Cianobacteria y Microalgas de Aguas Continentales Brasileñas descrito por Tucci et al. (2019), entre otros. Para la comparación se tomaron en cuenta factores como cantidad de células en el organismo, presencia de flagelos, organización de colonias, forma de las células, entre otros.

### **Protocolo para el Mantenimiento y Escalamiento de Cultivos Mixtos de Microalgas**

A partir de las muestras obtenidas de las lagunas, se prepararon fotobiorreactores en "Erlenmeyer" de 1 L con dos tipos de cultivos recomendados para el crecimiento de las microalgas: el BG-11 de la marca Millipore y la mezcla a base de fertilizantes conocido como solución A (Cuadro 2). Estas soluciones cumplen la función de estimular el crecimiento de la biomasa algal adicionada mediante una cepa conocida o un inóculo determinado.

La puesta en marcha de los fotobiorreactores se realizó mediante la mezcla de un inóculo del cultivo mixto en una relación 10:1 con el medio de cultivo seleccionado, es decir combinando 900 mL de cada medio de cultivo por separado con 100 mL de muestra como inóculo (Elnabris, 2012; Rahman Al-Mayah y Al-Rikabey, 2018). El montaje de los reactores se realizó vertiendo primero los 900 mL de medio en cada "Erlenmeyer" y posteriormente los 1,00 mL del inóculo correspondiente de cada laguna

como se observa en la Figura 1. Se tuvo un arreglo de 4 reactores por repetición, dos con el inóculo de Monte Redondo y los diferentes medios y dos con el inóculo de la laguna de oxidación con los diferentes medios con 3 repeticiones del experimento, teniendo un total de 12 unidades experimentales.

## Cuadro 2

### *Composición del Medio Solución A*

Componente	mg/L
Sulfato de amonio	150
Urea	7.5

*Nota.* adaptado de Elnabris (2012)

El periodo de mantenimiento del cultivo que fue de 10 días, con suministro de luz en fotoperiodos de 12 horas con luces artificiales LED en un arreglo de 9 focos que tienen una potencia lumínica de 800 lm y una potencia de 8 W cada uno. Estos asemejan el espectro lumínico adecuado para el crecimiento de organismos fotosintéticos que es entre 600 y 700 nm (Kommareddy y Anderson). Se mantuvo esta condición a lo largo del ensayo ya que se ha identificado la importancia del periodo oscuro para imitar las condiciones naturales que tienen las microalgas en su hábitat, en adición a la importancia del ciclo día-noche para su ciclo celular. Del mismo modo, se mantuvieron condiciones de temperatura entre 20 y 28 °C. Condiciones como el intercambio de gases no fueron controladas, pero se monitorearon las dinámicas del cultivo diariamente con mediciones de pH y temperatura (Abalde, DL 1995).

Se realizaron muestreos para la medición de biomasa en los días 1, 5 y 10 del periodo de retención. Previo al monitoreo de parámetros, los reactores eran sometidos a un proceso de mezclado mecánico para su homogenización. Al concluir con el periodo de mantenimiento, se recolectaron las algas en su máxima curva de crecimiento para su posterior traspaso al fotobiorreactor en donde se realizará el tratamiento del efluente agrícola. Se determinan 10 días como el periodo óptimo con base a las curvas de crecimiento realizadas por Ortiz-Moreno et al. (2012) y Brito et al. (2013) que demuestran que, con diferentes medios de cultivo, entre los días 10 y 12 se obtiene el mayor

crecimiento de las microalgas en cuanto a células por mililitro. Esta fase del experimento se repitió en 3 ocasiones para obtener robustez en los parámetros cuantificados.

Se realizó un análisis de normalidad Shapiro-Wilk para las variables de sólidos suspendidos totales de la primera fase del experimento. Seguidamente se realizó una prueba de análisis no paramétrico Mann-Whitney con un nivel de significancia del 5 por ciento, para comparar el desempeño en el crecimiento de los tratamientos con los diferentes medios de cultivo en la fase de reproducción, comparando el desempeño en la producción de biomasa a partir de los inóculos tomados en las lagunas y los dos medios de cultivo seleccionados.

### **Remoción de Nutrientes en los Cultivos Mixtos**

Esta investigación se enfoca en la remoción de nitrógeno y el fósforo, directamente en sus formas de nitratos y fosfatos pues son la forma en la que se suministra en los fertilizantes y se encuentra mayormente en el agua residual. Esto se debe al potencial de eutrofización y a los graves impactos que tienen ambos en los cuerpos de agua al promover condiciones de hipoxia y anoxia. Adicionalmente, son los elementos más suplementados en los cultivos de agricultura intensiva y que representan la mayor contaminación a causa de las prácticas agrícolas (Laffoley y Baxter, 2019).

### ***Recolección de Muestras de Efluentes Agrícolas***

Las muestras de los efluentes agrícolas fueron recolectadas en el canal de salida de lixiviados de los invernaderos de agricultura intensiva ubicados en la zona 3 de la Escuela Agrícola Panamericana, donde estaba en producción un cultivo de tomate en la etapa de cosecha. Estas muestras se recolectaron 1 vez a la semana en frascos de 20 litros y posteriormente fueron llevadas al laboratorio del Departamento de Ambiente y Desarrollo y preservadas a 4 °C, para el análisis de nutrientes y parámetros básicos como el pH y la conductividad eléctrica (Cuadro 1). Las muestras fueron tamizadas para remover partículas de gran tamaño de suelo, partes de plantas o insectos que pudiesen alterar las condiciones del reactor.

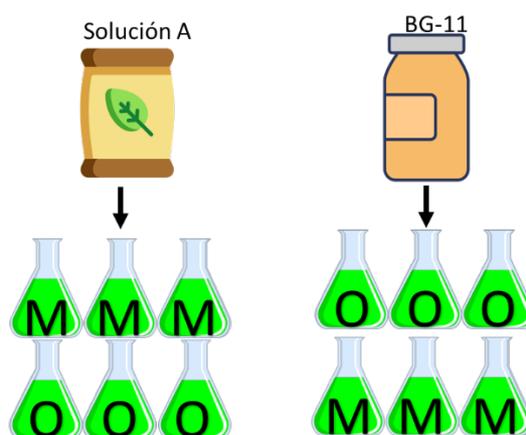
El tratamiento se realizó en reactores tipo “Batch”, donde se incluyó el inóculo de microalgas obtenido en la fase de escalamiento y el efluente agrícola, evaluando el desempeño de los cultivos mixtos conforme al arreglo experimental presentado en la Figura 2. Al igual que en la fase de escalamiento, los reactores tuvieron un tiempo de retención de 10 días. Al día 1, 5 y al terminar este periodo se realizaron análisis para determinar la concentración de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) y fosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), adicional a pruebas de sólidos suspendidos totales. Se realizó una relación 1:10 de inóculo-lixiviado para la preparación del fotobiorreactor hasta obtener un volumen de 3 litros. Previo al monitoreo de parámetros, los reactores fueron sometidos a un proceso de mezclado mecánico para su homogenización. Con los valores finales de nitratos y fosfatos se determinó la remoción en cada uno de los fotobiorreactores aplicando la siguiente Ecuación 1 (Min et al., 2011)

$$\text{Remoción de nutrientes (\%)} = \frac{C_o - C'}{C_o} * 100 \quad [1]$$

Donde  $C_o$  representa la concentración inicial del nutriente (g/L) y  $C'$  la concentración al finalizar el tratamiento (g/L). El arreglo experimental de esta tuvo un arreglo de 3 repeticiones por medio de cultivo para cada cultivo mixto, es decir, 6 unidades experimentales.

**Figura 2**

*Arreglo Experimental, Fase de Tratamiento del Efluente Agrícola*



*Nota.* M: inóculo de Monte Redondo, O: Inóculo de la laguna de Oxidación

En las variables de nitratos, fosfatos y sólidos suspendidos totales de la fase de tratamiento se aplicó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk que determinó que los datos no contaban con una distribución normal. Se prosiguió a realizar análisis de estadística descriptiva con valores como la media, coeficiente de variación y desviación estándar.

