



UNIVERSIDAD ESTATAL
PENÍNSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

**“SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN EN AGUAS
RESIDUALES UTILIZANDO MICROALGAS
INMOVILIZADAS”**

TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR

Previa a la obtención del Título de:
BIÓLOGO

AUTOR:
SORIANO CANCIO JOAN FRANSHESCO

TUTOR ACADÉMICO:
Ing. JORGE LEONARDO MAGALLANES
TOMALÁ, M.Sc.

LA LIBERTAD – ECUADOR

2026

UNIVERSIDAD ESTATAL
PENINSULA DE SANTA ELENA
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
CARRERA DE BIOLOGÍA

“SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN EN AGUAS
RESIDUALES UTILIZANDO MICROALGAS
INMOVILIZADAS”

TRABAJO DE INTEGRACIÓN
CURRICULAR
Previa a la obtención del Título de:

BIÒLOGO

AUTOR:

SORIANO CANCIO JOAN FRANSHESCO

TUTOR ACADÉMICO:

Ing. JORGE LEONARDO MAGALLANES TOMALÁ, M.Sc.

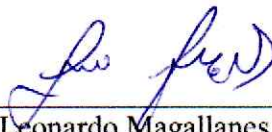
LA LIBERTAD – ECUADOR

2026

DECLARACIÓN DEL DOCENTE TUTOR

En mi calidad de Docente Tutor del Trabajo de Integración Curricular, “**SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN EN AGUAS RESIDUALES UTILIZANDO MICROALGAS INMOVILIZADAS**”, elaborado por **JOAN FRANSESCO SORIANO CANCIO**, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo/a, me permito declarar que luego de haber dirigido su desarrollo y estructura final del trabajo, este cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, apruebo en todas sus partes, encontrándose apto para la evaluación del docente especialista.

Atentamente



Ing. Jorge Leonardo Magallanes Tomalá, M.Sc.

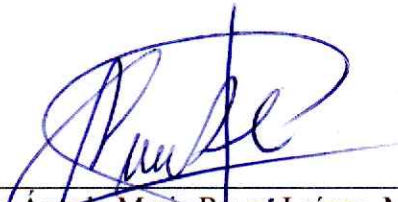
DOCENTE TUTOR

C.I. 0928355346

DECLARACIÓN DEL DOCENTE DE ÁREA

En mi calidad de Docente Especialista, del Trabajo de Integración Curricular **“SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN EN AGUAS RESIDUALES UTILIZANDO MICROALGAS INMOVILIZADAS”**, elaborado por **JOAN FRANSHESCO SORIANO CANCIO**, estudiante de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Península de Santa Elena, previo a la obtención del título de Biólogo, me permito declarar que luego de haber evaluado el desarrollo y estructura final del trabajo, éste cumple y se ajusta a los estándares académicos, razón por la cual, declaro que se encuentra apto para su sustentación.

Atentamente



Blga. Ángela María Reyes Láinez, M.Sc.

DOCENTE DE ÁREA

C.I. 0913401014

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo a mis padres, Cancio Pita Daysse Mireya y Soriano Soriano Sergio Aquilino, quienes han sido un pilar esencial en mi desarrollo académico, y cuyo ejemplo de honestidad, resiliencia y perseverancia, junto con sus consejos, enseñanzas y amor me han formado para ser una persona de bien.

A mis queridos abuelos, Cancio Godoy Héctor y Pita Pizarro Lucila, quienes me han brindado amor, enseñanzas de vida y han contribuido a la persona que soy hoy. Así como a mi pareja Salvador Clemente Melanie, quien me ha apoyado no solo en mi vida personal, sino también con su compañía y ayuda durante la elaboración de este trabajo.

Ustedes me han motivado a ser quien soy y a llegar hasta donde hoy me encuentro, cumpliendo cada una de mis metas. Por ello, este logro también les pertenece a ustedes.

Joan Franshesco Soriano Cancio

AGRADECIMIENTO

A las autoridades y personal académico de la Universidad Estatal Península de Santa Elena por liderar el proceso de formación profesional. En particular, al Ing Jorge Magallanes Tomala, tutor de tesis, por su guía profesional oriento el presente trabajo.

Asimismo, deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mis hermanas, Lucy y Angie con quienes he compartido risas, enojos y lágrimas; siempre serán fundamentales en mi vida. A mis tías, Yuvani y Hayde, quienes siempre han sido un apoyo constante e invaluable.

A mi grupo de amigos de la facultad, algunos ya egresados y otros que aún luchan por obtener este título, gracias por su apoyo incondicional y por ayudarme a despejar las dudas que surgieron durante la elaboración de este trabajo. Finalmente, mi agradecimiento al Blgo. William Salvador y a la Blga. Sandra Clemente, quienes estuvieron desde el inicio apoyándome en la construcción de mi propuesta y en sus posteriores avances.

“El éxito siempre está acompañado de buenos recuerdos y buenas amistades” por ello, gracias de corazón a cada una de las personas que pasaron por esta etapa de mi vida.

TRIBUNAL DE GRADO

Trabajo de Integración Curricular presentado por **Soriano Cancio Joan Franshesco** como requisito parcial para la obtención del grado de Biólogo/a de la Carrera de Biología, Facultad de Ciencias del Mar de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Trabajo de Integración Curricular **APROBADO** el: 11/12/2025



Ing. Jimmy Agustin Villón Moreno, M.Sc.
DIRECTOR/A DE CARRERA
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Blga. Angela Maria Reyes Láinez, M.Sc.
PROFESOR DE ÁREA
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Ing. Jorge Leonardo Magallanes Tomalá, M.Sc.
DOCENTE TUTOR
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Blgo. Richard Gonzalo Duque Marín, Mgt.
DOCENTE GUÍA DE LA UIC II
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lcdo. Pascual Alejandro Roca Silvestre, M.Sc.
SECRETARIO/A DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN EXPRESA

Yo, **SORIANO CANCIO JOAN FRANSHESCO**, estudiante de la carrera de Biología, declaro que el Trabajo de Integración Curricular, cuyo título es **“SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN EN AGUAS RESIDUALES UTILIZANDO MICROALGAS INMOVILIZADAS”** es de mi exclusiva autoría y responsabilidad. Las ideas, datos, investigación y resultados que se presentan son producto de mi trabajo académico y pertenece al patrimonio intelectual de la Universidad Estatal Península de Santa Elena.

Atentamente



Soriano Cancio Joan Franshresco.

C.I. 0928227628

ÍNDICE GENERAL

1. RESUMEN	20
2. INTRODUCCIÓN	1
3. PROBLEMÁTICA	3
4. JUSTIFICACIÓN	5
5. OBJETIVO PRINCIPAL	7
6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	7
HIPÓTESIS	7
7. MARCO TEÓRICO	8
7.1. Aguas Residuales.	8
7.2. Compuestos Inorgánicos	9
7.2.1. Fosfato	9
7.2.2. Nitrato	9
7.2.3. Nitrito	10
7.3. Eutrofización	10
7.4. Normativa Ambiental Vigente	11
7.5. Tecnologías de Tratamiento de Aguas Residuales	13
7.6. Sistema de Tratamiento por Etapas	13
7.7. Clasificación de Métodos de Tratamiento de Aguas Residuales. ...	14
7.7.1. Métodos Físicos	14
7.7.2. Métodos Químicos	15
7.7.3. Métodos Biológicos	15
7.8. Biorremediación	17
7.8.1. Fitorremediación	18
7.9. Cultivo de Microalgas	19
7.9.1. Componente de un Cultivo de Microalgas	20
7.10. Parámetros de un Cultivo de Microalgas	21
7.10.1. Luz	21

7.10.2.	Temperatura	22
7.10.3.	pH.....	22
7.10.4.	Nutrientes.....	22
7.10.5.	Agitación y Transferencia de Gases.	23
7.10.6.	Contaminación y Depredadores	24
7.11.	Tipos de Sistemas de Cultivo	24
7.11.1.	Sistemas Abiertos	24
7.11.2.	Sistemas Cerrados.....	25
7.11.3.	Régimen Operativo	25
7.12.	Cultivo Discontinuo (batch).....	26
7.12.1.	Ventajas, Limitaciones, y Aplicaciones	28
7.13.	Características Generales de las Microalgas.	29
7.13.1.	Generalidades del filo <i>Chlorophyta</i>	30
7.14.	Generalidades del Género <i>Chlorella</i>	30
7.14.1.	Clasificación Taxonómica	31
7.14.2.	Morfología de <i>Chlorella</i>	32
7.15.	Generalidades del Género <i>Tetraselmis</i>	32
7.15.1.	Clasificación Taxonómica	33
7.15.2.	Morfología de <i>Tetraselmis</i>	34
7.16.	Inmovilización de Microalgas	34
7.16.1.	Proceso de Inmovilización de Microalgas	35
7.16.2.	Interacción Entre Agua Residual, Perla de Alginato y Microalga	37
7.16.3.	Beneficios de las Perlas de Alginato	39
8.	MARCO METODOLÓGICO	40
8.1.	Tipo de Investigación	40
8.2.	Área De Recolección de Muestras.	40
8.3.	Calidad admisible de agua marina.....	41
8.4.	Trabajo de Campo	43

8.4.1.	Toma de Muestras de las Aguas Residuales.	43
8.4.2.	Registro de parámetros fisicoquímicos.	44
8.5.	Trabajo De Laboratorio.	44
8.5.1.	Análisis de nitrato, nitrito y fosfatos por métodos fotométricos. 44	
8.5.2.	Cultivo Discontinuo o Batch.	46
8.5.3.	Preparación del medio guillar f/2 para <i>Chlorella</i> sp. y <i>Tetraselmis</i> sp.	47
8.6.	Preparación del Sistema de Cultivo.	49
8.6.1.	Dilución de la cepa madre.	49
8.6.2.	Preparación de agar	50
8.6.3.	Siembra en agar.	51
8.6.4.	Siembra en tubos	52
8.6.5.	Cultivo en Matraz Erlenmeyer	53
8.7.	Cuantificación de Microalgas Mediante Cámara Neubauer	53
8.8.	Curva de Crecimiento	54
8.9.	Inmovilización de las Microalgas.	55
8.9.1.	Cálculo de la Densidad Celular Inicial	57
8.10.	Determinación de la Densidad de Microalgas para Biorremediar Aguas Residuales	58
8.11.	Comparación de Efectividad del Sistema de Biorremediación en Escalado	60
9.	ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	73
9.1.	Caracterización Fisicoquímica del Agua Residual	73
9.2.	Curva de Crecimiento de los Cultivos de Microalgas	74
9.2.1.	Curva de Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.	75
9.2.2.	Curva de Crecimiento de <i>Tetraselmis</i> sp.	77
9.2.3.	Densidad Celular de Inmovilización en Perlas de Alginato	79
9.3.	Determinar la Efectividad en la Reducción de Nutrientes en Función de la Densidad Celular a Partir de Distintas Proporciones.	80

9.3.1	Reducción De Fosfato (PO_4)	81
9.3.2	Reducción de Nitrato (NO_3)	83
9.3.3	Reducción de Nitrito (NO_2)	86
9.4.	Análisis Estadístico Comparativo de la Reducción de Nutrientes (PO_4 , NO_3 y NO_2)	89
9.4.1.	Reducción Porcentual de Fosfato (PO_4)	89
9.4.2.	Reducción Porcentual de Nitrato (NO_3)	92
9.4.3.	Reducción Porcentual de Nitrito (NO_2)	95
9.5.	Eficiencia de Remoción en el Sistema de Tratamiento (20000 mL)	98
9.5.1	Cinética de Remoción en el Sistema de 20000ml	98
9.5.2	Comparación de Eficiencia de Remoción entre Escalas (200 mL vs 20000 mL)	105
10.	DISCUSIÓN	109
11.	CONCLUSIÓN	115
12.	RECOMENDACIONES	118
13.	BIBLIOGRAFÍA	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas en un sistema discontinuo o batch	27
Figura 2 Fases del cultivo de las microalgas.	28
Figura 3 Microalga del género Chlorella	31
Figura 4 Microalga del generó Tetraselmis.....	33
Figura 5 Procesos intracelulares de Nitrógeno y Fósforo en microalgas inmovilizadas aplicadas al tratamiento de aguas residuales	38
Figura 6 Área de recolección de muestras "La Chueca - Salinas - Santa Elena"	41
Figura 7 Cultivo de microalgas siguiendo el modelo discontinuo/Batch hasta matraces de 2000 mL.	47
Figura 8 Dilución seriada para cultivo de microalgas.	50
Figura 9 Procesos para la elaboración de perlas de alginato con microalgas.	57
Figura 10 Diseño experimental en botellas de vidrio de 400mL.	60
Figura 11 Sistema de biorremediación por etapas.	61
Figura 12 Curva de crecimiento de Chlorella sp.....	75
Figura 13 Curva de crecimiento de Tetraselmis sp.	77
Figura 14 Concentración inicial y final del Fosfato	81
Figura 15 Concentración inicial y final del Nitrato	84
Figura 16 Concentración inicial y final del Nitrito	86

Figura 17 Reducción porcentual de PO₄ por tratamiento y proporción (Media ± DE).....	89
Figura 18 Reducción porcentual de NO₃ por tratamiento y proporción (Media ± DE).....	92
Figura 19 Reducción porcentual de NO₂ por tratamiento y proporción (Media ± DE).....	95
Figura 20 Cinética de Remoción de Fosfato (PO₄) en Sistema de 20000mL .	99
Figura 21 Cinética de Remoción de Nitrato (NO₃) en Sistema de 20000mL	101
Figura 22 Cinética de Remoción de Nitrato (NO₂) en Sistema de 20000mL	103
Figura 23 Comparación de Eficiencia de Remoción Final (Escala botellas vs Escalado)	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Descripción de las fases de crecimiento en un cultivo discontinuo/Batch	27
Tabla 2 Parámetros fisicoquímicos (pH, Salinidad, Temperatura, Fosfato, Nitrato, Nitrito) del TULSMA y el Agua Marina.....	42
Tabla 3 Medio F/2 modificado a partir de Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975.....	48
Tabla 4 Medio F/2: Contenido de metales trazas.	48
Tabla 5 Parámetros ideales para cultivo de microalgas (Torrentera. et al. 1989).....	52
Tabla 6 Parámetros fisicoquímicos de agua de mar, límites máximos en efluentes al mar y área de estudio	74
Tabla 7 Densidad de Chlorella y Tetraselmis	78
Tabla 8 Cálculo de células/ml en perlas de alginato.....	80
Tabla 9 Concentración de fosfato en botellas de 200ml al Inicio y Final de diez días	83
Tabla 10 Concentración de nitrato en botellas de 200ml al Inicio y Final de diez días	85
Tabla 11 Concentración de nitrito en botellas de 200ml al Inicio y Final de diez días	88
Tabla 12 Prueba estadística de Shapiro-Wilk, Kruskal - Wallis y prueba post-hoc de Dunn para la reducción porcentual de PO₄.	91
Tabla 13 Prueba estadística de Shapiro-Wilk, Kruskal - Wallis y prueba post-hoc de Dunn para la reducción porcentual de NO₃.....	94
Tabla 14 Prueba estadística de Shapiro-Wilk, Levene, Anova y prueba post-hoc de Tukey para la reducción porcentual de NO₂.	97
Tabla 15 Resumen del análisis estadístico Prueba de Friedman para la cinética de remoción de Fosfato (PO₄).....	100
Tabla 16 Resumen del análisis estadístico Prueba de Friedman para la cinética de remoción de Nitrato (NO₃).....	102
Tabla 17 Resumen del análisis estadístico RM-ANOVA para la cinética de remoción de Nitrito (NO₂).....	104
Tabla 18 Resumen estadístico de la comparación de la eficacia de remoción final (%) entre las escalas de 200 mL y 20000 mL.	107
Tabla 19 Registro de parámetros fisicoquímicos del área de muestreo.....	140
Tabla 20 Registro de Fosfato en las botellas al inicio y final de los distintos tratamientos.	141

Tabla 21 Registro de Nitrato en las botellas al inicio y final de los distintos tratamientos.....	151
Tabla 22 Registro de Nitrito en las botellas al inicio y final de los distintos tratamientos.....	162
Tabla 23 Registro de Fosfato, Nitrato y Nitrito, a lo largo de los diez días de tratamiento.....	172

GLOSARIO

Alginato de sodio: Es un biopolímero natural utilizado como matriz de encapsulación. Cuando reacciona con el cloruro de calcio, se gelifica.

Biorremediación: Es un método de tratamiento que emplea organismos vivos para eliminar, degradar o asimilar contaminantes, presentes en un medio.

Consorcio de microalgas: Conjunto de diferentes especies de microalgas, que coexisten y trabajan de manera conjunta en un entorno común.

Cultivo Discontinuo (batch): Sistema de cultivo cerrado donde se inocula un medio de cultivo y se deja que los microorganismos crezcan hasta que los nutrientes se agoten

Descarga de choque (Shock load): Liberación aguda y masiva de nutrientes hacia el ecosistema marino.

Eutrofización: Proceso ecológico negativo causado por el enriquecimiento excesivo de nutrientes (N y P) en el agua, lo que provoca la proliferación descontrolada de algas y el agotamiento del oxígeno.

Ficorremediación: Un tipo específico de biorremediación que utiliza microalgas para la remoción de nutrientes y contaminantes del agua.

Fotometría: Método analítico utilizado para medir cuantitativamente las concentraciones de fosfato, nitrato y nitrito.

Inmovilización (celular): Proceso de encapsular las células de microalgas dentro de las perlas de alginato para resolver el problema de la cosecha.

Monocultivo: Tratamientos experimentales que utilizaron una sola especie de microalga.

Proporción de biomasa: Variable clave (v/v) de la solución de alginato respecto al cultivo de microalgas (ej. 50:50, 70:30, 90:10) usada para fabricar las perlas.

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

CENAIM: Centro Nacional de Acuicultura e Investigaciones Marinas

DE: Desviación Estándar

DHN: Dirección de Hidrografía y Navegación

FAN: Floraciones Algales Nocivas

HSD: Diferencia Significativa Honesta (Prueba de Tukey)

LMP: Límite Máximo Permisible

NO₂⁻: Ion Nitrito

NO₃⁻: Ion Nitrato

NTE INEN: Norma Técnica Ecuatoriana INEN

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

PO₄³⁻: Ion Fosfato

RM-ANOVA: ANOVA de Medidas Repetidas

TULSMA: Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente

v/v: Volumen/Volumen (para las proporciones alginato: microalga)

μ (mu): Tasa de crecimiento específica

1. RESUMEN

Este estudio evaluó un sistema de biorremediación en etapas utilizando un consorcio inmovilizado de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. para tratar un efluente proveniente de “La Chueca”, Salinas, buscando reducir sus concentraciones de nutrientes (PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^-) y compararlas con la normativa TULSMA y con valores de agua de mar natural. La investigación fue cuantitativa y experimental, combinando ensayos en laboratorio (200 mL) y un escalado piloto (20000 mL). Se realizó una caracterización fisicoquímica del efluente, medición de nutrientes por fotometría, pruebas batch con distintas proporciones de biomasa (90:10, 70:30 y 50:50) y, finalmente, el análisis cinético del mejor tratamiento en mayor volumen. La caracterización inicial confirmó un desequilibrio de nutrientes superior al agua marina (PO_4^{3-} : 0,88 mg/L; NO_3^- : 2,52 mg/L; NO_2^- : 15,15 $\mu\text{g/L}$). Posteriormente, la proporción 50:50 fue la más eficiente, logrando reducir el fosfato a 0,13 mg/L, el nitrato a 0,53 mg/L y el nitrito a 1,02 $\mu\text{g/L}$, alcanzando valores cercanos o inferiores a los del agua de mar natural. Aunque el escalado mantuvo la eficiencia de remoción, presentó una disminución significativa frente a los ensayos de laboratorio. En conclusión, se acepta la hipótesis planteada y se confirma que la biorremediación con microalgas inmovilizadas es eficaz a nivel de laboratorio; sin embargo, su aplicación a gran escala requiere optimización ingenieril para evitar pérdidas de eficiencia durante el escalado.

Palabras clave: Biorremediación, Microalgas inmovilizadas, Alginato, Eutrofización, Acuicultura, Remoción de nutrientes, *Chlorella*, *Tetraselmis*.

ABSTRACT

This study evaluated a staged bioremediation system using an immobilized consortium of *Chlorella* sp. and *Tetraselmis* sp. to treat an effluent from “La Chueca,” Salinas, aiming to reduce nutrient concentrations (PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^-) and compare them with TULSMA standards and natural seawater values. The research followed a quantitative and experimental approach, combining laboratory assays (200 mL) and a pilot-scale system (20 L). The methodology included physicochemical characterization, nutrient analysis by photometry, batch tests using different biomass ratios (90:10, 70:30, and 50:50), and kinetic evaluation of the best treatment at a larger scale. Initial characterization revealed nutrient imbalance compared to seawater (PO_4^{3-} : 0.88 mg/L; NO_3^- : 2.52 mg/L; NO_2^- : 15.15 $\mu\text{g/L}$). The 50:50 consortium showed the highest performance, reducing phosphate to 0.13 mg/L, nitrate to 0.53 mg/L, and nitrite to 1.02 $\mu\text{g/L}$ —reaching values close to or below natural seawater. Although pilot-scale tests-maintained removal efficiency, a statistically significant decrease was observed compared to laboratory trials. In conclusion, the hypothesis was supported, confirming that immobilized microalgae constitute an effective bioremediation strategy at laboratory scale; however, large-scale application requires engineering optimization to prevent efficiency loss during scale-up.

Keywords: Bioremediation, Immobilized microalgae, Alginate, Eutrophication, Aquaculture, Nutrient removal, *Chlorella*, *Tetraselmi*

2. INTRODUCCIÓN

La costa ecuatoriana constituye un pilar esencial para la economía nacional, ya que albergando una inmensa biodiversidad que mantiene tanto a los ecosistemas marinos como a las industrias clave del país, especialmente la acuicultura y el turismo. Sin embargo, esta coexistencia genera, a su vez una presión ambiental significativa. En particular, los efluentes de origen industrial los cuales suelen contener altas cargas de compuestos inorgánicos como fosfatos, nitratos y nitritos, los cuales son los principales causantes de la eutrofización en medios acuáticos (Lananan et al., 2014). Este exceso de nutrientes produce una proliferación descontrolada de microalgas, afectando el equilibrio del ecosistema y la biodiversidad.

