

**FICOREMEDIACIÓN DE PETRÒLEO CRUDO POR *Chlorella sp.* INMOBILIZADA BAJO  
DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

**YEFERSON JOSÈ ARROYO ÁLVAREZ**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**GRUPO DE INVESTIGACION EN BIOPROSPECCIÓN AGROPECUÀRIA**

**SINCELEJO**

**FICOREMEDIACIÓN DE PETRÒLEO CRUDO POR *Chlorella sp.* INMOBILIZADA BAJO  
DIFERENTES CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

**YEFERSON JOSÈ ARROYO ÀLVAREZ**

**Trabajo de grado para optar por el título de biólogo**

**DIRECTOR:**

**ALEXANDER PÈREZ CORDERO**

**IA, MSc, PhD en Microbiología Agrícola**

**CODIRECTOR:**

**DEIMER VITOLA ROMERO**

**BSc, MSc en Ciencias Ambientales**

**UNIVERSIDAD DE SUCRE**

**FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS**

**PROGRAMA DE BIOLOGÍA**

**SINCELEJO**

**2019**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

---

**FIRMA DEL JURADO**

---

**FIRMA DEL JURADO**

**SINCELEJO, OCTUBRE DE 2019**

**“pertenece al estudiante el derecho moral sobre la producción intelectual que realice personal y/o con orientación de un asesor o tutor, en desarrollo de las actividades académicas”**

**Art. 29 Res. 1675 de 2012**

## **Dedicatoria**

Dedico todo el esfuerzo y entusiasmo ofrecido para la realización de este trabajo, así como la satisfactoria aprobación del mismo, a mi familia, personas sin las cuales no hubiese sido posible alcanzar este sueño.

Decirles con esto que, tras casi 8 años, finalmente lo he logrado.

Dedico este triunfo, a todas aquellas personas que me acompañaron durante toda mi trayectoria, mis compañeros y amigos.

## **Agradecimientos**

Agradezco rotundamente a mis padres, Mirla Álvarez y José Arroyo, por haberme apoyado durante todo el camino recorrido en esta fase. Es un honor para mí poder culminar esta etapa de mi vida sabiendo que ellos siempre estuvieron a mi lado a lo largo de todas mis vivencias mientras me desempeñaba como un estudiante de pregrado de biología. Gracias por su respaldo y dedicación.

A mis compañeros de batalla, mis hermanos menores, Yeison Arroyo y Yaira Arroyo. Les doy las gracias por el esfuerzo y ayuda que me brindaron durante mi carrera, sin ellos no habría tenido la fuerza y la suficiente motivación para culminar esta etapa.

Agradezco a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en mi desarrollo personal y me ayudaron a crecer como un profesional, entre ellos Danilo Chávez, Cristian Ortiz, Jonatán Ortega, Luis de Hoyos, Jorge Carrascal, Oscar Conde, Diana García, Claudia Zuluaga, Luz Chávez, Luis Ricardo, Luisa Galván, siendo además unas grandes amistades, que soportaron todas mis facetas y me apoyaron en los momentos cruciales y decisivos. Hago mención especial a las chicas, Yan Yanine y Shirley Mendoza por todos sus consejos, buen trato, comprensión, ayuda y apoyo, son excelentes personas; muchas gracias por haberme dejado entrar en sus vidas.

A la Universidad de Sucre le agradezco el poner en mi camino un excelente y destaca cuerpo docente, que se encargó de proporcionar todos los conocimientos básicos necesarios para mi formación integral como biólogo.

Doy gracias al Grupo de Investigación en Bioprospección Agropecuaria de la Universidad de Sucre por darme la oportunidad de permitir alcanzar la última etapa de mi formación profesional, mediante el apoyo y acompañamiento en la realización de este trabajo de tesis.

## Tabla de contenido

LISTADO DE TABLAS .....	7
LISTADO DE FIGURAS .....	8
RESUMEN .....	10
ABSTRACT .....	11
1. INTRODUCCION .....	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	16
3. JUSTIFICACION .....	22
4. OBJETIVOS .....	24
4.1. General .....	25
4.2. Específicos .....	25
5. MARCO TEORICO .....	25
5.1 Antecedentes .....	26
5.2 Marco conceptual .....	27
5.2.1. Biorremediación .....	27
5.2.2. Microalgas .....	28
5.2.2.1. <i>Chlorella</i> sp. ....	30
5.2.3. Petróleo .....	30
5.2.3.1. Efectos negativos del petróleo crudo .....	31
6. METODOLOGIA .....	33
6.1 Descripción general del experimento .....	33
6.2 Muestras de petróleo crudo .....	33
6.3 Medio de cultivo y crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. ....	34
6.4 Separación y lavado de la biomasa .....	35
6.5 Montaje de las microalgas con petróleo .....	36
6.6 Extracción del petróleo crudo del medio con microalgas ( <i>Chlorella</i> sp.) .....	37
6.7 Actividad de biodegradación de hidrocarburos .....	38
6.8 Determinación del peso seco .....	39
6.9 Estimación de los pigmento clorofila a, b y carotenoides .....	40
6.10 Análisis estadístico .....	41
7. RESULTADOS Y DISCUSION .....	42
7.1 Curvas de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. ....	42

7.2	Curvas de degradación de petróleo .....	44
7.3	Actividad de biodegradación de hidrocarburos .....	45
7.4	Determinación del peso seco .....	48
7.5	Estimación del pigmento clorofila a, b y carotenoides.....	51
8.	CONCLUSIONES .....	58
9.	RECOMENDACIONES .....	59
10.	BIBLIOGRAFIA .....	60

## Listado de figuras

<i>Figura 1. Petróleo usado en los ensayos de biorremediación. La Muestra de petróleo crudo fue donada por el campo petrolero petirrojo ubicada en el municipio de trinidad Casanare.</i>	33
<i>Figura 2. Medio de cultivo de la microalga <i>Chlorella sp.</i> bajo condiciones de crecimiento mixotrófico.</i>	34
<i>Figura 3. Muestras de cultivo de microalgas para para la separación y lavado de biomasa algal. Muestras obtenidas del medio de cultivo (A), centrifugación de las muestras de cultivo de microalgas (B).</i>	35
<i>Figura 4. Montaje de la microalga con petróleo, depositada en ficorreactores</i>	36
<i>Figura 5. Obtención del petróleo crudo del medio de microalgas por medio de un tubo de separación (A), muestras de petróleo crudo para análisis posterior después de extraerlas del medio de microalgas (B).</i>	37
<i>Figura 6. Concentración de la muestra de petróleo crudo en un rotaevaporador, con el fin de eliminar el solvente, y garantizar total pureza de la misma.</i>	38
<i>Figura 7. Determinación del peso seco de las muestras de microalgas sometidas a temperaturas de 80 °C, hasta peso constante expresados en g/l.</i>	39
<i>Figura 8. Volúmenes definidos de 5 ml de suspensión algal, para la determinación de clorofila a, b y carotenoides.</i>	40
<i>Figura 9. Curva de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> bajo las diferentes concentraciones de petróleo evaluada</i>	42
<i>Figura 10. Curva de degradación de petróleo crudo por días.</i>	44
<i>Figura 11. Prueba de Tukey para la degradación de petróleo por días, por parte de la microalga <i>Chlorella sp.</i> en porcentaje (%)</i>	46
<i>Figura 12. Prueba de Tukey para la degradación de petróleo por concentración, por parte de la microalga <i>Chlorella sp.</i> en porcentaje (%)</i>	47
<i>Figura 13. Relación del peso seco de <i>Chlorella sp.</i> por concentración g/l y días de exposición.</i>	48

## **Listado de abreviaturas**

**HAP:** Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

**SARA:** Saturados, Aromáticos, Resinas y asfáltenos.

**UF:** Unidad Fitorremediadora.

**BS:** Biomasa seca.

## Resumen

La contaminación es una problemática de gran importancia a nivel global, ya que pone el equilibrio de las poblaciones de animales, plantas, microorganismos y del ser humano en alto riesgo, así como sus propias vidas. Uno de mayores impactos lo ocasiona el petróleo, debido a que posee una toxicidad muy elevada, siendo su introducción al medio una consecuencia de la gran cantidad de incidentes que se presentan constantemente y que terminan arrojando millones de litros sobre los ecosistemas acuáticos y terrestres. No obstante, se han desarrollado algunas técnicas con las que se puede llevar a cabo su remediación; sin embargo, tales metodologías no han sido lo suficientemente eficientes como para permitir la obtención de resultados satisfactorios, pues nunca se logra en su totalidad, incluso, a veces, provocan más estragos sobre el medio que el recurso en sí mismo. Por tal motivo, se ha venido trabajando en la prospección de un nuevo enfoque, la biorremediación, que emplea organismos vivos para este propósito. Entre ellos, las microalgas del genero *Chlorella* sp., que reportan estudios con resultados privilegiados en lo que a su biodegradación respecta. Bajo dicho dictamen, esta investigación centró sus propósitos en la determinación del potencial ficorremediador de petróleo crudo con ésta especie inmovilizada, sometida bajo condiciones de crecimiento heterotróficas y Mixotróficas en distintas concentraciones, mediante el cálculo de los porcentajes de remoción de dicha sustancia. Los datos indican que el alga es capaz de remover aceite en ambos medios, siendo 70,52 el porcentaje promedio en Heterotrofia y 75,49 en mixotrofia, presentándose diferencias estadísticas significativas ( $P_{valor} = 0,5978$ ); por su parte, la concentración a la cual se llevó acabo la mayor extracción fue la de 10 g/L. La capacidad de *Chlorella* sp. para crecer en este fluido obedece a sus atributos genética y metabólicos eucarióticos que le permiten desarrollarse a límites superiores a 20 g/L, favorecido esto por las ventajas que ofrece el mixotrofismo. En concordancia con lo anterior, puede decirse que la microalga

inmovilizada se ratifica su estatus promisorio para el tratamiento de crudo en laboratorio, en especial si se le permite hacerlo mixotróficamente.

## **Palabras claves**

*Chlorella* sp., heterotrófico, mixotrófico, Petróleo, contaminación, remoción, biorremediación, fitorremediación, biomasa, Clorofila a, Clorofila b y carotenoides.

## **Abstract**

Pollution is a problem of great importance globally, as it will place the balance of populations of animals, plants, microorganisms and human beings at high risk, as well as their own lives. One of the greatest risks is caused by oil, because it has a very high toxicity, its introduction being a consequence of the large number of incidents that constantly occur and end up throwing millions of liters on aquatic and terrestrial ecosystems. However, some techniques have been developed with which remediation can be carried out; nevertheless, the methodologies of studies have not been efficient enough to allow obtaining satisfactory results, because it is never achieved in its entirety, even, sometimes, causing more damage to the environment than the resource itself. For this reason, work has been done on prospecting for a new approach, bioremediation, which uses living organisms for this purpose. Among them, the microalgae of the genus *Chlorella* sp., which report studies with privileged results in what their biodegradation respects. Under this opinion, this investigation focused its specificities on the determination of the potential for remedy of crude oil with this immobilized species, sometimes under heterotrophic and mixotrophic growth conditions in different variables, by calculating the

percentages of removal of said substance. The data indicate that the algae is capable of removing oil in both media, 70.52 being the average percentage in Heterotrophy and 75.49 in myxotrophy, presenting specific statistical differences ( $P_{\text{valor}} = 0.5978$ ); on the other hand, the concentration at which the greatest extraction was carried out was 10 g / L. The capacity of *Chlorella* sp. to grow in this fluid, it obeys its eukaryotic genetic and metabolic attributes that allow it to develop at limits greater than 20 g / L, favored by the advantages that mixotrofism offers. In accordance with the above, it can be said that the immobilized microalgae ratifies its promising status for the treatment of crude in the laboratory, especially if it is allowed to do it mixotomically.

### **Keywords**

*Chlorella* sp., heterotrophic, mixotrophic, oil, pollution, removal, bioremediation, bioremediation, biomass, Chlorophyll a, Chlorophyll b and carotenoids.

## 1. Introducción

La contaminación de ecosistemas acuáticos y terrestres por hidrocarburos de petróleo, corresponde una de las problemáticas ambientales de mayor importancia a nivel mundial, debido a los fuertes estragos que se han evidenciado sobre la estructura, composición y función de estos ambientes, principalmente por la ocurrencia de derrames, cuyos orígenes pueden deberse a accidentes durante la exportación o transporte, por el mal estado de las redes de distribución o como resultado de atentados por conflictos armados. (El-Sheekh *et al.*, 2013; Velásquez). Solo por causas accidentales, aproximadamente 5.74 millones de toneladas de crudo fueron incorporados al medio en todo el mundo entre los años 1970 y 2014, evidenciando la magnitud de la problemática (Ahmed & Fakhruddin, 2018).

Existen varias estrategias para la remediación de hidrocarburos de petróleo, que incluyen un considerable abanico de técnicas basadas en principios físicos y químicos, herramientas con las que normalmente se afrontan estos desastres; no obstante, el principal obstáculo que éstas presentan es que su aplicación genera costos muy elevados, lo que en muchos casos reduce la viabilidad de los tratamientos; además, la extracción efectiva de los contaminantes puede no llevarse a cabo e incluso, se ha documentado, que en algunos lugares los métodos de remoción tuvieron efectos similares o peores a los ocasionados por los derrames, tal como el aumento de la toxicidad del medio (Ojewimi *et al.*, 2017). Es por eso que se recurre cada vez con mayor frecuencia al empleo de alternativas biológicas, como los microorganismos, para este propósito, pues han probado tener menores costos, mayores eficiencias, manejos más factibles y sobre todo una mayor capacidad para mitigar los impactos (Sharma, 2012).

Dentro de los microorganismos utilizados en biorremediación se encuentran las microalgas, las cuales se conocen universalmente por su elevada eficacia y eficiencia en la depuración de ecosistemas acuáticos contaminados con altas concentraciones de nitrógeno y fósforo (Ortiz *et al.*, 2018). No

obstante, algunas investigaciones demostraron la gran capacidad que ciertas especies presentan para la remoción de crudo (Walker, 1975; Cernigia *et al.*, 1980). Recientemente ciertos autores la han comprobado en especies del género *Chlorella* (El-Sheekh *et al.*, 2013; Xaaldi *et al.*, 2017; Vitola *et al.*, 2018). Sin embargo, cabe resaltar que estos trabajos han sido realizados bajo circunstancias de laboratorio, por lo que a un se siguen investigando las condiciones que favorezcan en mayor medida la eliminación del aceite, para así lograr aplicaciones futuras en campo que sean exitosas.

Es así como una alternativa para estudiar la remoción de petróleo crudo por *Chlorella* sp. Se centra en las ventajas que puede conferirle la inmovilización en las fibras de lignocelulosa del fruto seco de *Luffa cilíndrica*, teniendo en cuenta los resultados satisfactorios que se han obtenido en otras investigaciones con metales pesados.

## 2. Planteamiento del problema

Las tecnologías aplicadas en los procesos de extracción, transporte y refinación de petróleo han tenido progresos muy significativos, aunque los resultados obtenidos luego de su uso y aplicación no son efectivos, ya que en muchos casos originan consecuencias lamentables (Suleman, 2011). Es por ello que de los 15000 millones de ton de oro negro que año tras año se han extraído del subsuelo a nivel mundial, una porción significativa ha ido a parar al entorno, principalmente a los ecosistemas acuáticos, marítimos y fluviales, trayendo con sigo repercusiones que terminan afectando en última instancia la vida del hombre (Chang *et al.*, 2014; Martínez *et al.*, 2017). Aunque existen planes elaborados para la mitigación de este tipo de desastres ambientales, aún no llegan a tener una eficacia que garantice la minimización de los impactos, porque la introducción de éstos depende de factores demográficos, sociales, ecológicos y temporales; por ejemplo, las condiciones climáticas pueden mermar los esfuerzos de limpieza o cambiar el patrón de esparcimiento del fluido, dificultando la remoción del mismo; por su parte, algunas zonas son de difícil acceso, retrasando la implementación de las ayudas (Bostrom *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2014). Es así como desde hace décadas los derrames ocasionados en el planeta han representado una importante problemática que ha logrado traspasar fronteras, llegándose a convertir en uno de los recurso más controvertidos en la actualidad, que si bien debido a su increíble aplicabilidad y usos logra consolidarse como una de las fuerza motoras que impulsa a los países, sus daños colaterales sobre el medio facilitan en gran medida su rechazo en la población y motiva a realizar investigaciones en busca otras fuentes alternativas (Suleman, 2011). Actualmente se estima que solo en Europa hay un total de 2.5 millones de áreas contaminadas con hidrocarburos (Agnello *et al.*, 2016); de forma similar, regiones en Alaska, Golfo de México, las Islas Galápagos, Francia, la región del Delta del Níger en Nigeria y muchísimos otros lugares en todo el mundo se han visto afectados; en irank los suelos

recibieron millones de litros de aceite mientras transcurría el conflicto armado (Godleads *et al.*, 2015; Dzionek *et al.*, 2016).

Los ecosistemas reciben un duro golpe durante y después de los derrames de petróleo (Suleman, 2011). Las afectaciones en éstos se presentan a distintos niveles dependiendo de las características de cada derrame y del ecosistema en sí mismo, por lo que los vertimientos de grandes volúmenes, ocasionados en zonas cercanas a las costas y /o de alta diversidad biológica generan una perturbación muy acusado sobre la vida (Bautista & Rahman, 2017). En ese orden, los arrecifes de coral, manglares y marismas, que son de los lugares más productivos del planeta, se ven altamente afectados por este tipo de catástrofes, debido a que la estructura y funcionamiento de los mismos depende en gran parte de la buena salud de los seres vivos que los componen (Pashaei *et al.*, 2015). De esta forma, las manchas de petróleo pueden inhibir la fotosíntesis de las algas coralinas por bloqueo de luz, trayendo consigo alteraciones metabólicas en los corales conllevándolos a la muerte y con ello al resto de animales que de alguna u otra formas les necesitan para sobrevivir (alimento y refugio) (NOAA, 2010).

Las plantas y los animales atraviesan diversas complicaciones cuando se exponen indiscriminadamente a petróleo. En los primeros, se evidencia una disminución en el crecimiento, tasa fotosintética, la altura del tallo, la densidad y la biomasa por encima del suelo (Onwurah, 2007). Las afectaciones de los segundos se manifiestan en diversos sistemas, exponiendo la supervivencia de los individuos y de sus generaciones, especialmente en vertebrados como peces, aves y mamíferos. En los peces, la vulnerabilidad aumenta conforme disminuye su edad; por lo tanto, los huevos y larvas son los estadios con mayor riesgo dado a que los mecanismos de desintoxicación y barreras protectoras (membranas, tegumentos y asociados) no están totalmente desarrollados, reduciendo en gran medida el aislamiento de los constituyentes del petróleo, que se ha demostrado que son letales o en los mejores

casos les producen deformaciones morfológicas, cambios fisiológicos e inmunosupresión (Meier, 2010; Langangen *et al.*, 2017). En las aves empapadas, las plumas reducen su capacidad de impermeabilización y termorregulación, dificultando el vuelo y el equilibrio termostático; además, si estas ingirieron accidentalmente líquido, puede hacerse evidente la manifestación de irritación digestiva, alteraciones hepáticas y hormonales (Troisi *et al.*, 2016). Lo anterior conlleva que a nivel mundial más de 1 millón de estos vertebrados mueran anualmente a causa de tales desastres y menos del 1 % de las impregnadas con el aceite sobrevivan, incluso si fueron lavados por los encargados de la remediación (Troisi *et al.*, 2016). Los mamíferos sufren estragos parecidos; el sistema respiratorio se ve seriamente afectado por la inhalación de los compuestos aromáticos; también se registra daño en órganos vitales por la ingesta, pérdida de regulación térmica y abando de crías por el fuerte olor del crudo en especies donde el reconocimiento entre congéneres se da por señales olfativas; todo ello con perturbaciones profundas sobre la su longevidad y fecundidad (Helm *et al.*, 2015).

La salud del hombre puede verse tremendamente afectada por la exposición a derrames de petróleo, dado a que numerosos estudios muestran que una amplia gama de parámetros fisiológicos y bioquímicos se ven desfavorecidos por el contacto directo y prolongado con este tipo de sustancias, desencadenando una gran variedad de enfermedades que en los peores casos pueden ser fatales si no se intervienen a tiempo (Ramírez *et al.*, 2017). La exposición a largo plazo puede causar discrepancia en los valores normales de glóbulos blancos, hematocrito, hemoglobina y creatinina; daño oxidativo al ADN y aberraciones cromosómicas; variación en la movilidad y conteo de espermatozoides e interrupción del desarrollo; desequilibrio en el sistema nervioso central, somnolencia, disminución de la capacidad para concentrarse, cansancio desmesurado, mareos, ansiedad, cambios de personalidad, depresión y estrés; aumento de la condición asmática y bronquitis; irritación cutánea; y como si fuera poco se suma también

el riesgo a desarrollar cáncer de piel, hígado, esófago, faringe, laringe, recto, riñón, vejiga y de cervix (Ramírez, *et al.*, 2017).