## Resultados y Discusión

### Identificación de Especies de Microalgas

Las condiciones ambientales que existen durante las diferentes épocas del año en la ubicación del sitio de estudio pueden alterar la presencia y abundancia de las microalgas en los sitios. En el estudio realizado por Guerrón Navarrete (2015), se concluyó que la temperatura es la variable que más influencia tiene sobre los niveles de clorofila que se encontraban en las muestras de la Laguna de Monte Redondo. Debido a que el experimento se realizó en diferentes meses, este factor pudo ser influyente para las variaciones en resultados de diversidad, pues existen especies más resilientes que otras. Otro aspecto por considerar es la dilución, pues debido a la cantidad de precipitación en algunas temporadas, las cargas de nutrientes y de SST se vieron modificadas en ambas lagunas

### *Parámetros Físicoquímicos de las Lagunas*

Se registraron diferencias entre las características físicoquímicas de ambos sitios de estudio. En este sentido, los valores de pH en la laguna de oxidación fueron numéricamente superiores a los obtenidos en la laguna de acuicultura. Esto puede deberse a que, la actividad fotosintética de las microalgas en este sitio es mayor, debido a la generación de compuestos alcalinos son atribuidos a la reacción química del consumo de CO<sub>2</sub> constante que tienen estos microorganismos (Gerardi y Lytle, 2015).

Otras condiciones, como la concentración de fosfatos, puede ser atribuida a la naturaleza de los efluentes que entran a cada una de las lagunas, y a las dinámicas hidráulica diferente que tiene cada una, consecuentemente, debido a la disponibilidad de estos nutrientes, los niveles de sólidos suspendidos totales son mayores, y estos son relacionados directamente al contenido de microalgas (Wood et al., 2005). Este contenido mayoritario de los organismos de interés se debe también a que este sistema de tratamiento depende directamente de las microalgas para su correcto funcionamiento. El resto de las características, como los nitratos y la temperatura, no presentaron grandes diferencias numéricas. Completar la línea o subir todo

Otra condición intrínseca que contribuye a las diferencias entre los valores encontrados entre las lagunas son los propósitos de cada una. La presencia de fosfatos es común en las lagunas de oxidación debido a que la simbiosis con bacterias hace disponible este nutriente que contiene la materia orgánica a tratar y es aprovechado por las microalgas (Rodríguez, 2008). En cambio, los sistemas productivos para acuicultura ocasionalmente son suplementados con fertilizantes fosforados cuando se quiere promover el crecimiento de las microalgas debido a la falta de este nutriente (Jenneman, 2019). Adicionalmente, la variación dentro de cada una de las lagunas se debe a la heterogeneidad de los afluentes pues ambas dependen de condiciones como las precipitaciones o las características diferentes del agua que entra diariamente.

### Cuadro 3

*Parámetros fisicoquímicos de la laguna de Monte Redondo*

VARIABLES	Temperatura	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	pH	SST (mg/L)
Muestreo 1	24.5	7.87	1.5	7.87	50
Muestreo 2	27.4	9.68	1.6	9.68	50
Muestreo 3	28.8	9.38	0.1	9.38	45.5
Mínimo	24.5	0.1	0.51	7.87	45.5
Máximo	28.8	1.6	1.84	9.68	50
Media	26.9	1.07	1.16	8.98	48.5
D.E.	2.19	0.84	0.67	0.97	2.6
CV	8.15	78.62	57.19	10.81	18.6

### Cuadro 4

*Parámetros Fisicoquímicos de la Laguna de Oxidación*

VARIABLES	Temperatura	Nitratos (mg/L)	Fosfatos (mg/L)	pH	SST (mg/L)
Muestreo 1	25.5	1.2	3.05	9.47	83.3
Muestreo 2	29.7	0.9	10.2	10.3	60
Muestreo 3	29.3	0.4	4.7	10.3	66.6
Mínimo	25.5	0.4	3.05	9.47	60
Máximo	29.7	1.2	10.2	10.3	83.3
Media	28.17	0.83	5.98	10.02	70
D.E.	2.32	0.4	3.74	0.48	12.5
CV	8.23	48.5	62.57	4.78	5.8

### ***Especies de Microalgas en las Lagunas de Oxidación***

Durante el proceso de caracterización de los tipos de microalgas, presentes en ambas lagunas, se identificaron un total de 16 especies a nivel de género, ocho de estas en la laguna de oxidación y 15 en la laguna de monte redondo. Seis de las ocho especies encontradas en la laguna de oxidación, también se encontraron presentes en la laguna de Monte Redondo. Durante el proceso de identificación de microalgas en ambas muestras, se reconocieron diferencias marcadas en las dinámicas poblacionales de estos microorganismos. En la laguna de Monte Redondo, predominaban las aglomeraciones de diversas especies, teniendo poca dominancia un tipo particular. Sin embargo, se encontró diferentes poblaciones del género *Scenedesmus* que de acuerdo a diversos estudios es uno de los más encontrados en las explotaciones acuícolas convencionales (Ivaylo Sirakov et al., 2015).

El estudio realizado por Guerrón Navarrete (2015), sugiere que la alta diversidad de especies en la laguna de Monte Redondo se debe a la disponibilidad de nutrientes provenientes del alimento de tilapia y las heces de la misma al igual que las condiciones ambientales que existen en Zamorano. Igualmente, atribuye una falta de nutrientes en exceso en la Laguna de Monte Redondo que podría limitar la existencia en mayor densidad de géneros como *Chlorella* y *Scenedesmus*.

Por otra parte, la laguna de oxidación, tiene mayor disponibilidad de nutrientes explicada por los contenidos de los afluentes que entran al sistema y adicionalmente, es parte de una cadena de ambientes limitantes y con características estresantes que limitan el desarrollo de microalgas a especies resilientes y de alta producción de oxígeno razón por la cual se observa predominancia de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* (Hernández-Pérez y Labbé, 2014). Esto también se ve explicado por Álvarez-Díaz et al. (2017) que comentan que estos géneros son los más utilizados en los procesos de remediación de aguas residuales, como lo es la laguna de oxidación.

**Cuadro 5***Especies de microalgas Identificadas en el Estudio*

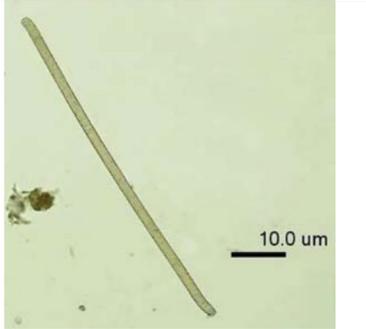
Especies de laguna de oxidación	Especies de laguna de Monte Redondo
<i>Scenedesmus</i> sp.	<i>Scenedesmus</i> sp.
<i>Chlorella</i> sp.	<i>Chlorella</i> sp.
<i>Desmodesmus</i> sp.	<i>Desmodesmus</i> sp.
<i>Closteriopsis</i> sp.	<i>Closteriopsis</i> sp.
<i>Monoraphidium</i> sp.	<i>Monoraphidium</i> sp.
<i>Kirchneriella</i> sp.	<i>Kirchneriella</i> sp.
<i>Aphanocapsa</i> sp.	<i>Selenastrum</i> sp.
<i>Synechocystis</i> sp.	<i>Euglena</i> sp.
	<i>Chlorococcum</i> sp.
	<i>Pseudanabaena</i> sp.
	<i>Coelastrum</i> sp.
	<i>Oscillatoria</i> sp.
	<i>Chlorogonium</i> sp.
	<i>Microcystis</i> sp.
	<i>Ankistrodesmus</i> sp.