Para mitigar este impacto, han surgido diversos tratamientos, entre ellos la biorremediación que emplean organismos vivos para eliminar o reducir contaminantes de forma natural, lo que convierte en alternativas más sostenibles y económicos frente a los tratamientos químicos o físicos convencionales (Cardona & García, 2008). Dentro de estas técnicas, la ficorremediación mediante el uso de microalgas ha demostrado ser una alternativa prometedora. Estos organismos, en particular las pertenecientes a la división Chlorophyta como pueden ser *Chlorella sp.* y *Tetraselmis sp.*, que emplean los nutrientes inorgánicos para su propio

crecimiento y son conocidas por su alta capacidad de asimilación de contaminantes y su adaptabilidad (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

No obstante, la aplicación de estas microalgas en cultivos libre presenta un desafío logístico relevante a escala industrial: la dificultad y el alto costo de la cosecha, es decir, a la separación de la biomasa del agua tratada, lo que limita su viabilidad práctica. Como consecuencia, se ha investigado la tecnología de inmovilización celular. “La encapsulación en perlas de alginato de sodio” (de-Bashan & Bashan, 2010). se ha consolidado como el método de preferencia, puesto que facilita la recolección, permite trabajar con altas densidades celulares y protege a las microalgas de condiciones adversas.

Si bien existen estudios sobre estas especies por separado, existe un vacío en la investigación sobre su desempeño en consorcios inmovilizados. Por lo antes expuesto, el presente trabajo de titulación tiene como objetivo evaluar la eficacia de un sistema piloto de biorremediación, utilizando un consorcio de *Chlorella sp.* y *Tetraselmis sp.* inmovilizadas en perlas de alginato, para determinar su potencial en la reducción de nutrientes (fosfato, nitrato y nitrito) en un efluente de acuicultura. Este estudio comparará los resultados no solo con la normativa legal (TULSMA), sino con los niveles de referencia del agua de mar natural (DHN, 2021), proponiendo un estándar de tratamiento enfocado en la restauración ecológica.

3. PROBLEMÁTICA

Los nutrientes como el nitrógeno y el fósforo, si bien son esenciales para el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos, en exceso provocan eutrofización, alterando el equilibrio natural y afectando gravemente a la fauna y flora (Lananan et al., 2014). Esta degradación ambiental, que a menudo manifestada como floraciones algales nocivas (FAN), no solo impacta la biodiversidad, sino que también compromete, en consecuencia, las actividades económicas locales que dependen de la salud del ecosistema, como la pesca artesanal y el turismo (García & Miraba, 2018).

En el área de estudio, "La Chueca", Salinas, esta problemática se presenta de manera particular. En esta zona, reconocida por su atractivo turístico por su paisaje como por ser un sitio de anidación para tortugas, existe un canal de descarga de efluentes de origen industrial-acuícola. Estos vertidos continuos han terminado por formar una poza estacional en donde se acumulan y concentran los nutrientes. En donde existe la problemática que en épocas de lluvias torrenciales y mareas altas, está poza se conecte con el océano, liberando una descarga de choque de nutrientes en el ecosistema marino.

La norma ecuatoriana (TULSMA) establece los Límites Máximos Permisibles (LMP) para los efluentes. No obstante, se ha percibido que las concentraciones en efluentes de este tipo aunque pueden cumplir con la norma legal, suelen ser considerablemente altos a los niveles del agua de mar natural (DHN, 2021; Pesantes & Pérez, 1993). Por lo tanto, el problema no reside en una falta de legalidad, sino de carencia de la norma para prevenir el daño ecológico a largo plazo.

Considerando que los efluentes del área de estudio representan un riesgo de eutrofización local, no se cuenta con un sistema piloto validado, de bajo costo, que trate los efluentes en su origen para reducir los nutrientes a un nivel ecológicamente seguro *antes* de que lleguen al cuerpo receptor. La principal amenaza es la permanencia de estas altas cargas de nutrientes que se liberan de forma aguda en el ecosistema.

Así, se traza la siguiente pregunta de investigación:

*¿En qué medida es eficaz el sistema de biorremediación, que emplea un consorcio inmovilizado de microalgas (*Chlorella sp.* y *Tetraselmis sp.*), para reducir concentraciones de fosfato, nitrato y nitrito en efluentes a niveles ambientalmente seguros?*

4. JUSTIFICACIÓN

Desde un punto de vista ecológico, esta investigación responde a un riesgo ambiental directo. Al proponer un tratamiento para la diferencia entre lo permitido por la norma TULSMA y las concentraciones presentes en el agua de mar natural, el estudio aborda la causa raíz de la eutrofización local. La validación de un sistema capaz de reducir los nutrientes a niveles por debajo o igual a los presentes en el agua de mar natural, para proteger la biodiversidad.

Por otro parte, desde el punto de vista tecnológico, el proyecto aporta una solución práctica a un problema industrial. La ficorremediación con algas libres, si bien es eficaz en términos biológicos, resulta logísticamente inviable a gran escala. Por ello, este estudio se justifica al evaluar un método de inmovilización en alginato. Esta técnica, además de ser de bajo costo y sostenible, resuelve el problema principal asociado a la cosecha de biomasa, permitiendo una fácil separación y reutilización del biocatalizador (de-Bashan & Bashan, 2010).

Desde el punto de vista científico, la investigación favorece con conocimiento novedoso en áreas. Primero, se evalúa un consorcio inmovilizado de microalgas (*Chlorella sp.* y *Tetraselmis sp.*), en donde si bien existen estudios de ambas

microalgas por separado, no existe uno donde se evalué el uso de ambas (de-Bashan & Bashan, 2010, Gonçalves et al., 2016). Segundo, cuestiona la conformidad legal como único objetivo, planteando la restauración ecológica como un estándar de tratamiento más importante (Mitsch & Jørgensen, 2003).

Debido a su importancia para la sostenibilidad, esta investigación se alinea con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS), número 6 (Agua Limpia) y el número 14 (Vida Submarina) (Naciones Unidas, 2018). El propósito de esta investigación es demostrar datos cuantitativos sobre la efectividad de este plan piloto de sistema de biorremediación, ofreciendo una herramienta validada para gestionar efluentes de manera proactiva y ecológicamente responsable.

5. OBJETIVO PRINCIPAL

Aplicar un sistema de biorremediación por etapas, utilizando un consorcio de microalgas *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. inmovilizadas, comparando los niveles de nitrito, nitrato y fosfato permisibles de acuerdo con el TULSMA.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Caracterizar cuantitativamente la calidad química de las aguas residuales mediante fotometría.
- Determinar la densidad celular de microalgas para el tratamiento de aguas residuales.
- Comparar las concentraciones de nitratos, nitritos y fosfatos antes y después del tratamiento, evaluando la eficacia del sistema de biorremediación.

HIPÓTESIS

Hipótesis Alternativa (H₁): El sistema de biorremediación por etapas utilizando microalgas inmovilizadas produce una reducción en las concentraciones de nitrito, nitrato y fosfato en las aguas residuales.

7. MARCO TEÓRICO

7.1. Aguas Residuales.

Las aguas residuales se conocen como aguas con impurezas que han sido afectadas en su calidad original; esto es causado por actividades humanas, las cuales provienen de vertidos de diferentes orígenes, entre los principales encontramos vertidos domésticos e industriales. Estas aguas contienen una combinación de diferentes contaminantes, ya sean físicos, químicos y biológicos, los cuales afectan gravemente a los ecosistemas receptores. Entre los componentes químicos más comunes en las aguas residuales se encuentran compuestos orgánicos como carbohidratos, grasas animales, aceites, pesticidas, fenoles, proteínas y compuestos volátiles; mientras que, entre los componentes inorgánicos, encontramos alcalinidad, cloruros, metales pesados, nitrógeno y sus variables como nitrito y nitrato, pH, fósforo o fosfatos, contaminantes prioritarios y azufre (Ecomar, 2020). Entre estos compuestos existen varios que pueden afectar el ecosistema acuático, como fosfatos, nitratos y nitritos, que son causantes de la eutrofización en medios acuáticos.

7.2. Compuestos Inorgánicos

7.2.1. Fosfato

El fósforo es un nutriente esencial para el desarrollo biológico y el metabolismo celular de organismos vegetales y animales. En ambientes acuáticos, se encuentra principalmente en forma de fosfato, y su presencia en exceso es una de las principales causas de la eutrofización, un proceso en el que se incrementa desproporcionadamente la biomasa de algas y plantas acuáticas, afectando el equilibrio del ecosistema (Correia et al., 2013; Smith, 2009). Aunque el fosfato suele estar presente en bajas concentraciones naturales, su incorporación masiva a los sistemas acuáticos proviene de actividades humanas, especialmente del vertido de aguas residuales domésticas e industriales.

7.2.2. Nitrato

El nitrato es la forma más oxidada del nitrógeno inorgánico. En aguas residuales, su presencia es señal de que el proceso de nitrificación ha sido eficiente. Sin embargo, altas concentraciones de nitrato en cuerpos de agua pueden provocar problemas ambientales, como la eutrofización, al estimular el crecimiento excesivo

de algas y fitoplancton, lo que reduce el oxígeno disuelto en el agua y afecta la biodiversidad (Cárdenas & Sánchez, 2013; Smith, 2009).

7.2.3. Nitrito

En el proceso del ciclo del nitrógeno, el compuesto del nitrito compone una forma intermedia durante la nitrificación, en el dónde diversas bacterias nitrificantes oxidan el amonio transformándolo en nitrito y posteriormente a nitrato (Cárdenas & Sánchez, 2013). Aunque el nitrito está presente en concentraciones menores que el nitrato, tiene una toxicidad considerablemente mayor, especialmente en organismos acuáticos y seres humanos. Su peligro radica en su capacidad para reaccionar con la hemoglobina en la sangre formando así metahemoglobina, la cual disminuye el transporte de oxígeno y genera efectos graves (Cárdenas & Sánchez, 2013).

7.3. Eutrofización

El proceso de eutrofización es el enriquecimiento excesivo de nutrientes, en donde principalmente actúan el nitrógeno y fósforo presentes en los ecosistemas acuáticos, como son lagos, ríos, embalses y humedales. Los niveles altos de nutrientes provocan un incremento en la productividad primaria, causando una proliferación

anormal de fitoplancton, macrófitos y otros organismos vegetales acuáticos. Es un proceso que puede darse de manera natural, pero también puede presentarse por el enriquecimiento provocado por actividades humanas, como son la agricultura en el uso de fertilizantes y el vertido de aguas residuales provenientes de cultivos acuícolas o empresas, los cuales incrementan la carga de nutrientes hacia los cuerpos de agua (Smith, 2009).

7.4. Normativa Ambiental Vigente

La gestión de los recursos hídricos y el control de la contaminación en el Ecuador se fundamentan en un marco jurídico estricto, cuyo instrumento operativo principal es el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente (TULSMA). Para la determinación de la calidad del efluente, se adoptaron los criterios técnicos establecidos en el Libro VI (De la Calidad Ambiental) y su Anexo 1 “Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes: Recurso Agua”. En su Artículo 1, establece como objetivo prioritario la prevención y control de la contaminación ambiental del recurso agua, con el fin de proteger su calidad y garantizar la sostenibilidad de los ecosistemas acuáticos a nivel nacional (Presidencia de la República del Ecuador, 2003).

El marco legal define en su Artículo 2 los términos rectores para la gestión ambiental, categorizando legalmente a las “Aguas Residuales” y al “Cuerpo

Receptor”, y estableciendo los criterios de “Toxicidad” que delimitan al alcance de la contaminación hídrica. Asimismo, el control de los vertidos se fundamenta en el Artículo 11, referente a las normas generales para la descarga de efluentes. Este apartado impone la obligatoriedad del tratamiento previo de las aguas residuales, domesticas o industriales, y prohíbe explícitamente la disposición de descargas que alteren las características naturales del cuerpo receptor o que incumplan los parámetros técnicos establecidos (Presidencia de la República del Ecuador, 2003).

Respecto a los estándares cuantitativos de cumplimiento, la normativa estipula valores limite que actúan como indicadores de calidad ambiental obligatoria. Para el caso de vertidos en ecosistemas marinos, los estándares se encuentran tipificados en la Tabla 13 del Anexo 1, la cual determina las concentraciones máximas permisibles de contaminantes, incluyendo nutrientes como son el nitrato y el fosfato, que pueden ser criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna acuática, proporcionando un marco de referencia ecológico sobre las condiciones fisicoquímicas necesarias para evitar procesos de eutrofización y garantizar el equilibrios de los ecosistemas marinos (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015).

7.5. Tecnologías de Tratamiento de Aguas Residuales

Las plantas de tratamiento de aguas residuales han evolucionado de manera significativa en las últimas décadas con el objetivo de responder a los requerimientos ambientales y normativos. Tradicionalmente, los sistemas de depuración se centraban en la reducción de la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la eliminación de sólidos suspendidos; sin embargo, la necesidad de remover nutrientes como el nitrógeno o el fósforo, principales responsables de procesos como la eutrofización en cuerpos de agua receptores, ha impulsado la adopción de procesos biológicos más avanzados y eficientes (Carrasquero-Ferrer et al., 2014; de-Bashan & Bashan, 2010).

7.6. Sistema de Tratamiento por Etapas

Generalmente, las plantas de tratamiento de aguas residuales se estructuran en una serie de fases que permiten la eliminación progresiva de contaminantes. Entre estas fases se encuentran el pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario y tratamiento terciario; este último, en muchos casos, es opcional y no siempre se aplica en todos los procesos de tratamiento de aguas residuales (Cely-Calixto et al., 2022; Tuset, 2017). La efectividad del tratamiento también dependerá de parámetros ambientales y operativos, como pH, oxígeno disuelto (OD), alcalinidad y la relación nitrógeno/fósforo (N/P), los cuales influyen en la actividad

microbiana; adicionalmente, de la clasificación de las aguas residuales según su origen, ya sea doméstico, industrial, agrícola, etc. (Li & Irvin, 2007; Kishida et al., 2003). Esto es fundamental para seleccionar el tratamiento más adecuado, minimizando riesgos ambientales (ISA, s. f.; Quispe et al., 2020).

7.7. Clasificación de Métodos de Tratamiento de Aguas Residuales.

El tratamiento de aguas residuales constituye un eje fundamental en la gestión sostenible de los recursos hídricos. Para ello, se han desarrollado diversos métodos que se clasifican en físicos, químicos y biológicos. Mientras los físicos actúan mediante separación mecánica o sedimentación, los químicos recurren a reacciones químicas para precipitar o neutralizar las sustancias contaminantes y, por último, los biológicos emplean organismos vivos que facilitan la eliminación natural de nutrientes y sustancias tóxicas; a este último también se lo conoce como biorremediación (Alonso Fernández, Palacios Arrieta & Martínez, 2023).

7.7.1. Métodos Físicos

Los tratamientos físicos se usan para separar sólidos en los efluentes. En donde se emplean filtros de caucho o de medios granulares, También se usan tanques de sedimentación para retener sólidos suspendidos. Este proceso es fundamental en la

primera etapa del tratamiento, ya que reduce la cantidad de partículas que pueden afectar métodos siguientes (Cripps & Bergheim, 2000; Dolan et al., 2013).

7.7.2. Métodos Químicos

El tratamiento químico se basa en la aplicación de reactivos como coagulantes, floculantes y oxidantes, que permiten precipitar contaminantes y desinfectar el agua. Tecnologías como la ósmosis inversa y la nanofiltración han mostrado eficacia en la remoción de nutrientes como el fósforo y compuestos nitrogenados, aunque sus costos de implementación y mantenimiento suelen ser elevados; además, pueden generar subproductos tóxicos que limitan su aplicación a gran escala (Qin et al., 2005; Leo et al., 2013).

7.7.3. Métodos Biológicos

Los métodos biológicos, enmarcados en la biorremediación, aprovechan el metabolismo de organismos como lo son bacterias, microalgas, hongos, animales y plantas para eliminar/reducir contaminantes. Estos tratamientos se consideran más sostenibles y económicos que los métodos químicos o convencionales, ya que no generan contaminación secundaria y permite la valorización de subproductos (Shah & Shah, 2020).

- a) **Biorremediación Bacteriana:** Las bacterias como son las del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Nitrosomonas* desempeñan un papel esencial en los ciclos de nitrificación, desnitrificación y amonificación. En particular, estas especies contribuyen de manera directa a la reducción de compuestos nitrogenados (amonio, nitritos y nitratos), constituyendo una de las alternativas más utilizadas en la acuicultura para mejorar la calidad del agua y disminuir la toxicidad de los efluentes (Hlordzi et al., 2020; Zokaeifar et al., 2014).
- b) **Ficorremediación:** Este proceso utiliza macroalgas, microalgas y cianobacterias para la remoción de nutrientes como nitrógeno y fósforo, además de metales pesados, pesticidas e hidrocarburos. Su valor agregado radica en la biomasa generada que puede ser transformada en biocombustibles, fertilizantes o alimentos. (Kaloudas et al., 2021).
- c) **Micorremediación:** Los hongos poseen enzimas ligninolíticas capaces de degradar antibióticos y otros compuestos orgánicos complejos. Entre especies como *Aspergillus niger* o *Pleurotus ostreatus* han mostrado eficiencia en la degradación de contaminantes presentes en efluentes acuícolas, lo que resulta de gran importancia en la mitigación de la resistencia antimicrobiana (Lalitha et al., 2019; Copete-Pertuz et al., 2018).
- d) **Fitorremediación:** El uso de plantas acuáticas, de especies como *Phragmites australis*, *Eichhornia crassipes* o *Pistia stratiotes*, puede absorber y acumular contaminantes inorgánicos, que incluye compuestos de nitrógeno, fósforo y metales pesados. Los humedales ya sean naturales o

artificiales, representan una de las aplicaciones más efectivas en esta técnica por su bajo costo y alta eficiencia (Kurade et al., 2021; Gorito et al., 2018).

- e) **Consortios de Bacterias y Microalgas:** En los últimos años, se ha desarrollado sistemas simbióticos que combinan bacterias y microalgas en biopelículas o lodos granulares. Este enfoque mejora la eficiencia de remoción de nutrientes y materia orgánica, al aprovechar la producción de oxígeno de las algas y el metabolismo bacteriano, optimizando así la depuración de aguas residuales (Fan et al., 2021)

7.8. Biorremediación

Uno de los métodos más utilizados en el tratamiento de aguas residuales es la biorremediación, la cual implica la utilización de organismos vivos, como bacterias, hongos, animales y plantas, que descomponen o degradan sustancias contaminantes. Las biotransformaciones de compuestos orgánicos e inorgánicos, facilitadas por la actividad metabólica de estos organismos, son procesos bioquímicos naturales que tienen lugar en el medio ambiente. La intervención humana puede potenciar estos procesos o introducir organismos eficientes para lograr un objetivo. La biorremediación puede llevarse a cabo in situ en el lugar original de la contaminación, o ex situ, cuando la muestra de contaminada es trasladada a otra ubicación para su tratamiento posterior (Rosales, 2017).

7.8.1. Ficorremediación

La ficorremediación es el tratamiento de aguas residuales utilizando algas, microalgas y cianobacterias, ya que estas pueden eliminar compuestos como fosfato, nitrato, metales pesados, pesticidas e hidrocarburos, debido a su capacidad de utilizar estos compuestos en su crecimiento y desarrollo, lo que las convierte en especies prometedoras para la biorremediación de aguas residuales (Shah & Shah, 2020). Además, la biomasa puede ser aprovechada para la producción de fertilizantes, ácidos grasos, productos terapéuticos, nutracéuticos y como alimento para animales (Kaloudas et al., 2021).

En el proceso de ficorremediación, se emplean dos tipos de sistemas para el tratamiento de las aguas residuales: sistemas abiertos y cerrados. Los sistemas abiertos consisten en tanques naturales o artificiales, que pueden operar sin agitación o con agitación. Los tanques sin agitación resultan más económicos y fáciles de gestionar, pero son más vulnerables a la depredación de las algas por el zooplancton y a la competencia de poblaciones mixtas de algas. Por el contrario, los sistemas con agitación ofrecen aireación y, en algunos casos, suplementación de CO₂, luz y distribución de nutrientes, lo que favorece el crecimiento de las algas (Rosales, 2017). En cuanto a los sistemas cerrados, utilizan fotobiorreactores como controladores de factores que influyen en la ficorremediación de las aguas residuales. Estos sistemas poseen control de factores abióticos, bióticos, químicos,

físicos y mecánicos, resultando más fiables, aunque con un mantenimiento más costoso y requisitos de personal capacitado (Kaloudas et al., 2021).

7.9. Cultivo de Microalgas

Un cultivo de microalgas es el proceso mediante el cual se reproducen y mantienen poblaciones de microalgas en condiciones artificiales o naturales, con el fin de obtener biomasa de interés o realizar estudios experimentales. En este cultivo se proporcionan los elementos o condiciones necesarias para su crecimiento; el cultivo debe proporcionar los elementos básicos para la fotosíntesis, principalmente agua, nutrientes, fuente de luz y dióxido de carbono. También debe contar con recipientes o estructuras de contención, dispositivos para agitación y aireación, y equipos de monitoreo de parámetros como pH, temperatura y densidad celular (Pástor & Pozo, 2013).