La mayoría de las repercusiones mencionadas en párrafos anteriores, se deben a la alta estabilidad y toxicidad de los constituyentes del petróleo, en especial de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que se ha registrado pueden permanecer en los hábitats por más de 30 años (por ejemplo, regiones polares donde la actividad metabólica microbiana es lenta) (Speigth, 2014). Los datos revelan que son las sustancias más tóxicas, por su elevado grado de genotoxicidad, mutagenicidad y teratógenicidad, uniéndose directamente al ADN y alterar los patrones de expresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular (Bergeon *et al.*, 2014; Ruda *et al.*, 2017). Por ello, la Agencia de Protección Ambiental de los EEUU (EPA), recopiló una lista con los 16 HPA de mayor riesgo para la salud pública y el ambiente, siendo todas estas moléculas de la fracción volátil del crudo (Shen, 2016). Dichos hidrocarburos, por citar solo algunos ejemplos, han sido halladas en concentraciones elevadas en sangre de aves, huevos de tortugas y pieles de serpientes (Bergeon *et al.*, 2014). Lo anterior se explica porque los HAP pueden bioacumularse y biomagnificarse; ya su afinidad a los sedimentos de los ríos les permite su incorporación, usando como punto de entrada a los gusanos detritívoros; por su parte, el zooplanton de los ecosistemas marinos es capaz de secuestrarlos al ingerirlos con las microgotas de aceite que se generan tras la disipación de los derrames (Lee *et al.*, 2015).

El derrame de petróleo más grande ocurrido recientemente fue en el golfo de México en 2010, lugar en el que la columna de agua recibió 100 millones de barriles, considerándose como uno de los más catastróficos de la historia donde a corto plazo se perdió una cantidad importantísima de bivalvos, anfípodos, reptiles, aves y mamíferos; mientras que con el correr de los años, se registró una disminución

de la diversidad vegetal de las costas y afectaciones en el suministro de detritos (Beyer *et al.*, 2016; Brakstad *et al.*, 2018).

En Colombia el panorama no es muy alentador, pues en los últimos 38 años se han derramado más de 3.7 millones de barriles de petróleo, de los cuales la mayoría son producto de atentados a las redes de transporte del crudo por parte de los grupos armados al margen de la ley, lo que deja de manifestar el aporte constante de este líquido al medio y las repercusiones que ello trae consigo (Guerrero, 2018; Pardo 2018). Historialmente, en 11 oportunidades este recurso ha impactado de manera catastrófica los ecosistemas naturales del país, siendo incorporados al medio más de 2.9 millones barriles conjuntamente en los derrames de Sain Peter (1976), Deedalus (1996), Rio Rosado (2000), Bahía de Cartagena (2001), Caño limón Coveñas (2001), Boyacá (2002), Cartagena (2005), Caño Limón Coveñas (2007), Reserva Natural de las Aves de Pagán (2009), Caño Limón Coveñas (2015), Ocaña (2015), Tumaco (2015) y Putumayo (2015) (Velásquez, 2016). Según la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA) entre los periodos ocurridos entre el primer trimestre de 2013 y el tercero de 2018 ocurrieron más de 600 derrames; contabilizándose solo en el último año un total de 18 000 barriles incorporados, siendo las zonas más afectadas los departamentos de putumayo, Nariño, Santander, Cesar y Sucre (Velásquez, 2017; ANLA, 2018). Lo anterior se acompaña del vertimiento de aguas del petróleo en los caños y arterias fluviales del país, lo que agudiza a un más el impacto.

### 3. Justificación

Las técnicas de tratamiento convencionales para la mitigación incluyen la precipitación química, el intercambio iónico, la ósmosis inversa, la coagulación, adsorción por carbones activados y la combustión, que a pesar de ser eficaces, consumen cantidades exorbitantes de energía y una desmesurada gama de productos químicos, cuyas secuelas al momento de su utilización pueden ser peores que incluso el problema de contaminación mismo, puestos que en ocasiones originan derrames, corrosión o aumento de la toxicidad; sumado a ello, la velocidad de implementación de dichas tecnologías en muchos casos se ve restringida por las características del ambiente a remediar (Fingas, 2013). Por su parte, el enfoque biorremediativo, especialmente el uso de microorganismos, es una alternativa prometedora, debido a que las investigaciones han mostrado que bacterias, levaduras y algas sobreviven en entornos que contienen desechos nocivos por su capacidad para reducir, acumular, secuestrar, absorber y oxidar esas sustancias, convirtiéndola en una tecnología más amigable, pues en la mayoría de los casos los residuos metabólicos originados son mucho menos tóxicos e incluso inocuos; además, sus bajos costos de operatividad, de hasta diez veces menor (Perelo, 2010). Actualmente estas técnicas se utilizan ampliamente para restaurar los valores naturales y útiles de los sitios contaminados (Mosa *et al.*, 2016).

La biorremediación utiliza las maquinarias metabólicas y moleculares bajo condiciones ambientales favorables para descomponer los contaminantes, especialmente hidrocarburos del petróleo (Godleads *et al.*, 2015; Kadry *et al.*, 2018). No obstante, ha sido eficaz en la eliminación de plástico (Gnamavel *et al.*, 2013; Bunty *et al.*, 2017), pesticidas (Ray, 2014), metales pesados (Dash & Das, 2012; Wood & Franks, 2016; Bernard *et al.*, 2018), fármacos y sus residuos (Mansour *et al.*, 2012), radionúcleidos (Yang *et al.*, 2015), compuestos de cianuro y colorantes artificiales (Brar *et al.*, 2017; Chand *et al.*, 2017).

Dentro de los microorganismos presentes para la biorremediación, el uso de microalgas (ficorremediación) viene jugando un papel significativo en décadas recientes (Paran *et al.*; 2014; Brar *et al.*, 2017), ya que son organismos que poseen una alta versatilidad metabólica que les permite crecer autotrófica, heterotróficamente y mixotróficamente (por ejemplo, *Chlorella* sp.), reduciendo los costos de operatividad y mantenimiento y a la vez brindando un manejo más factible (Mohammad *et al.*, 2015). Estas células no son patogénicas, no producen desechos tóxicos, aumentan los niveles de O<sub>2</sub> y disminuyen los de CO<sub>2</sub>, controlan poblaciones bacterianas, reducen la producción de lodos y olores fétidos, restringen la carga de sólidos dispersos, mejoran el aspecto del agua y la biomasa generada tiene un alto potencial de aprovechamiento, tanto en la industria energética como como en la agrícola y acuícola (Abdelaziz *et al.*, 2014; Brar *et al.*, 2017).

Entre las algas más destacadas en ficorremediación se encuentran las especies del género *Chlorella*, debido a sus atributos metabólicos y fisiológicos que se le hacen ser un candidato excelente para este tipo de trabajos (Andrade & Andrade; 2017). Entre ellos, alta velocidad de crecimiento, tolerancia a un rango amplio de pH, capacidad para crecer bajo distintas condiciones y una tasa fotosintética que supera con creces a las de las otras microalgas (Mirzaei *et al.*, 2015; Angulo *et al.*, 2017). Se ha evaluado su potencial para remover metales pesados (níquel, cadmio, mercurio y plomo) (Andrade & Andrade, 2017); fármacos de distintos tipos (Hernández & Labbè, 2014); aguas residuales municipales, textiles (Vacca *et al.*, 2017); nitrógeno y fósforo (Mirzaei *et al.*, 2015); hidrocarburos de petróleo (Kalhor *et al.*, 2017; Vitola *et al.*, 2018); todos con resultados satisfactorios.

*Chlorella*, al igual que otras algas, se cultivan de dos formas diferentes para procesos ficorremediativos; en uno de ellos las células se encuentran libres en solución (células libres) y en el otro,

crecen sobre una matriz polimérica formando una biopelícula (inmovilización) (Di *et al.*, 2016; Jyothi, 2017). Los datos muestran que la inmovilización es una alternativa mucho más favorable en comparación con la forma libre, principalmente por dos razones; la primera, radica en que las células se vuelven más tolerantes a los contaminantes que están remediando debido a las propiedades de retención y aislamiento de las sustancias extracelulares de la biopelícula y la segunda, está referida a que se puede alcanzar densidades celulares más altas con las que se pueden remover más cantidad de impurezas (Botello *et al.*, 2016; Uma *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2019). Otro punto a resaltar es el tipo de matriz a utilizar, dado a que esta también influye en los resultados a obtener, si bien se maneja alginato como sustrato de fijación estándar para estas investigaciones, la literatura muestra que otros han demostrado tener rendimientos elevados, tales como las fibras de lignocelulosa que componen el endocarpio del fruto de *Luffa cilíndrica* (estropajo), que gozan de una accesibilidad económica mayor, son fácilmente biodegradables y se han empleado para la inmovilización de tejidos animales, vegetales y fúngicos, células bacterianas; ácidos orgánicos y enzimas; sumado a ello, permite un mayor tiempo de utilidad del cultivo por que aumentan la supervivencia de las células (Saeed & Lobal, 2013; Bayat *et al.*, 2015).

Gracias a toda la evidencia recolectada y expuesta anteriormente en la problemática y justificación de este proyecto, el Grupo de Investigación en Bioprospección Agropecuaria (GIBA) planteó las siguientes preguntas de investigación: ¿la técnica de inmovilización en cultivo en lote mejora la capacidad de *Clorella sp* para la ficorremediación de petróleo crudo? Y ¿bajo qué condición de crecimiento se obtienen los mejores resultados?

## 4. Objetivos

### General

- Determinar el potencial de fitorremediación de petróleo con *Chlorella sp* inmovilizada bajo condiciones Mixotróficas y Heterotróficas.

### Específicos

- Evaluar la capacidad fitorremediativa de hidrocarburos del petróleo por *Chlorella sp.* bajo condiciones de crecimiento mixotrófico y heterotrófico.
- Cuantificar la productividad de biomasa algal y pigmentos fotosintéticos por *Chlorella sp.* en los diferentes tratamientos.

## 5. Marco teórico

### 5.1 Antecedentes

Los inicios de la biorremediación como campo de estudio se remontan a los años 40, cuando las primeras investigaciones fueron realizadas, a pesar de que se ya se tenía conocimiento de la existencia de microorganismos capaces de degradar algunos hidrocarburos de petróleo, incluidos derivados como la gasolina (Busenell & Has, 1940; Zoball, 1946; Hoff, 1993; Atlas & Hazen 2011).

Dentro de la variedad de organismos usados para la remediación de hidrocarburos de petróleo, se encuentran las microalgas. Los primeros estudios, realizados por Walker en 1975 revelaron que *Prototheca zopfii*, un pariente cercano de *Chlorella*, llevó a cabo la degradación de alcanos, isoalcanos y HAP a partir de una fuente de crudo; más tarde Cerniglia y colaboradores (1979 y 1980) mostraron la capacidad de diversas especies de algas para la degradación de naftaleno (Jain & Cerniglia *et al.*, 1980; Vigna *et al.*, 2002; Baipai, 2008).

Durante la década de los 80 surgió un nuevo panorama para la remediación con microorganismos, ya que por primera vez se empleó la inmovilización como una técnica para mejorar el rendimiento. En 1985 Clevier y Noue llevaron a cabo dos estudios pioneros (Clevier & Noue 1985 a y b) donde tras inmovilizar células de *Scenedesmus acutus*, *Scenedesmus obliquus*, *Scenedesmus quadricauda* en perlas de carragenina, lograron resultados más satisfactorios, de los que ya ofrecía la literatura, para la remoción de nitrógeno y fosforo, proponiendo este método como una alternativa rentable para depuración de aguas residuales, en comparación con los cultivos en suspensión, los cuales presentaban deficiencias en cuanto a la recuperación de la biomasa tras el tratamiento. Azku y colaboradores (1997) usaron alginato y agarosa para el atrapamiento de *Chlorella vulgaris* para el secuestro de cobre. Éstos determinaron que

ambas matrices, aunque por si solas podían absorber al elemento, la inclusión de las células de *Chlorella* aumentaban significativamente la absorción, siendo mayor en agarosa que en el alginato por la acusada capacidad difusiva de la primera. A principios de 1998, Suzuki y el resto de su equipo investigaron la degradación de hidrocarburos de petróleo como tetradecano, pentadecano y hexadecano (C40, C50 Y C60) por *Prototheca zopzi* encapsula en alginato de calcio, comparando el remiendo con cultivos en solución. Los datos indicaron que, tras 14 días de interacción con las células inmovilizadas, se alcanzó una degradación del 100 % de dichas sustancias, comprobando así la viabilidad de dicho sistema.

Akhtar y colaboradores (2002) llevaron a cabo por primera vez la inmovilización de especies de *Chlorella* en segmentos de *Luffa cylindrica*, para la absorción de Cadmio; este metal fue retirado del medio con una eficiencia de entre 89,7 y 93,5 % tras 5 minutos de exposición, y de 97,9 % transcurrida 1 hora. Estos mismos autores (Akhtar *et al.*, 2004) investigaron la eficiencia de este sistema con otros metales pesado, como el plomo. En este caso, se obtuvo que para soluciones de 10 a 300 mg/L la remoción ascendió en promedio a valores cercanos al 96% al cabo de 5 minutos de montaje. Así mismo, dichos investigadores encontraron que *Chlorella sorokiana*, extrajo 17,79 % más cromo cuando se encontraba inmovilizada que cuando se dejó en interacción con éste en solución (Akhtar *et al.*, 2008).

Como se pudo observar, no se mostraron en este apartado investigaciones referidas a la efectividad de especies del genero *Chlorella* en la remoción de petróleo, inmovilizadas en *Luffa cylindrica*, debido a la aparente inexistencia de este tipo de estudios, aunque si pueden encontrarse aquellos en donde se remueven estas sustancias con las mismas algas, pero en solución (Hamouda *et al.*, 2016; Vitola *et al.*, 2018). Por ello, puede afirmarse, que este es la primera investigación que muestra resultados de remoción de petróleo por *Chlorella* inmovilizada, en segmentos de *Luffa cylindrica*.

## 5.2 Aspectos generales sobre el petróleo

### 5.2. 1. Origen

El termino petróleo, que literalmente significa aceite de roca, es el término acuñado para designar a un fluido viscoso de apariencia aceitosa, de coloración marrón, integrado por una mezcla altamente compleja compuesta mayoritariamente de hidrocarburos y cantidades pequeñas de nitrógeno, azufre, oxígeno y metales pesados a (Cyprian, 2011; Duarte et al., 2016)

El petróleo se forma bajo tierra, donde las presiones y temperaturas extremas dan como resultado la aparición de depósitos de ésta sustancia, tras millones de años (McCarthy, 2011). Su principal precursor es el kerògeno, definido como aquel conjunto de restos orgánicos localizados entre las formaciones de rocas sedimentarias (Walters, 2007). A su vez, éste último tiene como fuente de origen la materia orgánica (MO) que escapó a la degradación realizada por los microorganismos que habitan los sedimentos, ya sea por sepultamente rápido o por deposición en ambientes anoxicos donde la velocidad de la degradación se reduce; en cualquiera de estos dos escenarios, la MO puede conservarse a medida que se va acumulando y transformarse en kerògeno (Walters, 2007; Willey et al., 2014). Algunos autores citan que gran parte de los depósitos de crudo de la actual se produjeron a partir de los restos de bacterias muertas de en los sedimentos (a partir de los hopanoides de la membrana celular) (Willey *et al.*, 2014). No obstante, se acredita a plantas y algas como los precursores mayoritarios, siendo algunos de los constituyentes de sus paredes celulares los aportadores cruciales; se contempla que entre el 0,1 y el 1 % de la biomasa viva de estos organismos se convirtió en kerògeno (Vandenbroucke & Largeau, 2007).

## 5.2. 2. Constituyentes

El petróleo es un fluido aceitoso, de coloración marrón oscura, en el que están mezclados más de 17 000 tipos de moléculas que pueden agruparse entre sí dependiendo de las propiedades químicas y físicas que posean (Demirbas & Taylon, 2016). Pueden verificarse cuatro grandes grupos de compuestos, a saber, hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfáltenos, que en conjunto reciben la denominación de SARA por la inicial de cada término (Muhammad *et al.*, 2013).

### 5.2.2.1 Saturados y aromáticos

Los hidrocarburos saturados son los constituyentes mayoritarios del SARA, comprenden moléculas cuyos átomos de carbono se conectan por enlaces simples, teniendo los restantes ocupados con átomos de hidrógeno. Se definen tres subgrupos dentro de esta fracción: alcanos e isoalcanos (figura 1 a y b), naftenos o cicloalcanos (figura 1 c) y alifáticos de anillos fusionados (Farmani & Schardar, 2013). Los primeros contemplan moléculas con estructuras lineales, ramificadas y cíclicas, mientras que en los últimos se encuentran compuestos más complejos como algunos esteroides y hopanoides . La toxicidad de esta fracción es variable, de tal forma que los cicloalcanos son los compuestos más tóxicos, seguidos de los isoalcanos y por último los alcanos. Los isoalcanos y cicloalcanos son más resistentes a la degradación microbiana, mientras que los alcanos se desdoblan con menor dificultad; no obstante, las parafinas de cuarenta átomos de carbono en adelante se vuelven indegradables (Boufadel et al., 2015).

La siguiente fracción del petróleo la constituye los hidrocarburos aromáticos, que se definen como moléculas cíclicas con dobles enlaces conjugados en resonancia (libro de bioorganica). El petróleo contiene hidrocarburos monoaromáticos (un ciclo), diaromaticos (dos ciclos) y poliaromáticos –HAP- (más de dos ciclos), siendo los más destacados el benceno, naftaleno y benzo(a)pireno; respectivamente

(figura 1 d, e y f). La toxicidad aumenta a medida que lo hace el número de ciclos al tiempo que también crece la resistencia a la degradación, de forma tal que los HAP son los más tóxicos de esta fracción y del petróleo; además, bajo la influencia de radiación UV estos se vuelven fototóxicos, afectando a crustáceos, moluscos y peces (Barron, 2017). Cabe resaltar que, debido a su bajo peso molecular, los monoaromáticos son los más volátiles, por lo que pueden ser inhalados durante la ocurrencia de derrames, tanto por el hombre como por los animales expuestos, aumentando de este modo el riesgo a desarrollar enfermedades respiratorias.

#### 5.2.2.2 Resinas y asfáltenos

La resina corresponde a la fracción de mayor polaridad del petróleo, compuesta de moléculas con anillos aromáticos fusionados que pueden presentar ramificaciones saturadas, conteniendo también átomos de oxígeno (figura g), azufre y nitrógeno (Demirbas & Taylon). Son insolubles en tolueno, pero solubles en propano líquido, por lo que pueden separarse de las asfáltenos que son soluble en el primero.

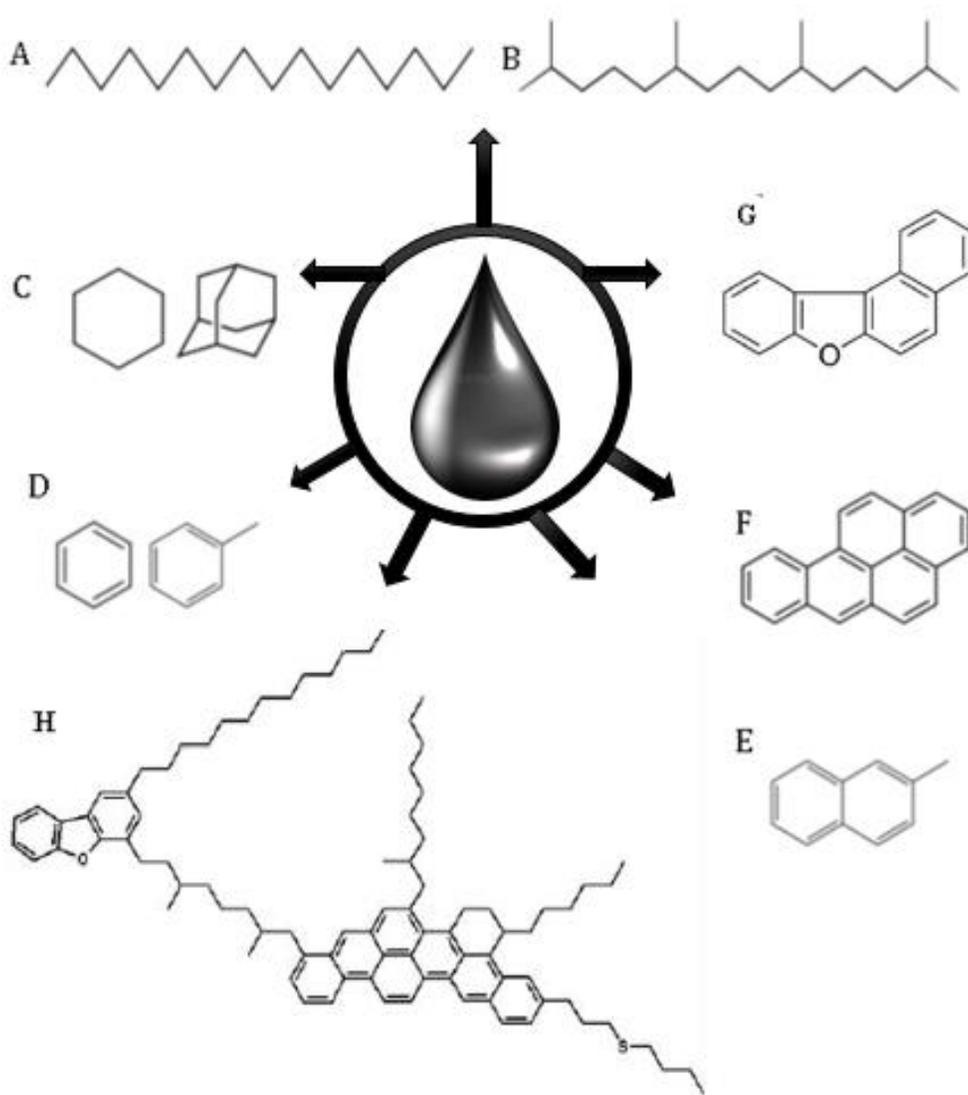
Los asfáltenos se definen como aquella fracción del petróleo que es soluble en pentano o heptano, pero insoluble en tolueno, en donde residen los componentes de mayor peso molecular (Farmani & Schardan, 2013). Esta definición, basada en su solubilidad, es producto de que actualmente aún se debate sobre la composición y estructura molecular de esta fracción, dado a que ha sido poco investigadas, pues se le considera como residuo y también porque los métodos más comunes empleados para el análisis de crudo solo contemplan a las fracciones más ligeras (saturados y aromáticos) dejándolos de lado, lo que como consecuencia ocasiona que se suelen plantearse hipótesis de aspecto que podrían tener (figura 1 h) (Santos et al., 2016). Éstas sustancias son reconocidas en la industria petrolera por obstruir los ductos de transporte del petróleo debido a que se adhieren a la superficie internas de éstos; esta característica es tan común que algunos les apodan como “colesterol de petróleo” (Boufadel et al., 2015; Salimi et al., 2016).