**Cuadro 6***Selenastrum* sp. en la laguna de Monte Redondo.

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b><i>Selenastrum</i> sp.</b></p> <p>Formas fuertemente lunadas, algunas de sus especies son utilizadas como bioindicadores en cuerpos de agua para toxicidad de compuestos.</p>		
(P. Bohórquez Echeverry y C. Campos Pinilla, 2007)		Núñez-Avellaneda et al. (2008)

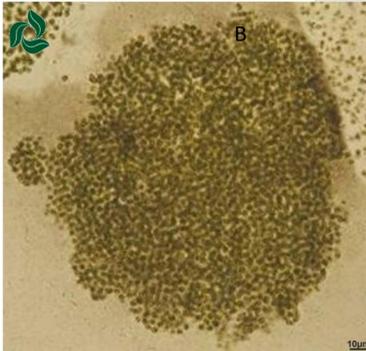
### Cuadro 7

#### *Oscillatoria sp. en la laguna de Monte Redondo*

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b><i>Oscillatoria sp.</i></b></p> <p>Caracterizada por formaciones largas de células aplanadas, comunes en cuerpos de agua dulce y salada. Presentes en ambientes con altas cargas orgánicas</p> <p>(Fuenmayor et al., 2009)</p>		 <p>Núñez-Avellaneda et al. (2008)</p>

### Cuadro 8

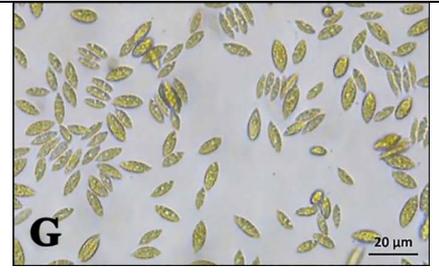
#### *Microcystis sp. en la laguna de Monte Redondo.*

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b><i>Microcystis sp.</i></b></p> <p>Micro o macro Colonias gelatinosas que flotan en el medio, en formas circulares. Pueden producir toxinas en el medio conocidas como microcistinas.</p> <p>(Borowitzka, 2018)</p>		 <p>Tucci et al. (2019)</p>

**Cuadro 9***Coelastrum sp. en la laguna de Monte Redondo*

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b><i>Coelastrum sp.</i></b> Células de color verde, ovoides en formaciones globosas de 4 a 32 células. Comunes en cuerpos de agua remansados como lagos, embalses y humedales</p>		
(Junta de Andalucía, 2010)		(Junta de Andalucía, 2010)

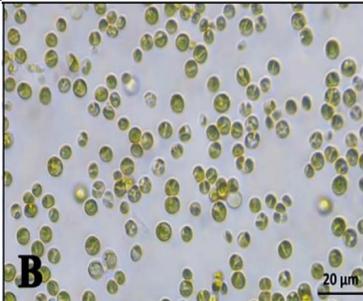
**Cuadro 10***Scenedesmus obliquus en la laguna de oxidación 5*

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b><i>Scenedesmus obliquus</i></b> Organización en cadenas de una o varias células oblicuas. Capacidad de producir hidrógeno en condiciones específicas de laboratorio, altos niveles de tolerancia a diversas circunstancias ambientales.</p>		
(Wünschiers et al., 1996)		Ferro et al. (2018)

**Cuadro 11***Scenedesmus sp. en la laguna de Oxidación 5*

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b>Scenedesmus sp.</b> constituido por algas verdes que se alinean en filas cortas de 4, 8 ó 16 células, Es un grupo representado por más de cien especies presentes en agua superficial y residual.</p>		
Junta de Andalucía (2010)		Junta de Andalucía (2010)

**Cuadro 12***Chlorella sp. en la laguna de Oxidación 5*

Especie / Género y características	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b>Chlorella sp.</b> Unicelular de forma esférica con gruesa capa celular. Alta capacidad de remoción de nutrientes y metales pesados, como adaptabilidad.</p>		
(Sydney et al., 2014)		Ferro et al. (2018)

**Cuadro 13***Aphanocapsa sp. en la laguna de Oxidación 5*

Especie / características	Género	y	Imagen identificada	Imagen de referencia
<p><b><i>Aphanocapsa sp.</i></b> Se organiza en colonias mucilaginosas irregulares con formas esféricas con pocos márgenes e incoloras. Encontrada en suelos y en lagunas en estado mesotrófico de agua dulce.</p>				
(Komárek, 2003)				Núñez-Avellaneda et al. (2008)

Las diferencias en diversidad y abundancias de especies se pueden atribuir a las condiciones que tiene cada una de las lagunas y las diferentes dinámicas de funcionamiento de estas. Las concentraciones elevadas de nutrientes disponibles en la laguna de oxidación promueven el desarrollo mayoritario de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus* como se observó en el sitio de estudio. Estos géneros son tolerantes a condiciones más adversas por sus características físicas de adaptación como la adición de células en el género *Scenedesmus* o la gruesa capa celular que posee el género *Chlorella*.

#### **Implementación de Protocolo de Inoculación y Escalamiento de Cultivos Mixtos**

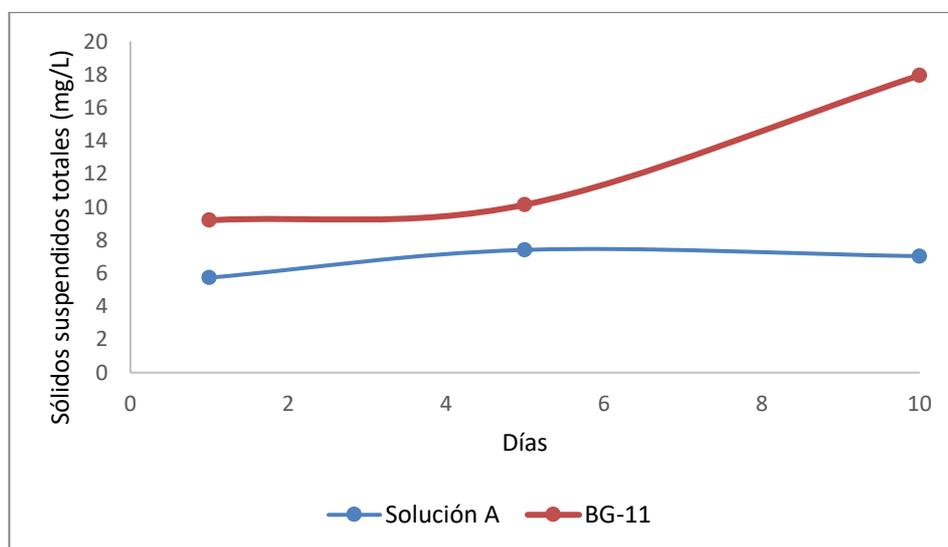
En el análisis de las dinámicas de crecimiento de las microalgas presentes en el cultivo mixto proveniente de la laguna de Monte Redondo, no se obtuvieron diferencias significativas ( $P=0.1$ ), sin embargo, se observaron tendencias notables entre los medios de cultivo BG-11 y Solución A. La falta de significancia de este indicador puede ser explicada por la varianza de los datos, que fue superior a

40% en todas las variables analizadas, esto debido a que la dinámica de crecimiento de los microorganismos no suele tener una distribución normal.

Al utilizar el medio de cultivo a base de fertilizantes (Solución A) se obtuvo una menor eficiencia en promover el crecimiento de los microorganismos, teniendo incrementos máximos de 2 mg/L en la concentración de sólidos suspendidos totales luego de completar el periodo de 10 días del proceso escalamiento, lo que indica una baja reproducción de las microalgas en este medio. En un estudio realizado por Ortiz-Moreno et al. (2012) se obtuvieron resultados similares al comparar la reproducción de una cepa aislada del género *Chlorella* con un medio de similar composición al BG-11 y un lixiviado de origen animal, donde el medio preparado a base de los lixiviados de gallinaza tuvo mejores resultados demostrando el alto potencial que tienen las alternativas de fertilizantes de bajo costo.

### Figura 3

*Crecimiento de microalgas, Laguna de Monte Redondo (mg/L)*



Este comportamiento obtenido con el BG-11 se puede asociar con la diversidad de especies presentes en este inóculo y la suplementación de micronutrientes incorporada en medios comerciales. Estos proporcionan un mejor control en los rendimientos de crecimiento de los

microorganismos a comparación con las alternativas de bajo precio como es el medio de cultivo Solución A que solo incluye fertilizantes de uso agrícola (Michelon et al., 2016); (Procházková et al., 2014).