El diseño del cultivo depende del objetivo de producción. En áreas de investigación, se usan sistemas simples y de fácil control, en los que se emplean equipos como recipientes pequeños, ya sea matraz Erlenmeyer o botellas transparentes de vidrio. Por otro lado, si el objetivo es la producción a gran escala, se emplean sistemas abiertos, como estanques de alta tasa, o cerrados, como fotobiorreactores tubulares y de panel plano, permitiendo mantener condiciones estables y minimizar la contaminación (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.9.1. Componente de un Cultivo de Microalgas

Independientemente de la escala, los componentes esenciales para un cultivo son tres: un medio de cultivo, el cual aporta agua y nutrientes en las concentraciones necesarias; un recipiente de cultivo, que debe ser transparente y resistente para garantizar la penetración de la luz y soportar procesos de esterilización; y, por último, un sistema de suministro de oxígeno, necesario para mantener los niveles de oxigenación cuando la densidad es demasiado alta (Pástor & Pozo, 2013).

En un laboratorio se emplean equipos como matraces Erlenmeyer de 250 mL a 5 L, frascos de vidrio de borosilicato o recipientes de policarbonato; mientras que, en escalas mayores, se utilizan reservorios como tanques o fotobiorreactores contruidos a partir de acrílico, vidrio o polietileno transparente. El suministro de luz puede provenir de tubos fluorescentes, lámparas LED o directamente de la radiación solar en el caso de los cultivos masivos de producción (Guevara, 2016). El uso de equipos de medición y control es indispensable: el seguimiento del crecimiento celular se realiza mediante conteos usando la cámara de Neubauer o mediciones de densidad óptica. El pH y la temperatura se monitorean constantemente, ya que una variación extrema puede afectar el crecimiento o incluso frenarlo. Para evitar contaminación, se requiere esterilización mediante el uso de autoclave. En sistemas experimentales también se incorporan sensores y

controladores automáticos que permiten regular de manera continua la aireación, nutrientes y el fotoperiodo; este último puede ser controlado usando un temporizador (Guevara, 2016).

7.10. Parámetros de un Cultivo de Microalgas

7.10.1. Luz

La luz es un factor primario y esencial en la fotosíntesis, condicionando directamente la tasa de crecimiento. El efecto dependerá de tres variables: la intensidad, la calidad espectral y el fotoperiodo. Una intensidad lumínica insuficiente limita la fotosíntesis, mientras que una en exceso ocasiona estrés y fotoinhibición, dañando la célula. Respecto a la calidad espectral, las longitudes de onda azul (400–500 nm) y roja (600–700 nm) son las más eficientes para estimular la fotosíntesis. Por último, los fotoperiodos de 12:12 o 16:8 horas de luz:oscuridad resultan adecuados para el cultivo, dependiendo de cada especie, pues permiten a las células alternar entre procesos fotosintéticos y metabólicos de recuperación (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.10.2. Temperatura

La temperatura es uno de los parámetros que influye directamente en la actividad enzimática y en la fluidez de las membranas celulares. La mayoría de las especies cultivadas en laboratorio se desarrollan entre 16 y 30 °C, pero los rangos óptimos se encuentran entre 18 a 27 °C. Variaciones por encima de 35 °C suelen ser letal afectando su tasa de crecimiento y supervivencia (Pástor & Pozo, 2013).

7.10.3. pH

El pH regula la forma química del carbono inorgánico disuelto y la eficiencia de la fotosíntesis. Muchas especies de agua dulce prosperan en valores cercanos a un pH de 8, aunque cada microalga tiene sus rangos específicos. En cultivos de alta intensidad el consumo rápido del CO₂ puede elevar el pH hasta niveles que afectan la solubilidad de nutrientes como el fósforo (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.10.4. Nutrientes

En el agua deben existir ciertos nutrientes que promuevan el crecimiento de las microalgas; entre ellas, el nitrógeno y el fósforo son los más relevantes para el crecimiento. El nitrógeno, se representado en nitrato o amonio, participa en la

síntesis de proteínas y pigmentos. Una limitación de este nutriente induce a la acumulación de lípidos, lo cual puede ser ventajoso para la producción de biocombustibles, aunque reduce el crecimiento poblacional. El fósforo es indispensable para la formación de ácidos nucleicos y fosfolípidos, su escasez limita la división celular. Otros nutrientes esenciales incluyen potasio, magnesio, hierro y oligoelementos, además de vitaminas específicas que ciertas especies requieren para crecer (Pástor & Pozo, 2013).

7.10.5. Agitación y Transferencia de Gases.

El movimiento del cultivo es necesario para evitar la sedimentación, mejorar la distribución de nutrientes y asegurar que las células roten entre zonas iluminadas y sombreadas, reduciendo la fotoinhibición. En los laboratorios, la agitación se logra mediante aireadores o burbujeo de aire; mientras que, en tanques abiertos, se emplean ruedas de paleta. El movimiento también facilita la transferencia de oxígeno y dióxido de carbono, lo que optimiza el intercambio gaseoso en la interfase aire-líquido (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.10.6. Contaminación y Depredadores

En los sistemas abiertos, como tanques o cultivos masivos, puede haber proliferación de microorganismos competidores y presencia de zooplancton, lo que puede ocasionar pérdidas significativas. Mientras que, en sistemas cerrados, la contaminación proviene generalmente de bacterias resistentes al proceso de esterilización o de un mal filtrado del agua que se utiliza. Para minimizar estos riesgos, se recomienda trabajar en condiciones axénicas en laboratorio, usar un filtro adecuado para evitar el paso de otros microorganismos, utilizar aire filtrado y mantener controles de inoculación (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.11. Tipos de Sistemas de Cultivo

7.11.1. Sistemas Abiertos

Los sistemas abiertos son los más antiguos y de menor costo. Se caracterizan por emplear estanques poco profundos, generalmente de forma circular o en canales tipo raceway, los cuales se mezclan mediante ruedas de paleta. Su principal ventaja es la simplicidad constructiva y la posibilidad de cultivar grandes volúmenes con bajo costo. Sin embargo, presenta limitaciones significativas en el control de

parámetros ambientales y contaminación del cultivo, además se requiere de extensas áreas de terreno (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.11.2. Sistemas Cerrados

Los sistemas cerrados o fotobiorreactores permiten mantener un control más estricto de las condiciones de cultivo. Los diseños más comunes son tubulares y de panel plano, fabricados en materiales transparentes como el vidrio, lo que permite el paso de la luz. Sus ventajas incluyen la reducción de contaminaciones, un mayor control de parámetros como el pH y los nutrientes, y la posibilidad de obtener cultivos casi axénicos. No obstante, requieren una inversión inicial más elevada, sistemas de enfriamiento o calentamiento y presentan dificultades técnicas en su escalado a nivel industrial (Hernández-Pérez & Labbé, 2014).

7.11.3. Régimen Operativo

Los cultivos pueden ser continuos, discontinuos o semicontinuos. El cultivo continuo se basa en el suministro constante de nutrientes y la extracción simultánea de biomasa, manteniendo la población en fase exponencial de crecimiento, lo cual permite obtener un flujo continuo de producto, aunque exige una infraestructura más sofisticada. El cultivo semicontinuo, en cambio, implica la extracción periódica

de parte del volumen, que se reemplaza con medio fresco, prolongando así el tiempo de operación. Finalmente, el cultivo discontinuo, o cultivo *batch*, consiste en inocular un volumen fijo de medio nutritivo y mantenerlo sin entradas ni salidas hasta agotar los recursos, momento en el cual se cosecha la biomasa (Pástor & Pozo, 2013).

7.12. Cultivo Discontinuo (batch)

El cultivo discontinuo es la modalidad más utilizada en laboratorios e investigaciones básicas. Consiste en un sistema cerrado en el cual las microalgas crecen dentro de un volumen limitado de medio de cultivo, sin agregar nutrientes durante el proceso. El cultivo consiste en una serie de etapas en las que el cultivo va pasando de un reservorio a otro, aumentando su volumen y, por ende, la densidad microalgal; estas etapas pueden dividirse en tubos de ensayo, matraz Erlenmeyer de 100, 250, 1000 hasta 2000 mL de capacidad (Figura 1). El ciclo de cultivo finaliza ya sea por la falta de nutrientes o de espacio debido al aumento de la densidad, lo que genera que su crecimiento se ralentice, provocando lo que se conoce como fase de declive o fase de muerte (Pástor & Pozo, 2013).

Figura 1

Etapas en un sistema discontinuo o batch



Tabla 1

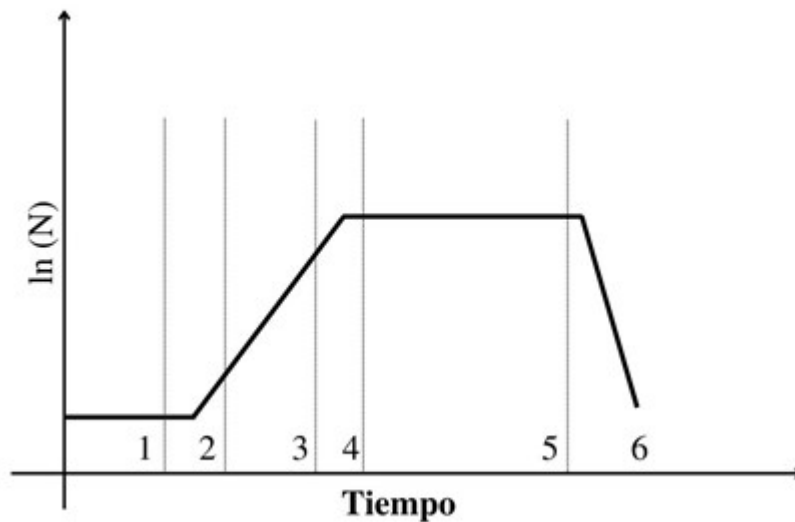
Descripción de las fases de crecimiento en un cultivo discontinuo/Batch

Fase	Crecimiento	Tasa de Crecimiento	Descripción
1	Lag	Cero	Las células se ajustan al nuevo medio, mediante adaptación fisiológica
2	Aceleración	Crecimiento	Aumentan progresivamente la división celular
3	Exponencial	Constante	Representa el periodo de mayor interés productivo
4	Retraso	Decreciente	Causada por la reducción de nutrientes y cambios en el pH
5	Estacionaria	Cero	La tasa de división celular se equilibra con la mortalidad
6	Declive	Negativo	Caracterizada por el predominio de la mortalidad celular

Nota. Adaptado de Cognita. (2023), con modificaciones propias

Figura 2

Fases del cultivo de las microalgas.



Nota Tomado de Cognita. (2023). Modos de cultivo de las microalgas.

7.12.1. Ventajas, Limitaciones, y Aplicaciones

Entre las principales ventajas del cultivo discontinuo se destacan su bajo costo, la facilidad de implementación y su utilidad para evaluar parámetros fisiológicos y cinéticos de crecimiento, tales como la tasa específica de crecimiento y el tiempo generacional. Pese a estas ventajas, presenta también claras desventajas, como la necesidad de reiniciar periódicamente los cultivos, la baja productividad sostenida en comparación con sistemas continuos y la susceptibilidad a la contaminación durante las primeras fases (Pástor & Pozo, 2013). En cuanto a las aplicaciones, es utilizado en el ámbito académico y experimental. Se emplea en la determinación de curvas de crecimiento, la evaluación de parámetros ambientales como pH,

intensidad lumínica y disponibilidad de nutrientes, así como en ensayos de acumulación de metabolitos de interés. Su simplicidad lo convierte en el punto de partida ideal para investigaciones previas a la implementación de sistemas semicontinuos o continuos a mayor escala (Verdugo, 2016; Pástor & Pozo, 2013).

7.13. Características Generales de las Microalgas.

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos que incluyen tanto organismos eucariotas unicelulares o multicelulares, autótrofos, heterótrofos o mixotróficos, así como procariotas en el caso de las cianobacterias. Poseen presencia de flagelo o ausencia de este durante alguna etapa de su ciclo. (Montaño, 2015). Se distribuyen en una gran diversidad de hábitats acuáticos, tanto en aguas dulces hasta ambientes marino, salinos y extremos, desempeñando un papel importante en el ciclo global del carbono y en las redes tróficas acuáticas. Aproximadamente se tiene que las microalgas contribuyen con el 50% de la producción primaria mundial de carbono orgánico, adicionalmente de participar activamente en los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y otros nutrientes. (Borowitzka, 2018). Taxonómicamente se agrupan diversos linajes que abarcan múltiples filos como son las *Cyanophyceae* (cianobacterias), *Bacillariophyceae* (diatomeas), *Dinophyceae* (dinoflagelados), *Cryptophyceae*, *Haptophyceae*, *Euglenophyceae*. Así como también de numerosas clases de algas verdes conocidas como *Chlorophyta* (Montaño, 2015).

7.13.1. Generalidades del filo *Chlorophyta*.

Las microalgas clorofitas pertenecen al filo *Chlorophyta*, microalgas verdes que se caracterizan por poseer clorofila *a* y *b* como pigmentos principales, así como por almacenar almidón en el interior de sus cloroplastos como sustancia de reserva. Sus cloroplastos están rodeados por dos membranas y, en algunos casos, presentan tilacoides apilados (Borowitzka, 2018). Muestra una notable diversidad morfológica, siendo unicelulares, coloniales, o filamentosas. Están presentes tanto en ambientes marino como en agua dulce, y abarcan clases de relevancia biotecnológica como *Trebuxiophyceae*, *Chlorophyceae* y *Chlorodendrophyceae*. Entre estas están presentes varios géneros como *Chlorella*, utilizada en la producción de suplementos alimenticios y tratamiento de aguas, y *Tetraselmis*, empleada ampliamente como alimento en acuicultura y perfil nutricional (Núñez, 2024) (Andreotti, 2019).

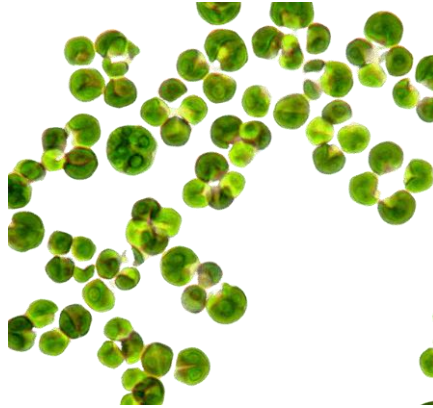
7.14. Generalidades del Género *Chlorella*

El género *Chlorella*, corresponde a microalgas verdes del filo *Chlorophyta* y a la clase *Trebouxioophyceae*. Las células de este grupo son unicelulares, redondeadas, subesféricas o elipsoidales y pueden existir solas o formar colonias de hasta 64 células. De la misma forma, pueden presentar o no mucilago envolvente (Okoro et al., 2019).

7.14.1. Clasificación Taxonómica

Figura 3

Microalga del género *Chlorella*



Nota Foto obtenida de Algatech Biotechnology; <https://www.microalgas.algatech.org/chlorella-vulgaris/>

Reino: Plantae

Filo: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Familia: Chlorellaceae

Género: *Chlorella* (Beijerinck, 1890)

7.14.2. Morfología de *Chlorella*

Las células del género *Chlorella* presentan un tamaño pequeño, entre 2 y 10 μm de diámetro, y carecen de flagelo, lo que las distingue como formas no móviles. Su pigmentación fotosintética incluye clorofila a y b, las cuales residen en un cloroplasto parietal único que contiene un pirenoide rodeado de gránulos de almidón. Su reproducción sucede mediante autosporulación; el contenido celular se divide en varias autosporas que maduran y son liberadas tras romperse la pared parental (Okoro et al., 2019).

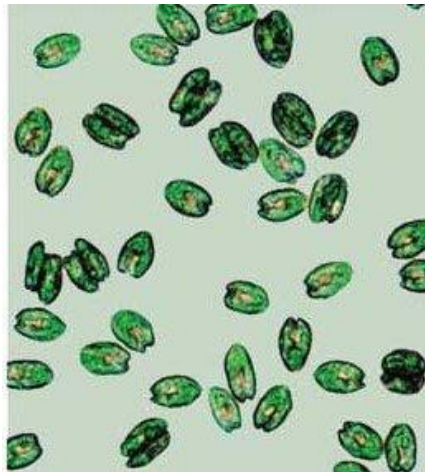
7.15. Generalidades del Género *Tetraselmis*

El género *Tetraselmis*. Descrito por F.Stein en 1878, agrupa microalgas verdes unicelulares que poseen un flagelo, lo que les permiten movilidad en el medio. Algunas especies pueden formar quistes con paredes gruesas en etapa vegetativa, los cuales germinan dividiéndose en cuatro células (Borowitzka, 2018).

7.15.1. Clasificación Taxonómica

Figura 4

Microalga del generó Tetraselmis



Nota. Foto obtenida de Wingerter, 2017;
<https://www.algaebarn.com/blog/phytoplankton/tetraselmis-the-big-and-fatty-alga/>

Reino: Plantae

Filo: Chlorophyta

Clase: Chlorodendrophyceae

Orden: Chlorodendrales

Familia: Chlorodendraceae

Género: *Tetraselmis* (Stein, 1878).

7.15.2. Morfología de *Tetraselmis*

Presenta células de formas variadas como pueden ser esféricas, elípticas, aplanadas o combinadas entre sí, su tamaño oscila entre 3,5 y 25 μm . Posee cuatro flagelos de igual longitud, los cuales emergen en pares desde una depresión apical, lo que les ayuda en la motilidad activa en el medio acuático. Internamente incluye un cloroplasto principal de forma lobulada que ocupa gran parte del citoplasma y contiene pirenoide central (Borowitzka, 2018).

7.16. Inmovilización de Microalgas

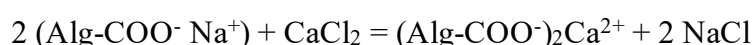
La inmovilización de microorganismos es una estrategia biotecnológica que se remonta a más de cuatro décadas, cuando surgió como una herramienta para estabilizar células en distintos procesos industriales, principalmente en la producción de metabolitos y en la biocatálisis enzimática (Tampion & Tampion, 1987, citado en de-Bashan & Bashan, 2010). En el caso de las microalgas, esta técnica comenzó a ganar relevancia a partir de los años ochenta, cuando de la Noüe y colaboradores en Canadá propusieron su uso en el tratamiento de aguas residuales, introduciendo el concepto de “algas inmovilizadas” como alternativa para superar las limitaciones de cultivo en suspensión (Chevalier & de la Noüe, 1985; de la Noüe & de Pauw, 1988).

El alginato de sodio se consolidó como el polímero de preferencia para la inmovilización de células microalgales, debido a su origen natural, bajo costo, inocuidad, facilidad de gelificación en presencia con iones de calcio y alta porosidad (de-Bashan & Bashan, 2010). Por ello, la encapsulación en alginato ha sido aplicado no solo en el ámbito ambiental, sino también en farmacología, biotecnología agrícola y producción de compuestos de valor agregado. Esta técnica, conocida también como **encapsulación** o **atrapamiento en perlas de polímero**, resulta de gran aprovechamiento de las microalgas, al resolver el problema de la recolección de biomasa y al mismo tiempo mejorara la eficiencia en la remoción de contaminantes de agua.

7.16.1. Proceso de Inmovilización de Microalgas

El proceso para inmovilizar mediante el uso de alginato consiste en mezclar una suspensión de células microalgales con una solución de alginato de sodio, para posteriormente depositarlo en forma de goteo sobre una solución de Cloruro de calcio (CaCl_2). El contacto con los iones calcio produce una gelificación inmediata que origina microesferas o perlas esféricas, dentro de las cuales las células quedan atrapadas, pero metabólicamente activas (de-Bashan & Bashan, 2010). Esta técnica constituye una forma de “inmovilización activa”, ya que implica intervención artificial mediante el uso de agentes gelificantes (Cohen, 2001; Moreno-Garrido, 2008).

Cuando una solución acuosa de alginato de sodio que contiene microalgas se gotea sobre una solución de cloruro de calcio (CaCl_2), ocurre una reacción de reticulación iónica. Los iones Ca^{2+} reemplazan a los iones Na^+ asociados a los grupos carboxilato, generando enlaces entre cadenas poliméricas adyacentes.



Donde:

- **Alg-COO⁻** representa el grupo carboxilato del alginato
- **(Alg-COO⁻)₂Ca²⁺** corresponde a la unión iónica entre dos cadenas de alginato mediante Ca^{2+}

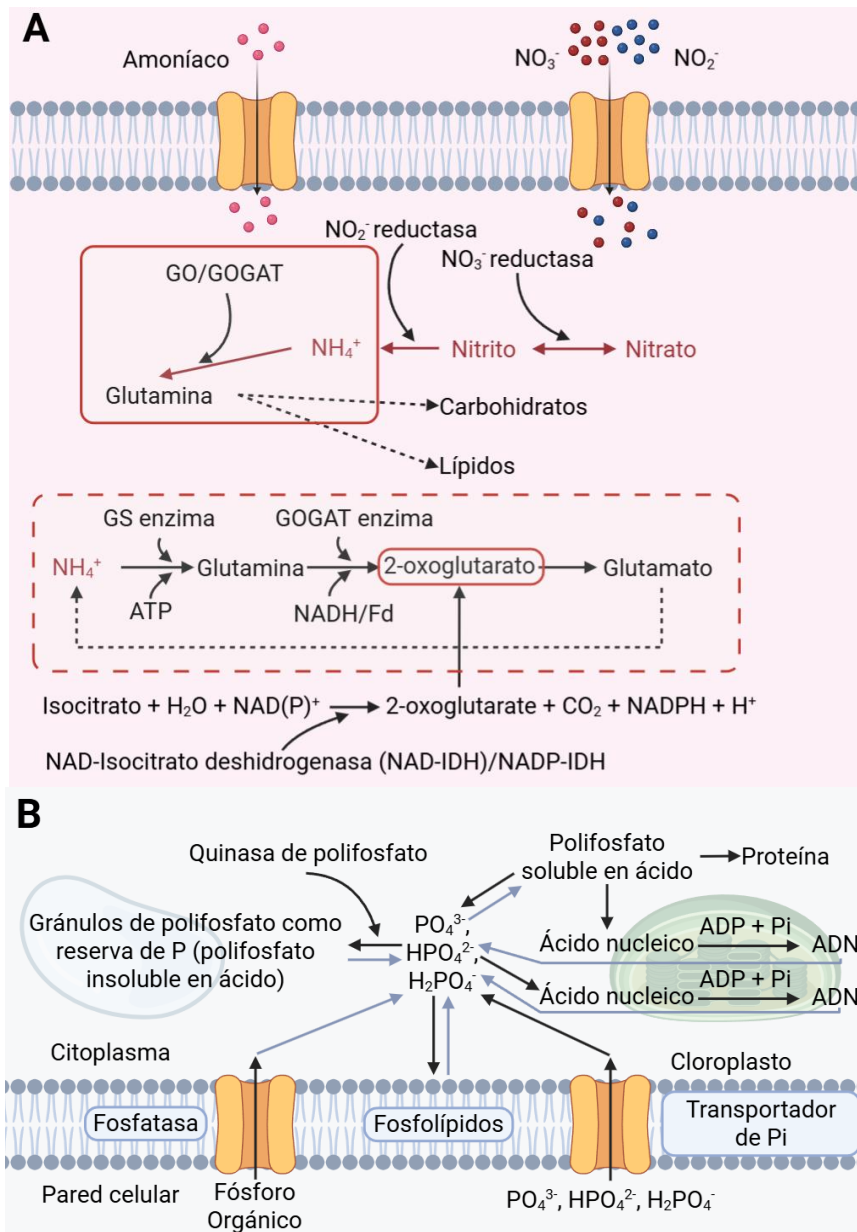
La calidad y dureza depende de variables como la concentración de alginato, la densidad celular inicial, la viscosidad de la solución y el tiempo de exposición a los iones de calcio. La estructura final del gel determina factores críticos como la porosidad, la resistencia mecánica y la capacidad de difusión de nutrientes y contaminantes hacia el interior de la perla (Han, Zhang, & Ho, 2023). Una de las principales ventajas de este método radica en que permite mantener densidades celulares elevadas dentro de un espacio reducido, facilitando la reutilización del sistema y reduciendo la necesidad de cosecha de biomasa.