En las refinerías durante el almacenamiento del crudo se depositan en el fondo de los contenedores cantidades significativas e residuos ricos en resinas y asfáltenos (lodos de petróleo), que generalmente son vertido en terrenos cercanos cuando se hace el mantenimiento de los tanques, sin tener en cuenta las afectaciones sobre la fauna y microbiota del suelo que esto puede llegar a tener a tener debido a persistencia de estas sustancias y a su toxicidad (Teharani *et al.*, 2014).

#### 5.2.2.3. Constituyentes menores

En el petróleo también puede verificarse cantidades pequeñas de otros compuestos nitrogenados, oxigenados, azufrados, y metaloporfirinas que pueden contener en sus estructuras hierro, vanadio, níquel o cobre (Boufadel *et al.*, 2015).

**Figura 1.** Estructuras moleculares de algunos constituyentes presentes en el petróleo. A - alcano (Hexadecano), B – Isoalcano (pristano), C – cicloalcanos (ciclohexano –izquierda- y adamantiano – derecha-), D – monoaromáticos (Benceno – izquierda – y tolueno – derecha-), E – diaromático (2 metilnaftaleno), F - Poliaromático (benzo[b]pireno), G – Resina (Benzo[b]naptofurano) y H – Asfalteno hipotético. Tomado, adoptado y modificado de Boufadel et al., 2015.



### 5.2.3 Toxicidad del petróleo.

Como se ha mencionado en reiteradas oportunidades a lo largo de este trabajo, el petróleo es una sustancia perjudicial para la mayoría de los seres vivos, dado a la toxicidad de sus constituyentes, entre ellos los Hidrocarburos aromáticos policíclicos, que son los más dañinos. Sin embargo, no se ha mostrado el mecanismo que explica el poder genotòxico y mutagènico de estas sustancias. Por ello, en los párrafos sucesivos se desvelarán dichos procesos.

La mayoría de los organismos, incluyendo el ser humano, son capaces de metabolizar los hidrocarburos aromáticos policiclicos, convirtiéndolos en metabolitos que luego pueden ser excretados al medio con relativa facilidad.

En los vertebrados el metabolismo de sustancias potencialmente nocivas tiene lugar en el hígado; donde son transformadas, y desde allí transportadas, para luego ser excretadas por la orina y/o bilis al exterior del cuerpo (Nair *et al.*, 2016; Jaimes *et al.*, 2014). Para ello, las células hepáticas utilizan el citocromo P450, un sistema enzimático compuesto por un conglomerado de monooxigenasas, localizadas mayoritariamente en el retículo endoplasmático liso, que, tras una serie de sucesivas reacciones, oxidan las moléculas mediante la incorporación de grupos hidroxilos, aumentando así la reactividad molecular y permitiendo su combinación con otros metabolitos celulares, generalmente carbohidratos, favoreciendo su transporte y excreción (incremento de la solubilidad) (McDonnell & Dang, 2013; Nair *et al.*, 2016). No obstante, la reactividad comienza a ejercer efectos negativos cuando el organismo se ve expuesto a concentraciones elevadas de la sustancia por periodos significativamente prolongados, ya que estos derivados hidroxilos u oxigenados comienzan a acumularse y a reaccionar con proteínas y ADN (capítulo de HAP). (Nair *et al.*, 2016).

#### 5.2.4. Mecanismos de degradación microbiana del petróleo

Como se mencionó en la sección anterior, el P450 es el sistema utilizado por muchas especies para neutralizar algunos constituyentes del petróleo; sin embargo, existen microorganismos que cuentan con los aparatos enzimáticos necesarios para degradar estas sustancias y aprovecharlas como una fuente rica de carbono y energía para así sustentar sus procesos celulares (Pandey *et al.*, 2016). Lo anterior explica la capacidad de algunos microorganismos para desarrollarse sin complicaciones en este aceite, pues lo utilizan como un recurso para su crecimiento y reproducción, de ahí que los utilice para practicar la remediación en ambientes contaminados con petróleo. Dentro del repertorio de enzimas encargadas del metabolismo de los hidrocarburos de petróleo, se encuentran las oxigenadas que conducen la oxidación de estas moléculas para su aprovechamiento como fuente de carbono o energía (Yemashova *et al.*, 2010).

Aunque en bacterias se han realizado cuantiosas investigaciones para desvelar los mecanismos enzimáticos tras la biodegradación de petróleo, en las microalgas la literatura no es consistente, ya que aún no se conoce a profundidad estos mecanismos, hallándose solo un estudio de 1999 en donde se muestra la biodegradación de HAP, siendo similar a lo ya comentado anteriormente en este documento; sin embargo, del resto de constituyentes no hay esclarecimiento alguno.

#### 5.2.5. Derrames de petróleo

Un derrame de petróleo se define como la introducción al ambiente de forma accidental o intencionada, de una cantidad igual o superior a un barril de petróleo que corresponde a 159 L. No obstante, como se describirá a continuación, las complicaciones para los seres vivos y el hombre,

comienzan a tomar relevancia e importancia cuando son introducidos de manera discriminada cantidades mucho mayores a la mencionada.

#### 5.2.6 Derivados del petróleo y efectos en el ecosistema

La enorme cantidad de compuestos químicos presentes en el petróleo, permiten la obtención de un gran número de productos tanto de uso cotidiano como industrial, entre los que se destacan la gasolina, diesel, keroseno, aceite de motor, nafta, asfaltos, carbón, nylon, plástico y numerosos solventes orgánicos (metanol, etanol, benceno, propanona, entre otros) (Cyprain, 2011).

Los derivados del petróleo por si mismos son capaces de generar un impacto acusado sobre el medio. Las más de 18 000 millones de toneladas de CO<sub>2</sub> y 5 000 millones de azufre que año tras año se liberan a la atmosfera, tienen su origen en la quema de combustibles obtenidos a partir de este recurso, así como también los 5 billones de partículas de plástico (250 000 toneladas) que flotan actualmente solo en los océanos; todo ello repercutiendo negativamente sobre los seres vivos (Smith et al., 2011; Eriksen et al., 2014). Por tal razón se busca la implementación masiva de alternativas de reemplazo que minimicen los impactos ocasionados, también técnicas que permitan una mayor eficiencia y eficacia de remediación.

### **5.3 Aspectos básicos sobre Biorremediación**

#### 5.3.1 definición y principales características

La Biorremediación es un conjunto de técnicas que considera la implementación de organismos vivos, partes de éstos o sus productos metabólicos para la remoción, degradación o transformación de agentes contaminantes en sustancias de menor toxicidad o inocuas para el ambiente, mejorando a la vez las condiciones de crecimiento microbianas para aumentar la eficiencia y la eficiencia del proceso

(Sharma, 2012). Ésta se basa en la capacidad que poseen determinados microorganismos para incorporar contaminantes en sus procesos metabólicos y usarlos como fuente de energía y/o carbono (Ortiz et al., 2018). Se ha utilizado una considerable variedad de especies para este propósito, en las que destacan algunas bacterias (*Pseudomonas*, *Clotridium*, *Metanobacterim* y *bacilus*), hongos (*Candida*), algas (*Chlorella*, *Scenedesmus* y *Sargassum*), plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Rizophora mangle*, *Eicohorina crassipes*) e incluso animales (*Artemia* y *Eisenia*) (Erdogan & karaca, 2011; Farag, & Soliman, 2011; Azubuike et al., 2016; Piccini; et al., 2019). Este enfoque ha sido exitoso en la remediación de nitrógeno, fósforo, metales pesados, residuos industriales, agrícolas y farmacológicos, aguas residuales, plástico, desechos nucleares, aceite de motor, gasolina, diésel, petróleo y algunos de sus derivados; sin embargo, los esfuerzos más notables se han ejecutado para la eliminación de éstos dos últimos, quienes en última instancia potenciaron su auge e implementación (Gani et al., 2015).

### 5.3.3 Enfoques biorremediativo: Ficorremediación

Dentro de los enfoques de la Biorremediación se encuentra la ficorremediación, que implementa el uso de algas, tanto macroalgas como microalgas, para la remediación de entornos contaminados, especialmente ecosistemas acuáticos (Gani et al., 2015). Se han usado para la remoción y degradación de nitratos, nitritos, metales pesados, pesticidas, desechos radiactivos, toxinas, bisfenoles policlorados, explosivos (TNT) e hidrocarburos de petróleo, obteniendo con ello resultados satisfactorios (Priyadarshani et al., 2011; Ben et al., 2014). Dentro de los géneros de microalgas más usados destacan *Scenedesmus*, *Phormidium*, *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Desmodesmus*, *Arthrospira*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Cyanothece*, *Scenedesmus* y *Chlorella*; mientras que para las macroalgas, son pioneras en este campo *Gracilaria*, *Ulva*, *Sargassum* y *Oedogonium* (Marinho et al. 2011; Roberst et al., 2015; Mostafaii et al., 2016; Piccini et al., 2019). Se ha implementado el uso

combinado de macroalgas y microalgas para la remediación de metales pesados con resultados promisorios en la remoción de Níquel, Zinc, Cadmio y cobre, dando pie a una expansión de las posibilidades en este campo (Piccini et al., 2019).

#### 5.4.2. Generalidades sobre el género *Chlorella*

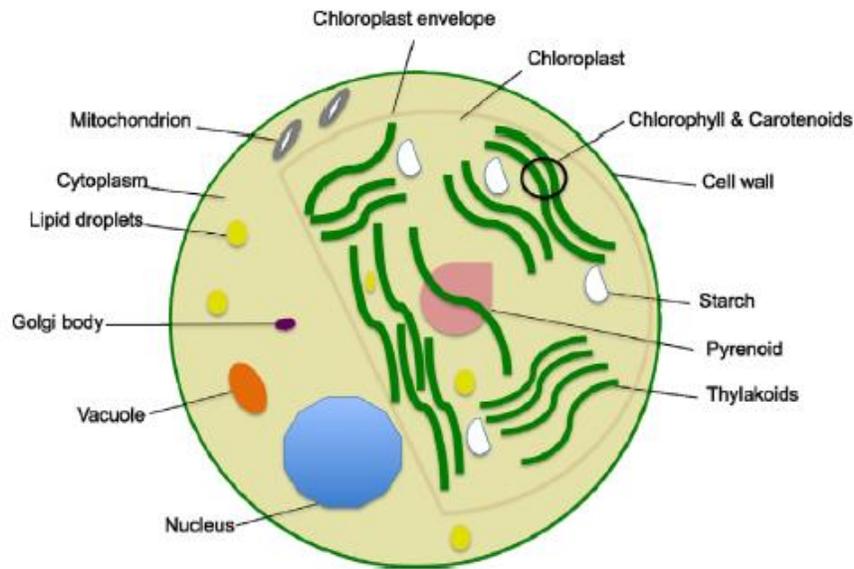
*Chlorella* es un género comprendido por 30 especies de algas verdes pertenecientes a la familia Chlorophyceae que se distribuye básicamente en todas las regiones del planeta, siendo especialmente abundantes en ecosistemas marinos y dulceacuícolas tropicales, en donde es quizás la microalga más frecuente de las comunidades fotosintéticas de las que hace parte, lo que explica por qué han sido muy estudiadas, pues son especies relativamente fáciles de detectar (Hodac et al., 2016).

*Chlorella* forma células elipsoidales de 2 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro (Figura 2), con envoltura gelatinosa y autoesporas que contiene clorofila a y b a las que deben su coloración verdosa (Infante, 2012; López & Andrade & Andrade, 2017; Mesa, 2017). Sus especies son consideradas como las de más rápido crecimiento, variando su ciclo de división celular de 22 hasta 3.5 horas cuando se encuentra en fase exponencial (Infante, 2012). Éstas especies tienen un alto valor económico y comercial debido a la facilidad en su cultivo, su elevado valor nutricional, y sus amplios rangos de tolerancia a niveles de pH, salinidad, temperatura y luminosidad (Lopez et al., 2015). Se han utilizado para la extracción de metabolitos como proteínas carbohidratos, lípidos, proteínas, minerales; para la producción de biodiesel y biogás; en la industria cosmética; y como suplementos alimenticios para humanos y animales (Safi et al., 2014).

Investigaciones novedosas han demostrado el efecto positivo de algunas bacterias promotoras de crecimiento vegetal sobre el crecimiento de especies del genero *Chlorella* sp. lo que abre las puertas a un

nuevo enfoque en el que se pueda extraer de estas bacterias las moléculas responsables de tal virtud y adicionar al cultivo para así aumentar los rendimiento de la remediación

**Figura 2.** Esquema de una célula de *Chlorella vulgaris*, se aprecian la localización de las principales organelas y de algunos pigmentos fotosintéticos y gránulos de almidón. Tomando y adoptado de Safi et al., 2014.



#### 5. 4. 3 Metabolismo microalgal

Las microalgas son considerados organismos versátiles, dado a su capacidad de adaptar su metabolismo dependiendo de las condiciones ambientales a las que se vean sometidas (Hamed, 2016). De esta forma, se ha evidenciado que algunas especies, dentro de las que se incluyen las del genero *Chlorella*, pueden crecer autotróficamente, heterotróficamente y mixotróficamente (Cecchin et al., 2014;

Hamed, 2016). En el primer caso, las células utilizan la luz y el CO<sub>2</sub> como fuente de energía y carbono; respectivamente, logrando como resultado su bioaumentación y la acumulación de productos fotosintéticos, siendo algunos de ellos de gran valor comercial (Li et al., 2014). Por su parte, La heterotrofia puede acelerar la tasa de crecimiento y aumentar la biomasa con respecto al metabolismo autotrófico, debido a que la fuente de carbono, que también se convierte en la de energía, está disponible en mayor proporción para el microorganismo, lo que facilita su captación y asimilación; en detrimento de la capacidad fotosintetizadora por la ausencia de luz (Morales et al., 2014). A su vez, la mixotrofia permite obtener porcentajes de biomasa aún más altos, porque además de proporcionar una fuente abundante de carbono, da accesibilidad a una de luz, favoreciendo la capacidad fotosintetizadora y superando con esto las limitaciones de las dos formas anteriores (Cecchin et al., 2014).

## 6. Metodología

Este estudio es de corte experimental y fue desarrollado en las instalaciones del laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre, bajo la dirección y cargo del grupo de investigación en Bioprospección Agropecuaria (GIBA) de la misma universidad.

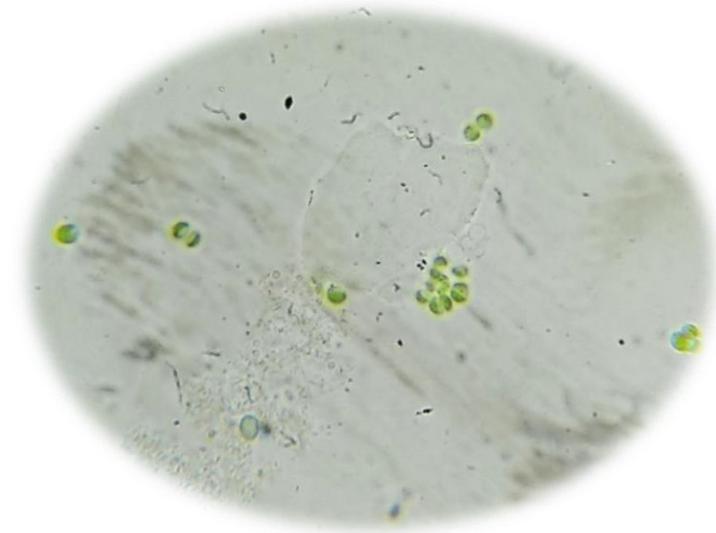
### 6.1 Descripción general del experimento

En este estudio se emplearon recipientes de vidrio de 600 ml para los minificobioreactores, donde se llevó a cabo la remoción de petróleo por *Chlorella* sp. inmovilizada en segmentos de lignocelulosa de endocarpio de fruto seco de *Luffa cylindrica*. Para tal propósito, se evaluaron 4 días de exposición por condición de crecimiento, siendo 3, 6, 9 y 12 los escogidos, pues corresponde a aquellos donde el microorganismo mostró la mayor tasa de replicación (basados en los resultados arrojados por la curva de crecimiento) y aumento de biomasa (infante *et al.*, 2012). *Chlorella* sp. Fue sometida a condiciones de crecimiento heterotróficas y Mixotróficas, determinando con ello el medio y los días más óptimo para retirar hidrocarburos. Las concentraciones de crudo evaluadas fueron 5, 10, 15 y 20 g/L (0,5, 1, 1,5 y 2 % v/v), con lo que se obtuvo un diseño en el cual se contemplaron dos (2) condiciones de crecimiento, cuatro (4) días de exposición, cuatro (4) concentraciones y un (1) control y tres (3) repeticiones; totalizando 120 unidades experimentales.

En este estudio se calcularon parámetros tales como % de remoción, biomasa seca (BS) y concentración de pigmentos fotosintético, que juntos relacionan la efectividad del *Chlorella* sp. inmovilizada para procesos ficorremediativos en las diferentes condiciones de crecimiento utilizadas.

**Figura 4.** Cultivo celular de *Chlorella* sp. utilizado en los experimentos. Nótese la variabilidad en la disposición de células, presentándose de forma individual -fechas verdes- o en conjunto que varían de 2

a 7 células – flechas azules-; como consecuencia del esparcimiento causado durante el montaje en microscopio. Las muestras se observaron a 40 X a una absorbancia de 0,5.



## 6.2 Bioaumentación y curvas de crecimiento

La construcción de la curva de crecimiento estuvo relacionada con la bioaumentación de la microalga, ya que el tiempo y la DO de inicio de ésta se solapó con el de aquella, usándose para ello los mismos cultivos.

### 6.2.1 Bioaumentación

La bioaumentación de *Chlorella* sp. se llevó a cabo en fotobioreactores de 3,5 L, a partir de una muestra de microalgas con una densidad óptica (DO) de 1,6 ( $16 \times 10^6$  células/ml) (Xiong *et al.*, 2017). Se realizaron los cálculos pertinentes para la determinación del volumen del microorganismo a tomar para obtener una DO de 0,1 ( $0.1 \times 10^6$  células/ml), valor de referencia para el inicio de la prueba (ecuación

1). Estos 218 ml fueron centrifugados a 7000 rpm por 5 minutos y se realizó dos lavados con agua destilada estéril para eliminar cualquier tipo de residuo. El pellet se depositó en el recipiente previamente autoclavado, se enrasó con agua destilada estéril hasta 3,5L y se agregó medio de crecimiento Agrimins a 4 mmol como bioestimulador, que brinda todos los elementos esenciales para su metabolismo, entre ellos nitrógeno, fosforo, azufre, hierro, manganeso zinc y potasio (Infante *et al.*, 2012; Vacca *et al.*, 2017). Seguidamente, se incorporó aireación al sistema con piedras difusoras conectadas por manguerillas de plástico a bombas de aire, con el fin de evitar la sedimentación de la biomasa y a la vez permitir la difusión de CO<sub>2</sub>, a una velocidad de flujo de 0,045 L/ minuto con el propósito de igualar la concentración que normalmente se encuentra en los ambientes acuáticos (0.03 %) (Font *et al.*, 2018). Finalmente, el cultivo fue expuesto a un régimen de luz/oscuridad de 12 horas a una intensidad de flujo fotónico de 200 lux con lámparas led blancas, radiación a la cual la microalga alcanza más rápidamente la fase exponencial (Ramos *et al.*, 2015).

Ecuación 1:

$$V1 = \frac{V2 \times C2}{C1}$$

Donde V1, es el volumen que debe centrifugarse para obtener una DO de 0,1; V2, equivale al volumen del ficobioreactor, 3,5 L; C2, es la DO fijada para el inicio de la bioaumentación, 0,1; y C 1, es la DO de la muestra, 1,6.

**Figura 5.** Bioaumentación de *Chlorella sp.* en condiciones Mixotróficas. Se muestran dos tiempos de crecimiento, que corresponde a los días 5 (abs= 1,1) y 9 (Abs = 1,9)



## 6. 2.2 Curva de crecimiento

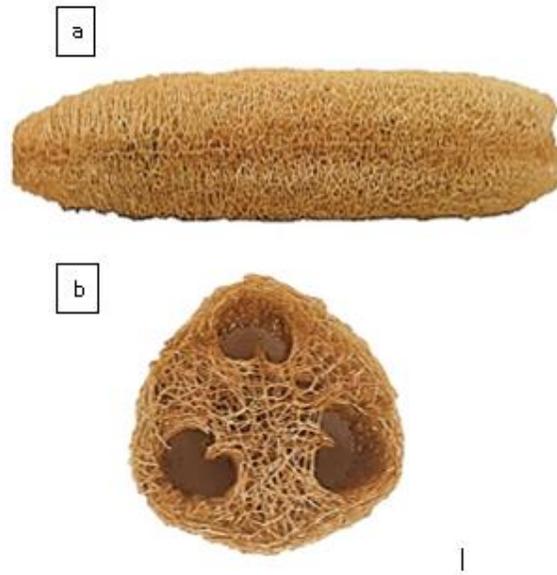
Se tomaron alícuotas de la suspensión celular a cada 24 horas durante 18 días, tiempo en el que estas desarrollan todas sus fases de crecimiento. La DO se determinó con el espectrofotómetro a una longitud de onda de 647 nm. Los datos para los gráficos se obtuvieron bajo condiciones Mixotróficas y heterotróficas, ejecutando tres mediciones diarias durante el proceso (Infante *et al.*, 2012; Vacca *et al.*, 2017).