#### Cuadro 14

##### *Crecimiento de Microalgas en Sólidos Suspendidos Totales, Laguna de Monte Redondo*

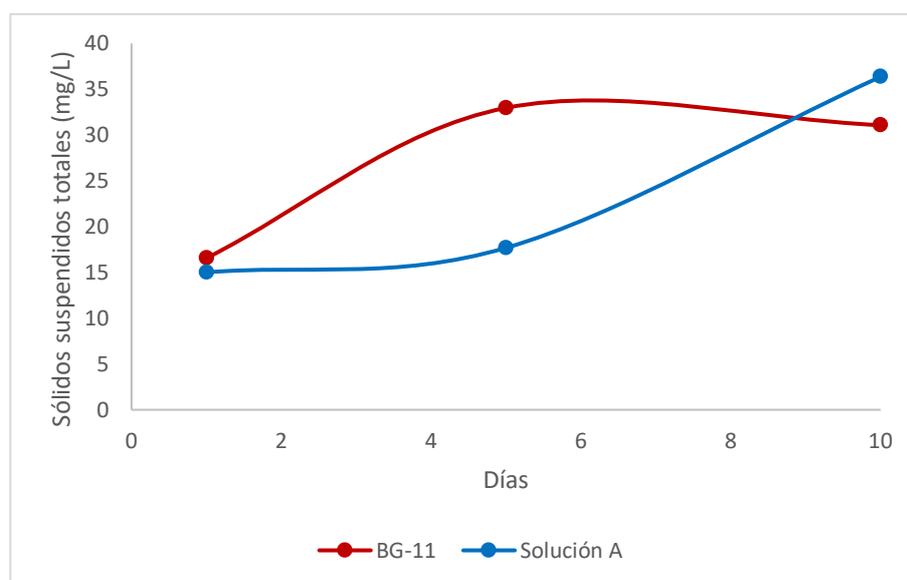
Medio de cultivo	SST día 1 (mg/L)	SST día 5 (mg/L)	SST día 10 (mg/L)
Sol A	5.73±3.21	7.41±4.62	7.03±6.98
BG-11	9.20±14.55	10.14±5.95	17.95±0.87
P	0.6	>0.99	0.1

*Nota.*  $p \geq 0.05$  no presentan diferencia significativa

A diferencia de la laguna de Monte Redondo, el inóculo proveniente de la laguna de oxidación obtuvo buenos resultados en ambos medios de cultivo. No existieron diferencias significativas, a pesar de existir dinámicas de crecimiento diferentes para cada medio. El medio de cultivo comercial BG-11, tuvo un punto máximo de crecimiento alrededor del día 5, a diferencia de la Solución A, que tuvo una dinámica de constante crecimiento hasta el último día de muestreo (Figura 12).

#### Figura 4.

##### *Crecimiento de Microalgas, Laguna de Oxidación (mg/L)*



Ambos medios de cultivo cumplen con el requerimiento de macronutrientes para el crecimiento de los organismos. Aun así, se puede inferir que la concentración de macronutrientes como fósforo y nitrógeno suplementados en el medio de Solución A, que es mayor que en el BG-11, favoreció que los microorganismos aumentaran su biomasa sin restricción. Igualmente, se puede atribuir esta versatilidad de crecimiento debido a la capacidad de adaptación que poseen las microalgas del género *Scenedesmus* que son mayoritarias en este inóculo (Cerón et al., 2018).

### Cuadro 15

#### *Crecimiento de Microalgas en Sólidos Suspendidos Totales, Laguna de Oxidación*

Medio de cultivo	SST día 1 (mg/L)	SST día 5 (mg/L)	SST día 10 (mg/L)
Sol A	15±2.58	17.68±9.24	36.36±9.45
BG-11	16.56±7.23	32.96±16.57	31.07±13.01
P	0.5714	0.2	0.8857

Nota.  $p \geq 0.05$  no presentan diferencia significativa

Durante el periodo de operación de los reactores (TRH = 10 días), se logró observar que existían diferencias en las características visibles de cada cultivo mixto. Los reactores de la laguna de Monte Redondo parecían tener mayores aglomeraciones de algas, en forma de coágulos sedimentados en forma de conglomerados, donde se concentraba la mayor parte de la biomasa. Este comportamiento se puede fundamentar en la presencia de *Microcystis* sp., especie que tiende a formar colonias gelatinosas que aglomeran a las demás microalgas (Borowitzka, 2018). Por otra parte, en los reactores de la laguna de Oxidación se observó una coloración verde intenso dispersa en todo el medio, que pueden ser asociada a la presencia de especies de comportamiento libre como *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella* sp., las cuales se encontraron con mayor frecuencia en este cultivo mixto (Sydney et al., 2014). Estas características fueron notables luego del día 5 en ambos cultivos mixtos.

Los tratamientos que obtuvieron mejores desempeños de reproducción en cada laguna se eligieron para inocular la segunda fase del experimento, siendo estos la laguna de Monte Redondo

con el medio BG-11, que obtuvo valores promedio de 17.9 mg/L de SST y el de la laguna de Oxidación con la Solución A, debido a su tendencia creciente diferenciada del otro medio alcanzando valores de 31 mg/L de SST. Es importante resaltar el mejor desempeño en general del cultivo de la laguna de oxidación en comparación al de Monte Redondo pues esta última obtuvo un incremento de 8.7 mg/L de SST en promedio mientras que el inóculo de oxidación reportó un aumento de 14.5 mg/L en los SST.

Los crecimientos esperados para cada una de las especies dependen de diferentes condiciones tanto ambientales como de la misma especie específica o de la cepa que está siendo evaluada, en este caso para *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. para la laguna de Oxidación. Existen investigaciones donde se obtuvieron valores de hasta 2 g/L\*día de productividad en biomasa para estos dos tipos de cepas, sin embargo, se contaban con diferentes condiciones en los reactores que potenciaron el crecimiento de las mismas (Anyanwu et al., 2022). Por otro lado, cultivos con tan alta diversidad como los encontrados en Monte Redondo tienen dinámicas de crecimiento únicas por la diversidad de especies que contiene.

### **Capacidad de Remoción de Nitratos y Fosfatos a partir de cultivos mixtos**

#### ***Caracterización del Efluente Agrícola***

Los valores de fosfatos y nitratos en este efluente evidencian un gran problema de aplicación de fertilizantes, adicionalmente, no cumplen con la reglamentación hondureña de vertimiento estipulada en las Normas Técnica de las Descargas de Aguas Residuales a Cuerpos Receptores y Alcantarillado Sanitario que estipula que los valores máximos son 30 mg/L y 5 mg/L para nitrógeno total Kjeldahl y Fósforo total respectivamente (Secretaría de Salud de Honduras, 1997). Aunque los valores anteriores se representan en forma de fosfatos y nitratos, se reconoce que dependiendo del origen del efluente, los datos pueden representar solo una porción de la medición de Fósforo total.

**Cuadro 16***Caracterización del Efluente Agrícola del Invernadero de Tomate*

Variable	Resultado
Fosfatos (mg/L)	153
Nitratos (mg/L)	148.8
pH	6.8

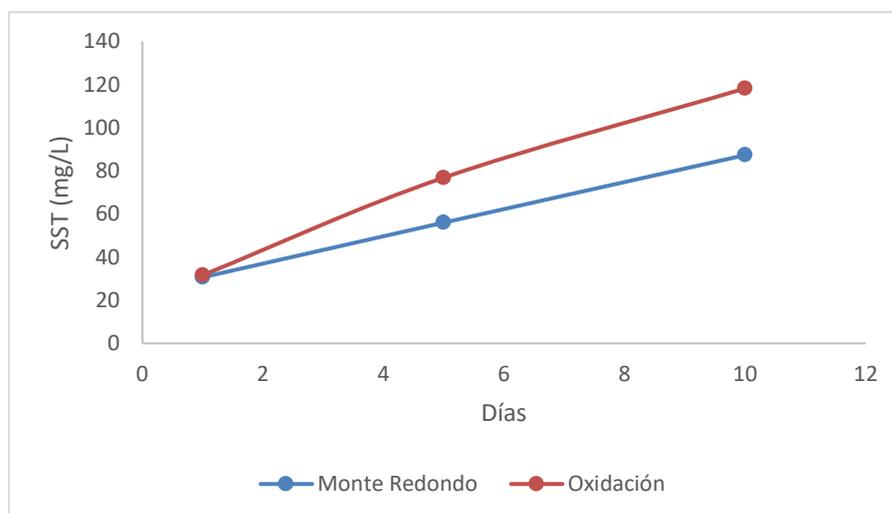
Los inóculos tomados luego de alcanzar el pico de la curva de crecimiento, fueron incorporados en los reactores preparados con el efluente agrícola previamente caracterizado. En la Figura 5 se aprecia un mayor crecimiento en el cultivo mixto obtenido de la laguna de oxidación durante los 10 días de retención en los reactores de tratamiento. Conclusiones reportadas por Fallahi et al. (2020) atribuyen un mayor desarrollo de la biomasa al existir competencia entre diferentes especies de microalgas en un mismo cultivo.