7.16.2. Interacción Entre Agua Residual, Perla de Alginato y Microalga

El funcionamiento de las perlas de alginato con microalgas inmovilizada se basa en un sistema de intercambio y retención de contaminantes dentro de una matriz porosa (Figura 5). Cuando el agua residual entra en contacto con las perlas, sus compuestos difunden a través de los poros del gel y llegan hasta las células microalgales atrapadas en el interior. Allí, los nutrientes como nitrógeno y fosforo son asimilados metabólicamente y transformados en biomasa celular, mientras algunos contaminantes orgánicos e inorgánicos pueden ser adsorbidos o transformados en formas menos tóxicas (de-Bashan & Bashan, 2010; Han et al., 2023). Este micro ecosistema controlado, que algunos autores comparan con los biofilms naturales (Han et al., 2023), permite que las microalgas mantengan su actividad fotosintética y metabólica durante periodos prolongados, al tiempo que se facilita el proceso de sedimentación y separación de las perlas del efluente tratado, eliminando la necesidad de operaciones costosas como centrifugación o filtración.

Figura 5

Procesos intracelulares de Nitrógeno y Fósforo en microalgas inmovilizadas aplicadas al tratamiento de aguas residuales



Nota. Adaptado de Han, M., Zhang, C. & Ho, S.-H. (2023), con modificaciones propias. Abreviaturas: P, fósforo; Pi, fosfato inorgánico; ADN, ácido desoxirribonucleico; ADP, adenosín difosfato; ATP, adenosín trifosfato; NH_4^+ , ion amonio; NADH, nicotinamida adenina dinucleótido reducido; NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido; Fd, ferredoxina; GS, glutamina sintetasa; GOGAT, glutamato sintasa; GO, glutamato oxidasa; IDH, isocitrato deshidrogenasa; CO_2 , dióxido de carbono. Colores: A (nitrógeno) = rosado; B (fósforo) = celeste.

7.16.3. Beneficios de las Perlas de Alginato

Ofrecen una variedad de ventajas tanto técnicas como económicas frente a los sistemas de cultivo en suspensión. En primer lugar, resuelve uno de los principales problemas de la biotecnología con microalgas: la cosecha de biomasa. Al concentrar las células en una matriz sólida y fácilmente separable, se eliminan los altos costos asociados a centrifugación, filtración o floculación (Han et al., 2023). En segundo lugar, la inmovilización permite trabajar en densidades celulares más elevadas, lo que incrementa su efectividad en la reducción de compuestos contaminantes y acelera los tiempos de tratamientos (de-Bashan & Bashan, 2010). Además, se ha confirmado que las microalgas inmovilizadas, al estar recubiertas por el alginato, poseen una mayor resistencia a condiciones ambientales adversas, como son las variaciones de pH, temperatura y presencia de compuestos tóxicos (Wang et al., 2020, citado en Han et al., 2023).

8. MARCO METODOLÓGICO

8.1. Tipo de Investigación

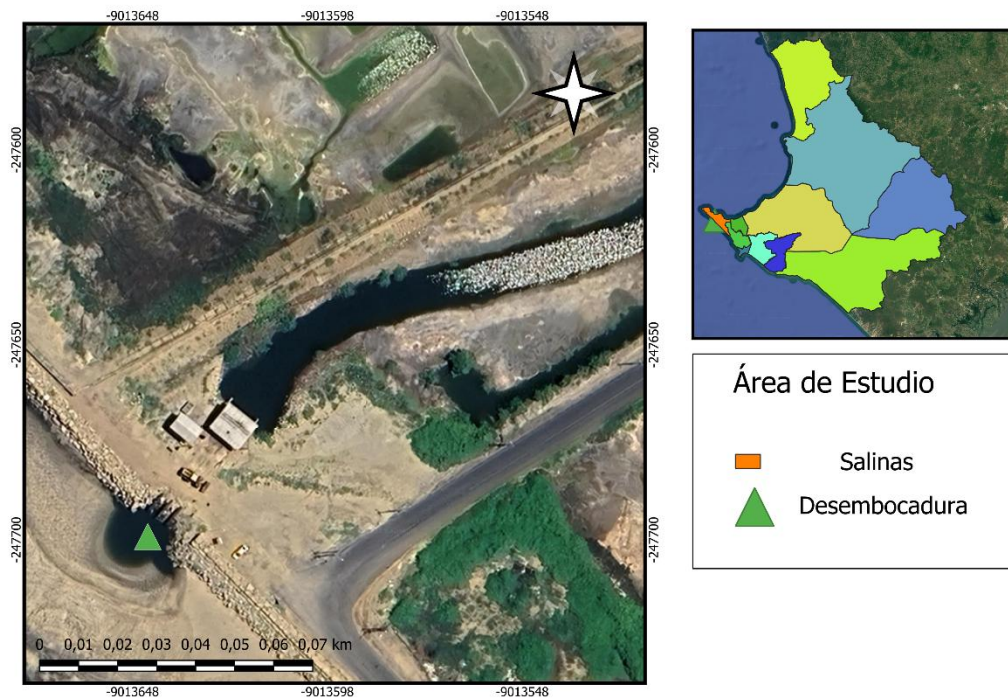
Se trata de una investigación de tipo cuantitativa y experimental, en donde se orienta a la recolección de datos numéricos, como los porcentajes de reducción de nutrientes, sometidos a análisis estadísticos para determinar su significancia. También, implica la manipulación de variables controladas, como son la proporción de alginato:microalga y el número de perlas utilizadas.

8.2. Área De Recolección de Muestras.

Las muestras de agua residual para el estudio de la remoción de nitratos, nitritos y fosfatos serán recolectadas en la desembocadura situada en la provincia de Santa Elena, cantón Salinas - "La Chueca", con coordenadas 2°13'28"S 80°58'15"W (Figura 6).

Figura 6

Área de recolección de muestras "La Chueca - Salinas - Santa Elena"



Nota: El triángulo verde muestra el área donde se ubica la poza al final de la desembocadura y donde se recolectaron las muestras.

8.3. Calidad admisible de agua marina.

En la Tabla 2 se observa que de acuerdo con el Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente sobre la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes al Recurso Agua, las concentraciones permitidas en efluentes que desembocan en estuarios o aguas marinas son de hasta 200 mg/L para nitratos y 0 mg/L para nitritos. En cuanto a los fosfatos, Hanna

Instruments (2021) y Maza (2017) establece que el rango ideal es de 0,01 a 0,03 mg/L. Mientras que en el caso del agua marina Pesantes & Pérez en 1993, afirmaron que la concentración en el mar de la costa ecuatoriana poseía concentraciones de nitrito que oscilaban valores de 0,1 a 0,6 µg/L. Por otro lado, DHN en 2021 presento que las concentraciones de nitrato y fosfato en las costas peruanas oscilaban entre < 1mg/L y 0,3 mg/L respectivamente.

Tabla 2

Parámetros fisicoquímicos (pH, Salinidad, Temperatura, Fosfato, Nitrato, Nitrito) del TULSMA y el Agua Marina.

Parámetro	Unidad	LMP – vertido al mar	Agua de mar natural
pH	-	6,5 – 9,5	7,8 – 8,2
Salinidad	ups	35	30 – 35
Temperatura	°C	<35	-
Nitrito (NO ₂)	µg/L	1000	0,1 – 0,6
Nitrato (NO ₃)	mg/L	200	<1
Fosfato (PO ₄)	mg/L	10	0,3

Nota. * Límites Máximos Permisibles – vertido al mar (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015 - TULSMA – Tabla 13)

8.4. Trabajo de Campo

8.4.1. Toma de Muestras de las Aguas Residuales.

Para la recolección de muestras del cuerpo de agua se siguió la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2169:2013 sobre calidad del agua, muestreo, manejo y conservación de muestras (INEN, 2013). Las muestras fueron tomadas cada 15 días, considerando tres muestreos para la primera fase experimental en la que se emplearon únicamente botellas y cuatro muestreos para la segunda fase experimental en la que se utilizaron peceras, cada uno con tres réplicas. En la primera fase, las muestras se recolectaron en frascos de polipropileno previamente esterilizados, lo que garantizó la ausencia de contaminantes externos. La toma se realizó en sentido horizontal y en dirección contraria al flujo del canal, con el propósito de minimizar la introducción de aire en la muestra. Posteriormente, los frascos fueron sellados herméticamente para evitar alteraciones en el contenido y se conservaron en una caja térmica, manteniendo una temperatura entre 2 °C y 5 °C durante el traslado al laboratorio (INEN, 2013). En la segunda fase experimental se utilizaron fundas larveras con el fin de transportar un mayor volumen de agua al laboratorio para el análisis de nutrientes.

8.4.2. Registro de parámetros fisicoquímicos.

Se registraron los parámetros fisicoquímicos del agua, siendo específicos, la temperatura, salinidad, pH, fosfato, nitrato y nitrito. Las mediciones se realizaron in situ con el fin de asegurar la precisión de los valores y evitar posibles alteraciones durante el transporte de las muestras. La temperatura y el pH fueron determinados mediante el uso de un medidor multiparámetros de la marca Hanna, mientras que la salinidad se obtuvo utilizando un refractómetro, por último los nutrientes como fosfato, nitrato y nitrito se obtuvieron mediante los análisis en un Fotómetro HI97105 marca Hanna, los análisis se realizaron en el laboratorio transportando las muestras en refrigeración.

8.5. Trabajo De Laboratorio.

8.5.1. Análisis de nitrato, nitrito y fosfatos por métodos fotométricos.

Nitrato: Para el análisis de nitrato primero se recogió una muestra de agua, esta a su vez fue filtrada para la eliminación de cualquier sólido o microorganismo, una vez filtrada la muestra se recolectó y añadió 7 mL del agua en la cubeta del equipo, se adicionó también 4 mL de HI781A-0 junto al sobre HI781B-0 del reactivo Nitrato LR, posteriormente se agitó vigorosamente durante 1 minuto hasta que la muestra tomara una coloración azulada, posteriormente la muestra se recolectó con

una jeringa de 10 mL y se usó un soporte de filtro en donde se colocó un filtro de 2 micras para eliminar los residuos del sobre HI781B-0, una vez filtrada, el agua tomó una coloración cristalina, que después se colocó en el fotómetro para hacer el zero o prueba en blanco mediante la opción “Zero”, una vez hecho esto se retiró la cubeta y se adicionó el sobre HI781C-0, este se agitó vigorosamente durante 2 minutos hasta que se homogeneizó, una vez pasado este tiempo se colocó la cubeta en el equipo, empezando el análisis, este duro un tiempo de 8 minutos que al terminar se obtuvo el resultado en ppm (Hanna Instruments, 2021).

Nitrito: Para el análisis del nitrito, se recogió una muestra de agua, se pasó por filtración para eliminar cualquier sólido o microorganismo posteriormente se llenó la cubeta del equipo con 10 mL, la cubeta fue colocada en el equipo para la elaboración del análisis en blanco y posteriormente se retiró la cubeta del equipo para añadir el sobre HI764-25 Reactivo Nitrito ULR, una vez adicionado el reactivo se agitó suavemente durante 15 segundos de forma que se disuelva y homogeneice el reactivo con la muestra de agua, se colocó la cubeta nuevamente en el fotómetro y se selecciona la opción de análisis, el cual tiene un tiempo estimado de 15 minutos, al final se obtiene el resultado en ppm (Hanna Instruments, 2021).

Fosfato: Para el análisis del fosfato, se recolectó 10 mL del agua a analizar y se filtró para eliminar cualquier sustancia que pueda interferir en el análisis, los 10 mL fueron colocados en la cubeta del fotómetro y se colocó la cubeta en el equipo para

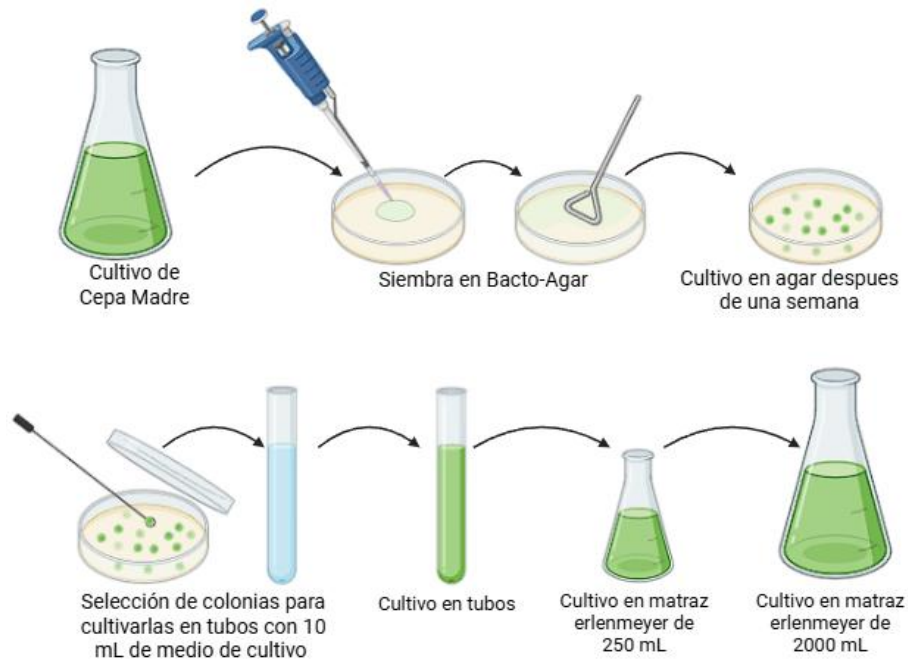
hacer el blanco de la muestra, posteriormente se retiró la cubeta y se adicionó el sobre HI774-0 del Reactivo de Fosfato ULR, se agitó durante 2 minutos de forma suave sin generar burbujas, después de este tiempo se colocó la cubeta en el equipo y se hizo el análisis el cual duro 3 minutos, al final se obtuvo el resultado en ppm (Hanna Instruments, 2021).

8.5.2. Cultivo Discontinuo o Batch.

Para el cultivo de microalgas se empleó un método discontinuo, también conocido como método batch en donde se cultiva en diferentes fases, aumentando el volumen de agua de forma que la densidad de microalgas también aumenta con forme pasan los días, como se observa en la Figura 7 (Pástor & Pozo, 2013).

Figura 7

Cultivo de microalgas siguiendo el modelo discontinuo/Batch hasta matraces de 2000 mL.



8.5.3. Preparación del medio guillar f/2 para *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp.

Para el cultivo de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. se aplicó un medio de cultivo Guillar F/2 de Guillard & Ryther ; 1962. El cual fue modificado para cultivar estas cepas, omitiendo la solución de metasilicato que afecta el crecimiento de las microalgas clorophytas, las concentraciones de estas soluciones se observan en la Tabla 3, mientras que en la Tabla 4, se observa el contenido de los metales traza (*).

Tabla 3

Medio F/2 modificado a partir de Guillard & Ryther, 1962; Guillard, 1975.

	Componentes	Cantidad (ppm)
Solución 1	Tripolifosfato	6500
	Nitrato de sodio	65000
Solución 2	EDTA disodium	4500
	Metales Traza (*)	750
	Cloruro férrico	750
Solución 3	Vitamina B	150
	Vitamina B12	500
	Biotina	150

Tabla 4

Medio F/2: Contenido de metales trazas.

Metales	Cantidad (ppm)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5000
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	9000
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	90000
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	12500
$\text{Na}_2\text{MnO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6000

Nota. CoCl_2 : Cloruro de cobalto, CuSO_4 : Sulfato de cobre, MnCl_2 : Cloruro de manganeso, ZnSO_4 : Sulfato de zinc, Na_2MnO_4 : Manganato de sodio.

8.6. Preparación del Sistema de Cultivo.

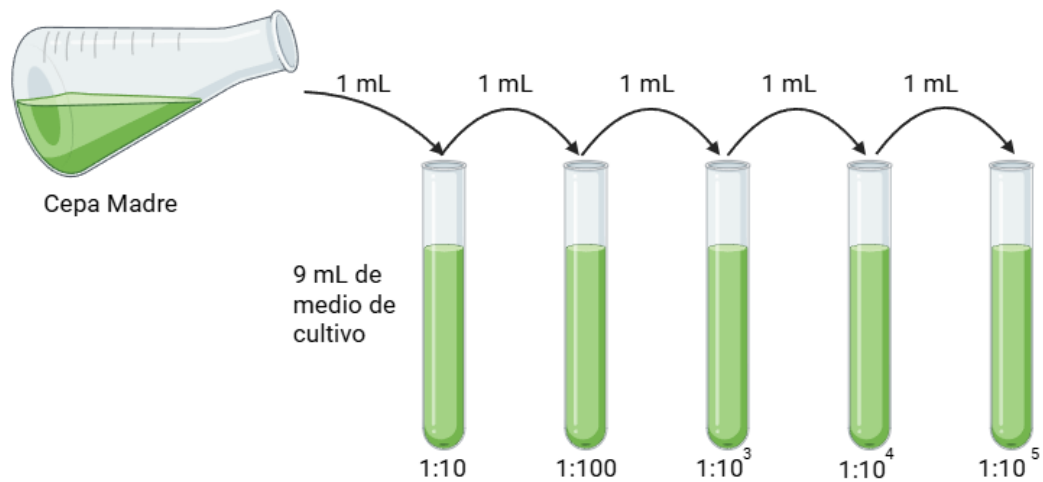
Las cepas madre de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. fueron obtenidas del CENAIM. A partir de ellas se generaron subcepas mediante cultivos en placas Petri y tubos de ensayo, utilizando diluciones seriadas con el fin de mantener los cultivos lo más puros posible, sin presencia de bacterias u hongos. Las cepas madre se conservaron en refrigeración, con el propósito de preservarlas intactas ante eventuales contingencias o pérdidas futuras (Foo et al., 2023).

8.6.1. Dilución de la cepa madre

A partir de la cepa madre se realizó una dilución (Figura 8), esto idealmente se empleó para minimizar la proliferación de posibles microorganismos como bacterias u hongos al momento de sembrar en el agar, para ello se utilizó una dilución 1:9 , para el primer tubo de ensayo se colocó 1 mL de la cepa madre y 9 mL del medio de cultivo. Este medio se preparó con agua de mar filtrada y nutrida con 1 mL de la solución 1, solución 2 y 0,15 mL de la solución 3, esto para elaborar 1 L de medio enriquecido, para los posteriores tubos se extrajo 1 mL del primer tubo y se lo colocó en 9 mL del medio de cultivo, esto sucesivamente hasta un total de 5 tubos por cepa (Sandoval Herrera., Malo Malo., Caragena Arévalo., Rubio Fernández. 2018).

Figura 8

Dilución seriada para cultivo de microalgas.



8.6.2. Preparación de agar

Para la elaboración del agar destinado al cultivo de las subcepas se empleó el agar **Bacto-Agar**, un medio simple que permite el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos. El medio de cultivo se preparó con 200 mL de agua de mar filtrada, a la que se adiciono 1 mL de las soluciones 1 y 2, y 0,25 mL de la solución 3. Posteriormente, se incorporaron 4 g de agar y la mezcla se homogeneizó durante cinco minutos hasta reducir la mayor cantidad de grumos. Una vez homogenizada, la preparación se sometió a calentamiento en una hornilla a una temperatura de 121 °C, hasta lograr la completa disolución del agar y la formación de espuma, la cual ascendió tres veces. Finalmente, el medio se dejó enfriar hasta una temperatura de

45 °C y 55 °C, con el propósito de evitar inconvenientes al momento de plaqueo (Tenorio et al., 2018).

8.6.3. Siembra en agar

Para el vertido del agar en las cajas Petri se empleó una cámara de flujo laminar y se encendió un mechero Bunsen, con el fin de generar una barrera térmica que eliminara posibles contaminantes. Una vez garantizadas las condiciones de esterilidad, el medio se distribuyó en las cajas Petri, colocando 20 mL de agar en cada una, lo que permitió obtener un total de diez cajas Petri con agar, de las cuales cinco fueron a *Chlorella* y otras cinco a *Tetraselmis*. Posteriormente, las cajas se dejaron enfriar sin tapa dentro de la cámara de flujo laminar, durante un lapso aproximado treinta minutos a una hora, hasta que el agar solidificara y alcanzara una temperatura adecuada para la siembra (25 °C – 32 °C). En cada caja se depositaron dos gotas provenientes de los tubos diluidos y se efectuó una Siembra por Extensión en Superficie con un asa de vidrio, previamente esterilizada en el mechero antes de cada uso (Tenorio et al., 2018). Cada caja Petri fue rotulada con la cepa inoculada y su respectiva dilución, obteniéndose cinco series correspondientes a 10E-1, 10E-2, 10E-3, 10E-4, 10E-5. Finalmente, las cajas se mantuvieron bajo condiciones establecidas en la Tabla 5, con fotoperiodo de 12:12 horas luz - oscuridad, durante un periodo de siete días, a fin de favorecer el crecimiento de las colonias en el agar.