Los datos obtenidos durante los 15 días de mediciones se tabularon en Excel, en donde se construyeron las curvas de crecimiento al tiempo que se caracterizaban cada una de sus fases.

### 6.3 Inmovilización de la biomasa

Las células de *Chlorella sp* se fijaron por adsorción a matrices poliméricas de fibras de lignocelulosa, constituidas por segmentos de 2,5 cm de alto y 2,5 cm de diámetro provenientes de endocarpio de fruto seco de *Luffa cylindrica* (figura 6 a y b) (Chen *et al.*, 2014). Para ello, el material fue disertados transversalmente, despojados de sus semillas, lavado, esterilizados a 121 ° C por 30 min en autoclave, secado y finalmente pesados. Los 120 fragmentos se sumergieron por 24 horas en 8 contenedores (15 por cada contenedor) de vidrio estériles con 3,5L de una solución de Agrimins a 4 mmol (Chen *et al.*, 2014). Trascurrido el tiempo, las matrices se traspasaron a los fotobiorreactores bioaumentados, dejándolos en interacción por 18 días. La adhesión de las microalgas se verificó mediante el cambio de color de la superficie del soporte, que pasó de ser amarillo (figura 6 b) a verde intenso (figura 7). Con tales unidades ficoremediadoras (UF) se realizó el montaje que se describe a continuación.

**Figura 6.** Mesocarpio del Fruto de *L. cylindrica*. Vista lateral de las matrices de *L. cylindrica* utilizadas (a). Plano trasversal de un segmento del fruto usado para la inmovilización de *Chlorella* sp. (b).



Fuente: Autor

*Figura 7.* Unidad Ficorremediadora. Puede observarse la coloración verdosa que indica la deposición de las células de *Chlorella* sp. en la matriz de *L. cylindrica*.



Fuente: Autor

#### 6.4 Actividad ficorremediadora

En la realización del montaje se utilizaron 120 minificobioreactores de 600 ml, 60 ámbar y 60 translúcidos, uno por cada UF (Figura 8). Todos fueron autoclavados, debidamente rotulados y marcados a 300 ml previo al inicio del experimento. Para el caso de las UF<sub>s</sub>, tras ser retiradas de los fotobiorreactores, se sometieron a un tratamiento preliminar en el que se secaron con papel absorbente estéril y el flujo de la cabina, con el propósito de retirar el exceso de agua para así estimar la cantidad de biomasa de microalgas adheridas al soporte, pesándolas en una balanza, por diferencia con el peso inicial del mismo. Con el propósito de calcular del petróleo requerido en cada uno de los tratamientos establecidos, inicialmente se determinó la densidad del líquido y con este valor las cantidades en gramos necesarios para finalmente hallar los volúmenes a adicionar.

*Figura 8.* Minificobioreactores. Minificobioreactor ámbar para ensayos de remoción heterotróficos – izquierda-. Minificobioreactor translucido para remoción de petróleo en condiciones Mixotróficas – derecha-.



Fuente: Autor

Las concentraciones evaluadas fueron, 5, 10, 15 y 20 g/L (figura 9). Para ello, en el primer caso, se tomó un minificobioreactor y se le adicionó 1720  $\mu$ L de petróleo con una Micropipeta, seguidamente

se enrasó con agua destilada estéril hasta 300 ml y se le incorporó la UF. Para los tratamientos de 10 g/L la cantidad usada fue de 3440  $\mu\text{L}$ ; mientras que para 15 y 20 g/L se incorporó 5160  $\mu\text{L}$  y 6680  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Finalizado todo este proceso, los tratamientos con los biorreactores ámbar, usados para la condición heterotrófica, se taparon y se sometieron a agitación con Sheiker a 100 rpm (figura 10 a); por su parte, los traslucidos, empleados para el crecimiento mixotrófico, se les introdujo aireación y se expusieron a una radiación lumínica de 200 lux con lámpara led blancas (Figura 10 b).

Los tratamientos se desmontaron (Separación de hidrocarburos y microalgas) según finalizaba el tiempo de exposición, de este modo los del día 3 fueron los primeros, seguido de los del 6, 9 y por último los del 12.

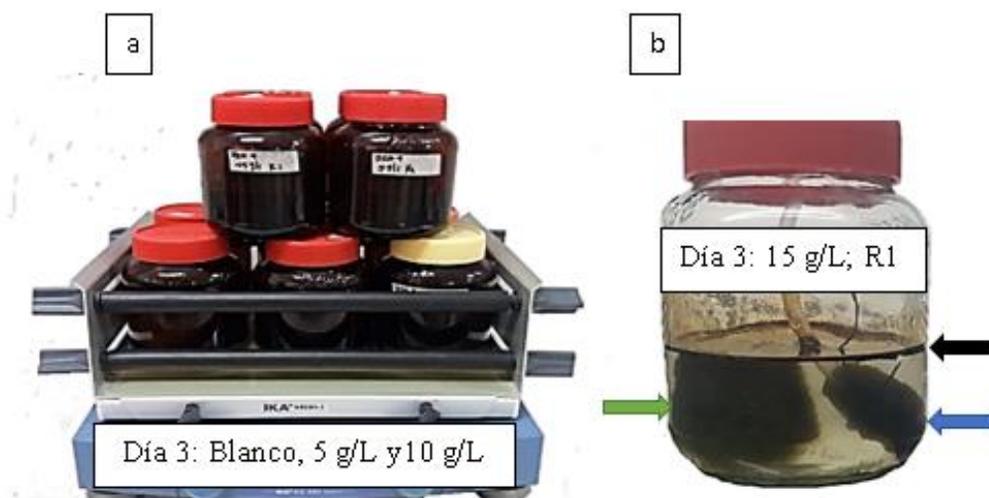
**Figura 9.** Muestra de Petróleo usada. El origen de la muestra no se especifica debido a los términos de confidencialidad impartida por la empresa donadora.



Fuente: Autor

*Figura 10.* Montajes realizados para la determinación de la actividad ficorremediadora de petróleo. Ficorremediación bajo condiciones heterotróficas; se muestra el montaje para el blanco y las concentraciones de 5 y 10 g/L del tercer día de exposición (para las concentraciones faltantes, 15 y 20 g/L, se utilizó el otro Sheiker presente en el laboratorio, así como para el resto de días evaluados) (a).

Ficorremediación en condiciones Mixotróficas; para este caso puede apreciarse la UF – flecha verde-, la piedra difusora – flecha azul-, así como también el petróleo depositado – flecha negra-, tomando como referencia a la primera repetición de la concentración de 15 g/L, al tercer día de exposición (b). La opacidad que se observa en la imagen de la UF y la piedra difusora, es debido al efecto de distorsión de la luz en el agua, al momento que se la fotografía fue tomada.



Fuente: Autor

## 6. 5 Separación de hidrocarburos y microalgas

Trascurrido el tiempo de experimentación, se procedió a realizar los desmontajes respectivo de la prueba para la recuperación de la microalga y del petróleo sobrantes (porción no removida por el microorganismo). Para tal fin, se tomaron las UF<sub>s</sub>, se cortaron con una tijera y se depositaron nuevamente

en el biorreactor, se añadió 20 ml de bencina de petróleo y se agitaron manualmente para la extracción de los hidrocarburos de la fase líquida. El contenido de estos se incorporó a una columna de vidrio de 600 ml para separar las dos fases formadas tras la adición del solvente. Por un lado, La fase orgánica, en donde se encontraban los hidrocarburos disueltos, se recogió en viales y se trató con sulfato de sodio anhidro para la eliminación del exceso de humedad. Por su parte, las microalgas, retenidas en la fase acuosa, se recogieron y centrifugaron con el objetivo de cuantificar la BS y pigmentos fotosintéticos.

*Figura 11.* Separación en columna de hidrocarburos de petróleo y microalgas. Obsérvese la deposición de los hidrocarburos extraído en la parte superior de la columna dado a menor densidad que este presenta con respecto al agua (flecha negra). La suspensión de microalgas ocupan el resto de la columna (flecha verde).

## **6. 6 Cuantificación de hidrocarburos y determinación de porcentajes de remoción**

El contenido de los viales, previamente tratado con sulfato de sodio anhidro, se rotaevaporó a presión reducida a 40 ° C, con el propósito de eliminar el exceso de solvente y concentrar las muestras, para así poder determinar la cantidad hidrocarburo que quedó sin remover (figura 13). Tomando este valor y el de petróleo adicionado al minificobioreactor al inicio de la prueba, se calculó el porcentaje de remoción, según las ecuaciones citadas por vitola y colaboradores (2018) (ecuación 2).

Ecuación 2:

$$\% R = \frac{V_i - V_f}{V_i} \times 100 \%$$

Donde % R, equivale al porcentaje de remoción;  $V_i$ , es el volumen de petróleo incorporado al inicio de la prueba, al día 0; y  $V_f$ , corresponde al crudo sobrante tras el desmonte de la misma.

Entre más altos sean los porcentajes de remoción de petróleo mayor efectividad habrán tenido los tratamientos evaluados.

*Figura 13.* Petróleo no ficorremediado. Se muestra la primera repetición de la concentración de 15 g/L para el tercer día de exposición. La variación en la coloración de la muestra con respecto al petróleo inicialmente utilizado, tendiendo hacia una tonalidad más marrón, puede considerarse como un indicativo indirecto de biodegradación microbológica.

## **6.7 Determinación de Biomasa Seca (BS) y pigmentos fotosintéticos**

Las microalgas obtenidas tras el proceso de separación con bencina de petróleo de cada uno de los minificobioreactores, se centrifugó y recogió en un tubo Falcon de 45 ml; resuspendiendo los pellets obtenidos con 10 ml de agua. Estos volúmenes se dividieron en parte iguales, para la determinación del contenido de BS y pigmentos fotosintéticos.

### **6.7.1 Cuantificación de la BS**

Los primeros 5 ml, se centrifugaron y lavaron con agua estéril 2(dos) veces a 7000 rpm por 5 minutos, secando en un horno a 80 ° C el pellet resultante por 24 horas y determinando la BS por pesaje en balanza analítica, restándole a estos valores los pesos de los tubos Falcon vacíos. Los resultados se expresaron en g/ml de solución de microalgas, para lo cual se dividió la cantidad registrada por el equipo en 5, por ser el volumen centrifugado (Hamouda *et al.*, 2016).

### **6.7.2 Estimación del contenido de clorofila *a*, *b* y carotenoides**

Los 5 ml restantes fueron centrifugados a 7000 rpm por 5 minutos y el pellet obtenido se incubó por 72 horas a 33 ° C con 5 ml de una solución de acetona al 10 % y CaCO<sub>3</sub> al 1 %, para la extracción de

los pigmentos fotosintéticos. Seguidamente el cúmulo celular fue expuesto a calentamiento en baño de María a 55 ° C hasta finalizar el blanqueamiento de las células. Ésta se centrifugó nuevamente a la misma cantidad de revoluciones por 10 minutos y el sobrenadante se analizó espectrofotométricamente a 630, 647 y 664 nm para Clorofila *a* y *b* (ecuación 3 y 4); a 480 y 510 nm con los carotenoides (ecuación 5); y a 664 y 665 nm con el propósito de cuantificar la degradación de las primeras (ecuación 6). Para lograrlo, se depositó en una celda de cuarzo 3000 µL de la muestra, realizando las lecturas por triplicado en cada longitud de onda evaluada, para así obtener un total de 21 absorbancias por cada sobrenadante sometido (Figura 14 a).

La degradación cuantifica los feopigmentos producidos tras someter las clorofilas a una solución ácida, en este caso HCl al 0,1 N (ecuación 6). Esto se logró adicionando en la celda de cuarzo 2910 µL de muestra y 90 µL de la solución del ácido, dejándose en interacción por 90 segundos. Trascurrido el intervalo, la celda cambió de una coloración verde intensa a una parda (figura 14 b), colocándose a disposición para la toma de las DO a 664 y 665 nm. Cabe resaltar que estos son los últimos datos que se obtuvieron de cada sobrenadante, pues tras dicho procedimiento éste queda inutilizable para más análisis, por el efecto de ácido. El objetivo de la prueba es corroborar el estado de las clorofilas al momento de las mediciones, es decir, una mayor cantidad inicial de feofitinas presentes antes de este ensayo, indican un estado fisiológico no óptimo en las algas que puede estar relacionado con un desarrollo inadecuado de las primeras fases de la metodología.

Con los promedios de las absorbancias logradas se calculará la concentración de cada pigmento y la degradación de las clorofilas, empleando las fórmulas citadas por López y colaboradores (2015). Los resultados se expresaron mg/ml de solución de microalgas.

Ecuación 3:  $Cl\ a\ (mg/ml) = 11.85 (A_{664}) - 1.54 (A_{647}) - 0.08 (A_{630})$

Ecuación 4:  $Cl\ b\ (mg/ml) = 21.03 (A_{647}) - 5.43 (A_{664}) - 2.66 (A_{630})$

Ecuación 5:  $Carotenoides\ (mg/ml) = 7.6 (A_{480} - A_{510})$

Ecuación 6:  $A_{664}/A_{665}$

Donde  $A_{480}$ ,  $A_{510}$ ,  $A_{630}$ ,  $A_{647}$ ,  $A_{664}$  y  $A_{665}$ , son los valores de absorbancia medidos a es el valor de absorbancia medido a una longitud de onda de 664 nm; A las longitudes de onda de 480, 510, 630, 647, 664, 665; respectivamente.

En la ecuación 6, la relación calculada debe estar en valores cercanos a 1,70 para la validación de los contenidos de clorofila, ya que indica un buen estado fisiológica de las células algas antes de desarrollar las pruebas. Cuando la relación se aproxima a 1, es un indicativo de senescencia o muerte celular, lo que puede llegar a subestimar los valores reales de los pigmentos.

## 6.8 Análisis estadístico

Se aplicará el criterio de normalidad con la prueba de Shapiro-Wilk, posteriormente se realizará un análisis de varianza mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 4 x 4, siendo el primer factor los dos (2) medios de crecimiento, mixotrófico y heterotrófico; el segundo, los cuatro (4) días de exposición (3, 6, 9, 12); y el tercero, las cuatro (4) concentraciones (5, 10, 15 y 20 g/l) (Ortiz *et al.*, 2018). los ensayos se realizarán por triplicado y serán analizados en el Software Infostat versión libre.

Los resultados de producción de los pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b* y carotenoides) y biomasa microalgal se expresarán como la media  $\pm$  de y graficados en Excel 2016.

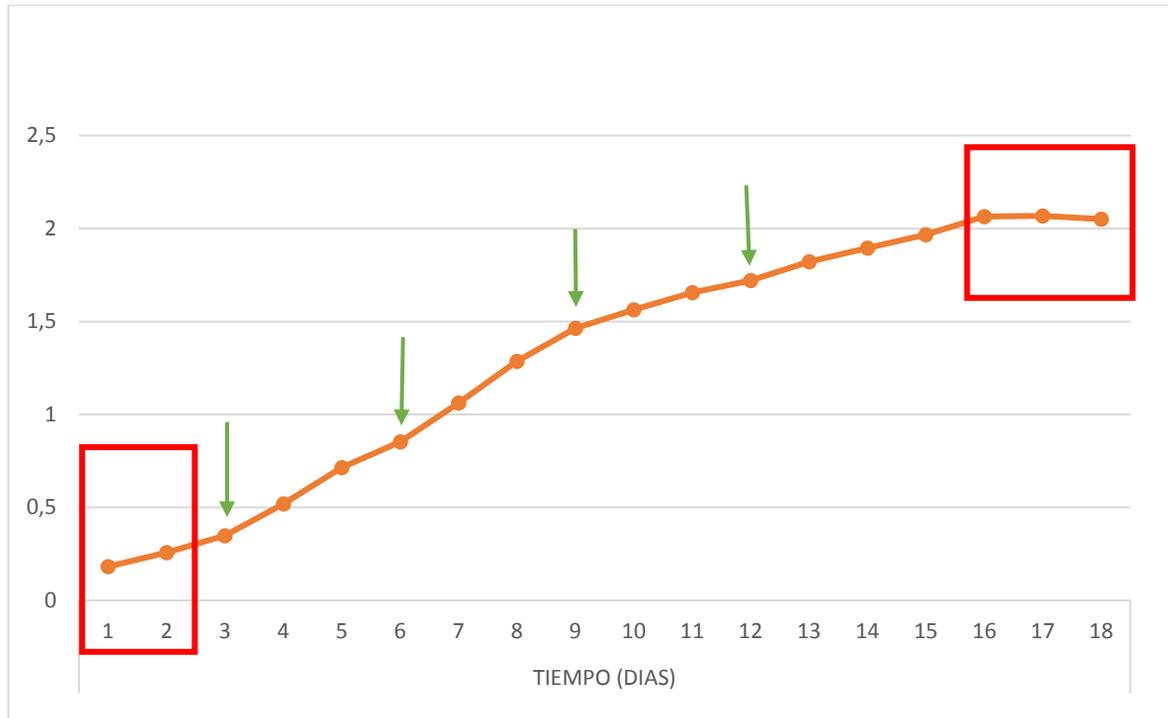
## 7. Resultados y análisis

### 7.1. Bioaumentación y curvas de crecimiento de *Chlorella sp.*

#### 7.1.1 Bioaumentación de *Chlorella sp.*

La bioaumentación de *Chlorella sp.* se llevó a cabo bajo condiciones autotróficas de crecimiento y los resultados obtenidos mostraron concordancia con lo establecido en la literatura con respecto a la caracterización de las fases del mismo (Lee *et al.*, 2015). El tiempo de estudio contemplado, permitió la observación de tres fases, las cuales fueron: (1) la fase adaptativa, (2) la fase de crecimiento lineal y (3) la fase estacionaria (gráfico 1). La fase adaptativa correspondió a los tres primeros días del ensayo; durante ésta, la microalga pone su metabolismo a tono con las condiciones ambientales circundantes, por lo que a rasgos generales no se observa una adición en el número total de células y por lo tanto una acrecencia considerable de la absorbancia a través del tiempo (Cerra *et al.*, 2010). La fase de crecimiento, contempló los 3 al 15, por lo que constituyó la de mayor duración; cuando comienza esta etapa, inicia el crecimiento propiamente de dicho microorganismo, que en un principio se traduce como un aumento en el volumen y masa celular que conllevará al incremento de la población, por las sucesivas divisiones celulares a las que se da lugar; este aumento poblacional se lleva a cabo a velocidad constantes, dado a que los ciclos celulares no están en sincronía, lo que produce que los valores de absorbancia muestren un comportamiento mayoritariamente lineal (lee *et al.*, 2015). La fase estacionaria, estuvo delimitada entre los días 16 y 18. Ésta se caracteriza por no presentar cambios notables en los valores de densidad óptica, pero a diferencia de lo ocurrido en la fase adaptativa, en este punto las causas son atribuibles al descenso de las concentraciones de nutrientes, la disminución de espacio intercelular, la toxicidad del medio, entre otros factores, que no permiten que la población se desarrolle de manera efectiva, evitando

el incremento neto del número de células en la población y manteniéndolo relativamente constante (Allen & Waclaw, 2018).



**Figura 1.** Curva de crecimiento de *Chlorella* sp. Se muestra las fases de crecimiento (recuadros rojos) y los días escogidos para la realización de los ensayos (flechas verdes).

Al comparar los resultados del gráfico 1 con otras investigaciones, se deduce que los tiempos de duración, así como el número de fases pueden presentar variaciones, de este modo, Vacca y colaboradores (2017) encontraron que *Chlorella* sp. no mostró fase de latencia, iniciando con la fase de creciente lineal que culminó en el día 12, para luego comenzar la fase estacionaria en el día 13 y finalizarla al 15, dejando los dos últimos días del ensayo para la fase de muerte (16 y 17); el microorganismo alcanzó valores máximos absorbancia de 1.3, siendo este valor menor al alcanzado en

este estudio, aun cuando iniciaron con el doble de concentración celular al que se usó aquí (0,2). Por su parte, Infante y su equipo de investigación (2012) evaluó el crecimiento de esta microalga, usando el mismo tipo de cultivo (por lotes) con 6 repeticiones, encontrando que *Chlorella* sp. se comportó linealmente y expresó un crecimiento constante, con lo que lograron obtener absorbancias máximas de aproximadamente 1.3, tras 15 días de crecimiento. Los resultados obtenidos en esos estudios y en el presente, pueden explicarse teniendo en cuenta que la expresión del crecimiento de las microalgas y el resto de microorganismos en general, dependen de las condiciones de sus entornos particulares a los que las células se vean enfrentadas, de esta forma el crecimiento puede variar para la misma especie o cepa dependiendo de factores como el pH, CO<sub>2</sub> disponible, concentraciones nutrientes limitantes (nitrógeno y fósforo), luminosidad, fotoperiodo, concentraciones de células inicialmente inoculadas y temperatura, por lo que las diferencias resaltadas no son de extrañar (Hernández & Labbè; 2014; Daliry *et al.*, 2017; Gatamaneni *et al.*, 2018).

*Chlorella* sp. se considera una de las microalgas con mayor cantidad de estudios realizados a nivel mundial, debido a su versatilidad metabólica, rápido crecimiento que puede registrar tasas de hasta de 1.8/día y su alto potencial de biodegradar o biotransformar compuestos que se encuentran comúnmente en el entorno, haciéndolo de forma autótrofas, mixotróficas y heterótrofas (Forero *et al.*, 2015; Roostaei *et al.*, 2018), tal y como se demostró en esta investigación.