Teniendo en cuenta la diversidad de microalgas encontradas, el inóculo de la laguna de oxidación demostró mayor resiliencia al momento de su crecimiento. La competencia entre dos especies como son la *Scenedesmus obliquus* y *Chlorella* sp., potenció el crecimiento de biomasa durante esta segunda fase en comparación al inóculo de Monte Redondo. Es importante reconocer que el inóculo de Monte Redondo poseía mayor diversidad de especies, sin embargo, en su mayoría no pertenecían a las antes mencionadas que son más adaptables a cambios en el medio.

Por otro lado, Anyanwu et al. (2022), encontró que las tasas de crecimiento de *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. son superiores a otras especies como *Nannochloropsis* sp. Estos resultados concuerdan igualmente con las tendencias obtenidas en esta fase del experimento.

**Figura 5**

*Crecimiento de Microalgas Durante el Tratamiento*



El porcentaje de promedio de crecimiento en el reactor con el inóculo de Monte Redondo fue de 65% en sus sólidos suspendidos totales al concluir los 10 días. Por otro lado, los reactores con el inóculo de la laguna de oxidación tuvieron resultados superiores con valores promedio de 73% de crecimiento en los sólidos suspendidos totales. Estos resultados son consecuentes con los obtenidos en la primera fase donde se mantienen las dinámicas de crecimiento en cada inóculo.

Al finalizar los 10 días de retención del tratamiento, los reactores inoculados con el cultivo mixto de la laguna de Monte Redondo lograron una remoción promedio de los fosfatos de un 36.39% equivalente a 71 mg/L. Se reconoce que la forma en la que las microalgas asimilan de mejor manera el fósforo para su metabolismo son los fosfatos en medios de agua dulce. Así mismo, el género *Scenedesmus* sp. tiene estrategias de regulación para su metabolismo donde puede formar uniones de entre 2 y 8 células para mejorar su asimilación de nutrientes en medios enriquecidos (Cerón et al., 2018). Además, las microalgas acostumbran a acumular fosfatos de manera intracelular cuando se encuentran en medios ricos en este nutriente lo que les permite continuar su división celular aunque ya no haya fósforo disponible en el medio y adicionalmente contribuye a que existan remociones rápidas de este (Fallahi et al., 2020).

**Cuadro 17***Remoción de Fosfatos con Inóculo de Laguna Monte Redondo*

Variable	Día 1 Fosfatos (mg/L)	Día 5 Fosfatos (mg/L)	Día 10 Fosfatos (mg/L)	Reducción mg/L	Remoción (%)
Rep 1	178	208	120	58	32.58
Rep 2	209	180	125	84	40.19
Media	193.5	194	122.5	71	36.39
D.E	21.92	19.8	3.54	18.38	5.38

La remoción de nitratos durante la fase de tratamiento con el inóculo de la laguna de Monte Redondo alcanzó valores promedio de reducción de 1.85% equivalentes a 2.8 mg/L al finalizar el tiempo de retención. Ruiz-Marin et al. (2010) obtuvo resultados similares de remoción de nitratos al inocular cepas de *S. obliquus* y *Chlorella* sp. en aguas residuales domésticas, donde los valores no variaron significativamente después del tratamiento. Esta baja remoción de nitratos es consecuente con lo reportado por Hyenstrand et al. (2000) quien comprobó que la forma preferencial de absorción de nitrógeno para las algas es el amonio debido a que la energía que es necesaria para asimilar en nitrógeno en esta forma es menor que en forma de nitrato.

**Cuadro 18***Remoción de Nitratos con Inóculo de Laguna de Monte Redondo*

Variable	Día 1 Nitratos (mg/L)	Día 5 Nitratos (mg/L)	Día 10 Nitratos (mg/L)	Reducción (mg/L)	Remoción (%)
Rep 1	154.385	156.39	155.073	0.000	0.00
Rep 2	151.95	155.55	146.343	5.608	3.69
Media	153.17	155.97	150.71	2.8	1.85
D.E.	1.72	0.59	6.17	3.97	2.61

El inóculo de la laguna de oxidación logró resultados similares a los obtenidos por el de Monte Redondo, donde se alcanzó un porcentaje de 30.4% de remoción y 51.7 mg/L en promedio del efluente agrícola. Se observan valores diferentes en las mediciones iniciales de los fosfatos que pueden ser atribuidos a las diferentes composiciones del medio donde fueron cultivados los inóculos durante la primera fase.

Estos resultados concuerdan con el experimento realizado por Ruiz et al. (2011) donde se encontraron que los valores máximos de remoción de fosfatos tras el mismo tiempo de retención (10 días) eran alrededor de 30 mg/L con una cepa asilada de *Chlorella* sp. Por otro lado, Michelin et al. (2016) reportaron remoción de hasta 100% en sus reactores inoculados con cultivos mixtos extraídos de lagunas de tratamiento terciario para los efluentes porcinos y que contenían igualmente, dominancia de *Chlorella* sp., este resultado difiere del obtenido en este estudio en cuestión de porcentaje pero esta diferencia es atribuible a las concentraciones iniciales que se usaron en el estudio en mención que fueron de al redor de 10 mg/L provenientes de aguas residuales ya tratadas de una granja porcina.

Se observaron valores diferentes en el total de remoción que existió para cada uno de los inóculos, esta desigualdad podría ser atribuida a que el inóculo de los reactores de la laguna de Oxidación tenía una mayor cantidad de fósforo. Esto pudo retrasar ligeramente la necesidad de las microalgas de recurrir al efluente agrícola para suplirse de este nutriente, sin así detener su crecimiento en biomasa que fue superior al de Monte Redondo.

Valores de 0.01 mg/L de fósforo son suficientes para promover el crecimiento de las microalgas en los ambientes naturales. Por lo que los valores altos de disponibilidad de este nutriente remueven la barrera de crecimiento de este inóculo que proviene de agua dulce y normalmente se ve limitado por la disponibilidad del fósforo (García, 2016). Por otro lado, se ha identificado que para la producción de 1 gramo de biomasa de microalgas se necesitan 0.063 g de nitrógeno y que una relación de carbono, nitrógeno y fósforo de 106 C: 16 N: 1 P, son las mejores para el crecimiento de estos microorganismos (Grobbelaar, 2010; Sukla et al., 2019).