Tabla 5

Parámetros ideales para cultivo de microalgas (Torrentera. et al. 1989).

Parámetros	Rango optimo
Temperatura	18 – 22 °C
Iluminación	13.5 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ (2,000 – 4,000 lux)
Salinidad	37 ups
pH	7 – 8.5

8.6.4. Siembra en tubos

Una vez obtenidas las colonias en el agar, estas fueron evaluadas tanto a nivel macroscópico y microscópico, con el propósito de seleccionar las de mejor desarrollo y verificar que no presentaran contaminación por otros microorganismos. Las colonias seleccionadas se recolectaron utilizando un asa de inoculación, la cual, se esterilizaba previamente al pasarla por la flama del mechero, a fin de evitar cualquier riesgo de contaminación. Posteriormente, cada colonia fue transferida a tubos de ensayo que contenían 10 mL de agua de mar enriquecida con el medio de Guillard F/2, obteniéndose así un total de diez tubos por cada cepa cultivada. Cada tubo fue etiquetado y mantenido durante tres días para su crecimiento. En cuanto a los parámetros de cultivo aplicados, estos fueron los mismo que se habían empleado en la preparación del agar (Vásquez. & Chávez. 2010; Tenorio et al., 2018).

8.6.5. Cultivo en Matraz Erlenmeyer

Para el cultivo en matraz se emplearon recipientes de 250 mL, en los cuales se utilizó una relación de 1:9, es decir, 10 mL del inóculo procedente del tubo de cultivo tras tres días de crecimiento y 90 mL del medio de cultivo. Estos matraces se mantuvieron bajo un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad durante un periodo de tres días, siguiendo los parámetros establecidos en la Tabla 3 (Sandoval Herrera., Malo Malo., Caragena Arévalo., Rubio Fernández. 2018). También, se utilizaron recipientes de 2 L con la misma proporción 1:9, incorporando 100 mL proveniente de los matraces de 250 mL y 900 mL del medio de cultivo. Se mantuvieron en condiciones de luz-oscuridad durante diez días, con el propósito de determinar la curva de crecimiento y establecer el punto en el cual las microalgas alcanzaron su fase estacionaria (Vásquez. & Chávez. 2010).

8.7. Cuantificación de Microalgas Mediante Cámara Neubauer

La cuantificación de la densidad celular de los cultivos de *Chlorella* y *Tetraselmis* se realizó mediante el uso de una cámara Neubauer, con el propósito de monitorear el crecimiento poblacional y determinar el inicio de la fase estacionaria. Para ello, las muestras fueron homogeneizadas suavemente. Posteriormente se tomó una muestra utilizando una pipeta Pasteur. Dicha muestra se depositó en la cámara, la cual había sido cubierta previamente con un cubreobjetos, procurando evitar la

formación de burbujas o desbordes (Pástor & Pozo, 2013). En el caso particular de las muestras de *Tetraselmis*, se empleó Lugol 2% con el fin de al fijarlas y prevenir inconvenientes durante la cuantificación de las microalgas. Para el recuento celular se consideraron los cuatro cuadros grandes de 1mm² situados en la esquina de la cámara (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007). Finalmente, la densidad celular (cel/mL) se calculó mediante la siguiente formula formula:

$$C = \frac{N \times 10^4 \times dil}{\text{Número de cuadros}}$$

Donde:

C: Es la densidad obtenida en células/mL

N: Es la suma de células por cuadrado

dil: Es la dilución empleada en caso de muestras con gran cantidad de microalgas

8.8. Curva de Crecimiento

La densidad celular de *Chlorella* y *Tetraselmis*, se registró diariamente durante un período de 10 días. Estos datos permitieron elaborar la curva de crecimiento de cada microalga, representando la densidad celular (cel/mL) en función del tiempo (días).

La curva se utilizó para identificar las diferentes fases de crecimiento: lag, exponencial y estacionaria. Para complementar la interpretación visual de la curva, se calculó la tasa de crecimiento específica (μ) mediante la ecuación:

$$\mu = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t_2 - t_1}$$

Donde:

N_t: Corresponde a la densidad celular final.

N₀: Corresponde a la densidad celular inicial.

t₂ – t₁: Corresponden a un intervalo de tiempo.

Esta tasa permite cuantificar el aumento relativo de la población celular y determinar objetivamente los días correspondientes a la fase exponencial, que es el período de mayor actividad metabólica (Arredondo-Vega & Voltolina, 2007).

8.9. Inmovilización de las Microalgas.

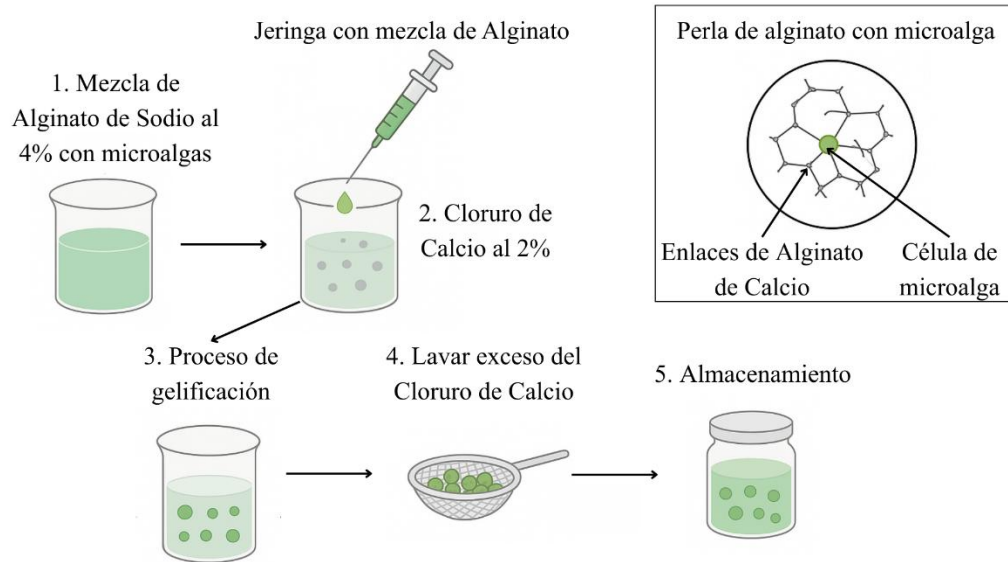
Para la preparación de las perlas de alginato con microalgas, los cultivos de 1L de ambas microalgas se refrigeraron 2 °C en el sexto día, momento en el que la densidad era mayor y aun no iniciaba completamente su fase estacionaria. La refrigeración se empleó para mantener la densidad y reducir la actividad metabólica. Al momento de utilizar el cultivo, se agito suavemente el matraz para homogeneizar el cultivo, se retiró en un vaso de precipitación la cantidad a emplear. Posteriormente se expuso a luz continua durante 24 horas, lo que permitió reactivar la fotosíntesis y restablecer la fisiología celular antes del proceso de encapsulación.

En la Figura 9, se observa el proceso de elaboración de las perlas de alginato. En donde se disolvió alginato de sodio al 4 % utilizando 4 g de alginato en 100 mL de agua de mar previamente filtrada y esterilizada. El alginato se agitó con una varilla de vidrio hasta lograr la homogeneización de la mezcla y reducir al máximo la presencia de grumos. Posteriormente, la solución se esterilizó en autoclave a 0,10 MPa durante 15 minutos, lo que permitió eliminar los grumos restantes. Una vez frío, el alginato se mezcló con las microalgas recolectadas en un vaso de precipitación, dichas microalgas habían permanecido un día en luz con el fin de reactivarse después de su almacenamiento en refrigeración y alcanzar la densidad adecuada antes de ingresar a la fase estacionaria (Marconi et al., 2022).

La mezcla de microalgas con la solución de alginato se preparó en tres distintas proporciones: 50:50, 70:30 y 90:10 v/v, esto para poder verificar si la densidad varía en la reducción de nutrientes (Forero-Cujiño et al., 2016). Mediante agitación constante se homogenizó la mezcla y, posteriormente, se transfirió a jeringas para la formación de las perlas de alginato. Para su solidificación se utilizó una solución de cloruro de calcio al 2 %, la cual, al reaccionar con el alginato, permitió su gelificación. Las perlas permanecieron en esta solución durante 2 horas para asegurar su correcta formación y, finalmente, se lavaron con agua destilada a fin de eliminar el exceso de cloruro de calcio. Una vez purificada, las perlas fueron almacenadas para su uso posterior (Bashan et al., 2002).

Figura 9

Procesos para la elaboración de perlas de alginato con microalgas.



8.9.1. Cálculo de la Densidad Celular Inicial

La cuantificación de la biomasa inicial inmovilizada en los reactores (botellas) se determinó mediante un cálculo teórico basado en la densidad de los cultivos stock y el volumen atrapado por perla (de-Bashan & Bashan, 2010). Primero, se calculó el volumen de cultivo en una perla ($V_{\text{cultivo/perla}}$) multiplicando el volumen promedio de una perla ($V_{\text{gota}} \approx 0,028 \text{ mL}$) por la fracción de cultivo de la proporción (F_{cultivo}), la cual fue de 0,5; 0,3 y 0,1 para las proporciones 50:50, 70:30 y 90:10 (alginato: microalga), respectivamente (Moreno-Garrido, 2008).

$$V_{\text{cultivo/perla}} = V_{\text{gota}} \times F_{\text{cultivo}}$$

Posteriormente, se calculó la densidad total por reactor (D_{reactor}). Para los tratamientos monoespecíficos, se multiplico la densidad por perla por el número de perlas añadidas ($N_{\text{perlas}}=50$).

$$D_{\text{reactor-mono}} = D_{\text{perla}} \times 50$$

Para los tratamientos en consorcio (mezcla 1:1), la densidad total fue la suma de las células aportadas por las 25 perlas de *Chlorella* sp. ($D_{\text{perla-C}}$) y las 25 perlas de *Tetraselmis* sp. ($D_{\text{perla-T}}$), calculadas según su proporción correspondiente.

$$D_{\text{reactor-consorcio}} = (D_{\text{perla-C}} \times 25) + (D_{\text{perla-T}} \times 25)$$

8.10. Determinación de la Densidad de Microalgas para Biorremediar

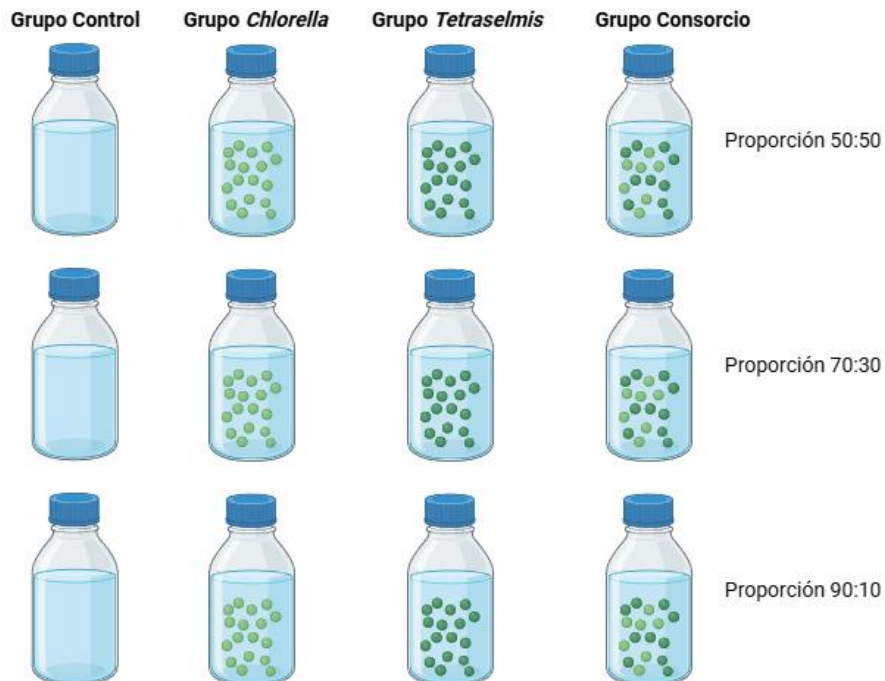
Aguas Residuales

En todos los grupos experimentales, el agua residual fue previamente filtrada empleando un papel filtro de dos micras, con el fin de eliminar microorganismos o material orgánico que pudiera alterar la concentración de nutrientes. Posteriormente, en botellas de vidrio con una capacidad de 400 mL se implementaron 8g de esferas de alginato que contenían células de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. para el tratamiento de 200 mL de agua residual (Hernández, 2011).

En el diseño experimental se establecieron un grupo control y tres tratamientos principales: uno con *Tetraselmis* sp., otro con *Chlorella* sp. y un tercero conformado por un consorcio de ambas especies. Dentro de cada tratamiento se evaluaron tres proporciones de alginato-microalga (50:50, 70:30 y 90:10), lo que permitió analizar el efecto de la densidad celular sobre la reducción de nutrientes (Forero-Cujiño et al., 2016). Cada combinación de tratamiento y proporción fue realizada por triplicado, asegurando así la validez estadística de los resultados (Figura 10).

Cabe señalar que, debido al reducido volumen de agua empleado en cada unidad experimental (200 mL), las muestras solo se recolectaron al inicio y al final de los diez días de tratamiento. Esta decisión metodológica se tomó con el fin de evitar una alteración significativa en el volumen disponible, lo cual podría haber interferido en la precisión de los datos obtenidos debido a un cambio del volumen a lo largo del tratamiento.

Figura 10 Diseño experimental en botellas de vidrio de 400mL.



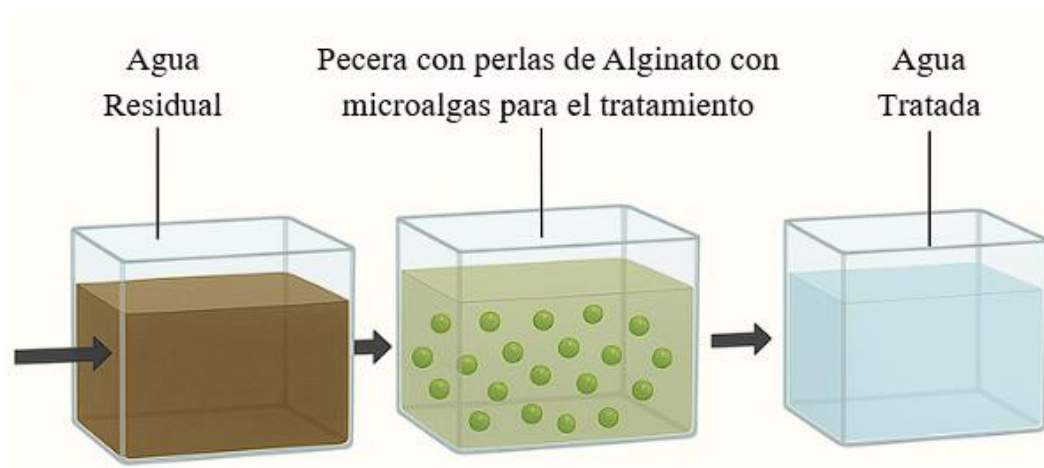
8.11. Comparación de Efectividad del Sistema de Biorremediación en Escalado

Para el sistema de biorremediación se implementó un modelo de tratamiento por etapas (Figura 11), en el cual se emplearon microalgas inmovilizadas en alginato. Para ello, se recolectaron 20 litros de agua del área de estudio, los cuales fueron sometidos a un proceso de filtrado mediante un bolso filtro de 5 micras, con el propósito de eliminar sólidos suspendidos y posibles microorganismos. Posteriormente, el agua filtrada se colocó en un recipiente de vidrio de 30 litros, destinado al tratamiento y a la observación de las perlas de alginato.

La cantidad de perlas empleada se calculó en proporción a la utilizada previamente en las botellas de vidrio. Con el fin de estimular la actividad fotosintética de las microalgas, se utilizó luz artificial a través de un reflector Led de 4000 lux (Chicaiza Ortiz et al., 2021), garantizando la intensidad lumínica adecuada. Dicho sistema se mantuvo bajo un fotoperiodo de 12:12 horas luz-oscuridad, durante diez días, periodo en el cual se recolectaron muestras cada 2 días para el análisis de los nutrientes. Posterior al tiempo de tratamiento se compararon los análisis obtenidos en la versión de botella, peceras, límite máximo permisible (Tuslma) y la calidad del agua de mar natural.

Figura 11

Sistema de biorremediación por etapas.



8.12. Programa y Pruebas Estadística para el Análisis de Datos.

8.12.1. Programas Empleados

Para poder graficar los resultados, se empleó RStudio (RStudio, 2020), un programa con desarrollo integrado para el lenguaje de programación R, que fue utilizado en este estudio para la generación de todas las visualizaciones y gráficos. Para los datos estadísticos, se empleó pruebas estadísticas como ANOVA, Levene, Kruskal-Wallis y comparaciones post hoc, se utilizó tanto la aplicación de RStudio como el software PAST (Hammer et al., 2001). Esto se realizó para validar de forma cruzada los resultados estadísticos, que garantizo la precisión y fiabilidad.

8.12.2. Pruebas Estadísticas

Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk

Para evaluar si los datos se ajustan a una distribución normal, se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk (Gribble Lab, 2019), cuyo estadístico W se calcula como:

$$W = \frac{(\sum_{i=1}^n a_i x_{(i)})^2}{(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2)}$$

Donde:

$x_{(i)}$: Son los valores ordenados de la muestra,

a_i : Son coeficientes basados en los valores esperados de los órdenes estadísticos de una distribución normal

\bar{x} : Es la media de la muestra,

n : Es el tamaño de la muestra.

Prueba de Homogeneidad de Varianzas de Levene

Se empleó la prueba de Levene (Levene, 1960) para evaluar la homogeneidad de las varianzas (homocedasticidad) entre los diferentes grupos de tratamiento. Esta prueba es fundamental para validar el uso de análisis paramétricos como el ANOVA. Se interpreta el estadístico W ; un valor $p > 0,05$ indica que las varianzas son homogéneas, cumpliendo el supuesto. Un valor $p < 0,05$ indica heterocedasticidad, sugiriendo el uso de pruebas no paramétricas. La fórmula del estadístico W es:

$$x^2 = \frac{(N - k) \sum_{i=1}^k (Z_{i.} - Z_{..})^2}{(k - 1) \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{N_i} (Z_{ij} - Z_{i.})^2}$$

Donde:

N: Tamaño total de observaciones.

N_i: Las observaciones en el grupo *i*

k: Número de grupos.

Z_{ij}: $|Y_{ij} - Y_i|$ (El valor absoluto de la diferencia entre una observación y la media de su grupo).

ANOVA de una vía

Se empleó la prueba de ANOVA de una vía (Datanovia, 2020) para comparar las medias de tres o más grupos independientes y de esta forma determinar si existen diferencias significativas entre ellos. La prueba se basa en el análisis de varianzas, utilizando el estadístico F, que se calcula como:

$$F = \frac{MS_{entre}}{MS_{dentro}}$$

Donde:

MS_{entre}: $\frac{SS_{entre}}{k-1}$ la media de los cuadrados entre los grupos.

MS_{dentro} : $\frac{SS_{dentro}}{N-k}$ la media de los cuadrados dentro de los grupos.

SS_{entre} y SS_{dentro} : las sumas de cuadrados entre y dentro de los grupos.

k : Número de los grupos.

N : Tamaño total de las muestras.

Prueba de post hoc de Tukey (HSD)

Tras obtener un resultado significativo en el ANOVA (indicando que existía una diferencia entre los tratamientos), se aplicó la prueba de Diferencia Significativa Honesta (HSD) de Tukey (Tukey, 1949) para realizar comparaciones múltiples por pares. Esta prueba paramétrica identifica cuáles medias de grupo son significativamente diferentes entre sí, controlando la tasa de error tipo I para el conjunto de todas las comparaciones. Se considera que un par de grupos difiere significativamente si el p -valor de su comparación es $< 0,05$. El estadístico q de la prueba es:

$$q = \frac{|Y_i - Y_j|}{\sqrt{\frac{MS_w}{n}}}$$

Donde:

$Y_i - Y_j$: Son las medias de los grupos comparados.

MS_w : Es el cuadrado medio del error obtenido del ANOVA.

n : Es el tamaño de muestra por grupo.

Kruskal-Wallis

Cuando los datos no cumplieron con los supuestos de normalidad (según Shapiro-Wilk) o de homocedasticidad (según Levene), se utilizó la prueba H de Kruskal-Wallis (Kruskal y Wallis, 1952) como alternativa no paramétrica al ANOVA de una vía. Esta prueba determina si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de dos o más grupos independientes, basándose en el rango de los datos. Un valor $p < 0,05$ indica que al menos un grupo difiere significativamente de los demás. El estadístico H se calcula como:

$$H = \left(\frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^k \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(N+1)$$

Donde:

N : Número total de observaciones.

k : Número de grupos.

R_i : Suma de los rangos del grupo i .

n_i : El tamaño del grupo i .

Prueba post hoc de Dunn

Tras obtener un resultado significativo en la prueba de Kruskal-Wallis, se aplicó la prueba de Dunn (Dunn, 1964) como análisis post hoc no paramétrico. Esta prueba realiza comparaciones por pares de los rangos promedio de cada grupo con el fin de identificar qué grupos específicos difieren entre sí. Generalmente, se utiliza una corrección para los valores de p por ejemplo, la corrección de Bonferroni con el propósito de ajustar los resultados debido a la presencia de comparaciones múltiples. Un p -valor ajustado $< 0,05$ indica una diferencia significativa entre el par de grupos analizado. El estadístico Z para la comparación entre el grupo i y j es:

$$Z = \frac{|R_i - R_j|}{\sqrt{\frac{N(N+1)}{12} \left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}}$$

Donde:

R_i : Es el rango promedio del grupo i .