Dado a que la fase lineal corresponde al periodo de máximo crecimiento y por lo tanto de mayor aprovechamiento en términos de remoción de petróleo, se escogieron días dentro de la misma para la realización de los ensayos de esta investigación. Con base a lo anterior, se consideraron los días 3, 6, 9 y 12, para tal propósito. No se usaron todos los días comprendidos en dicha fase, dado a que hubiese conllevado a un mayor costo en la realización de este trabajo y siempre se pretendió tener la mejor

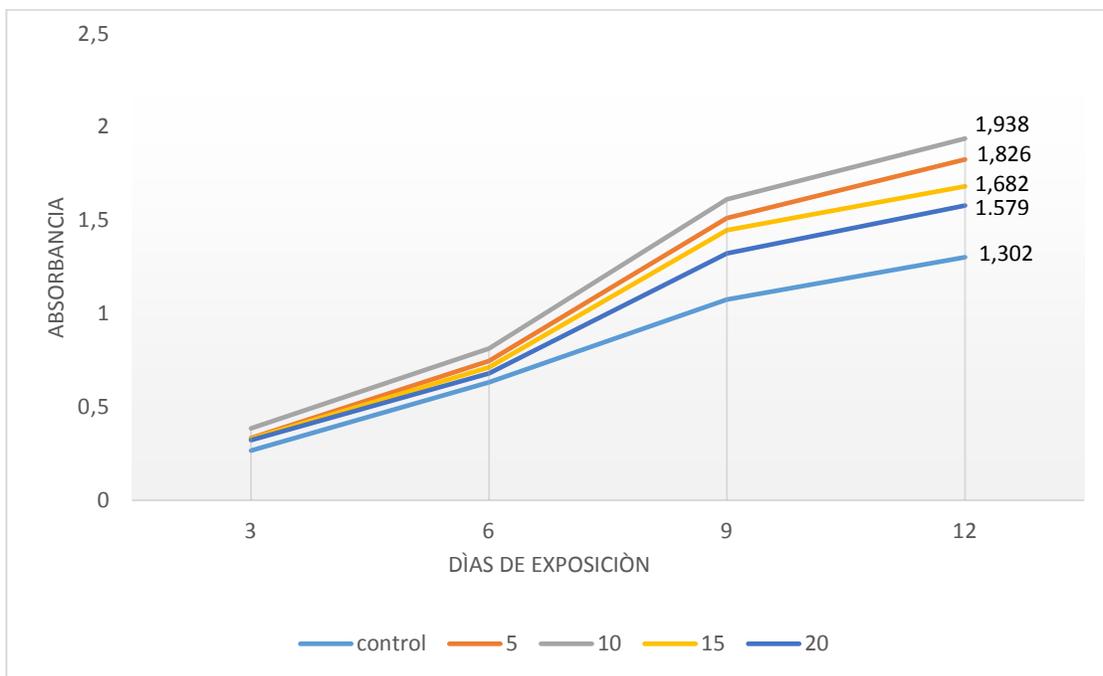
eficiencia económica posible, aunque no fuera explícitamente uno de los objetivos establecidos. Lo anterior, explica el porqué de la utilización del día 12 en lugar del 14, el cual, a pesar de tener los valores máximos de crecimiento, no fue contemplado porque acarrearía más tiempo de experimentación y más costos en mantenimiento.

Cabe resaltar que a pesar de que existen técnicas más potentes y precisas para el seguimiento del crecimiento de microalgas, como lo es la citometría de flujo (Chioccioli *et al.*, 2014), el uso de espectrofotometría puede considerarse adecuado para esta investigación, pues aunque es sabido que las células de *Chlorella* (así como otras microalgas) expresan diferentes formas superficiales y tamaños cuando se somete la misma cepa a diferentes fuentes de carbono (Chioccioli *et al.*, 2014; ), en este caso al ser usado petróleo como única fuente, puedo garantizarse la homogeneidad en los parámetros mencionado y de esta forma la veracidad de los resultados arrojados por esta técnica.

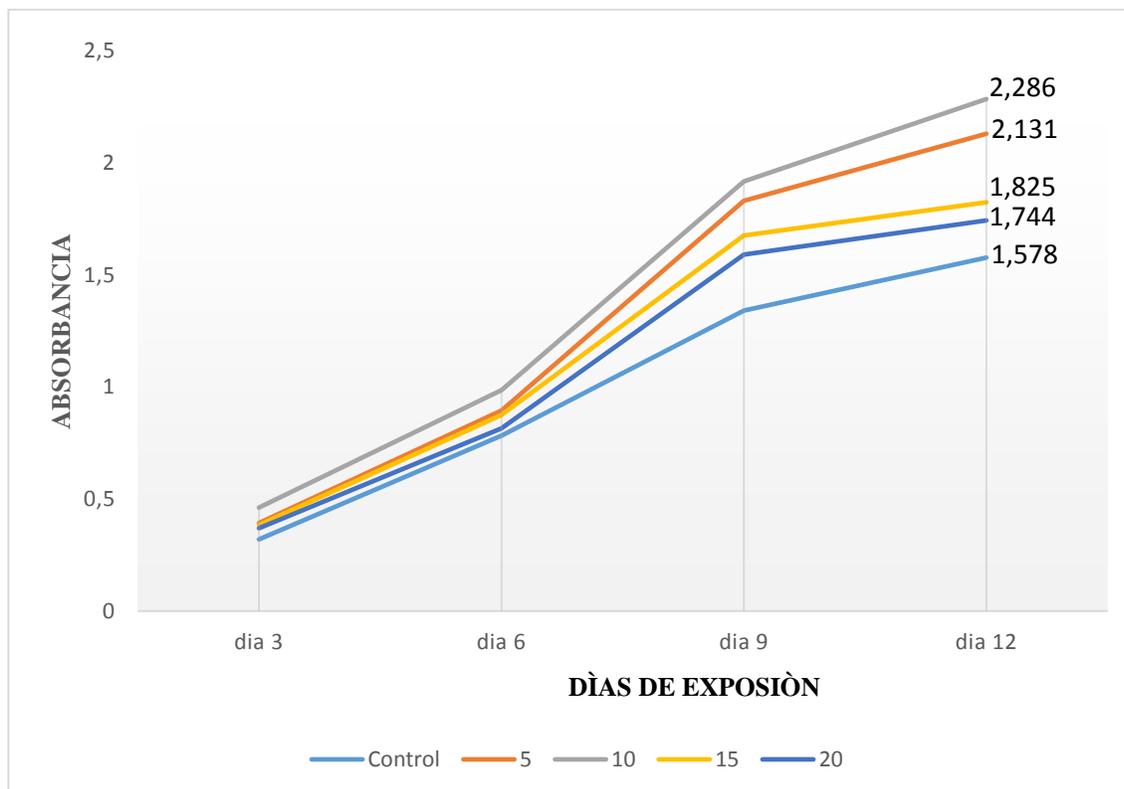
7.1.2. Efecto de las concentraciones de petróleo crudo sobre el crecimiento de *Chlorella* sp. bajo condiciones mixotróficas y heterotróficas.

En lo que respecta al efecto del petróleo sobre las curvas de crecimiento de *Chlorella* sp., se observó que éste aumentó los valores de absorbancia en todas las concentraciones utilizadas con respecto a los controles, para ambas condiciones de crecimiento (gráficos 2 y 3). Por lo tanto, puede decirse que el petróleo tuvo una influencia positiva sobre el crecimiento de *Chlorella* sp., aumentándolo considerablemente con respecto al de las algas no expuestas. Dicho efecto, varió de acuerdo a las concentraciones utilizadas, aumentando la diferencia con relación al control a medida aumentó la concentración, desde 5 g/L a 10 g/L, disminuyendo luego, a concentraciones de 15 y 20 g/L; siendo la de 10 g/L la más alta de todas, seguida de la 5 g/L, 15 g/L y por último 20 g/L; situación que se verificó tanto mixotróficamente como heterotróficamente. Por su parte, al dirigir la atención con respecto a lo

que ocurre al comparar ambas condiciones de crecimiento, de inmediato se hace evidente de que todos los valores logrados en cada una de las concentraciones en mixotrofia fueron superiores a los obtenidos en Heterotrofia. De esta forma, al contrastar los dos gráficos, la concentración de 10 g/L fue mayor en condiciones mixotròficas que en hetetròficas, caso igual para las de 5 g/L, 15 g/L y 20 g/L. Por lo tanto, puede decirse que la mixotrofia favorece el crecimiento de *Chlorella* por encima de la Heterotrofia, aun cuenta éste microorganismo se encuentra expuesto a contaminantes muy tóxicos.



**Gráfico 2.** Efecto de las concentraciones de petróleo evaluadas sobre el crecimiento de *Chlorella* sp. bajo condiciones heterotròficas. Obsérvese que el valor máximo obtenido para fue logrado utilizando la concentración de 10 g/L.



**Gráfico 3.** Efecto de las concentraciones sobre el crecimiento de *Chlorella sp.* bajo condiciones mixotróficas de crecimiento. Nótese que la concentración de 10 g/L obtuvo los valores mayores de absorbancia; no obstante, al comparar con el gráfico 2, éstos fueron superiores a los obtenidos allí.

Lo anteriormente descrito permite resaltar la tolerancia de *Chlorella sp.* al petróleo crudo, sabiendo que, como ya se ha comentado (apartados planteamiento del problema y marco teórico), es una sustancia altamente toxica para muchos seres vivos. Sin embargo, esta microalga es capaz de desarrollarse de una manera conveniente en éste, porque puede aprovechar algunos de sus componentes, tomándolos como una fuente de carbono y energía para sustentar su crecimiento (Hamouda et al., 2016; Vitola et al., 2018). Los mecanismo bioquímicos y moleculares con los cuales *Chlorella sp.* puede llevar a cabo esta hazaña a un no están del todo esclarecidos, pues la literatura comenta que no se han realizado las investigaciones suficientes y pertinentes para dicho propósito (Chaillan et al., 2006; El-Sheekh et al.,

2014; Ifeanyi & Ogbulie, 2016); no obstante, lo que es casi seguro es que al ser un organismo eucariota posee un repertorio genético mucho más amplio que le permite contrarrestar los efectos negativos del crudo, con mayor eficiencia que incluso algunas bacterias (Romero, 2014 ). Es permanente resaltar que algunas microalgas son capaces de crecer a concentraciones de petróleo superiores a los 200 g/L, de este modo especies como *Microcystis aeruginosa* pueden hacer a 210 g/L (Romero, 2014).

Como pudo verificarse (gráfico 1), *Chlorella* sp. es una microalga capaz de crecer bajo condiciones heterotróficas y mixotróficas, mostrando resultados satisfactorios en ambos casos (gráfico 1). Tal capacidad, que está restringida a un determinado número de especies de microalgas, es debida a la versatilidad metabólica que estas presentan, que les permiten crecer bajo luz y oscuridad con un rango amplio de fotoperiodo, siendo capaces de tomar una amplia gama de sustratos orgánicos e inorgánicos para usarlos como fuentes de carbono y/o energía, entre ellos, glucosa, CO<sub>2</sub>, acetato, ácido cítrico, y contaminantes ambientales como fármacos, combustibles e hidrocarburos de petróleo (Battah et al., 2013; Praveen et al., 2017). Los resultados muestran una clara diferencia que aventaja a las células que se expusieron a condiciones mixotróficas de crecimiento sobre aquellas que se desarrollaron a condiciones heterotróficas, observándose mayores valores de absorbancia en las primeras en comparación con las segundas, acentuándose estas diferencias a medida que el tiempo transcurre (gráfico1). Numerosas investigaciones han demostrado la eficiencia en términos de crecimiento y biomasa que presenta el desarrollo de microalgas como *Chlorella* sp. en condiciones mixotróficas con respecto a las heterotróficas. Praveen y colaboradores (2017), obtuvieron mayor crecimiento de *Chlorella* sp. y una mejora en el contenido de carbohidratos, bajo condiciones mixotróficas que, en heterotróficas, con una producción de 1.24 mg/ml y 1.16 mg/ml; respectivamente. En otras investigaciones, bajo esta condición de crecimiento se obtuvieron mayores tasas de crecimiento, en comparación con el medio

heterotrófico y autotrófico, siendo esta 71.4 % mayor que el primero y 14 veces superior al segundo; dichos resultados fueron producto de la implementación de cepas de *Chlorella vulgaris* para el tratamiento de algunos tipos de aguas residuales (Mohammad *et al.*, 2015). Roostaei y colaboradores (2018), al trabajar con biopelículas de algunas microalgas, demostraron que éstas en condiciones mixotróficas exhibían una productividad y calidad de materia prima de biocombustibles significativamente más altas: 2 a 3 veces mayor en rendimiento de biomasa, 2 a 10 veces mayor en acumulación de lípidos en comparación con las biopelículas de microalgas en condiciones autótrofas. El medio Mixotrofico ofrece una mayor cantidad de ventajas que otros medios para las microalgas en el campo de la biorremediación; ya que, por un lado, subsana los requerimientos lumínicos de los que carece la heterotrofia y por el otro, proporciona una fuente de carbono más abundante que la autotrofia (Zhan *et al.*, 2016). Ahora bien, suplidas dichas deficiencias, el microorganismo puede desarrollarse de una manera más conveniente, lo que se traduce en otras cosas en un mayor crecimiento.

## **7.2. Inmovilización de biomasa de *Chlorella* sp. en la biomatriz de *Luffa cylindrica*.**

Los resultados de la tabla 1 muestran que los segmentos de matriz de *Luffa cylindrica* presentaron en promedio una masa de 1,29 g con una desviación de 0,018 g, permitiendo inferir una homogeneidad presumiblemente satisfactoria en el conjunto de datos (anexo 1). La contemplación y exaltación de este hecho es de gran importancia, dado a que la masa de *Luffa cylindrica* es una variable que puede correlacionarse de forma moderadamente directa con la superficie de exposición de la misma, por lo que entre mayor sea la variabilidad entre las masas, así será la que halla en la superficie de exposición (Seed & Iqbal, 2013). Esto conllevaría a diferencias notorias en la cantidad de biomasa algal contenida entre cada una de las Unidades Ficorremediadoras, convirtiéndose una fuente importante de error al momento de la realización de la actividad remediadora. Sin embargo, tal situación no fue precisamente observada

en esta investigación, ya que la tabla 1 también indica un promedio de biomasa retenida de 1,37 g con una desviación estándar de 0,072 g, siendo ésta, aunque mayor que el desvió anteriormente resaltada, lo suficientemente baja como para minimizar el efecto negativo sobre la remoción que tal variabilidad pudiera tener. Los resultados obtenidos son ligeramente inferiores a los reportados individualmente por el grupo de Benítez (2018) y el de Hernández (2018), quienes inmovilizaron en promedio 1.58 g y 1.69 g de biomasa por UF; respectivamente. No obstante, un hecho a destacar es que en esta investigación se utilizaron fragmentos más pequeños y de menor masa de estropajo, por lo que dicha diferencia cabría de ser esperada.

<b>PROCESO</b>	<b>PESOS PROMEDIO (g)</b>
Segmento de estropajo	1,29 ± 0,018
UF	2,66 ± 0,10
Microalga inmovilizada	1,37 ± 0,072

**Tabla 1.** Pesos promedios de los segmentos de estropajo, microalga inmovilizada y UF.

Además de la superficie de la masa y superficie de exposición, otro factor importante para promover la inmovilización de células de *Chlorella* sp y otras microalgas, es el nivel de porosidad con el que cuenta la matriz en donde se desea llevar a cabo el proceso, debido a que esta propiedad permite incrementar el número de células que pueden alojarse en la misma, y por lo tanto obtener, cantidades de biomasa superiores. Por ello, *Luffa cylindrica* puede ratificarse como una matriz ideal para albergar microalgas, ya que cuenta con una alta porosidad, que se estima entre el 79 y 93% de su volumen, formando microporos en las fibras que oscilan entre 150 y 800 micras de diámetros, que le permite una elevada transferencia de masas y una gran capacidad para absorber agua, estimada en 18, 4 g de agua/g de fibra (Seed & Iqbal, 2013). Sumado a ello, la estabilidad de la unión de las células de la microalga a la superficie de la esponja, se ve favorecida por interacciones electrostáticas entre ambas, de este modo las

cargas positivas predominantes en la superficie de la capa celular del alga, interactúan con las negativas presentes en las fibras de lignocelulosa de *Luffa cylindrica*, lo acentúa que acentúa su unión (Seed & Iqbal, 2013). Cabe resaltar que la inmovilización de esta microalga también fue inducida gracias a la presencia de elementos como N y P gracias al pretratamiento que sufrieron los segmentos con el bioestimulador.

### **7.3. Remoción de petróleo crudo por *Chlorella sp.* bajo condiciones de crecimiento mixotróficas y heterotróficas.**

Antes de iniciar con los resultados de este apartado, se dejará claro, para reducir dudas, que en este punto se realizó una descripción más detallada de los datos obtenidos, así como una ampliación de los análisis estadísticos. Todo esto permitir la obtención de conclusiones más precisas (ver conclusión 2), ya que aquí se presentan los resultados principales de este trabajo, y la vez los que motivaron su realización.

Con respecto a las concentraciones de crudo evaluadas, se encontró que hubo diferencias estadísticas significativas, observándose un aumento de la remoción a medida que la concentración también lo hacía, pasando de ser de 73,72 % a 5g/L a 79,86 % a 10 g/L, presentando una disminución a partir de 15 g/L, en donde se obtuvo un 69,68 %; no hubo diferencias significativas entre 15 g/L y 20 g/L, aunque su porcentaje fue considerablemente menor, 68,87 %. Por lo tanto, puede decirse que la remoción de petróleo por *Chlorella sp.* se ve muy favorecida hasta 10 g/L, para luego presentar una disminución a partir de 15 g/L.

Por su parte, al evaluar la remoción a través del tiempo, se observó que a medida que éste transcurría aumentaba la extracción del petróleo, hallándose diferencias estadísticas significativas entre

cada uno de los días evaluados. De este modo, el menor porcentaje de remoción lo obtuvo el día 3, con un 48,30 %; seguido del 6, con el 69,81 %; el noveno, alcanzó el 85,75 %; y finalmente, el duodécimo día, en el cual se obtuvo el resultado más favorable, llegó a remover hasta 88,16 % de crudo.

Al revisar el efecto que tuvo la interacción entre las concentraciones evaluadas y las condiciones de crecimiento sobre la remoción de petróleo por *Chlorella sp.*, se encontró diferencias significativas al comparar las concentraciones de forma recíproca entre las condiciones. De este modo, la remoción a 10 g/L en condiciones mixotróficas fue significativamente mayor a la encontrada a la misma concentración en crecimiento heterotrófico, siendo las remociones 82,70 % y 77,12 %; respectivamente. Del mismo, la significancia se vio reflejada para la concentración de 5 g/L, en la cual se removió mayor cantidad de crudo en mixotrofia, con un 75,26 %, confrontado con los 71,98 % del heterotrofismo. El comportamiento se repite al fijar la atención sobre los tratamientos de 15 g/L y 20 g/L; en el primero, 72,87 % y 68,14 %; y en el segundo, 71,22 % y 64,87. Por lo tanto, puede decirse que se mantiene la relación descrita con anterioridad, en el que bajo la influencia de condiciones mixotróficas se obtienen mejores resultados de remoción a grandes rasgos. Por su parte, al realizar contrastes no recíprocos queda manifestada la influencia de tales concentraciones, ya que no hubo diferencias significativas entre el tratamiento de 5 g/L en condiciones mixotróficas y el de 10 g/L en heterotróficas, así como tampoco para 20 g/L mixotrófico y 5 g/L heterotrófico. Por tal motivo, la remoción de crudo por esta microalga depende del tipo de condición donde se lleve a cabo este proceso, pero ésta está fuertemente influenciada por la concentración de petróleo usado, favoreciéndose en mixotrofia y a concentraciones de 10 g/L.

### **7.5. Biomasa seca de *Chlorella sp.***

Los resultados de la tabla 2 muestran que los valores obtenidos de biomasa obtenidos tras la exposición de *Chlorella sp.* a todas las concentraciones de petróleo para las dos condiciones de crecimiento, siendo los valores mayores en todos casos con respecto a los controles.

Los resultados muestran Se encontró que hubo diferencias significativas al comparar la producción de biomasa para ambos medios de crecimiento, de este modo puede decirse con toda confiabilidad que bajo condiciones mixotróficas la producción promedio de esta fue mayor que en heterotrofia (gráfico 7).

Con respecto al tiempo de exposición, se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los días evaluados para cada condición de crecimiento. De este modo, el día 12 bajo condiciones mixotróficas fue el que presentó mayor influencia positiva sobre la biomasa seca, tanto en condiciones mixotróficas como heterotróficas, siendo la primera la mejor de ambas. Los días 9, 6 y 3 presentaron valores significativamente menores entre sí y con el día 12 (gráfico 8).

Hubo diferencias significativas al comparar el efecto de las condiciones de crecimiento y las concentraciones evaluadas, de este modo se encontró que la mayor producción de biomasa se obtuvo a la concentración de 10 g/L para ambas condiciones de crecimiento, siendo la correspondiente al medio mixotrófico la que obtuvo los mayores valores de biomasa (39,29 mg/ml) (gráfico 9).

Estos resultados pueden explicarse teniendo en cuenta que la concentración de 10 g/L es la que ofrece las mejores condiciones de crecimiento para la microalga, por encima o por debajo de tal concentración no es lo suficientemente estimulante o se el nivel de toxicidad empieza a convertirse en un problema para la microalga. La literatura comenta que por encima de concentraciones de 10 g/L,

algunos metabolitos del petróleo pueden alterar la capacidad replicativa de *Chlorella* sp., al interferir los procesos de división celular (El-Seek *et al.*, 2013). Hamouda y colaboradores (2016), obtuvieron las mayores cantidades de biomasa a la misma concentración cuando evaluaron a *Chlorella* sp con petróleo bajo condiciones heterotróficas. Por su parte, Vitola y su equipo de investigación, encontraron que a 10 g/L la producción de biomasa de las microalgas fue mayor cuando la sometieron a condiciones mixotróficas.