**Cuadro 19***Remoción de Fosfatos con Inóculo de Laguna de Oxidación*

Variable	Día 1 Fosfatos (mg/L)	Día 5 Fosfatos (mg/L)	Día 10 Fosfatos (mg/L)	Reducción (mg/L)	Remoción (%)
Rep 1	156	116	114	42	26.92
Rep 2	181	167	119.5	61.5	33.98
Media	168.5	141.5	116.75	51.75	30.45
D.E	17.68	36.06	3.89	13.79	4.99

Similar a los resultados del inóculo de Monte Redondo, el cultivo mixto de la laguna de Oxidación no tuvo un efecto mayor al 5% en remoción de nitratos. Las diferencias en los valores iniciales de nitratos se pueden atribuir, al igual que con los fosfatos, a la composición del medio de cultivo que es diferente para cada inóculo utilizado. Así mismo, la diferencia que existe entre la remoción de nitratos de los dos inóculos puede ser atribuida a la actividad de bacterias desnitrificantes que pudiesen estar presentes en el cultivo y que son frecuentes en sistemas de lagunas facultativas. Estas bacterias logran convertir los nitratos en amonio que sí puede ser consumido por las microalgas como parte de la asimilación de sus proteínas y otros procesos metabólicos (Michelon et al., 2016)

**Cuadro 20***Remoción de nitratos con inóculo de laguna de Oxidación*

Variable	Día 1 Nitratos (mg/L)	Día 5 Nitratos (mg/L)	Día 10 Nitratos (mg/L)	Reducción (mg/L)	Remoción (%)
Rep 1	131.0975	137.08	118.845	12.253	9.35
Rep 2	130.2725	137.04	123.967	6.306	4.84
Media	130.69	137.06	121.41	9.28	7.1
D.E.	0.58	0.03	3.62	4.21	3.19

Los cultivos mixtos en microalgas representan una alternativa para el tratamiento de los efluentes que se generan en la unidad productiva de oleicultura intensiva si se combina con otros tratamientos biológicos como bacterias desnitrificantes. Igualmente, se reconoció que el fósforo es el nutriente más demandado en cuestión de volumen por las microalgas en cuerpos de agua dulce,

haciendo eficiente su remoción en los residuos. Adicionalmente, se reconoce que el uso de los cultivos mixtos como alternativa a las cepas puras de microalgas representan una opción más realizable, económica y accesible gracias a su fácil obtención y mantenimiento. Igualmente considerando, que tienen rendimientos muy similares a la hora de tratar los efluentes y que tienen alto potencial para la obtención de biomasa o productos como el biodiesel de los mismos crecimientos algales.

### Conclusiones

Las diferentes dinámicas de operación de las lagunas seleccionadas para el estudio influyen en la diversidad y abundancia de especies de microalgas encontradas. Las especies *Chlorella* sp. y *Scenedesmus obliquus* fueron dominantes en la laguna de oxidación, mientras que, en el cultivo obtenido de la laguna de producción acuícola de Monte Redondo, se encontró mayor diversidad de especies, predominando *Scenedesmus* sp.

Bajo las condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes, ambos inóculos mixtos de microalgas tuvieron la capacidad de reproducirse satisfactoriamente utilizando dos medios de cultivo con proporciones de nutrientes diferentes. Sin embargo, la eficiencia de los medios de cultivo en el desarrollo de biomasa se ve influida por el origen del inóculo y las especies de microalgas predominantes en estos.

Se identificó el potencial de ambos inóculos mixtos para la remoción de fosfatos en el efluente agrícola, teniendo rendimientos muy similares a cepas puras con valores de remoción promedios del 30% de, lo que denota que estos representan una alternativa viable en procesos de fitorremediación.

La eficiencia en la remoción de los nitratos es inferior al valor obtenido para fosfatos. Esto se puede deber a la disponibilidad del nitrógeno en el medio de cultivo requerido para el mantenimiento del inóculo y la conversión de otras fuentes de nitrógeno por parte de las bacterias nitrificantes en sus procesos simbióticos dentro del fotobiorreactor.

### Recomendaciones

Realizar el experimento incluyendo diferentes efluentes de la producción agropecuaria como aguas residuales porcinas.

Realizar una comparación *in-situ* entre los cultivos mixtos y una cepa asilada en laboratorio para comparar las capacidades de remoción de nutrientes bajo las mismas condiciones.

Repetir el experimento tomando en cuenta otras variables clave como la presencia de bacterias desnitrificantes, la remoción de amonio, concentraciones celulares y de clorofila. Condiciones óptimas de laboratorio como suministro de gases constante y agitación de los reactores.

Utilizar el inóculo de la laguna de oxidación por su potencial de remoción de fosfatos para un tratamiento de los efluentes que se generan en los invernaderos de Zona 3 en lagunas de depuración.

## Referencias

- Abalde, J. (DL 1995). *Microalgas: Cultivo y aplicaciones. Monografías: n. 26*. Universidade, Servicio de Publicaciones.
- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. y Ibraheem, I.B.M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Álvarez-Díaz, P. D., Ruiz, J., Arbib, Z., Barragán, J., Garrido-Pérez, M. C. y Perales, J. A. (2017). Freshwater microalgae selection for simultaneous wastewater nutrient removal and lipid production. *Algal Research*, 24, 477–485. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.02.006>
- Standard methods for the examination of water and wastewater* (22. ed.). (2012). American Public Health Association.
- Anyanwu, R. C., Rodriguez, C., Durrant, A. y Olabi, A. G. (2022). Evaluation of Growth Rate and Biomass Productivity of *Scenedesmus quadricauda* and *Chlorella vulgaris* under Different LED Wavelengths and Photoperiods. *Sustainability*, 14(10), 6108. <https://doi.org/10.3390/su14106108>
- Aparicio Jiménez, D. (2013). *Condiciones de hipoxia/anoxia en la bahía de Cienfuegos, Cuba: consecuencias adversas para la macrofauna bentónica: Condiciones de hipoxia/anoxia en la bahía de Cienfuegos, Cuba: consecuencias adversas para la macrofauna bentónica* [, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas]. [dspace.uclv.edu.cu](https://dspace.uclv.edu.cu). <https://dspace.uclv.edu.cu/handle/123456789/1813>
- BBC News (2021, 8 de abril). "Zona muerta" del golfo de México: la preocupante expansión de esta área en la que la vida marina es imposible. *BBC News Mundo*. <https://www.bbc.com/mundo/noticias-58094558>

- Borowitzka, M. A. (2018). Chapter 3 - Biology of Microalgae. En I. A. Levine y J. Fleurence (Eds.), *Microalgae in Health and Disease Prevention* (pp. 23–72). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811405-6.00003-7>
- Brito, D., Castro, A., Colivet, J., Gómez, E. y Mora, R. (2013). Cinética de crecimiento de un cultivo mixto de las microalgas *Hyaloraphidium contortum* y *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Interciencia*, 38(8), 605-608-608. <https://biblat.unam.mx/es/revista/interciencia/articulo/cinetica-de-crecimiento-de-un-cultivo-mixto-de-las-microalgas-hyaloraphidium-contortum-y-pseudokirchneriella-subcapitata>
- Carias L., T. L. (2013). *Macroinvertebrados acuáticos como bioindicadores del sistema de lagunas de estabilización de Zamorano*. Zamorano: Escuela Agrícola Panamericana, 2013. <https://bdigital.zamorano.edu/items/76652acf-4577-44fd-8972-64ee92942078>
- Carrasquero Ferrer, S. J., Marquina Gélvez, D. C., Soto López, J. G., Vilorio Rincón, S., Pire Sierra, M. C. y Díaz Montiel, A. R. (2015). Remoción de nutrientes en aguas residuales de un matadero de reses usando un reactor biológico secuencial. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 25(2), 43–60. <https://doi.org/10.18359/rcin.1431>
- Catarina, A. y Xavier, F. (2012). Nutritional Value and Uses of Microalgae in Aquaculture. En Z. Muchlisin (Ed.), *Genomics and Genome Sequencing: Benefits for Finfish Aquaculture*. INTECH Open Access Publisher. <https://doi.org/10.5772/30576>
- Cerón, L. E., Miramag, K. M., Izquierdo, P. F. y Ortiz, F. L. (2018). Efecto de las variaciones de las fuentes de nitrógeno, fósforo y mezcla de micronutrientes en agua residual municipal para la producción de biomasa de *Scenedesmus* sp. *REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLOGICAS*, 1(30), 121–128. <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/163>

- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J. M. y Flores-Cotera, L. B. (2003). AVANCES EN EL DISEÑO CONCEPTUAL DE FOTOBIOREACTORES PARA EL CULTIVO DE MICROALGAS. *Interciencia*.  
[https://www.researchgate.net/publication/237243095\\_AVANCES\\_EN\\_EL\\_DISENO\\_CONCEPTUAL\\_DE\\_FOTOBIOREACTORES\\_PARA\\_EL\\_CULTIVO\\_DE\\_MICROALGAS](https://www.researchgate.net/publication/237243095_AVANCES_EN_EL_DISENO_CONCEPTUAL_DE_FOTOBIOREACTORES_PARA_EL_CULTIVO_DE_MICROALGAS)
- Dearmas Duarte, D. y Ramírez Hernández, L. F. (2015). Remoción de nutrientes mediante coagulantes naturales y químicos en planta de tratamiento de aguas residuales, Valledupar Colombia. *RIAA*, 6(2), 183–196.  
<https://repositorio.cuc.edu.co/bitstream/handle/11323/4663/Implementaci%C3%B3n%20de%20un%20Tratamiento%20Alternativo%20para%20la%20Remoci%C3%B3n%20de%20F%C3%B3foro%20y%20Nitr%C3%B3geno.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- del Campo Vega,, M. J. (2018). Sistemas de tratamiento de remoción de nitrógeno y fósforo, en efluentes de industrias de la Cuenca del Río Santa Lucía. 1688-2792.  
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/29392>
- Elnabris, K. (2012). *Development of Cheap and Simple Culture Medium for the Microalgae Nannochloropsis sp. Based on Agricultural Grade Fertilizers Available in the Local Market of Gaza Strip (Palestine)* (Vol. 14). <http://h1.honducompras.gob.hn/Docs/Lic480BID-Mdej-002-2009407-EnmiendaoAdendum.pdf>
- Fallahi, A., Hajinajaf, N., Tavakoli, O. y Sarrafzadeh, M. H. (2020). Cultivation of Mixed Microalgae Using Municipal Wastewater: Biomass Productivity, Nutrient Removal, and Biochemical Content. *Iranian Journal of Biotechnology*, 18(4), e2586. <https://doi.org/10.30498/IJB.2020.2586>
- Ferro, L., Gentili, F. G. y Funk, C. (2018). Isolation and characterization of microalgal strains for biomass production and wastewater reclamation in Northern Sweden. *Algal Research*, 32, 44–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.006>

- Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales-Loaiza, N. y Morales, E. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. *Rev. Soc. Venez. Microbiol*, 21–25. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-631631>
- García, J., Ortiz, A., Álvarez, E., Belohlav, V., García-Galán, M. J., Díez-Montero, R., Álvarez, J. A. y Uggetti, E. (2018). Nutrient removal from agricultural run-off in demonstrative full scale tubular photobioreactors for microalgae growth. *Ecological Engineering*, 120, 513–521. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.07.002>
- García, M. (2016). *Eutrofización: una visión general*.
- Gerardi, M. H. y Lytle, B. (Eds.). (2015). *Wastewater Microbiology. The Biology and Troubleshooting of Facultative Lagoons*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781118981771>
- Good, A. G. y Beatty, P. H. (2011). Fertilizing nature: A tragedy of excess in the commons. *PLoS Biology*, 9(8), e1001124. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001124>
- Grobbelaar, J. U. (2010). Microalgal biomass production: Challenges and realities. *Photosynthesis Research*, 106(1), 135–144. <https://doi.org/10.1007/s11120-010-9573-5>
- Guerrón Navarrete, P. V. (2015). *Relación entre las variables fisicoquímicas y la concentración de microalgas en la laguna de Monte Redondo*. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras.
- Hernández-Pérez, A. y Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista De Biología Marina Y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Hersch, R. W., Wolanski, E., Andutta, F., Delhez, E., Fairbridge, R. W., Bengtsson, L., Farley, M., Sklar, F. H. y Fontaine, T. D. (2012). Eutrophication in Fresh Waters: An International Review. En R. W. Hersch (Ed.), *Encyclopedia of Earth Sciences Series. Encyclopedia of lakes and reservoirs: Geography, geology, hydrology and paleolimnology* (1ª ed., pp. 258–270). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6\\_79](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4410-6_79)

- Hyenstrand, P., Burkert, U., Pettersson, A. y Blomqvist, P. (2000). Competition between the green alga *Scenedesmus* and the cyanobacterium *Synechococcus* under different modes of inorganic nitrogen supply. *Hydrobiologia*, 435(1), 91–98. <https://doi.org/10.1023/A:1004008721373>
- Ivaylo Sirakov, Katya Velichkova, Stefka Stoyanova y Yordan Staykov. (2015). *The importance of microalgae for aquaculture industry. Review* (2(4)). [https://www.researchgate.net/publication/272523704\\_The\\_importance\\_of\\_microalgae\\_for\\_aquaculture\\_industry\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/272523704_The_importance_of_microalgae_for_aquaculture_industry_Review)
- Jenneman, L. (2019). *Phosphorus: Key to phytoplankton management - Responsible Seafood Advocate*. [http://cnpml-honduras.org/wp-content/uploads/docu\\_tecnicos/doc/Norma\\_Tecnica\\_de\\_descarga\\_Aguas\\_Residuales.pdf](http://cnpml-honduras.org/wp-content/uploads/docu_tecnicos/doc/Norma_Tecnica_de_descarga_Aguas_Residuales.pdf)
- Juneja, A., Ceballos, R. M. y Murthy, G. S. (2013). Effects of Environmental Factors and Nutrient Availability on the Biochemical Composition of Algae for Biofuels Production: A Review. *Energies*, 6(9), 4607–4638. <https://doi.org/10.3390/en6094607>
- Junta de Andalucía. (2010). *Atlas de Microorganismos Planctónicos Presentes en los Humedales Andaluces*.
- Kazbar, A., Cogne, G., Urbain, B., Marec, H., Le-Gouic, B., Tallec, J., Takache, H., Ismail, A. y Pruvost, J. (2019). Effect of dissolved oxygen concentration on microalgal culture in photobioreactors. *Algal Research*, 39, 101432. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101432>
- Komárek, J. (2003). 3 - COCCOID AND COLONIAL CYANOBACTERIA. En J. D. WEHR y R. G. SHEATH (Eds.), *Freshwater algae of North America: Ecology and classification* (pp. 59–116). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012741550-5/50004-0>
- Kommareddy, A. y Anderson, G. Study of Light as a parameter in the growth of algae in a Photo-Bio Reactor (PBR). En 2003, Las Vegas, NV July 27-30, 2003. American Society of Agricultural and Biological Engineers. <https://doi.org/10.13031/2013.13868>

- Laffoley, D. D.'A. y Baxter, J. M. (2019). *La desoxigenación de los océanos: un problema de todos* (núm. 9782831720272). Union internationale pour la conservation de la nature. <https://www.patrinum.ch/record/241424> <https://doi.org/10.22005/bcu.241424>
- Michelon, W., Da Silva, Marcio Luis Busi, Mezzari, M. P., Pirolli, M., Prandini, J. M. y Soares, H. M. (2016). Effects of Nitrogen and Phosphorus on Biochemical Composition of Microalgae Polyculture Harvested from Phycoremediation of Piggery Wastewater Digestate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 178(7), 1407–1419. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1955-x>
- Middelburg, J. J. y Levin, L. A. (2009). Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry. *Biogeosciences*, 6(7), 1273–1293. <https://doi.org/10.5194/bg-6-1273-2009>
- Min, M., Wang, L., Li, Y., Mohr, M. J., Hu, B., Zhou, W., Chen, P. y Ruan, R. (2011). Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(1), 123–137. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9238-7>
- Moeller, G. y Tomasini., A. C. (2004). *Microbiología de lodos activados*. <http://documentacion.ideam.gov.co/openbiblio/bvirtual/018834/memorias2004/capituloii/5microbiologiadelodosactivados.pdf>
- Morales Amaral, María del Mar (2016). Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=111493>
- Narala, R. R., Garg, S., Sharma, K. K., Thomas-Hall, S. R., Deme, M., Li, Y. y Schenk, P. M. (2016). Comparison of Microalgae Cultivation in Photobioreactor, Open Raceway Pond, and a Two-Stage Hybrid System. *Frontiers in Energy Research*, 0, 29. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2016.00029>

National Oceanic and Atmospheric Administration. (2017). *What is eutrophication?*

<https://oceanservice.noaa.gov/facts/eutrophication.html>

Núñez-Avellaneda, M., Marciales-Caro, L. J. y & Beltrán Gutiérrez, M. (2008). *Microalgas acuáticas:*

*la otra escala de la biodiversidad en la Amazonia colombiana.*

<https://scholar.google.com/citations?user=ct3fn7saaaaj&hl=es&oi=sra>

Ortiz-Moreno, M. L., Otero-Paternina, A. M., Sánchez-Villarraga, J., Cortés-Castillo, C. E. y Padilla, J.