R_j : Es el rango promedio del grupo j .

ANOVA de Medidas Repetidas (RM-ANOVA)

Cuando los datos cumplieron el supuesto de normalidad, se utilizó el ANOVA de Medidas Repetidas (Fisher, 1934) para comparar las medias de las concentraciones de nutrientes entre los seis puntos de muestreo (Día 0 al Día 10) en el sistema de 20 L. Esta prueba se empleó para determinar si existió un cambio estadísticamente significativo en la concentración a lo largo del tiempo. Se consideró que existía una diferencia significativa si el p-valor asociado al estadístico F era menor a 0,05. El estadístico F de la prueba es:

$$F = \frac{MS_{\text{Between}}}{MS_{\text{Within}}}$$

Donde:

MS_{Between} : Varianza Media entre los diferentes tiempos.

MS_{Within} : Varianza Media dentro de las unidades experimentales.

Prueba de Mauchly (Esfericidad)

Antes de interpretar los resultados del RM-ANOVA, se aplicó la prueba de Mauchly (Mauchly, 1940) con el fin de verificar el supuesto de esfericidad. Esta prueba evalúa si las varianzas de las diferencias entre todos los pares posibles de días de muestreo son aproximadamente iguales. Cuando el valor de p es mayor a 0,05, se asume que el supuesto de esfericidad se cumple; Por el contrario si era menor a 0,05, se utilizó la corrección de Greenhouse-Geisser para ajustar los grados de libertad y el p -valor del RM-ANOVA.

Prueba de Friedman

Cuando los datos no cumplieron el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba de Friedman (Friedman, 1937) como alternativa no paramétrica al RM-ANOVA. Esta prueba se empleó para comparar las medianas de las concentraciones de nutrientes entre los seis puntos de muestreo (Día 0 al Día 10). Se consideró que existía una diferencia significativa si el p -valor asociado al estadístico X^2 era menor a 0,05. El estadístico X_r^2 (o Q) de la prueba es:

$$Q = \frac{12}{Nk(k+1)} \sum_{j=1}^k R_j^2 - 3N(k+1)$$

Donde:

N : Número de unidades experimentales (replicas).

k : Número de tiempos de muestreo (días).

R_j : Suma de los rangos para el tiempo j .

Prueba de Wilcoxon por Pares (Post-hoc)

Tras obtener un resultado significativo en la prueba de Friedman, se aplicó la prueba de Wilcoxon por pares (Wilcoxon, 1945) con corrección de Bonferroni con el fin de identificar cuáles pares específicos de días de muestreo diferían significativamente entre sí. Se consideró que un par de días difería significativamente si el p -valor corregido de su comparación era menor a 0,05.

Prueba t de Student

Cuando los datos de porcentaje de remoción cumplieron el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba t de Student (Student, 1908) para comparar las medias de eficacia entre las dos escalas experimentales (200mL y 20000mL) para cada

nutriente. Se empleó la variante de Welch (que no asume varianzas iguales). Se consideró que existía una diferencia significativa entre las escalas si el p -valor era menor a 0,05. El estadístico t de la prueba (Welch) es:

$$t = \frac{X_1 - X_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Donde:

X_1, X_2 : Medias de los grupos.

s_1^2, s_2^2 : Varianzas de los grupos 1 y 2.

n_1, n_2 : Tamaños de muestras de los grupos 1 y 2.

Prueba U de Mann-Whitney

Cuando los datos de porcentaje de remoción no cumplieron el supuesto de normalidad, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney (Mann & Whitney, 1947) como alternativa no paramétrica a la prueba t . Esta prueba se empleó para comparar las distribuciones (medianas) de eficacia entre las dos escalas experimentales (200mL y 20000mL) para cada nutriente. Se consideró que existía una diferencia

significativa entre las escalas si el p -valor era menor a 0,05. El estadístico U de la prueba es:

$$U_1 = R_1 - \frac{n_1(n_2 + 1)}{2}$$

Donde:

n_1 : Tamaño de muestra del grupo 1.

R_1 : Suma de los rangos de las observaciones del grupo 1 cuando ambos grupos se ordenaron juntos.

9. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

9.1. Caracterización Físicoquímica del Agua Residual

Tras el análisis de los datos presentados en la Tabla 6, se observó que los parámetros físicoquímicos del agua de estudio se mantuvieron estables durante el periodo de muestreo. El pH ($7,77 \pm 0,05$) y la Temperatura ($25,33 \pm 1,12$ °C) se encontraron dentro de los rangos establecidos por la normativa TULSMA. Por su parte, la salinidad ($39 \pm 0,82$ ups) se registró ligeramente por encima del valor de referencia para lo admitido por la normativa TULSMA (<35) y el agua de mar natural (20 – 25 ups).

En lo referente a los nutrientes, se registraron concentraciones de Fosfato (PO₄), con una media de $0,88 \pm 0,01$ mg/L, las cuales están por debajo del Límite Máximo Permisible (10 mg/L) pero para el caso del agua de mar natural este estuvo muy por encima (0,3 mg/L). De forma similar, el Nitrito (NO₂) $15,15 \pm 0,92$ µg/L estuvo dentro del rango admisible por la normativa TULSMA (1000 µg/L) y por encima de lo reportado para el agua de mar natural (0,1 – 0,6 µg/L). Finalmente, la concentración de Nitrato (NO₃) $2,52 \pm 0,18$ mg/L se mantuvo por debajo del LMP (200 mg/L), pero por encima del valor de referencia natural (<1 mg/L). Estas

concentraciones promedio se establecieron como los valores iniciales para los posteriores ensayos de remoción.

Tabla 6

Parámetros fisicoquímicos de agua de mar, límites máximos en efluentes al mar y área de estudio

Parámetro	Unidad	LMP – vertido al mar	Agua de mar natural	Promedio de muestreos
pH	-	6,5 – 9,5	7,8 – 8,2	7,77 ± 0,05
Salinidad	ups	35	30 – 35	39 ± 0,82
Temperatura	°C	<35	-	25,33 ± 1,12
Nitrito (NO ₂)	µg/L	1000	0,1 – 0,6	15,15 ± 0,92
Nitrato (NO ₃)	mg/l	200	<1	2,52 ± 0,18
Fosfato (PO ₄)	mg/L	10	0,3	0,88 ± 0,01

Nota. * Límites Máximos Permisibles – vertido al mar (TULSMA – Tabla 13)

9.2. Curva de Crecimiento de los Cultivos de Microalgas

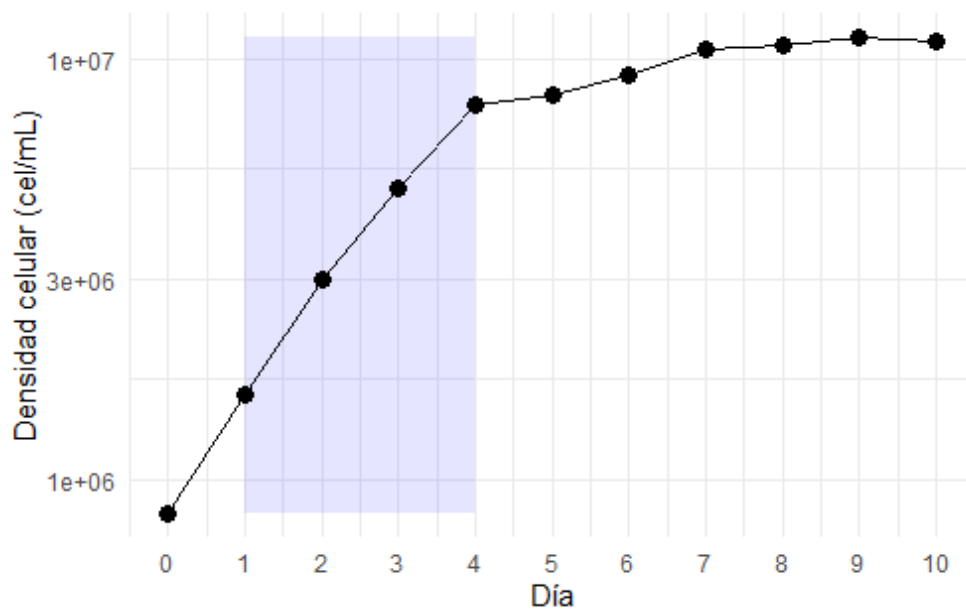
El crecimiento de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. se evaluó mediante la densidad celular en un período de 10 días, con el objetivo de identificar las fases de crecimiento y determinar el momento óptimo para la elaboración de perlas de alginato. La recolección para encapsulado se realizó al día 6, aprovechando que

ambos cultivos presentaban densidades celulares elevadas y aún mantenían actividad metabólica significativa, lo que garantiza la viabilidad dentro de las perlas. Cabe destacar que los cultivos no contaron con réplicas biológicas, por lo que los resultados corresponden a un seguimiento individual de cada cultivo. Por lo que, los datos presentados (Tabla 6) solo caracterizan el estado fisiológico y la densidad celular específica de los cultivos que se emplearon como inóculo para los ensayos de biorremediación.

9.2.1. Curva de Crecimiento de *Chlorella* sp.

Figura 12

Curva de crecimiento de *Chlorella* sp.



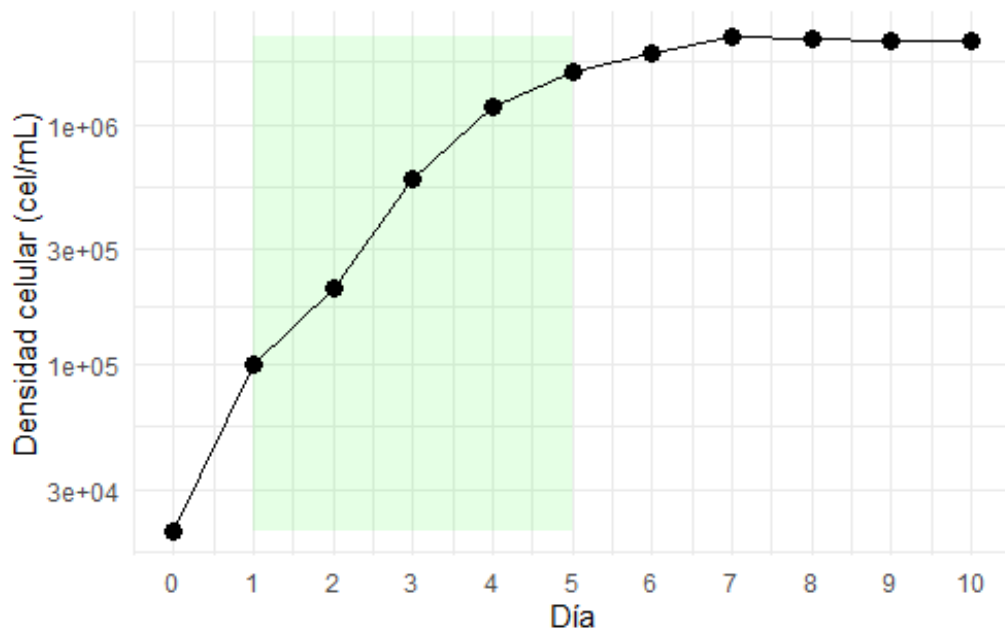
Nota. La zona sombreada representa el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria.

La Figura 12 mostró que la densidad celular de *Chlorella* sp. aumentó de $8,3 \times 10^5$ cel/mL al inicio del cultivo en el día cero a $7,75 \times 10^6$ cel/mL al día cuatro, lo que correspondió a la fase exponencial, caracterizada por un incremento diario promedio superior a $1,5 \times 10^6$ cel/mL entre los días dos y cuatro. A partir del día cuatro, el aumento diario comenzó a desacelerarse, alcanzando $8,25 \times 10^6$ cel/mL al día cinco, lo que indicó la transición hacia la fase de crecimiento más lento. Al día seis, la densidad fue de $9,12 \times 10^6$ cel/mL, evidenciando que todavía se mantenía un crecimiento relativamente activo. Posteriormente, entre los días siete y diez, la densidad se estabilizó alrededor de $1,1 \times 10^7$ cel/mL, confirmando la entrada en la fase estacionaria, en la cual el incremento diario se volvió mínimo y la tasa de crecimiento específica disminuyó notablemente. En la Tabla 7 con los valores de densidad celular se evidenció que la tasa de crecimiento específica alcanzó su valor máximo entre los días dos y cinco, coincidiendo con la fase exponencial. De este modo, la recolección al día seis permitió aprovechar una densidad elevada y garantizar la viabilidad celular para la elaboración de perlas.

9.2.2. Curva de Crecimiento de *Tetraselmis* sp.

Figura 13

Curva de crecimiento de *Tetraselmis* sp.



Nota. La zona sombreada representa el inicio de la fase exponencial hasta el inicio de la fase estacionaria.

En la Figura 13, se indicó que la densidad celular de *Tetraselmis* sp. aumentó de $2,0 \times 10^4$ cel/mL al inicio del cultivo a $1,20 \times 10^6$ cel/mL al día cuatro, identificando la fase exponencial con incrementos diarios de hasta $3,0 \times 10^5$ cel/mL entre los días tres y cuatro. Entre los días cuatro y cinco, el crecimiento comenzó a desacelerarse, alcanzando $1,68 \times 10^6$ cel/mL, lo que señaló la transición hacia la fase de crecimiento más lento. Al día seis, cuando se recolectó el cultivo para la elaboración de perlas, la densidad alcanzó $2,0 \times 10^6$ cel/mL, evidenciando que, aunque el crecimiento natural se había reducido, las células permanecían viables y metabólicamente

activas. Entre los días siete y diez, la densidad se estabilizó alrededor de $2,25 \times 10^6$ cel/mL, indicando la entrada en la fase estacionaria. Mientras que, en la Tabla 7 se presentó los datos de densidad celular y mostró que la tasa de crecimiento específica fue máxima entre los días uno y cuatro, coincidiendo con la fase exponencial. Por lo tanto, la selección del día seis para encapsulado permitió maximizar la densidad celular y asegurar la viabilidad de las células dentro de las perlas de alginato, a pesar de que la fase de crecimiento rápido ya había comenzado a disminuir.

Tabla 7

Densidad de *Chlorella* y *Tetraselmis*

Día	Chlorella (cel/mL)	μ Chlorella (día ⁻¹)	Tetraselmis (cel/mL)	μ Tetraselmis (día ⁻¹)
0	8,30E+05	-	2,00E+04	-
1	1,60E+06	0,69	1,00E+05	1,61
2	3,00E+06	0,69	2,08E+05	0,73
3	4,92E+06	0,66	6,00E+05	0,98
4	7,75E+06	0,53	1,20E+06	0,69
5	8,25E+06	0,06	1,68E+06	0,34
6	9,12E+06	0,1	2,00E+06	0,18
7	1,05E+07	0,13	2,32E+06	0,14
8	1,08E+07	0,03	2,28E+06	-0,01
9	1,12E+07	0,04	2,25E+06	-0,01
10	1,10E+07	-0,02	2,26E+06	0

Nota. “ μ ” representa la tasa específica de crecimiento (día⁻¹), calculada como la pendiente de la curva de Ln(Densidad Celular) vs. Tiempo durante la fase exponencial. Un valor positivo indica crecimiento, un valor cercano a cero indica la fase estacionaria, y un valor negativo indicaría una fase de declive.

9.2.3. Densidad Celular de Inmovilización en Perlas de Alginato

Las densidades celulares iniciales, calculadas para cada uno de los nueve tratamientos, se presentan en la Tabla 8. Estos valores cuantifican la biomasa microalgal efectiva que se introdujo en cada unidad experimental. El análisis de los datos de la tabla revela una dependencia directa tanto de la especie utilizada como de la proporción alginato:microalga. Siendo, la proporción 50:50 (que contenía el mayor volumen de cultivo) resultó consistentemente en la mayor densidad de biomasa para los tres tipos de inóculo (*Chlorella* sp., *Tetraselmis* sp. y Consorcio).

Contrariamente, la proporción 90:10 generó las densidades de inóculo más bajas. Al comparar los tratamientos, se identifica un rango claro de biomasa. La dosis más alta se obtuvo con el tratamiento *Chlorella* sp. 50:50, alcanzando $6,40E+06$ células totales por botella. Esto se debe a la combinación de la alta densidad del cultivo stock de *Chlorella* sp. y la alta proporción de cultivo en la perla. En el extremo opuesto, la dosis más baja de todo el experimento se registró en el tratamiento *Tetraselmis* sp. 90:10, con un valor de $2,80E+05$ células por botella. Los tratamientos en consorcio, conformados por una mezcla 1:1 de perlas, arrojaron valores intermedios; por ejemplo, el consorcio 50:50 ($3,90E+06$ célula por botella) se situó entre los valores de *Chlorella* 50:50 ($6,40E+06$) y *Tetraselmis* 50:50 ($1,40E+06$).

Tabla 8

Cálculo de células/ml en perlas de alginato

Tratamiento	Proporción (Alginato:Microalga)	Células promedio / Perla	Células totales / Botellas
<i>Chlorella</i>	50:50	1,28E+05	6,40E+06
	70:30	7,66E+04	3,83E+06
	90:10	2,55E+04	1,28E+06
<i>Tetraselmis</i>	50:50	2,80E+04	1,40E+06
	70:30	1,68E+04	8,40E+05
	90:10	5,60E+03	2,80E+05
Consortio	50:50	7,80E+04	3,90E+06
	70:30	4,67E+04	2,34E+06
	90:10	1,56E+04	7,78E+05

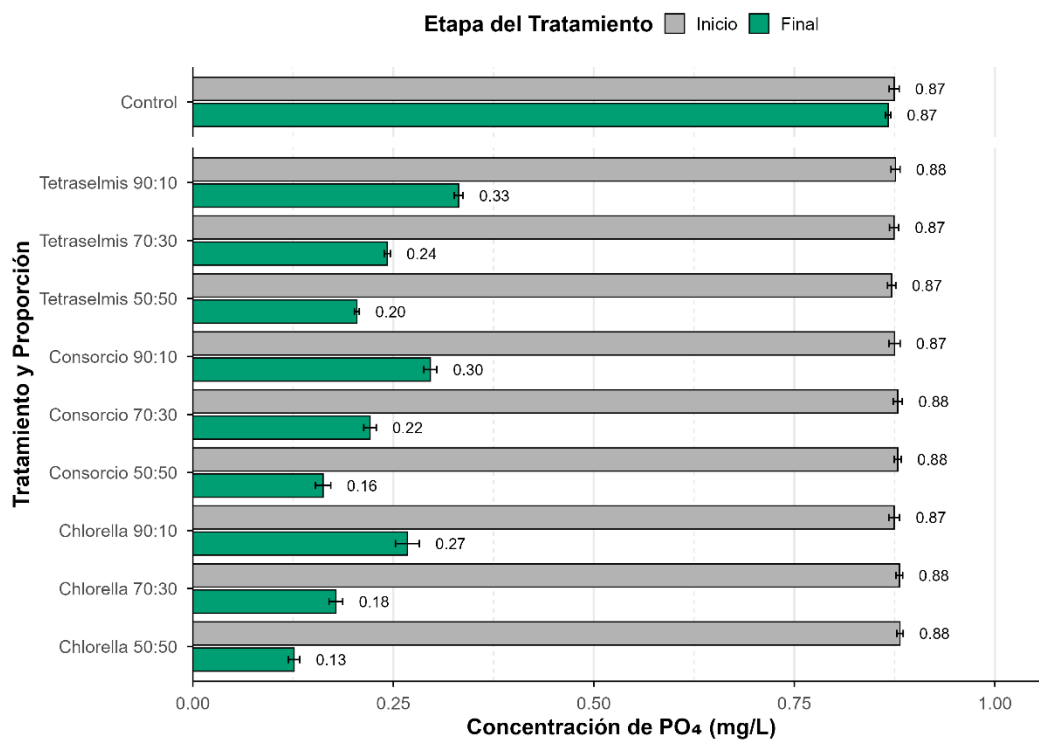
9.3. Determinar la Efectividad en la Reducción de Nutrientes en Función de la Densidad Celular a Partir de Distintas Proporciones.

Con el fin de determinar una densidad óptima para reducción de fosfatos, nitratos y nitritos, se usó tres proporciones de alginato: microalga a partir de diez días de tratamiento compararon las concentraciones iniciales y finales en cada uno de los tratamientos, también se calcularon las concentraciones de reducción.

9.3.1 Reducción De Fosfato (PO₄)

Figura 14

Concentración inicial y final del fosfato



Nota. Comparación de las concentraciones medias de Fosfato (PO₄) al inicio y al final después del tratamiento de biorremediación en 10 días. Las barras representan la media y las barras de error indican el error estándar de la media. Los valores numéricos sobre las barras indican el promedio exacto para cada etapa.

La Figura 14 presenta la comparación de las concentraciones de fosfato (PO₄) antes y después de los diez días de tratamiento para los nueve tratamientos experimentales. Se observó una notable homogeneidad en la línea base, con concentraciones iniciales que promediaron entre 0,87 y 0,88 mg/L en todos los tratamientos. La evaluación de los resultados finales demuestra que todos los

tratamientos poseían una capacidad significativa en remoción. Sin embargo, se evidenció una tendencia irrefutable ligada a la densidad empleada: la proporción 50:50 (mayor biomasa) resultó en la mayor eficiencia de remoción para los tres tipos de inóculo. El tratamiento más eficaz fue *Chlorella* sp. 50:50, el cual alcanzó la concentración final más baja ($0,13 \pm 0,02$), logrando así la mayor remoción absoluta, con $0,75$ mg/L. Este fue seguido por el Consorcio 50:50, que obtuvo una concentración final de $0,16 \pm 0,03$ (una remoción absoluta de $0,72$ mg/L). Por el contrario, los tratamientos con la proporción 90:10 (menor densidad) presentaron las concentraciones finales más elevadas, en donde *Tetraselmis* sp. 90:10 obtuvo $0,33$ mg/L como el de menor eficiencia, y una remoción absoluta de solo $0,54$ mg/L.