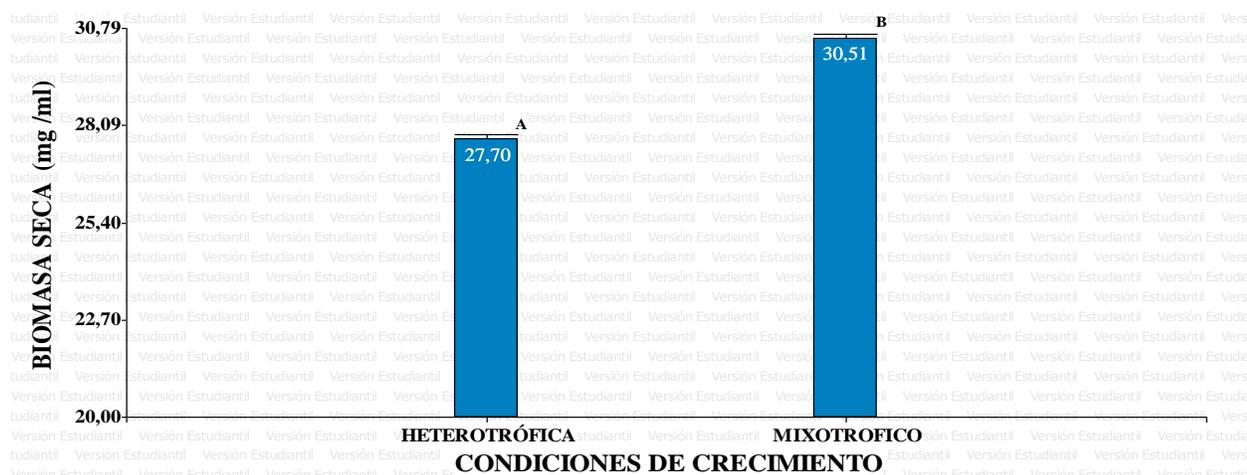
**Tabla 2.** Valores promedio de biomasa obtenidos bajo condiciones mixotróficas y heterotróficas tras la exposición a las diferentes concentraciones de petróleo evaluadas.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN (Días)	CONCENTRACIONES DE PETRÓLEO (g/L)	BIOMASA SECA (mg/L)	
		MEDIO HETEROTRÓFICO	MEDIO MIXOTRÓFICO
3	Control	16.6	18.8
	5	26.5	27.8
	10	28.3	29.8
	15	23.3	26.1
	20	19.7	21.5
6	Control	20.4	21.8
	5	30.1	30.1
	10	32.3	32.3
	15	28.3	28.3
	20	25.2	25.2
9	Control	25.1	26.9
	5	33.2	37.0
	10	36.0	39.6
	15	31.1	34.1
	20	27.0	30.8
12	Control	28.3	29.7
	5	35.7	40.1
	10	38.4	43.4
	15	34.4	35.5

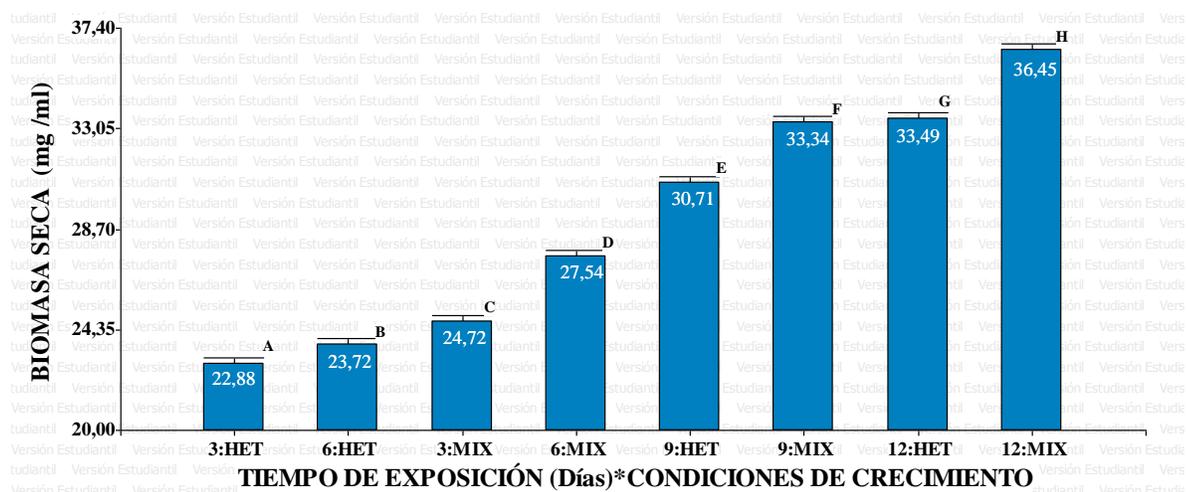
20

31.0

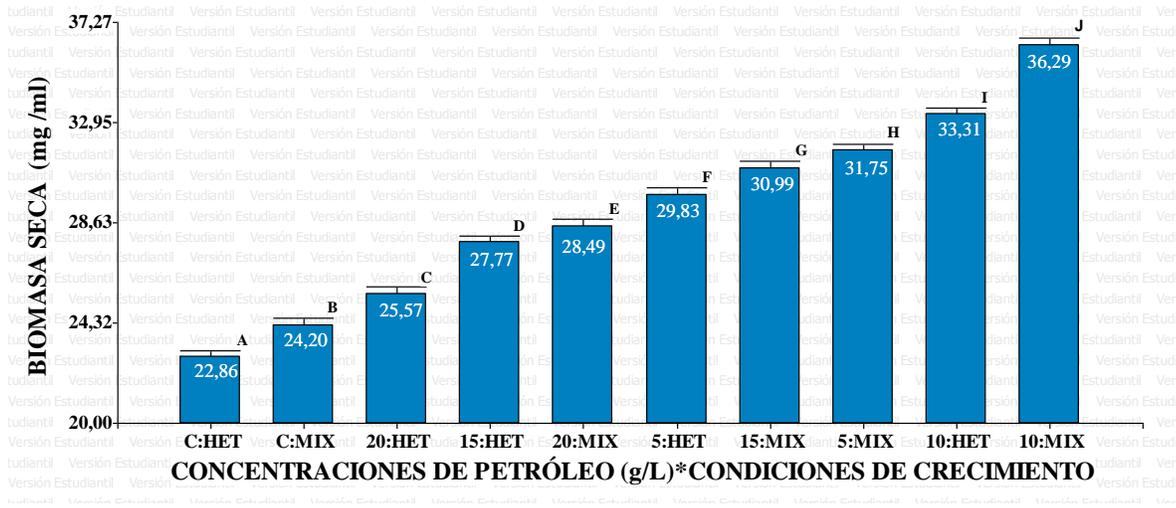
33.6



**Gráfico 7.** Prueba múltiple de rango tukey para la producción de biomasa seca bajo la influencia de las concentraciones de petróleo evaluadas en condiciones de crecimiento heterotróficas y mixotróficas.



**Gráfico 8.** Prueba múltiple de rango Tukey para el efecto del tiempo del tiempo de explosión y las condiciones de crecimiento sobre la productividad de biomasa seca de *Chlorella* sp.



**Gráfico 9.** Prueba múltiple de rango Tukey para el efecto de las concentraciones de petróleo crudo y las condiciones de crecimiento sobre la productividad de biomasa seca de *Chlorella* sp.

**7. 4 Efecto del petróleo sobre los contenidos de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella* sp.**

Los resultados muestran que en general el contenido de clorofila a fue en promedio 3.319 veces superior al de clorofila b y carotenoides (tabla 3), resultados que concuerdan con los encontrados por El-Seek y colaboradores (2013) quienes estudiaron el efecto de diferentes condiciones de crecimiento sobre *Chlorella* sp., encontraron una relación de aproximadamente 3.5 veces.

La clorofila a, se encuentra en concentraciones superiores a las de otras clorofilas y demás pigmentos en las células algas, ya que esta se les considera como el pigmento principal de la fotosíntesis y a el resto, como pigmentos antenas, pues redirigen parte de la energía captada a esta clorofila (clorofila

b); además, aquellos pueden cumplir otras funciones (Azcón & Talón, 2008). Cabe que resaltar que, en ciertos casos, algunas moléculas como los carotenoides se producen en cantidades que pueden llegar a superar a la clorofila a, pues algunas algas, como *Dunaliella salina* son capaces de producir hasta un 14 % de su biomasa seca solo en carotenoides, ya que son microorganismo que usan estas sustancias como un mecanismo de adaptación en ecosistemas con alta luminosidad y estrés osmótico, por alta carga de solutos disuelto (Hu & Harvey).

Condiciones	Días de exposición	Clorofila a (µg/ml)	Clorofila b (µg/ml)	Carotenoides (µg/ml)	Relación contenido de Clorofila a y b
Heterófico	3	6,335	1,807	1,629	3,505
	6	7,772	2,22	2,042	3,500
	9	9,266	2,646	2,354	3,501
	12	9,735	3,041	2,783	3,201
Mixotrófico	3	6,614	2,06	1,882	3,216
	6	8,675	2,636	2,485	3,366
	9	10,366	3,272	3,132	3,168
	12	11,26	3,536	3,504	3,187
<b>Promedio</b>					<b>3,319</b>

**TABLA 3.** Producción promedio de pigmentos fotosintéticos por día de exposición y relación entre el contenido de clorofila a y b de *Chlorella* sp.

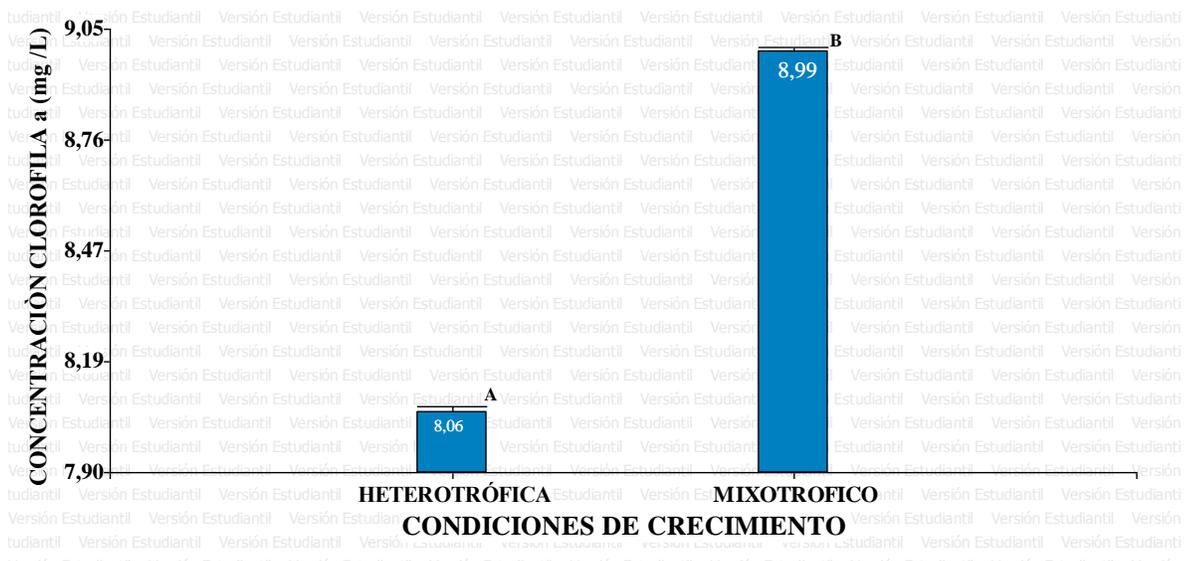
#### 7.4.1 Contenidos de Clorofila a de *Chlorella* sp

El medio Mixotrofico siguió la tendencia general de forma significativa Las células de *Chlorella* sp expuesta bajo condiciones mixotróficas presentaron contenidos de clorofila significativamente mayores a los logrados en los medios heterotróficos (gráfico 10).

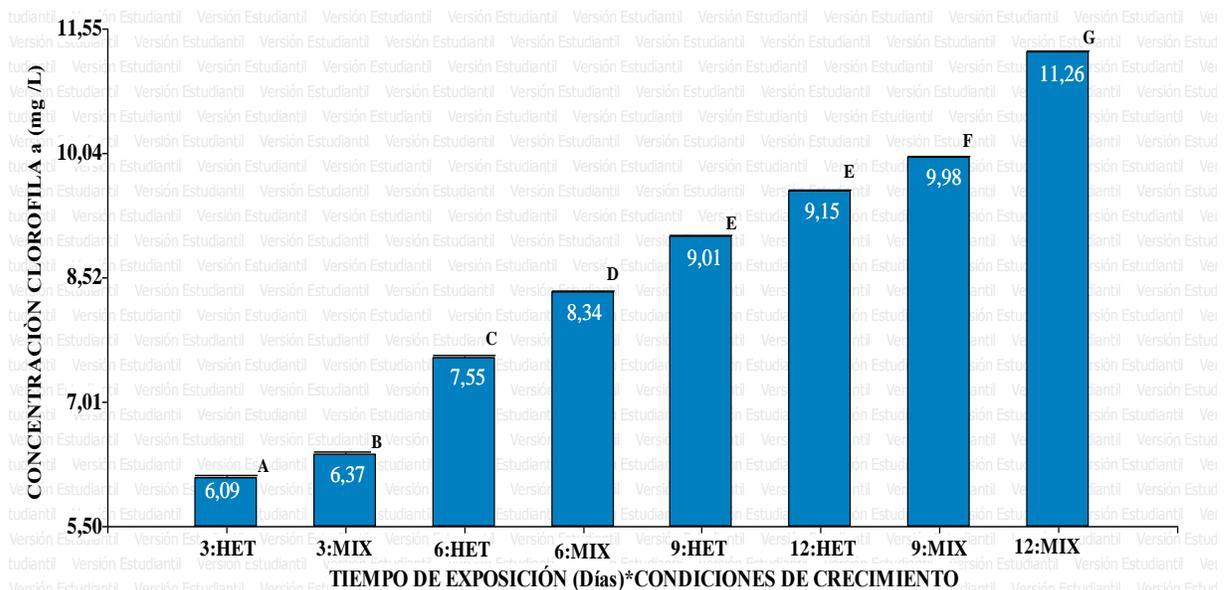
Hubo diferencias significativas con respecto al tiempo de exposición y los medios de crecimiento, de este modo se observó un aumento progresivo del contenido de clorofila a. No obstante, cabe aclarar que las células expuestas a heterotrofia, mostraron que, aunque hay un aumento de la concentración de

este pigmento a medida que pasan los días, el avance se detiene en el día 9, ya que la variación no mostró significancia con respecto al día 12 (gráfico 11). Por lo tanto, puede decirse que en condiciones mixotróficas, hay un incremento progresivo de clorofila a que no se detiene, mientras en la otra condición, alcanzado el noveno día, la producción desacérela y se hace casi igual a la obtenida en el día 12. Lo anterior, es debido a que cuando la microalga crece heterotróficamente, el pigmento pierde relevancia dado a la ausencia de luz, y esta lo reabsorbe como un mecanismo para ahorrar energía (Pérez *et al.*, 2011). Algunas investigaciones han calculado que después del décimo los niveles de pigmentos fotosintéticos comienzan a disminuir de forma significativa cuando se realizan cultivos en solución; no obstante, esta situación no fue observada en esta investigación, ya que los niveles de clorofila a, se mantuvieron en el día 12 (Hamouda *et al.*, 2016). Sin embargo, este cambio puede justificarse, teniendo en cuenta que el proceso se llevó a cabo bajo inmovilización y que esta condición modifica la fisiología de la microalga (Guolan *et al.*, 2000).

Con respecto al efecto de las concentraciones de petróleo sobre el contenido de clorofila de *Chlorella* sp. se encontraron diferencias estadísticas significativas que muestran que la mejor concentración de crudo fue la de 10 g/L, tal y como debió de esperarse pues a estas mismas cantidades se produjeron las mayores cantidades de biomasa (gráfico 12). El análisis muestra que bajo condiciones mixotróficas este pigmento fue hallado en mayores concentraciones, siendo a 10 g/L donde se lograron los mayores valores (10,20 µg/ml).



**Gráfico 10.** Prueba múltiple de rango Tukey para efecto de los medios de crecimiento sobre la producción de *Chlorella* sp. bajo condiciones de crecimiento mixotróficas.



**Gráfico 11.** Prueba múltiple de rango Tukey para el efecto del tiempo de exposición y las condiciones de crecimiento sobre el contenido de clorofila a de *Chlorella sp.*

#### 7.4.2 Carotenoides

Los resultados expresados en la gráfica muestran que existen una tendencia al aumento del contenido de los carotenoides de *Chlorella sp.* tras su exposición a petróleo, a medida que el tiempo transcurre, siendo menor en el día 3 y mayor en el duodécimo. Los contenidos del pigmento fueron mayores en todos los tratamientos con respecto al control, en general y para cada condición evaluada (gráfico x y; respectivamente). Los carotenoides fueron significativamente mayores en condiciones mixotróficas que en heterotróficas, Al examinar las cantidades logradas en cada tipo de crecimiento, se observó que hubo diferencias entre todos los días evaluados para el medio Mixotrófico y heterotrófico. Al comparar las condiciones entre sí, se observa que los valores obtenidos mixotróficamente fueron mayores a los logrados en condiciones heterotróficas, acentuándose la diferencia en los últimos dos días de evaluación.

En lo referente al efecto de las concentraciones de petróleo evaluadas en el contenido de carotenoides, en general hubo diferencias estadísticas significativas con respecto al control; sin embargo, entre las concentraciones, se observó que hubo significación entre 20 g/L y las concentraciones de 5 y 10 g/L, pero no con 15 g/L. A su vez, 15 g/L, no mostro diferencias con 5 y 10 g/L. De la misma forma, 5 g/L y 10 g/L, no presentaron diferencias entre sí. No obstante, los mayores promedios fueron para el tratamiento de 20 g/L, seguido de 15 g/L, luego el 10 g/L y finalmente 5 g/L.

Los resultados descritos en el párrafo anterior, a simple vista pueden no seguir los acontecimientos vistos y evaluados en el apartado de la biomasa seca (7.2), pero, estimado lector, tenga

en cuenta, primeramente, que la concentración de 15 g/L, obtuvo contenidos de carotenos similares con respecto a 5 g/L y 10 g/L, ya que no hubo significancia, a pesar de que son las concentraciones con las mayores biomásas. Lo anterior deja de manifiesto que, a pesar de que la población de células producidas por 15 g/L fue menor, éstas fueron capaces de producir y contener cantidades de carotenos casi iguales a las expuestas a dichas concentraciones. Caso similar ocurre con respecto a 20 g/L, donde si hubo diferencias significativas con estos dos tratamientos, siendo su población celular la menor de todas las concentraciones. Tal situación deja de manifiesto, el posible efecto que tiene el uso cantidades elevadas de petróleo para estimular los productos de estos pigmentos, ya puede aumentar el estrés sufrido por la microalga.

Los carotenoides son pigmentos que contribuyen en una amplia gama de funciones dentro de los seres vivos, desde aquellas que van relacionadas con cambios de coloración para expresar comportamientos, pasando por las involucradas en la atracción de los polinizadores, hasta las que tratan de reducir los daños causados por el estrés. Para el caso concreto de esta investigación, estas sustancias son producidas con el propósito de disminuir las consecuencias que trae consigo la exposición a la luz continua y contaminantes como el petróleo. En presencia de luz el contenido de carotenos en las algas y plantas terrestres aumenta a medida que lo hace su intensidad y el tiempo de exposición, con el objetivo de impedir la inhibición de la fotosíntesis por exceso de radiación lumínica (fotoinhibición), ya que un exceso en la captación de fotones causa alteraciones en la clorofila, que modifica su estado electrónico y disminuye su capacidad para ceder electrones a la cadena que los transporta hacia el interior del tilacoide (asemejándose a lo que ocurre con un corto circuito cuando el sistema se sobrecarga), reduciéndose así la capacidad fotosintetizadora). Cuando tal situación empieza a manifestarse, se activa un conjunto de enzimas que conllevan al aumento en la producción de carotenoides, los cuales captaran el excedente de

energía anteriormente recibida por la clorofila, gracias a su sistema de doble enlaces conjugados, disipándola al medio en forma de calor). También, estas sustancias reducen daño causado por la producción de oxígeno, durante el proceso de biofotólisis, reconvirtiéndolo en una de sus formas menos tóxicas y liberando la energía, nuevamente en forma de calor. Todo esto, puede llegar a explicar, por qué el contenido de carotenoides fue significativamente mayor en condiciones mixotróficas que heterotróficas, por el efecto de la incidencia de la luz. Por su parte, estas sustancias también se producen cuando el microorganismo se enfrenta a un entorno con presencia de sustancias contaminantes.

## **7.5 Consideraciones finales**

Los resultados obtenidos en este trabajo, tienen una relevancia importante dentro del campo de la biorremediación y fitorremediación, ya que aporta evidencias nuevas de la capacidad que tiene algunos microorganismos como *Chlorella* sp. para la remediación de petróleo en inmovilización, lo que abre las puertas para nuevas investigaciones en este campo, sobre todo en un país en donde casi es de la cotidianidad la ocurrencia de derrames de petróleo.

*Chlorella* sp se ratifica como un organismo multifuncional, que ha sido utilizado en un sinnúmero de aplicaciones, con resultados mayoritariamente satisfactorios, situación que también pudo verificarse en esta investigación.