(2012). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *Orinoquia*, 16(1), 11–20.

<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=89625076002>

P. Bohórquez Echeverry y C. Campos Pinilla (2007). EVALUACIÓN DE *Lactuca sativa* Y *Selenastrum*

*capricornutum* COMO INDICADORES DE TOXICIDAD EN AGUAS. *Universitas Scientiarum*,

12(2), 83–98. <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/scientarium/article/view/4868>

Paerl, H. W., Dennis, R. L. y Whitall, D. R. (2002). Atmospheric deposition of nitrogen: Implications

for nutrient over-enrichment of coastal waters. *Estuaries*, 25(4), 677–693.

<https://doi.org/10.1007/bf02804899>

Pradana, Y. S., Sudibyo, H., Suyono, E. A., Indarto y Budiman, A. (2017). Oil Algae Extraction of

Selected Microalgae Species Grown in Monoculture and Mixed Cultures for Biodiesel

Production. *Energy Procedia*, 105, 277–282. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.03.314>

Procházková, G., Brányiková, I., Zachleder, V. y Brányik, T. (2014). Effect of nutrient supply status on

biomass composition of eukaryotic green microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 26(3),

1359–1377. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0154-9>

Qiu, R., Gao, S., Lopez, P. A. y Ogden, K. L. (2017). Effects of pH on cell growth, lipid production and

CO<sub>2</sub> addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Algal Research*, 28, 192–199.

<https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>

- Rahman Al-Mayah, A. M. y Al-Rikabey, M. N. (2018). Cultivation of *Chlorella Vulgaris* in BG-11 Media Using Taguchi Method. *Journal of Advanced Research in Dynamical and Control Systems*, 10(7), 19–30.  
[https://www.researchgate.net/publication/328841186\\_Cultivation\\_of\\_Chlorella\\_Vulgaris\\_in\\_BG-11\\_Media\\_Using\\_Taguchi\\_Method](https://www.researchgate.net/publication/328841186_Cultivation_of_Chlorella_Vulgaris_in_BG-11_Media_Using_Taguchi_Method)
- Rodriguez, J. (2008). Tratamiento de aguas residuales en pequeñas comunidades.  
<http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/19117/capitulo4.pdf>
- Roopnarain, A., Gray, V. M. y Sym, S. D. (2014). Phosphorus limitation and starvation effects on cell growth and lipid accumulation in *Isochrysis galbana* U4 for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 156. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.092>
- Ruane, J., Sonnino, A. y Agostini, A. (2010). Bioenergy and the potential contribution of agricultural biotechnologies in developing countries. *Biomass and Bioenergy*, 34(10), 1427–1439.  
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.04.011>
- Ruiz, J., Álvarez, P., Arbib, Z., Garrido, C., Barragán, J. y Perales, J. A. (2011). Effect of Nitrogen and Phosphorus Concentration on Their Removal Kinetic in Treated Urban Wastewater by *Chlorella Vulgaris*. *International Journal of Phytoremediation*, 13(9), 884–896.  
<https://doi.org/10.1080/15226514.2011.573823>
- Ruiz-Marin, A., Mendoza-Espinosa, L. G. y Stephenson, T. (2010). Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. *Bioresource Technology*, 101(1), 58–64.  
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.076>
- Santos-montes, A., González Arechavala, Y. y Sastre, C. M. (2014). *Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas* (XCI). <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/4518/1/IAD-2015-026.pdf>

- Secretaría de Salud de Honduras (1997). NORMAS TÉCNICAS DE LAS DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES A CUERPOS RECEPTORES Y ALCANTARILLADO SANITARIO.
- Sukla, L. B., Subudhi, E. y Pradhan, D. (Eds.). (2019). *The Role of Microalgae in Wastewater Treatment*. Springer Singapore. <http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2>  
<https://doi.org/10.1007/978-981-13-1586-2>
- Sydney, E. B., Novak, A. C., Carvalho, J. C. de y Soccol, C. R. (2014). Chapter 4 - Respirometric Balance and Carbon Fixation of Industrially Important Algae. En A. Pandey (Ed.), *Biofuels from algae* (pp. 67–84). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59558-4.00004-8>
- Tucci, A., Sant'Anna, C.L., Azevedo, M. T. d. P., da Silva Malone, C. F. y de Souza Santos, K. R. (2019). *Atlas de cianobacterias e microalgas de águas continentais brasileiras*.  
[https://www.researchgate.net/publication/338777676\\_Atlas\\_de\\_cianobacterias\\_e\\_microalgas\\_de\\_aguas\\_continentais\\_brasileiras](https://www.researchgate.net/publication/338777676_Atlas_de_cianobacterias_e_microalgas_de_aguas_continentais_brasileiras)
- Turner, R. E., Rabalais, N. N. y Justic, D. (2008). Gulf of Mexico Hypoxia: Alternate States and a Legacy. *Environmental Science & Technology*, 42(7), 2323–2327.  
<https://doi.org/10.1021/es071617k>
- UNESCO. (2018). *Nature-based solutions for water. The United Nations world water development report: Vol. 2018*. Unesco. <http://unesdoc.unesco.org/images/0026/002614/261424e.pdf>
- US EPA, OW, OWM y Water Permits Division (2002). Wastewater Technology Fact Sheet: Facultative Lagoons.
- Wood, A. M., Everroad, R.C. y Wingard, L.M. (2005). Measuring Growth Rates in Microalgal Cultures. En R. A. Andersen (Ed.), *Algal culturing techniques* (pp. 269–285). Elsevier/Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-012088426-1/50019-6>
- Wünschiers, R., Appel, J., Stangier, K., Phunpruch, S. y Schulz, R. (1996). INVESTIGATIONS TO APPLY BIOLOGICALLY PRODUCED PHOTOHYDROGEN AS A FUTURE ENERGY SOURCE. En P. Chartier

(Ed.), *Biomass for energy and the environment: Proceedings of the 9th European Bioenergy Conference, Copenhagen, Denmark, 24-27 June 1996* (1<sup>a</sup> ed., pp. 1668–1673). Pergamon.

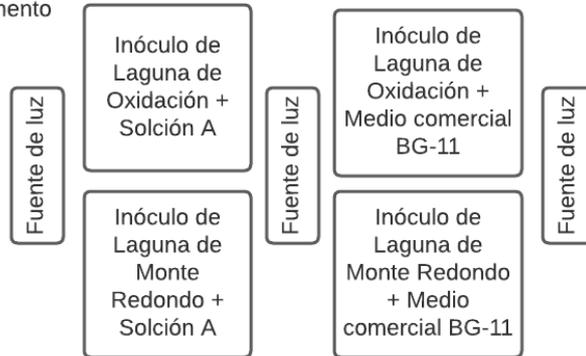
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-042849-9.50038-0>

**Anexos****Anexo A***Composición del Medio de Cultivo BG-11*

Compuesto	Cantidad
cloruro de calcio dihidrato	36,7 mg/L
ácido cítrico	5,6 mg/L
fosfato de hidrógeno dipotásico	31,4 mg/L
ETDA de magnesio disódico	1 mg/L
citrato de amonio férrico	6 mg/L
sulfato de magnesio	36 mg/L
carbonato de sodio	20 mg/L
nitrato de sodio	1,5 g/L

**Anexo B***Diseño Experimental Fase de Escalamiento*

Tres repeticiones  
del experimento



**Anexo C**

*Metodo de Recolección del Lixiviado*