Tabla 9

Concentración de fosfato en botellas de 200ml al Inicio y Final de diez días

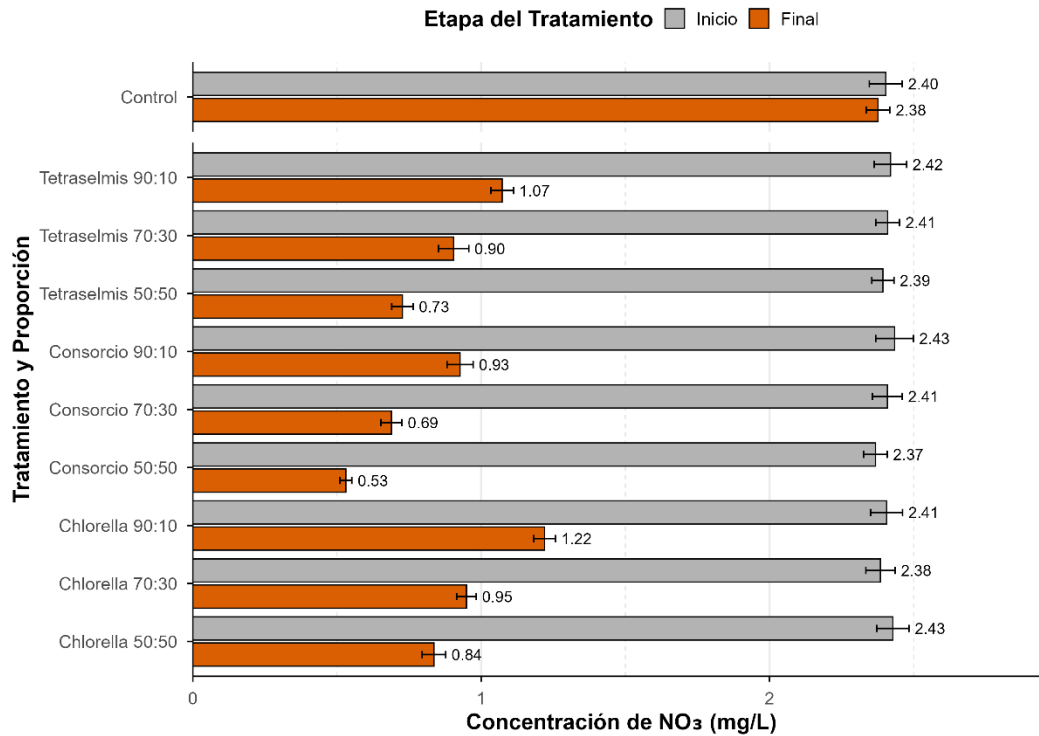
Tratamiento	Proporción Alginato:Microalgas	PO4 inicial (mg/L)	PO4 final (mg/L)	Reducción (mg/L)
Control	-	0,87 ± 0,02	0,86 ± 0,01	0,0074 ± 0,02
	50/50	0,87 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,67 ± 0,02
Tetraselmis	70/30	0,87 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,63 ± 0,03
	90/10	0,88 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,54 ± 0,03
	50/50	0,88 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,76 ± 0,03
Chlorella	70/30	0,88 ± 0,01	0,18 ± 0,03	0,7 ± 0,03
	90/10	0,87 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,61 ± 0,06
	50/50	0,88 ± 0,01	0,16 ± 0,03	0,72 ± 0,04
Consorcio de microalgas	70/30	0,88 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,66 ± 0,03
	90/10	0,87 ± 0,02	0,3 ± 0,02	0,58 ± 0,04

9.3.2 Reducción de Nitrato (NO₃)

En la Tabla 10 se presentó los resultados de remoción de nitrato (NO₃). Las concentraciones iniciales fueron notablemente homogéneas, situándose en un rango de 2,37 a 2,43 mg/L para todos los tratamientos evaluados.

Figura 15

Concentración inicial y final del nitrato



Nota. Comparación de las concentraciones medias de Nitrato (NO₃) al inicio y al final después del tratamiento de biorremediación en 10 días. Las barras representan la media y las barras de error indican el error estándar de la media. Los valores numéricos sobre las barras indican el promedio exacto para cada etapa.

En la Figura 15 se observó una clara correlación entre la densidad inmovilizada y la eficiencia de remoción, siendo esta una tendencia consistente en los tratamientos. La proporción 50:50 alcanzó las concentraciones finales más bajas, seguido de la proporción 70:30 y, finalmente, la 90:10, que demostró la menor capacidad de remoción. El rendimiento más eficiente se obtuvo con el Consorcio 50:50, el cual redujo la concentración a $0,53 \pm 0,06$ mg/L, logrando una remoción absoluta más alta ($1,84 \pm 0,08$). El consorcio 70:30 también mostró una remoción destacada, con

un valor final de $0,69 \pm 0,11$. Al comparar los tratamientos monoespecíficos en su proporción más eficaz (50:50), *Tetraselmis* sp. obtuvo $0,73 \pm 0,11$ que superó el rendimiento de *Chlorella* sp. $0,84 \pm 0,12$. Sin embargo estos siguieron por debajo de los resultados obtenidos en el Consorcio. Mientras que el tratamiento con el menor desempeño fue *Chlorella* sp. 90:10, que solo redujo la concentración a un valor final de $1,22 \pm 0,11$.

Tabla 10

Concentración de nitrato en botellas de 200ml al Inicio y Final de diez días

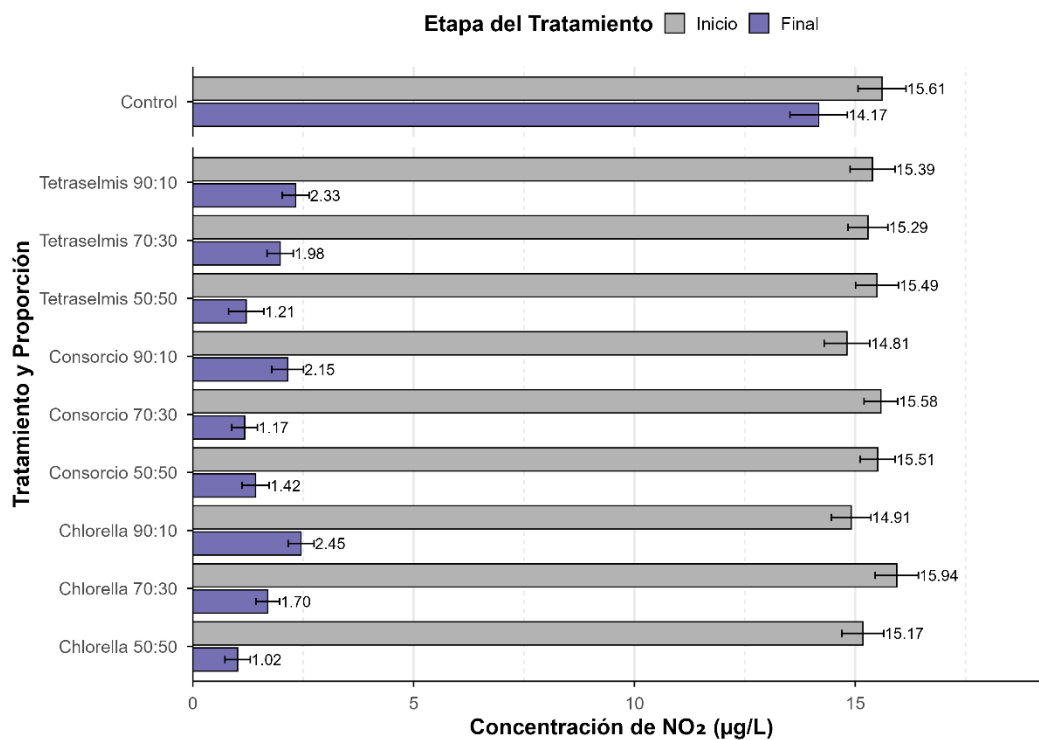
Tratamiento	Proporción Alginato:Microalgas	NO3 inicial (mg/L)	NO3 final (mg/L)	Reducción (mg/L)
Control	-	$2,40 \pm 0,17$	$2,37 \pm 0,12$	$0,0271 \pm 0,17$
	50/50	$2,39 \pm 0,11$	$0,73 \pm 0,11$	$1,67 \pm 0,07$
Tetraselmis	70/30	$2,41 \pm 0,12$	$0,9 \pm 0,16$	$1,51 \pm 0,13$
	90/10	$2,42 \pm 0,17$	$1,07 \pm 0,12$	$1,35 \pm 0,16$
	50/50	$2,43 \pm 0,17$	$0,84 \pm 0,12$	$1,59 \pm 0,12$
Chlorella	70/30	$2,38 \pm 0,15$	$0,95 \pm 0,1$	$1,44 \pm 0,09$
	90/10	$2,41 \pm 0,17$	$1,22 \pm 0,11$	$1,19 \pm 0,12$
	50/50	$2,37 \pm 0,12$	$0,53 \pm 0,06$	$1,84 \pm 0,08$
Consorcio de microalgas	70/30	$2,41 \pm 0,16$	$0,69 \pm 0,11$	$1,72 \pm 0,11$
	90/10	$2,43 \pm 0,2$	$0,93 \pm 0,14$	$1,51 \pm 0,11$

9.3.3 Reducción de Nitrito (NO₂)

En la Tabla 11 se presentaron los resultados de la remoción de nitrito (NO₃). Las concentraciones iniciales para este diseño experimental mostraron mayor variabilidad que en los nutrientes anteriores, oscilando entre 14,81 y 15,94 µg/L.

Figura 16

Concentración inicial y final del nitrito



Nota. Comparación de las concentraciones medias de Nitrito (NO₂) al inicio y al final después del tratamiento de biorremediación en 10 días. Las barras representan la media y las barras de error indican el error estándar de la media. Los valores numéricos sobre las barras indican el promedio exacto para cada etapa.

En la Figura 16 se observa los análisis de los resultados finales que revelaron tendencias más complejas. Si bien *Chlorella* sp. 50:50 alcanzó concentración final más baja ($1,02 \pm 0,86 \mu\text{g/L}$), no fue el tratamiento con la mayor remoción absoluta. Este corresponde al Consorcio 70:30, que logró una concentración final de $1,17 \pm 0,87 \mu\text{g/L}$ y una remoción absoluta de $14,41 \pm 1,34 \mu\text{g/L}$. A diferencia de, fosfato y el nitrato la proporción 50:50 no fue sistemáticamente la más eficaz. Para los tratamientos monoespecíficos de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp., la proporción 50:50 sí fue la más efectiva ($1,02 \mu\text{g/L}$ y $1,21 \mu\text{g/L}$, respectivamente). Sin embargo, en el caso del Consorcio de microalgas, la proporción 70:30 ($1,17 \mu\text{g/L}$) demostró ser superior a la proporción 50:50 ($1,42 \mu\text{g/L}$). De manera consistente con los análisis previos, las proporciones 90:10 fueron las menos eficientes. El tratamiento *Chlorella* sp. 90:10 fue el que presentó el menor desempeño, resultando en la concentración final más alta de $2,45 \pm 0,88 \mu\text{g/L}$.

Tabla 11

Concentración de nitrito en botellas de 200ml al Inicio y Final de diez días

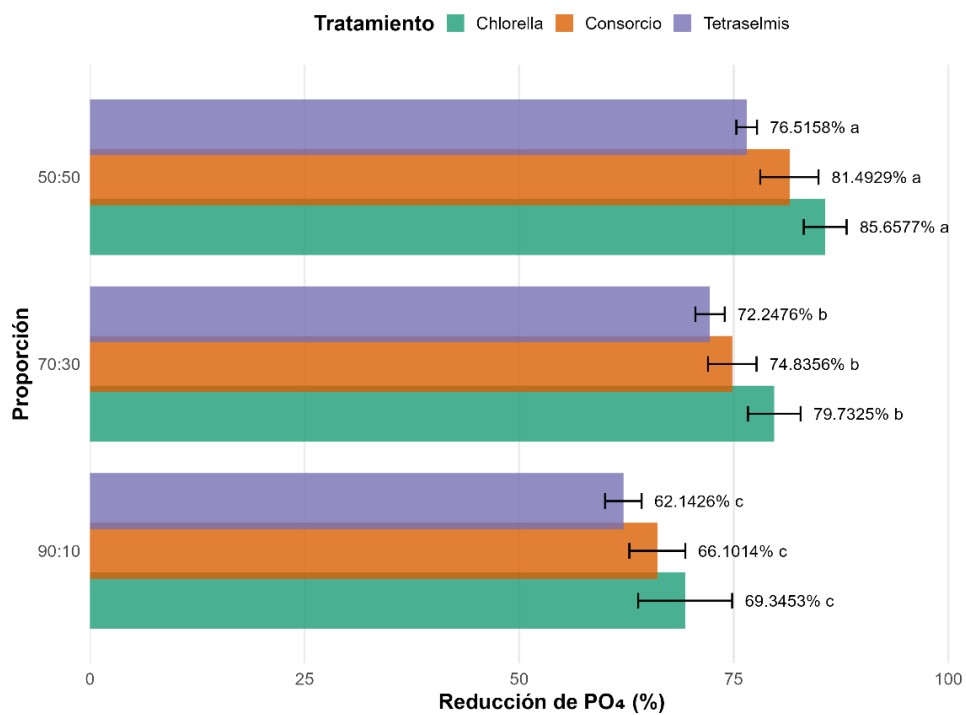
Tratamiento	Proporción Alginato:Microalgas	NO2 inicial ($\mu\text{g/L}$)	NO2 final ($\mu\text{g/L}$)	Reducción ($\mu\text{g/L}$)
Control	-	$15,60 \pm 1,63$	$14,17 \pm 1,95$	$1,4344 \pm 1,3$
	50/50	$15,49 \pm 1,45$	$1,21 \pm 1,2$	$14,28 \pm 2,1$
Tetraselmis	70/30	$15,29 \pm 1,35$	$1,98 \pm 0,89$	$13,31 \pm 1,71$
	90/10	$15,39 \pm 1,52$	$2,33 \pm 0,92$	$13,06 \pm 0,92$
	50/50	$15,17 \pm 1,42$	$1,02 \pm 0,86$	$14,16 \pm 1,21$
Chlorella	70/30	$15,94 \pm 1,47$	$1,7 \pm 0,8$	$14,24 \pm 1,68$
	90/10	$14,91 \pm 1,34$	$2,45 \pm 0,88$	$12,46 \pm 0,99$
Consorcio de microalgas	50/50	$15,51 \pm 1,19$	$1,42 \pm 0,93$	$14,09 \pm 1,46$
	70/30	$15,58 \pm 1,15$	$1,17 \pm 0,87$	$14,41 \pm 1,34$
	90/10	$14,81 \pm 1,55$	$2,15 \pm 1,07$	$12,66 \pm 1,36$

9.4. Análisis Estadístico Comparativo de la Reducción de Nutrientes (PO₄, NO₃ y NO₂).

9.4.1. Reducción Porcentual de Fosfato (PO₄)

Figura 17

Reducción porcentual de PO₄ por tratamiento y proporción (Media ± DE)



Nota. Porcentaje de remoción de Fosfato (PO₄) por los tres tratamientos (*Chlorella* sp., Consorcio y *Tetraselmis* sp.) en las tres proporciones. Las barras indican la mediana y las barras de error el error estándar de la media. Las etiquetas muestran la mediana del porcentaje y el grupo estadístico. Las letras distintas: a, b, c... indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Kruskal-Wallis con post-hoc de Dunn, $p < 0.05$)

Para la validación estadística de la remoción de fosfato (Figura 17), se evaluaron inicialmente los supuestos paramétricos. La prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 12) indicó que no se ajustaban a una distribución normal, ya que presentaron desviaciones significativas ($p < 0.05$). Debido a que no se cumplió el supuesto de normalidad, se empleó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los resultados confirmaron que existían diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de remoción de los nueve tratamientos ($H = 60.31$, $p = 3,97 \times 10^{-10}$). La prueba post-hoc de Dunn (Tabla 12) permitió identificar los grupos homogéneos. *Chlorella* 50:50 fue el grupo de mayor eficiencia con un porcentaje de remoción de $85,6577 \pm 2,5$ (grupo "a"), seguido de Consorcio 50:50 que logro un $81,4929 \pm 3,39$. Notablemente, el desempeño del Consorcio fue significativamente superior al de *Tetraselmis* en la misma proporción. Se reitera la tendencia de que la proporción 90:10 fue la menos eficaz en todos los casos, siendo *Tetraselmis* 90:10 el menos efectivo con porcentaje de $62,1426 \pm 2,13$ (grupo "c").

Tabla 12

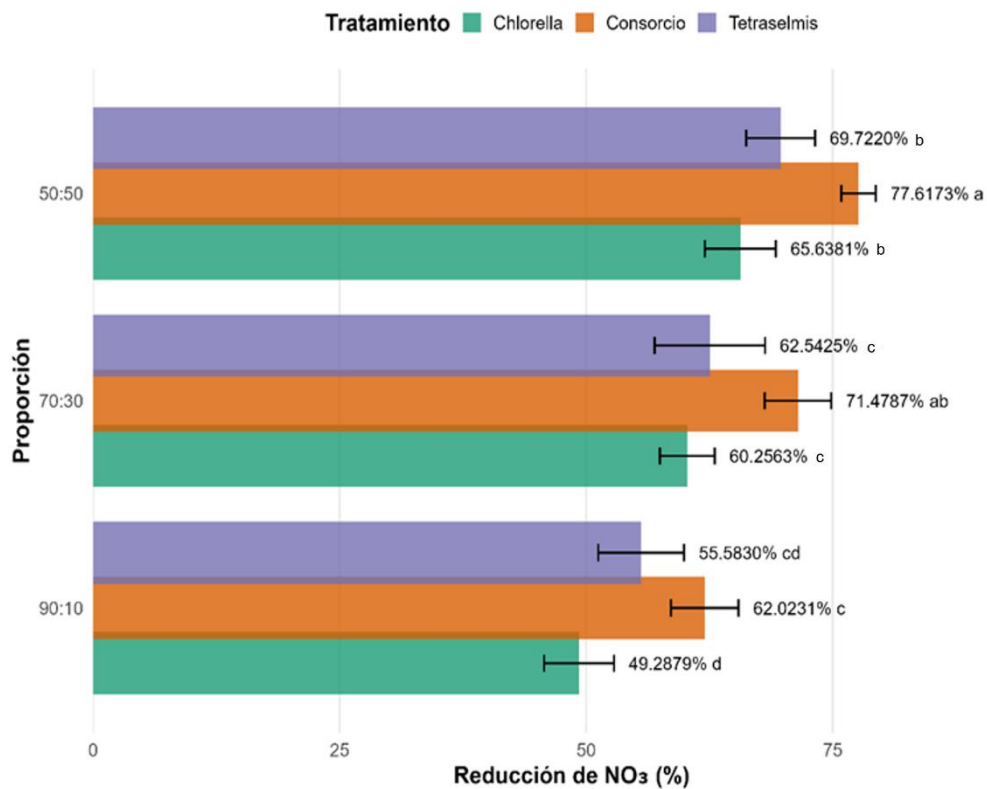
Prueba estadística de Shapiro-Wilk, Kruskal - Wallis y prueba post-hoc de Dunn para la reducción porcentual de PO₄.

Tratamiento	Proporción	Shapiro (p)	Kruskal-Wallis (p)	Dunn (Post-hoc)	% Reducción (media ± DE)
Tetraselmis	50:50	0.0025	3,97×10 ⁻¹⁰	ab	76,5158 ± 1,2
	70:30	0.5152	3,97×10 ⁻¹⁰	b	72,2476 ± 1,71
	90:10	0.0101	3,97×10 ⁻¹⁰	c	62,1426 ± 2,13
Chlorella	50:50	0.9769	3,97×10 ⁻¹⁰	a	85,6577 ± 2,5
	70:30	0.8509	3,97×10 ⁻¹⁰	ab	79,7325 ± 3,07
	90:10	0.9373	3,97×10 ⁻¹⁰	b	69,3453 ± 5,48
Consortio	50:50	0.9514	3,97×10 ⁻¹⁰	a	81,4929 ± 3,39
	70:30	0.9571	3,97×10 ⁻¹⁰	b	74,8356 ± 2,83
	90:10	0.9468	3,97×10 ⁻¹⁰	c	66,1014 ± 3,26

9.4.2. Reducción Porcentual de Nitrato (NO₃)

Figura 18

Reducción porcentual de NO₃ por tratamiento y proporción (Media ± DE)



Nota. Porcentaje de remoción de Nitrato (NO₃) por los tres tratamientos (*Chlorella* sp., Consorcio y *Tetraselmis* sp.) en las tres proporciones. Las barras indican la mediana y las barras de error el error estándar de la media. Las etiquetas muestran la mediana del porcentaje y el grupo estadístico. Las letras distintas a, b, c... indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba de Kruskal-Wallis con post-hoc de Dunn, $p < 0.05$)

Para los datos de remoción de nitrato (Figura 18), se siguió un procedimiento similar al descrito previamente. Se empleó la prueba de Shapiro-Wilk el cual

determinó que no cumplían con el supuesto de normalidad, presentando desviaciones significativas ($p < 0.05$) en los grupos *Tetraselmis* 90:10 y *Chlorella* 50:50. Debido a esto, se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la cual indicó un resultado altamente significativo ($H = 66,4$; $p = 2,55 \times 10^{-11}$), lo que demostró que las diferencias en la remoción de nitrato entre cada tratamiento eran estadísticamente válidas (Tabla 13).