Esta investigación, es el primer paso a seguir para la estandarización de metodologías que permitan aumentar la eficacia y eficiencia de la remediación, para, en un futuro, poder implementar el sistema de inmovilización en campo, con el propósito de reducir no solo los índices de contaminación de petróleo, sino de otras sustancias tóxicas como metales pesados, fármacos y agroquímicos, en los ecosistemas acuáticos del país, aportando al mejoramiento de la calidad de vida de las personas y demás seres vivos.

## 8. Conclusiones

- La microalga *Chlorella sp.* ratifica su lugar como un microorganismo promisorio para la remediación de petróleo crudo en inmovilización bajo condiciones controladas de laboratorio; no obstante, debe ahondarse con mayor profundidad en posteriores investigaciones que permitan la implementación de esta tecnología en campo.
- *Chlorella sp.* es una microalga verde capaz de remover petróleo de mejor forma en condiciones Mixotróficas de crecimiento, lo que facilitaría la posible implementación de ésta como alternativa para la mitigación de derrames.
- Los resultados muestran que bajo la influencia de una concentración de 10 g/L se obtiene la mayor remoción de petróleo, así como también, contenidos más elevados de biomasa seca y pigmentos fotosintéticos, que demuestran el mayor rendimiento que tubo sobre el resto de tratamiento
- Aunque el día 12 obtuvo mayores promedios de remoción de petróleo que el día 9, no hubo diferencias estadísticas significativas, por lo que se propone como mejor día de exposición a este último, dado a que podría ofrecer una mejor relación costo-beneficio.

## 9. Recomendaciones

- Analizar por cromatografía de gases acoplada a masas las muestras de petróleo obtenidas para identificar su perfil químico y así poder tener una idea más clara del proceso de biodegradación.
- Realizar pruebas moleculares que permitan desvelar la identidad taxonómica a nivel de especie de las microalgas utilizadas, para así, poder guiar los enfoques de estudio de una manera más pertinente.
- Realizar estudios en donde se estandarice un tamaño de UF adecuado para llevar a cabo una remoción más eficiente.
- Estandarizar un protocolo que permita homogenizar en mayor medida las cantidades de biomasa retenidas en las matrices de *L. cylindrica*, integrando las variables peso de la matriz con su relación área – volumen, para poder lograr así resultados con un mayor soporte estadístico.
- Incursionar en estudios para la determinación del contenido lipídico de las microalgas, como una posible alternativa para el aprovechamiento de la biomasa generada tras la exposición al petróleo en la producción de biodiesel.
- Probar otros tipos de reactores en lo que se pueda garantizar un mayor crecimiento de estas microalgas.

- Investigar en construcción de un sistema que permita la aplicación de la tecnología de inmovilización en campo, de la forma más económicamente viable posible.

## 10. Bibliografía

- Abdelaziz, A., Leite, G., Belhaj, M., & Hallenbeck, P. (2014) Screening microalgae native to Quebec for wastewater treatment and biodiesel production. *Bioresour Technol*, 157, 140–148.
- Afanasjeva, N. (2014). Conversión pirolítica de los concentrados resino-asfálticos de los crudos pesados. *Rev. ion*, 27(2), 71-86.
- Agnello, A. C., Bagard, M., VanHullebusch, E.D., Esposito, G. & Huguenot, D. (2016). Comparative bioremediation of heavy and petroleum hydrocarbons co-cotaminated soil by natural attenuation, phytoremediation, bioaugmentation and bioaugmentation-assisted phytoremediation. *Science of the Total Environment*, 1 – 12.
- Akhtar, N., Iqbal, J., & Iqbal, M. (2004). Enhancement of lead (II) Biosorption by microalgal biomass immobilized onto loofa (*Luffa cylindrica*) sponge.
- Akhtar, N., Saeed, A., & Iqbal, M. (2003). *Chlorella sorokiniana* immobilized on the biomatrix of vegetable sponge of *Luffa cylindrica*: a new system to remove cadmium from contaminated aqueous medium. *Bioresource Technology*, 88, 163–165.
- Al-Hasan, R. H., Al-Bader, D. A., Sorkhoh, N. A. & Radwan, S. S. (1998). Evidence for n -alkane consumption and oxidation by filamentous cyanobacteria from oil-contaminated coasts of the Arabian Gulf. *Marine Biology*, 130 (3), 521–527. doi:10.1007/s002270050272.
- Allen, R. J., & Waclaw, B. (2018). *Microbial population dynamics and evolution: a statistical physicist's guide*. *Reports on Progress in Physics*. doi:10.1088/1361-6633/aae546
- Andrade, C. & Andrade, L. (2017). An overview on the application of genus *Chlorella* in biotechnological processes. *J. Adv. Res Biotech*, 2 (1), 1-9.

- Angulo M, E., Castellar O, G., Cely, B, M., Ibáñez S, L., & Prasca M, L. (2017). Decoloración de aguas residuales de una industria de pinturas por la microalga *Chlorella sp.* *Revista MVZ Córdoba*, 22 (1), 5706 - 5716. doi:10.21897/rmvz.930.
- Atlas, R. M., & Hazen, T. C. (2011). Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environmental Science & Technology*, 45 (16), 6709–6715. doi:10.1021/es2013227.
- Autoridad Nacional de Licencias Ambiental (2018). Base de datos de contingencia de hidrocarburos 2013 – 2018. Recuperado de: [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/A\\_1150347\\_2018814Base%20de%20datos%20Contingencias%20Hidrocarburos%20a%20Julio%2016%20de%202018.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/A_1150347_2018814Base%20de%20datos%20Contingencias%20Hidrocarburos%20a%20Julio%2016%20de%202018.pdf).
- Azcón, B. J., & Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. Recuperado de: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/FundamentosdeFisiologiaVegetal2008Azcon..pdf>.
- Azubuike, C. C., Chikere, C. B., & Okpokwasili, G. C. (2016). Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32 (11). doi:10.1007/s11274-016-2137-x.
- Bajwa, K., Bishnoi, R. N., Kirrolia, A., Sharma, J., Gupta, S. (2017). Comparison of various growth media composition for physio-biochemical parameters of biodiesel producing microalgal species (*Chlorococcum aquaticum*, *Scenedesmus obliquus*, *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella pyrenoidosa*). *European Journal of Biotechnology and Bioscience*, 5 (6), 27-31.
- Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K & Ignacimuthu, S. (2012). Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces sp.* (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresour. Technol*, 112, 83-90.

- Barron, M. G. (2017). *Photoenhanced Toxicity of Petroleum to Aquatic Invertebrates and Fish*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 73(1), 40–46. doi:10.1007/s00244-016-0360-y
- Battah M. G. El-Sayed, A.B., & El-Sayed, E.W (2013). Growth of the green alga *Chlorella vulgaris* as affected by different carbon sources. *Life Science Journal*, 10(1), 2075 – 2082.
- Bautista, H. & Rahman, M. (2016). Effects of crude oil pollution in the tropical rainforest biodiversity of Ecuadorian Amazon Region. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 8(2), 249-254.
- Ben, C. K., Sánchez, E. & Mourad, B. (2015). The role of algae in bioremediation of organic pollutants. International Research. *Journal of Public and Environmental Health*, 1 (2), 19-32.
- Bergeon, C., Olin, A., Woltmann, S., Stouffer, C., & Taylor, S. (2014). Effects of Oil on Terrestrial Vertebrates: Predicting Impacts of the Macondo Blowout. *Bio Science*, 64 (9), 820–828.
- Bernard, E., Stanley, I., Grace, O., Ebere, P., Abraham, O. & Ibe, K. (2018). Toxicity and Bioremediation of Heavy Metals Contaminated Ecosystem from Tannery Wastewater: A Review. *Journal of Toxicology*, 1 – 16.
- Beyer, J., Trannum, H. C., Bakke, T., Hodson, P. V., & Collier, T. K. (2016). Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 110 (1), 28–51. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.06.027.
- Botello, S. W. Ortiz, Varón, J. & Peña, P. S. (2016). Inmovilización microbiana en polímeros sintéticos para el tratamiento de aguas residuales. *Fundación universidad de San Gil*, 13 (26), 99 – 110.

- Boufadel, M. Chen, B., Foght, B., Hodson, P. Lee, K., Swanson, S., & Venosa, A. (2015). The Behaviour and Environmental Impacts of Crude Oil Released into Aqueous Environments. Recuperado de: <https://www.cepa.com/wp-content/uploads/2016/11/OIW-Report.compressed1.pdf>.
- Brakstad, O. G., Lewis, A., & Beegle, K. C. (2018). A critical review of marine snow in the context of oil spills and oil spill dispersant treatment with focus on the Deepwater Horizon oil spill. *Marine Pollution Bulletin*, 135, 346–356. doi: 10.1016/j.marpolbul.2018.07.028.
- Brar, A., Kumar, M., Vivekanand, V., & Pareek, N. (2017). Photoautotrophic microorganisms and bioremediation of industrial effluents: current status and future prospects. *3 Biotech*, 7(18), 1 - 8. doi:10.1007/s13205-017-0600-5.
- Broström, G., A. Carrasco, L. R. Hole, S. Dick, F. Janssen, J. Mattsson, & S. Berger. (2011). Usefulness of high resolution coastal models for operational oil spill forecast: The Full City accident. *Ocean Science Discussions*, 8 (3):1467-1504. [http://dx. doi.org/10.5194/osd-8-1467-2011](http://dx.doi.org/10.5194/osd-8-1467-2011).
- Bunty S., Himanshi R., Himanshi, P. & Ruchika, S. (2017). Bioremediation - A Progressive Approach Toward Reducing Plastic Wastes. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (12), 1116-1131.
- Busenell, D, I. & Has, k. H. (1940). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms'. *Agricultural experiment station received for publication*, 663 – 673.
- Cecchin, M., Benfatto, S., Griggio, F., Mori, A., Cazzaniga, S., Vitulo, N., ... Ballottari, M. (2018). Molecular basis of autotrophic vs mixotrophic growth in *Chlorella sorokiniana*. *Scientific Reports*, 8 (1), 1 – 13. doi:10.1038/s41598-018-24979-8.

- Cerniglia, C. E., Gibson, D. T., & Baalen, C. V. (1979). Algal oxidation of aromatic hydrocarbons: Formation of 1-naphthol from naphthalene by *Agmenellum quadruplicatum*, strain PR-6. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 88 (1), 50–58. doi:10.1016/0006-291x(79)91695-4.
- Chaillan, F., Gugger, M., Saliot, A., Couté, A., & Oudot, J. (2006). *Role of cyanobacteria in the biodegradation of crude oil by a tropical cyanobacterial mat. Chemosphere*, 62(10), 1574–1582. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.06.050.
- Chand, T., Kumar, V., & Kumar, V (2017). Microbial Remediation of Cyanides. En Ashok, K. R. (Ed). *Bioremediation Current Research and Applications*. (pp, 88 - 110).
- Chang, S, & Paul, R. (2010). Practical Advances in Petroleum Processing. En Walters, C. (Ed.). *The Origin of Petroleum*. (pp. 79 - 103). Nueva York, USA: Springer.
- Chang, S. E., Stone, J., Demes, K., & Piscitelli, M. (2014). Consequences of oil spills: a review and framework for informing planning. *Ecology and Society*, 19 (2), 1 – 26. doi:10.5751/es-06406-190226.
- Chen, B. Y., Chen, C.-Y., Guo, W.-Q., Chang, H.-W., Chen, W.-M., Lee, D.-J., ... Chang, J.-S. (2014). Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized *Scenedesmus obliquus* CNW-N cells on loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Bioresource Technology*, 160, 175–181. doi: 10.1016/j.biortech.2014.02.006.
- Chioccioli, M., Hankamer, B., & Ross, I. L. (2014). *Flow Cytometry Pulse Width Data Enables Rapid and Sensitive Estimation of Biomass Dry Weight in the Microalgae Chlamydomonas reinhardtii and Chlorella vulgaris. PLoS ONE*, 9(5), e97269. doi:10.1371/journal.pone.0097269.
- Cyprain, O, E. (2011). A petroleum review: uses, processing, products and the environment. *Journal Applied Science*, 11 (12), 2084 – 2091.

- Daliry, S., Hallajisani, A., Mohammadi, R. J., Nouri, H., & Golzary, A. (2017). Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *Global J. Environ. Sci. Manage.*, 3(2), 217-230.
- Dash, H.R. & Das, S. (2012). Bioremediation of mercury and importance of bacterial mer genes. *Int. Biodeterior Biodegradation*. 75, 207 - 213.
- Demirbas, A., & Taylan, O. (2016) Removing of resins from crude oils. *Petroleum Science and Technology*, 34:8, 771-777, DOI: 10.1080/10916466.2016.1163397.
- Demirbas, A., & Taylan, O. (2016). Removing of resins from crude oils. *Petroleum Science and Technology*, 34(8), 771–777.doi:10.1080/10916466.2016.1163397.
- Di, C. F., Viscaa, A., Altimaria, P., Toroa, L., Masciocchib, B., Gaetano Iaquaniello, G., Pagnanelli, F. (2016). Two Stage Process of Microalgae Cultivation for Starch and Carotenoid Production. *CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS*, 49, 415 – 420.
- Duca, C. A., Grova, N., Ghosh, M., Mikael, J., Peter, H. M. Jeroen, H., Vanoirbeek J., Appenzeller, B. & Godderis, L. (2018). Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Leads to Nonmonotonic Modulation of DNA and RNA (hydroxy)methylation in a Rat Model. *Scientific reports*, 8 (10577), 1 – 9. DOI:10.1038/s41598-018-28911-y.
- Dzionic, A., Wojcieszynska, D., & Guzik, U. (2016). *Natural carriers in bioremediation: A review. Electronic Journal of Biotechnology*, 23, 28–36. doi: 10.1016/j.ejbt.2016.07.003.
- Erdogan, E. & karaca, A. (2011). Biorremediation the crude Polluted soils. *Asian Journal of Biotechnology*, 3 (3), 206 – 213.

- Eriksen, M., Lebreton, L. C. M., Carson, H. S., Thiel, M., Moore, C. J., Borerro, J. C., ... Reisser, J. (2014). Plastic Pollution in the World's Oceans: More than 5 Trillion Plastic Pieces Weighing over 250,000 Tons Afloat at Sea. *PLoS ONE*, 9(12). doi: 10.1371/journal.pone.0111913.
- Ewa, B., & Danuta, M.-Š. (2016). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics*, 58 (3), 321–330. doi:10.1007/s13353-016-0380-3.
- Farag, S., & Soliman, N. A. (2011). Biodegradation of crude petroleum oil and environmental pollutants by *Candida tropicalis* strain. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(4), 821–830. doi:10.1590/s1516-89132011000400023.
- Fingas, M. (2013). The basic of oil spill cleanup. Recuperado de: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Merv%20Fingas%20.pdf.
- Font, S. Y., Gómez, L. L., Kufundala, W. M., Salazar, H. D., Ortega, D. Y. (2018). Variación de la composición de pigmentos de *Chlorella vulgaris* Beijerinck, con la aplicación del campo magnético estático. *Rev. Cubana Quím.*, 30 (1), 55 – 67.
- Forero, C. M, Montenegro, R. L., Pinilla, A. G., Melgarejo, M. L (2016). Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. *Acta biol. Colomb*, 21(2), 437-442. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n2.51253>.
- Gamilla, M, H. & Ibrahim, M. B. (2004). Algae bioassay for evaluating the role algae in Biorremediation of crude oil: i-isolate Strain. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*, 73, 883 – 889.
- Gani, P., Mohamed, S. N., Peralta, H., Abdul, A., Umi Kalthsom, P. U. & Abdul Rafiq, A. Z. (2015). Phycoremediation of wastewaters and potential hydrocarbon from microalgae: a review. *Advances in environmental biology*, 9 (20), 1 – 8.

- Gatamaneni, B. L., Orsat, V., & Lefsrud, M. (2018). *Factors Affecting Growth of Various Microalgal Species. Environmental Engineering Science.*
- Gnanavel, G., Mohana, J., Thirumarimurugan, M. & Kannadasan, T. (2013). Degradation of plastics waste using microbes. *Chemical Engineering, 54*, 12212-12214.
- Godleads, O. A., Prekeyi, T. F., Samson, E. O., Igelenyah, E. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, 3* (1), 28-39.
- Guerrero, U. M. (2018). Ruptura de oleoductos por interferencia externa, daño ambiental y sostenibilidad en Colombia. *Revista producción + limpia, 13* (2), 7 – 13.
- Guolan, H., Hongwen, S., & Li, C. L. (2000). *Study on the physiology and degradation of dye with immobilized algae. Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 28*(4), 347–363. doi:10.3109/107311900009119364.
- Hamed, I. (2016). The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15* (6), 1104–1123. doi:10.1111/1541-4337.12227.
- Hamouda, R. A., Sorour, N. M., & Yeheia, D. S. (2016). Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation, 112*, 128–134. doi: 10.1016/j.ibiod.2016.05.001.
- Héctor Cerra, H., Cristina, F. M., Horak, C., Lagomarsio, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2010). Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos. Recuperado de: <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>.

- Helm, C. R., Costa, P. D., Debruyh, D. J. & Oshea, J. T. (2015). Overview of effects of oil spill on marine mammals. En Fingas, M. (Ed), Handbook of oil spill science and technology. (pp. 455 - 475). Canada. Copyright C. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118989982>.
- Hernández, P. A. & Labbé, I. J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49 (2), 157-173. DOI 10.4067/S0718-19572014000200001.
- Hernández, P. A. & Labbé, J. I. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157-173. doi:10.4067/s0718-19572014000200001
- Hester, W., Willis, M., Rouhani, S., Steinhoff, A., & Baker, C. (2016). Impacts of the Deepwater Horizon oil spill on the salt marsh vegetation of Louisiana. *Environmental Pollution*, 216, 361–370. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.065.
- Hodac, L. Christine, H., Spitzer, K., Elster, J., Fashauer, F., Brinkmann, N., Lepka, D., Diwan, V. & Fried, T. (2016). Widespread green algae *Chlorella* and *Stichococcus* exhibit polar-temperate and tropical-temperate biogeography. *FEMS Microbiology Ecology*, 92, 1 – 16.
- Hoff, R. Z. (1993). Bioremediation: an overview of its development and use for oil spill cleanup. *Marine Pollution Bulletin*, 26 (9), 476–481. doi:10.1016/0025-326x(93)90463-t .
- Idris, J., Ahmad, Z., Eyu, G. D. & Chukwuekezie, C. S. (2013). Oil spills hazard and sustainable mitigation approach: a review. *Adv. Mater. Res*, 845, 955-959.
- Ifeanyi, V. O. & Ogbulie. J. N. (2016). Biodegradation of Crude Oil by Microalgae *Microcystis flos-aquae*. *Nigerian Journal of Microbiology*, 30(2), 3459-3463.
- Ilavarasi, A., Mubarakali, D., Praveenkumar, R., Baldev E., & N. Thajuddin (2011). Optimization of Various Growth Media to Freshwater Microalgae for Biomass Production, 10 (6), 540 – 545.

- Infante, C., Angulo, E., Zárate, A., July Z. Flórez, F. & Barrios, Z. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3 (2), 159-164.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. (1975). New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b,  $c_1$  and  $c_2$  in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)*, 167, 191-194.
- Joel Jaimes, S. J., Montesinos, S. A., Barbosa, C. R., Moreno, M. S., Rodríguez, B. D., Ramos, C. T., Ocharán, H. M., Toscano, G. J., Olga Beltrán, R. J. (2014). El Citocromo P-450. *Rev Hosp Jua Mex*, 81(4), 250-256.
- Jyothi, K. (2017). Micro algal Immobilization Techniques. *J. Algal Biomass Utiln*, 8(1), 64-70.
- Kadri, T., Magdouli, S., Rouissi, T. & Kaur, S. (2018). *Ex-situ* biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. *Biochem. Eng. J.* 132, 279-287.
- Kalhor, X. A., Movafeghi, A., Mohammadi, N, A., Abedi, E., & Bahrami, A. (2017). Potential of the green alga *Chlorella vulgaris* for biodegradation of crude oil hydrocarbons. *Marine Pollution Bulletin*, 123 (1-2), 286–290. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.08.045.
- Karigar, C. S., & Rao, S. S. (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011, 1–11. doi:10.4061/2011/805187.
- Langangen, O., Olsen, E., Stige, L. C., Ohlberger, J., Yaragina, N. A., Vikebo, F. B., ... Hjermann, D. O. (2017). The effects of oil spills on marine fish: Implications of spatial variation in natural mortality. *Marine Pollution Bulletin*, 119 (1), 102–109. doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.03.037.

- Lee, E., Jalalizadeh, M., & Zhang, Q. (2015). *Growth kinetic models for microalgae cultivation: A review. Algal Research, 12*, 497–512. doi: 10.1016/j.algal.2015.10.004.
- Lee, K., Boufadel, M., Chen, B., Foght, J., Hodson, P., Swanson, S., & Venosa, A. (2015). Expert Panel Report on the Behaviors and Environmental Impacts of Crude Oil Released into Aqueous Environments. *Royal Society of Canada, Ottawa, ON*. ISBN: 978-1-928140-02-3.
- Li, Y.-R., Tsai, W.-T., Hsu, Y.-C., Xie, M.-Z., & Chen, J. J. (2014). Comparison of Autotrophic and Mixotrophic Cultivation of Green Microalgal for Biodiesel Production. *Energy Procedia, 52*, 371–376. doi: 10.1016/j.egypro.2014.07.088.
- Liu, Y. Y., Weisberg, R. H., Hu, C. C., & Zheng, L. L. (2013). Trajectory forecast as a rapid response to the Deepwater Horizon oil spill. En Liu, Y. Y., Macfadyen, A., Ji, Z. G. & R. H. Weisberg, (Ed). *Monitoring and modeling the Deepwater Horizon oil spill: a record-breaking enterprise*. Washington, USA: American Geophysical Union.
- López, M. S. & Mesa V. J. (2017). Eficiencia de la microalga *Chlorella* sp. Para la remoción de nutrientes en las lagunas de oxidación en la ciudad de manta. Universidad Lanca Eloy Alfaro de Manabí. Tesis de grado, 13 – 16.
- López, S, F., Moraña, B. L, Salusso, M. M. (2015). Aislamiento, identificación y cultivo de *Chlorella vulgaris* con potencial para suplemento nutricional de peces. Investigaciones en *Facultades de Ingeniería del NOA, 10*, 829 - 833.
- Mansour, H. B., Mosrati, R., Barillier, D., Ghedira, K., & Chekir-Ghedira, L. (2012). *Bioremediation of industrial pharmaceutical drugs. Drug and Chemical Toxicology, 35(3)*, 235–240. doi:10.3109/01480545.2011.591799

- Marinho, S. E., Azevedo, C. A. A., Trigueiro, T. G., Pereira, D. C., Carneiro, M. A. A., & Camara, M. R. (2011). Bioremediation of aquaculture wastewater using macroalgae and *Artemia*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65 (1), 253–257. doi: 10.1016/j.ibiod.2010.10.001.
- Martínez, O. M., Melé, R. A., Sabaté, C. M. Gordo, O. C., Cibrián, M. N. & Mayor, P. (2017). First evidences of Amazonian wildlife feeding on petroleum-contaminated soils: A new exposure route to petrogenic compounds? *Environmental Research*, 160, 514–517.
- McCarthy, K., Niemann, M. Palmowski, D., Peters, K. & Stankewicz, A. (2011). Geoquímica básica del petróleo para la evaluación de rocas generadoras. *Oilfield review*, 23 (2), 36 – 48.
- McDonnell, A. M., & Dang, C. H. (2013). Basic review of the cytochrome p450 system. *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 4(4), 263–268.
- Meier, S., Craig Morton, H., Nyhammer, G., Grøsvik, B. E., Makhotin, V., Geffen, A., ... Svardal, A. (2010). Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. *Marine Environmental Research*, 70 (5), 383–394.
- Mohammad Mirzaie, M. A., Kalbasi, M., Mousavi, S. M., & Ghobadian, B. (2015). Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2), 150–156. doi:10.1080/10826068.2014.995812.
- Mohammad Mirzaie, M. A., Kalbasi, M., Mousavi, S. M., & Ghobadian, B. (2015). Investigation of mixotrophic, heterotrophic, and autotrophic growth of *Chlorella vulgaris* under agricultural waste medium. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2), 150–156. doi:10.1080/10826068.2014.995812.

- Morales, S. D., Martínez, R. O., Kyndt, J., & Martínez, A. (2014). Heterotrophic growth of microalgae: metabolic aspects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(1), 1–9. doi:10.1007/s11274-014-1773-2.
- Mosa, K. A., Saadoun, I., Kumar, K., Helmy, M. & Dhankher, P. O. (2016). Potential biotechnological strategies for the cleanup of heavy metals and metalloids front plan. *From Plant Sci*, 7, 300 – 310. Doi: 10.3389/fpls.2016.00303.
- Mostafaii, G. R., Aseman, E., Asgharnia, H., Akbari, H., Iranshahi, L., & Sayyaf, H. (2016). Efficiency of the earthworm *eisenia fetida* under the effect of organic matter for bioremediation of soils contaminated with cadmium and chromium. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 33(4), 827–834. doi:10.1590/0104-6632.20160334s20150230.
- Nair, P. C., McKinnon, R. A., & Miners, J. O. (2016). *Cytochrome P450 structure–function: insights from molecular dynamics simulations*. *Drug Metabolism Reviews*, 48(3), 434–452. doi:10.1080/03602532.2016.1178771.
- NOAA. (2010). Oil Spills in Coral Reefs. Recuperado de: [https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/Oil\\_Spill\\_Coral.pdf](https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/Oil_Spill_Coral.pdf).
- Onwurah, I. N., Ogugua, V. N., Onyike, N. B., Ochonogor, A. E. & Otitoju, O. F. (2007). Crude Oil Spills in the Environment, Effects and Some Innovative Clean-up Biotechnologies. *Int. J. Environ. Res*, 1 (4), 307-320.
- Ortiz, V. M., Romero, M. M., & Meza, R. L. (2018). La biorremediación con microalgas (*Spirulina máxima*, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de

- Ubaque, Colombia. *Rev. investig. desarro. innov*, 9 (1), 163-176. doi: 10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153.
- Pandey, P., Pathak, H., & Saurabh Dave, S. (2016). Microbial Ecology of Hydrocarbon Degradation in the Soil: A Review. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 10 (1), 1-15.
- Paran, G., Norshuhaila, M., Hazel, M., Ab Aziz, A., Umi, K., Abdul, R. (2015). Phycoremediation of Wastewaters and Potential Hydrocarbon from Microalgae: A Review. *Advances in Environmental Biology*, 9(20), 1-8.
- Pardo, I. T. (20 de abril del 2018). En Colombia se han derramado 3,7 millones de barriles de crudo. *El Tiempo*. Recuperado de: <https://www.eltiempo.com/vida/medio-ambiente/cifras-de-derrames-de-crudo-en-colombia-en-los-ultimos-anos-207664>.
- Pashaei, R., Gholizadeh, M. Jodeiri I. K. & Ahad, H. (2015). The Effects of Oil Spills on Ecosystem at the Persian Gulf. *Int. J. Rev. Life. Sci.*, 5 (3), 82-89.
- Perelo, W. L. (2010). Review in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Harzard Mater*, 177, 81 – 89. Doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.12.090.
- Pérez, G. O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2011). Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 45(1), 11–36. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.037.
- Piccini, M., Raikova, S., Allen, M. J., & Chuck, C. J. (2019). A synergistic use of microalgae and macroalgae for heavy metal bioremediation and bioenergy production through hydrothermal liquefaction. *Sustainable Energy & Fuels*, 3, 292 – 301. doi: 10.1039/c8se00408k.

- Praveen, K., Abinandan, S., Natarajan, R., & Kavitha, M. S. (2018). *BIOCHEMICAL RESPONSES FROM BIOMASS OF ISOLATED Chlorella sp., UNDER DIFFERENT CULTIVATION MODES: NON-LINEAR MODELLING OF GROWTH KINETICS*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 35(2), 489–496. doi:10.1590/0104-6632.20180352s20170188.
- Priyadarshani, I., Sahu, D. & Rath, B. (2015). Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives. *J Biochem Tech*, 3 (3), 299-304.
- Prototheca zopfii (Chlorophyta) capaz de utilizar "gas oil", registrada por primera vez en aguas contaminadas de Argentina. MARÍA S. VIGNA<sup>1,2</sup>, JOSEFINA ALBERGHINA<sup>1</sup>, SILVANA M. DEL MÓNACO<sup>3</sup> & MIGUEL A. GALVAGNO<sup>3</sup>. *ilizar "gas oil", registrada por primera vez en aguas contaminadas DARWINIANA* ISSN 0011-6793 40(1-4): 45-50. 2002
- Ramírez, M. I., Arevalo, A. P., Sotomayor, S., & Bailon M. N. (2017). Contamination by oil crude extraction – Refinement and their effects on human health. *Environmental Pollution*, 231, 415–425. doi: 10.1016/j.envpol.2017.08.017.
- Ray, S. (2014). Bioremediation of Pesticides. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 511–518. doi:10.1016/b978-0-12-800021-2.00022-4
- Roberts, D. A., Paul, N. A., Bird, M. I., & de Nys, R. (2015). Bioremediation for coal-fired power stations using macroalgae. *Journal of Environmental Management*, 153, 25–32. doi: 10.1016/j.jenvman.2015.01.036.
- Rodríguez, R. P., Sánchez, M. Y., Zumalacárregui, C. L., Osney, P., Hernández, M. A., Echeveste, M. P., Lombardie, T. A. (2015). Obtención de biomasa de microalga Chlorella vulgaris en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *AFINIDAD LXXIII*, 574, 125 – 129.

Romero, L. J. (2014). Adaptación de microalgas a contaminantes antropogénicos emergentes: aplicaciones (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Departamento de producción animal. Recuperado de:

Saeed, A., & Iqbal, M. (2013). *Loofa (Luffa cylindrica)* sponge: Review of development of the biomatrix as a tool for biotechnological applications. *Biotechnology Progress*, 29(3), 573–600. doi:10.1002/btpr.1702.

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. doi: 10.1016/j.rser.2014.04.007.

Sammarco, P. W., Kolian, S. R., Warby, R. A., Bouldin, J. L., Subra, W. A. & Porter, S. A. (2013). Distribution and concentrations of petroleum hydrocarbons associated with the BP/ Deepwater Horizon Oil Spill, Gulf of Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 73(1), 129-143.

Santos, J., Vetere, A., Wisniewski, A., Eberlin, M., & Schrader, W. (2018). *Comparing Crude Oils with Different API Gravities on a Molecular Level Using Mass Spectrometric Analysis. Part 2: Resins and Asphaltenes.* *Energies*, 11(10), 2767. doi:10.3390/en11102767.

Sharma, S. (2012). Bioremediation: Features, Strategies and applications. *Asian Journal of Pharmacy and Life Science*, 2 (2), 202 – 213.

Shen, H. (2016). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Their Global Atmospheric Emissions, Transport, and Lung Cancer Risk. Recuperado: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/(Springer%20Theses)%20Huizhong%20Shen%20(auth.

Smith, S. j., Aardenne, V. J., Klimont, R, J., Andres, J. R., Volke, A. & Arias, D. (2011). Anthropogenic sulfur dioxide emissions: 1850–2005 S. *Atmos. Chem. Phys*, 11, 1101–1116.

- Suleman, S. (2011). Oil Spills: Law on Liability with Special Reference to the Indian Regime. *SSRN Electronic Journal*, 1(48), 1 – 32. doi:10.2139/ssrn.2044827.
- Troisi, G., Barton, S., & Bexton, S. (2016). Impacts of oil spills on seabirds: Unsustainable impacts of non-renewable energy. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(37), 16549–16555. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.04.011.
- Uma, A. M., Aruna, S., Gomathi, M. & Ali H. A. (2017). Bioremediation by free and immobilized bacteria isolated from tannery effluent. *Impact Journals*, 5 (7), 75 – 90.
- Uzoh, C. V., Ifeanyi, V. O., Okwuwe, C. I., Oranus, S. U., Braide, W., Iheukwumere, I. H.... Ntamzor, B.G. (2015). *Effect of Light on the Biodegradation of Crude Oil by the Algae Closterium species*. *Journal of Natural Sciences Research*, 5 (22), 112 – 118.
- Vacca J. E., Victor, A., Gardo, R., Angulo, M., Diana, M. & Puentes, ... Plaza, V. (2017). Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. *Prospect*, 15 (1), 93 – 99.
- Vandenbroucke, M., & Largeau, C. (2007). *Kerogen origin, evolution and structure*. *Organic Geochemistry*, 38(5), 719–833. doi:10.1016/j.orggeochem.2007.01.001
- Velásquez, A. (2016). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia: Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8 (1158), 153 – 169.
- Velázquez, J. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Fito remediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 8 (1), 151 – 167.

- Walters, C. (2007). The origin of petroleum. En Hsu, C. & Robinson, P. (Ed), practical Advances in Petroleum Processing (pp, 79 – 101). New York, USA. Springer.
- Willey, J. Sherwood, L. & Woolverton. (2014). Prescotts Microbiology. Nueva York, Estados Unidos: McGrawHill.
- Wong, H. Y., Ho, K. C., Leung, H. M., & Yung, K. K. (2017). Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *Journal of Aquaculture & Marine Biology* 6 (1), 1 – 10.
- Wood, J. & Franks, A. (2016). Microorganisms in heavy metal bioremediation: strategies for applying microbial-community engineering to remediate soils. *AIMS Bioengineering*, 3 (2): 211-229.
- Xiong, J. Q., Kurade, M. B. & Jeon, B. H. (2017). Biodegradation of levofloxacin by an acclimated freshwater microalga, *Chlorella vulgaris*. *Chem. Eng. J*, 313(1), 1251-1257.
- Xu, Y., & Harvey, P. J. (2019). Carotenoid Production by *Dunaliella salina* under Red Light. *Antioxidants*, 8(5), 123. doi:10.3390/antiox8050123.
- Yan, Y., Fu, D., & Shi, J. (2019). Screening and Immobilizing the Denitrifying Microbes in Sediment for Bioremediation. *Water*, 11(3), 614. doi:10.3390/w11030614.
- Yang, J., Dong, F. Q., Dai, Q. W., Liu, M. X., Nie, X. Q., Zhang, D., Ma, J. L. & Zhou, X. (2015). Biosorption of radionuclide uranium by *Deinococcus radiodurans*. *Europepmc.org*, 35 (4), 1010-1014.
- Yemashova, N. A., Murygina, V. P., Zhukov, D. V., Zakharyantz, A. A., Gladchenko, M. A., Appanna, V., & Kalyuzhnyi, S. V. (2007). Biodeterioration of crude oil and oil derived products: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 6(4), 315–337. doi:10.1007/s11157-006-9118-8.

Zhan, J., Rong, J., & Wang, Q. (2017). Mixotrophic cultivation, a preferable microalgae cultivation mode for biomass/bioenergy production, and bioremediation, advances and prospect. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(12), 8505–8517. doi: 10.1016/j.ijhydene.2016.12.021.

Zobell, C. E. (1946). Action of Microorganisms on hydrocarbons. *Bacterial Rev.*, 10 (295), 1 - 49.

## Anexos

### Anexo 1:

Tabla 5. Pesos obtenidos para los segmentos de *L. cylindrica*, UF y biomasa fresca inmovilizada.

<b>Peso de los segmentos de <i>L.</i> <i>cylindrica</i> (g)</b>	<b>Peso de las UF (g)</b>	<b>Biomasa algar inmovilizada en las UF (g)</b>
1,23	2,55	1,32
1,26	2,59	1,33
1,31	2,58	1,27
1,37	3,74	1,39
1,27	2,23	1,26
1,24	2,69	1,45
1,25	2,46	1,47
1,28	2,67	1,39
1,36	3,76	1,40
1,38	2,48	1,36
1,21	2,49	1,28
1,27	2,56	1,29
1,29	2,64	1,28
1,36	2,84	1,48
1,34	3,81	1,47
1,37	3,81	1,44
1,32	2,82	1,30
1,36	2,68	1,32
1,33	2,79	1,46
1,27	2,55	1,28
1,25	2,50	1,29
1,31	2,71	1,40
1,21	2,56	1,35
1,23	2,53	1,30
1,29	2,60	1,32
1,30	3,76	1,46
1,31	2,60	1,29
1,36	2,66	1,56
1,25	2,57	1,30
1,37	2,70	1,33
1,31	2,67	1,36

---

1,32	2,70	1,38
1,36	3,78	1,42
1,38	2,87	1,49
1,26	2,56	1,30
1,25	2,53	1,28
1,23	2,59	1,36
1,38	3,75	1,37
1,30	2,69	1,39
		1,33
1,35	2,68	
1,37	2,68	1,31
1,39	2,69	1,30
1,32	2,80	1,48
1,32	2,78	1,46
1,33	2,78	1,45
1,34	3,80	1,46
1,35	2,65	1,26
1,29	2,62	1,33
1,28	2,65	1,36
1,27	2,63	1,36
1,22	2,56	1,34
1,22	2,55	1,33
1,25	2,63	1,28
1,32	2,60	1,28
1,33	2,69	1,30
1,38	2,74	1,36
1,32	2,74	1,42
1,30	2,72	1,42
1,27	2,70	1,63
1,24	2,62	1,38
1,25	2,65	1,40
1,28	2,73	1,49
1,27	2,72	1,46
1,26	2,72	1,45
1,28	2,75	1,47
1,33	2,81	1,48
1,34	2,67	1,33
1,32	2,59	1,27
1,31	2,60	1,29
1,28	2,59	1,31
1,29	2,63	1,34
1,27	2,61	1,34
1,21	2,63	1,42

---

	1,24	2,62	1,38
	1,39	2,75	1,36
	1,27	2,67	1,40
	1,26	2,57	1,31
	1,28	2,73	1,45
	1,25	2,73	1,48
<b>Medias</b>	<b>1,29</b>	<b>2,66</b>	<b>1,37</b>
<b>Sd</b>	<b>0,018</b>	<b>0,10</b>	<b>0,072</b>

**Nota:** se muestran los pesos promedios y las desviaciones estándar para cada uno.

## Anexo 2:

Biomasa fresca y seca obtenidas bajo condiciones de crecimiento heterotróficas y Mixotróficas.

Medio de crecimiento	Días de exposición	Concentración (g/L)	Réplicas	Biomasa fresca	Biomasa seca
<b>H E T E R O T R Ò F I C O</b>	3	Control	1	1,836	0,0162
			2	1,856	0,0171
			3	1,846	0,0166
		5	1	2,196	0,0275
			2	2,151	0,0255
			3	2,174	0,0265
		10	1	2,207	0,0278
			2	2,235	0,0288
			3	2,221	0,0283
		15	1	1,914	0,0190
			2	1,950	0,0203
			3	1,932	0,0197
		20	1	2,028	0,0225
			2	2,082	0,0240
			3	2,055	0,0233
		Control	1	1,929	0,0196
			2	1,991	0,0212
			3	1,960	0,0204
		5	1	2,223	0,0285
			2	2,183	0,0273
			3	2,203	0,0279
		10	1	2,331	0,0308
			2	2,375	0,0320
			3	2,353	0,0313

	6		1	2,125	0,0247
		15	2	2,053	0,0231
			3	2,089	0,0239
			1	2,074	0,0238
		20	2	2,179	0,0265
			3	2,126	0,0252
			1	2,181	0,0272
		Control	2	2,175	0,0260
			3	2,178	0,0251
			1	2,491	0,0342
		5	2	2,397	0,0322
			3	2,444	0,0332
			1	2,494	0,0342
		10	2	2,541	0,0351
			3	2,517	0,0360
			1	2,252	0,0290
		15	2	2,215	0,0280
	9		3	2,233	0,0270
			1	2,379	0,0320
		20	2	2,310	0,0302
			3	2,345	0,0311
			1	2,260	0,0291
		Control	2	2,193	0,0275
			3	2,226	0,0283
			1	2,621	0,0366
		5	2	2,519	0,0348
			3	2,570	0,0357
			1	2,738	0,0391
		10	2	2,670	0,0377
			3	2,704	0,0384
			1	2,240	0,0283
		15	2	2,394	0,0312
	12		3	2,317	0,0310
			1	2,568	0,0355
		20	2	2,458	0,0333
			3	2,513	0,0344
			1	1,942	0,0201
		Control	2	1,877	0,0175
			3	1,915	0,0188
			1	2,317	0,0305
		5	2	2,258	0,0291
			3	2,449	0,0278
			1	2,247	0,0290
		10	2	2,220	0,0282

**M  
I  
X  
O  
T**

R Ò F I C O	3	15	3	2,233	0,0298	
			1	2,016	0,0223	
			2	1,972	0,0207	
				3	1,994	0,0215
				1	2,180	0,0266
			20	2	2,155	0,0256
				3	2,167	0,0261
				1	1,961	0,0205
			Control	2	2,049	0,0231
		3		2,005	0,0218	
		1		2,353	0,0312	
		5	2	2,249	0,0290	
			3	2,301	0,0301	
			1	2,366	0,0314	
		10	2	2,380	0,0332	
			3	2,373	0,0323	
			1	2,101	0,0244	
		6	15	2	2,177	0,0260
				3	1,139	0,0252
				1	2,236	0,0288
			20	2	2,205	0,0278
				3	2,220	0,0283
				1	2,223	0,0282
			Control	2	2,158	0,0256
				3	2,191	0,0269
				1	2,575	0,0356
		5	2	2,450	0,0332	
			3	2,407	0,0344	
			1	2,649	0,0372	
		10	2	2,761	0,0394	
			3	2,705	0,0383	
			1	2,370	0,0316	
		9	15	2	2,322	0,0308
	3			2,351	0,0312	
	1			2,364	0,0314	
	20		2	2,415	0,0330	
			3	2,390	0,0322	
			1	2,307	0,0303	
	Control		2	2,262	0,0291	
			3	2,285	0,0297	
			1	2,695	0,0381	
	5	2	2,761	0,0395		
		3	2,728	0,0388		
		1	2,780	0,0402		

12	10	2	2,844	0,0428
		3	2,812	0,0415
		1	2,447	0,0339
	15	2	2,415	0,0325
		3	2,431	0,0332
		1	2,594	0,0361
	20	2	2,527	0,0349
		3	2,561	0,0355

### Anexo 5:

Análisis de varianza para la remoción de petróleo

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	26935,04	22	1224,32	408,07	<0,0001
Condiciones de crecimiento	591,48	1	591,48	197,14	<0,0001
Concentraciones de petróleo (g/L)	1811,57	3	603,86	201,27	<0,0001
Tiempo de exposition (Días)	24306,32	3	8102,11	2700,45	<0,0001
Condiciones de crecimiento*Concentraciones de petróleo (g/L)	95,29	3	31,76	10,59	<0,0001
Condiciones de crecimiento*Tiempo de exposición (Días)	11,22	3	3,74	1,25	0,2993
Concentraciones de petróleo (g/L)*Tiempo de exposición (Días)	119,17	9	13,24	4,41	0,0001
Error	219,02	73	3		
Total	27154,06	95			

### Anexo 6:

Prueba de Shapiro-Wilks para la remoción de petróleo

Variable	n	Media	D.E.	W*	p-valor
RDUO Ficorremediación de petróleo (%)	96	0	1,52	0,98	0,7958