La prueba post-hoc de Dunn permitió establecer un rango de efectividad y destacó la efectividad del Consorcio de microalgas. Particularmente, el Consorcio 50:50 que presentó la mayor eficiencia de remoción promedio ($77.6173\% \pm 1.75$, grupo 'a'), siendo estadísticamente similar a los tratamientos monoespecíficos (*Tetraselmis* 50:50 y *Chlorella* 50:50). Es importante destacar que el Consorcio 70:30 ($71.4787\% \pm 3.37$, grupo 'ab') mantuvo un rendimiento elevado, comparable al grupo superior y significativamente mejor que *Chlorella* 70:30. El tratamiento con el menor desempeño se atribuyó a *Chlorella* 90:10 ($49.2879\% \pm 3.54$).

Tabla 13

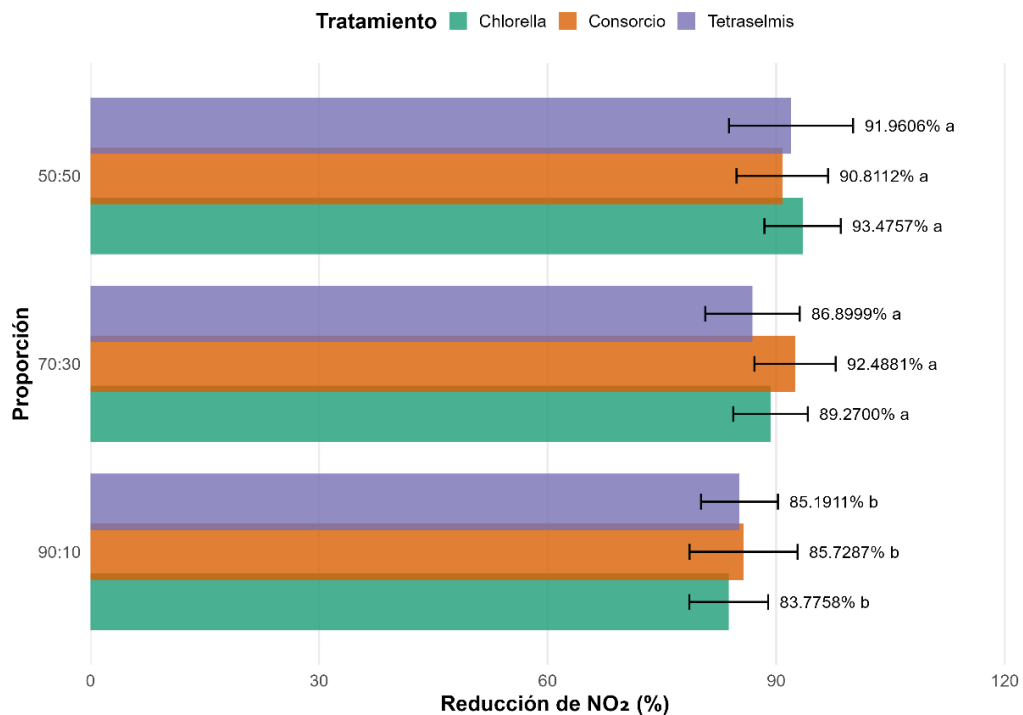
Prueba estadística de Shapiro-Wilk, Kruskal - Wallis y prueba post-hoc de Dunn para la reducción porcentual de NO₃.

Tratamiento	Proporción	Shapiro (p)	Kruskal-Wallis (p)	Dunn (Post-hoc)	% Reducción (media ± DE)
Tetraselmis	50:50	0.9694	2,55×10 ⁻¹¹	b	69,7220 ± 3,49
	70:30	0.9596	2,55×10 ⁻¹¹	c	62,5425 ± 5,6
	90:10	0.0160	2,55×10 ⁻¹¹	cd	55,5830 ± 4,35
Chlorella	50:50	0.0125	2,55×10 ⁻¹¹	b	65,6381 ± 3,59
	70:30	0.9642	2,55×10 ⁻¹¹	c	60,2563 ± 2,78
	90:10	0.8585	2,55×10 ⁻¹¹	d	49,2879 ± 3,54
Consortio	50:50	0.9134	2,55×10 ⁻¹¹	a	77,6173 ± 1,75
	70:30	0.9475	2,55×10 ⁻¹¹	ab	71,4787 ± 3,37
	90:10	0.8949	2,55×10 ⁻¹¹	c	62,0231 ± 3,43

9.4.3. Reducción Porcentual de Nitrito (NO₂)

Figura 19

Reducción porcentual de NO₂ por tratamiento y proporción (Media ± DE)



Nota. Porcentaje de remoción de Nitrito (NO₂) por los tres tratamientos (*Chlorella* sp., Consorcio y *Tetraselmis* sp.) en las tres proporciones. Las barras indican la mediana y las barras de error el error estándar de la media. Las etiquetas muestran la mediana del porcentaje y el grupo estadístico. Las letras distintas a, b, c... indican diferencias estadísticamente significativas (Prueba ANOVA con post-hoc de Tukey, $p < 0.05$)

A diferencia de los otros nutrientes, el análisis de remoción porcentual de nitrito (Figura 19) siguió una ruta paramétrica. La prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 14)

indicó que los nueve grupos de datos se ajustaban a una distribución normal ($p > 0.05$ para todos los grupos). Adicionalmente, la prueba de Levene confirmó la homocedasticidad de las varianzas ($p = 0.7914$). Al cumplirse ambos supuestos paramétricos, se procedió a emplear ANOVA de una vía. El análisis resultó significativo ($p = 0.0037$), lo que confirmó la existencia de diferencias estadísticamente válidas en el desempeño de los tratamientos (Tabla 14). Posteriormente, se aplicó la prueba post-hoc de Tukey HSD para las comparaciones múltiples.

Los resultados evidenciaron una alta eficiencia general en la remoción de nitrito. Aunque el tratamiento *Chlorella* 50:50 ($93.4757\% \pm 5.01$, grupo 'a') mostro el mejor desempeño promedio, es crucial señalar que los tres tratamientos del Consorcio (50:50, 70:30 y 90:10) se ubicaron en el grupo "ab", con medianas de remoción de 90.8112%, 92.4881% y 85.7287% respectivamente. Esto indica que el Consorcio, en todas sus proporciones, no fue estadísticamente diferente del mejor tratamiento monoespecífico, demostrando una capacidad de remoción de nitrito.

Tabla 14

Prueba estadística de Shapiro-Wilk, Levene, Anova y prueba post-hoc de Tukey para la reducción porcentual de NO₂.

Tratamiento	Proporción	Shapiro (p)	Levene (p)	ANOVA (p)	Tukey (Post-hoc)	% Remoción (Mediana)
Tetraselmis	50:50	0.2011	0.7914	0.0037	ab	91,9606 ± 8,14
	70:30	0.2261	0.7914	0.0037	ab	86,8999 ± 6,2
	90:10	0.3370	0.7914	0.0037	ab	85,1911 ± 5,05
Chlorella	50:50	0.5782	0.7914	0.0037	a	93,4757 ± 5,01
	70:30	0.5638	0.7914	0.0037	ab	89,2700 ± 4,89
	90:10	0.4042	0.7914	0.0037	b	83,7758 ± 5,17
Consortio	50:50	0.7179	0.7914	0.0037	ab	90,8112 ± 6,01
	70:30	0.2765	0.7914	0.0037	ab	92,4881 ± 5,33
	90:10	0.9914	0.7914	0.0037	ab	85,7287 ± 7,09

9.5. Eficiencia de Remoción en el Sistema de Tratamiento (20000 mL)

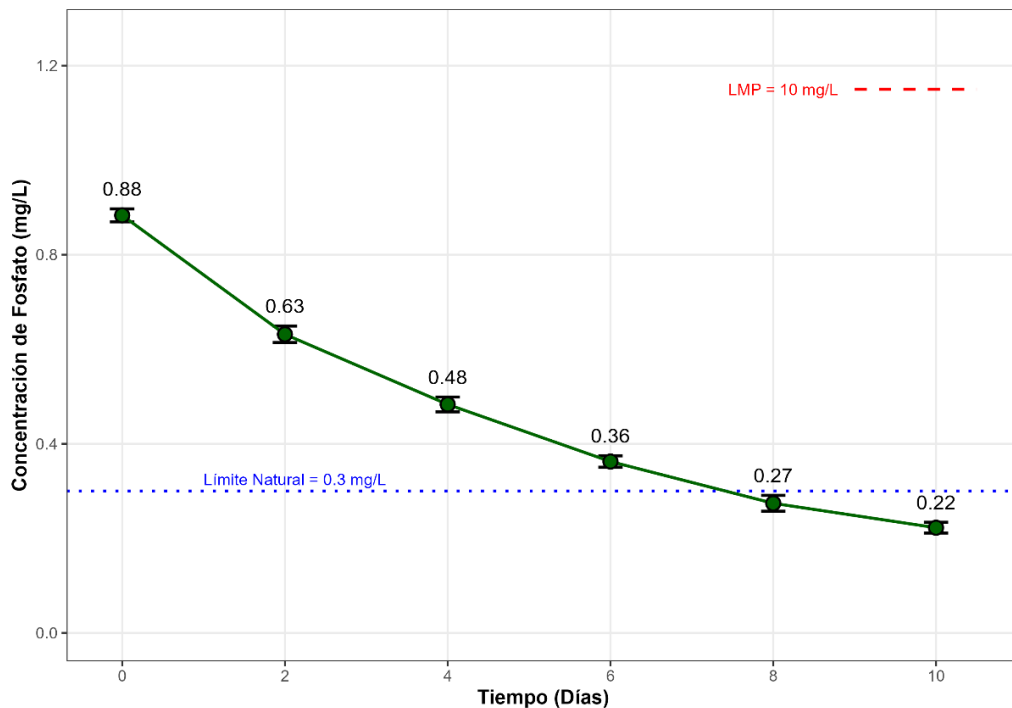
9.5.1 Cinética de Remoción en el Sistema de 20000ml.

Para validar la efectividad del tratamiento con mejores resultados (Consortio 50:50) se empleó en condiciones de mayor volumen, en donde se implementó un sistema de tratamiento por lotes (20000 mL). Este sistema, se monitoreo las concentraciones de nutrientes durante 10 días, con mediciones cada 48 horas.

9.5.1.1. Cinética de Remoción de Fosfato (PO_4)

Figura 20

Cinética de Remoción de Fosfato (PO_4) en Sistema de 20000mL



Nota. Cinética de remoción de Fosfato (PO_4) en el sistema de escalado (20000 mL). Los puntos representan la concentración media y las barras de error indican la desviación estándar (\pm DE). La línea azul punteada indica el límite superior de concentración en agua de mar natural (0.3 mg/L); el indicador rojo discontinuo señala el Límite Máximo Permissible (LMP= 10 mg/L) según TULSMA.

La cinética de remoción del fosfato se presentó en la Figura 20. Para determinar si la reducción observada a lo largo del tiempo fue estadísticamente significativa, se evaluaron los supuestos de normalidad. La Prueba de Shapiro-Wilk indicó que los datos de concentración en el Día 8 no seguían una distribución normal ($p = 0,012$), por lo que se descartó el uso de un ANOVA paramétrico de medidas repetidas. En

consecuencia, se empleó la Prueba de Friedman, la cual confirmó que el factor “Tiempo” tuvo un efecto altamente significativo en la reducción de la concentración de fosfato ($X^2(5) = 60; p = 1,257E-11$).

Tabla 15

Resumen del análisis estadístico Prueba de Friedman para la cinética de remoción de Fosfato (PO_4).

Prueba	Estadístico	gl*	p-valor	Resultado Post-hoc**
Prueba de Friedman	$X^2 = 60,0$	5	1.26×10^{-11}	Todas las comparaciones pareadas (Días 0-10) fueron significativas ($p < 0.05$).

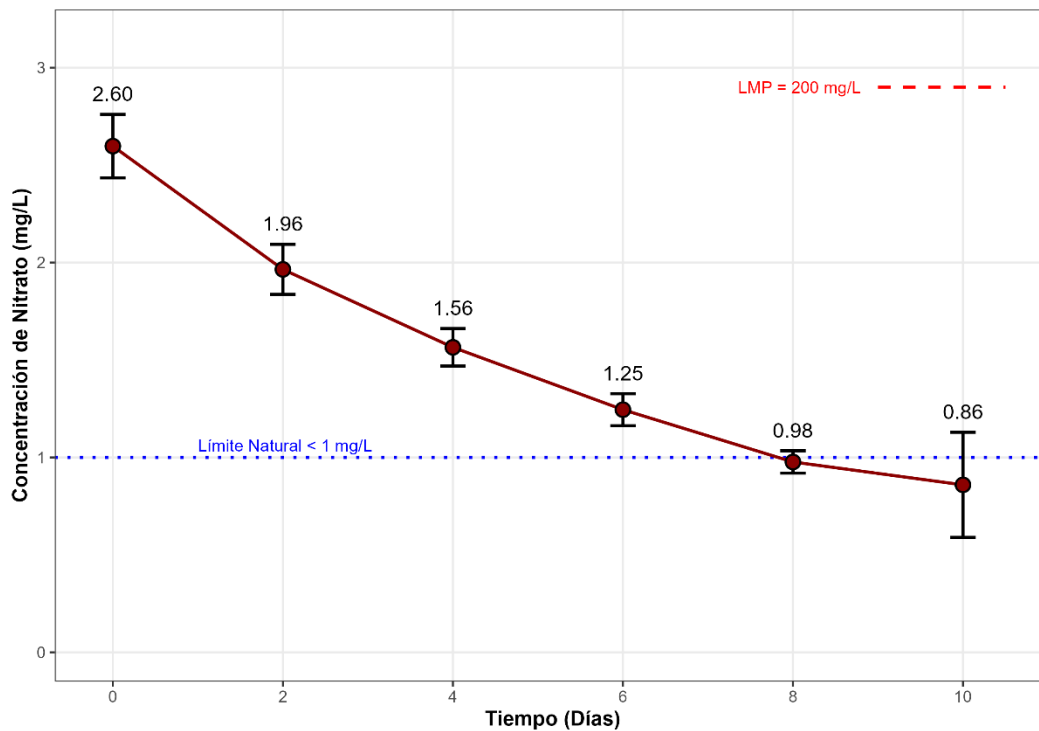
Nota. * gl: Grados de libertad. ** Prueba post-hoc de Wilcoxon pairwise con corrección de Bonferroni.

En la Figura 20, se observó una tendencia de remoción pronunciada y constante. La concentración media inicial de fosfato, que partió de $0,88 \pm 0,01$ mg/L en el Día 0, disminuyó progresivamente en cada punto de muestreo hasta alcanzar una concentración final de $0,22 \pm 0,01$ mg/L en el Día 10. El análisis post hoc (Tabla 15) validó esta observación, revelando que la diferencia en la concentración entre todos los pares de días muestreados fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Al comparar la cantidad final con las referencias visuales del gráfico, se constató que la concentración al Día 10 (0,22 mg/L) se situó por debajo del límite superior reportado para agua de mar natural (0,3 mg/L, línea azul) y muy por debajo del Límite Máximo Permisible (LMP = 10 mg/L, indicador rojo).

9.5.1.2. Cinética de Remoción de Nitrato (NO_3)

Figura 21

Cinética de Remoción de Nitrato (NO_3) en Sistema de 20000mL



Nota. Cinética de remoción de Nitrato (NO_3) en el sistema de escalado (20000 mL). Los puntos representan la concentración media y las barras de error indican la desviación estándar (\pm DE). La línea azul punteada indica el límite superior de concentración en agua de mar natural (< 1 mg/L); el indicador rojo discontinuo señala el Límite Máximo Permisible (LMP = 200 mg/L) según TULSMA.

Para la confirmación estadística de la cinética, se evaluó primero el supuesto de normalidad mediante la Prueba de Shapiro-Wilk, revelando que los datos cumplían con la distribución normal ($p > 0,05$). Debido a esto, se optó por utilizar ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA) para comparar las medianas de los seis puntos de muestreo. Los resultados mostrados en la Tabla 6, evidenciaron un efecto

temporal altamente significativo en cuanto la reducción de la concentración de nitrato.

Tabla 16

Resumen del análisis estadístico Prueba de Friedman para la cinética de remoción de Nitrato (NO₃).

Prueba	Estadístico	gl*	p-valor	Resultado Post-hoc**
RM-ANOVA	2538	1.15, 12.6 0	1.06×10 ⁻⁶³	Todas las comparaciones pareadas (Días 0-10) fueron significativas ($p < 0.01$).

Nota. * gl: Grados de libertad con corrección Greenhouse-Geisser ($\epsilon = 0.23$). ** p-valor con corrección Greenhouse-Geisser. *** Prueba post-hoc de Tukey HSD.

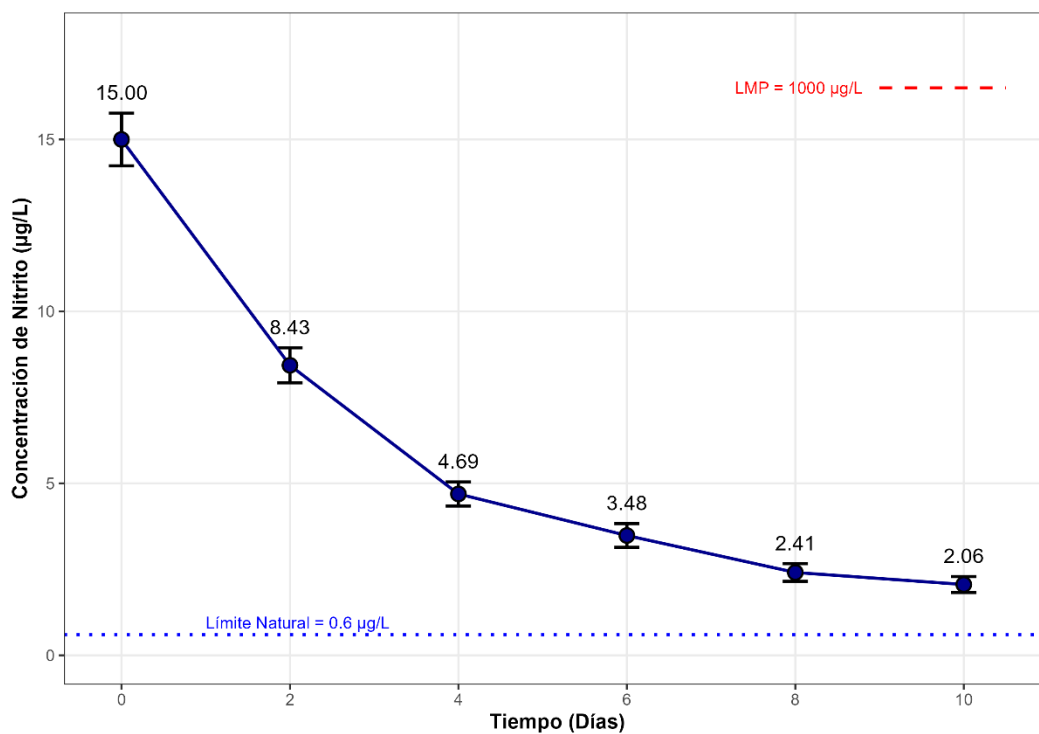
En la Figura 21 se observó una clara tendencia decreciente. La concentración media inicial de nitrato fue de 2,60 mg/L (Día 0) y se redujo hasta 0.78 mg/L al finalizar el ensayo (Día 10). El análisis estadístico mediante ANOVA de medidas repetidas confirmó que esta reducción fue altamente significativa a lo largo del tiempo ($F = 2538$; $p < 0.001$). A diferencia de una estabilización estadística, la prueba post-hoc de Tukey (Tabla 16) reveló que la disminución de la concentración se mantuvo significativa ($p < 0.05$) en todas las comparaciones entre días consecutivos, incluso en las etapas finales del experimento (Días 6, 8 y 10). Esto indica que el sistema de biorremediación continuó removiendo nitratos de manera eficiente hasta el último día de muestreo, sin alcanzar una meseta estadística. Finalmente, al contrastar el estado final con las referencias normativas, se constató que la concentración al Día

10 (0.86 mg/L) se situó por debajo del límite superior reportado para agua de mar natural (< 1 mg/L, línea azul) y cumplió holgadamente con el Límite Máximo Permisible (LMP = 200 mg/L, indicador rojo).

9.5.1.3. Cinética de Remoción de Nitrito (NO_2)

Figura 22

Cinética de Remoción de Nitrato (NO_2) en Sistema de 20000mL



Nota. Cinética de remoción de Nitrito (NO_2) en el sistema de escalado (20000 mL). Los puntos representan la concentración media y las barras de error indican la desviación estándar (\pm DE). La línea azul punteada indica el límite superior de concentración en agua de mar natural (0.6 $\mu\text{g/L}$); el indicador rojo discontinuo señala el Límite Máximo Permisible (LMP = 1000 $\mu\text{g/L}$) según TULSMA.

Se procedió con la evaluación de los supuestos. La Prueba de Shapiro-Wilk aplicada por cada día de muestreo, demostró que todos los grupos de datos seguían una distribución normal ($p > 0.05$ para todos los días). Por lo tanto, se utilizó un ANOVA de medidas repetidas (RM-ANOVA) para evaluar el efecto del tiempo sobre la concentración de nitrito. Los resultados del RM-ANOVA (Tabla 17) indicaron un efecto temporal altamente significativo. No obstante, se observó que el supuesto de esfericidad no fue cumplido (Prueba de Levene, $p < 0.05$), por lo que se reportó el estadístico con la corrección de Greenhouse-Geisser.

Tabla 17

Resumen del análisis estadístico RM-ANOVA para la cinética de remoción de Nitrito (NO₂).

Prueba	Estadístico (F)	gl*	p-valor**	Resultados Post-hoc***
RM-ANOVA	5375	1.213, 13.34	1.23×10^{-72}	Todas las comparaciones pareadas (Días 0-10) fueron significativas ($p < 0.01$).

Nota. * gl: Grados de libertad con corrección Greenhouse-Geisser. ** p -valor con corrección Greenhouse-Geisser. *** Prueba post-hoc de Tukey HSD

La tendencia observada en la Figura 22 mostró una remoción drástica y constante. La concentración media inicial de nitrito fue de 15,00 µg/L (Día 0) y disminuyó significativamente en cada intervalo medido, alcanzando un valor final de 2,06 µg/L

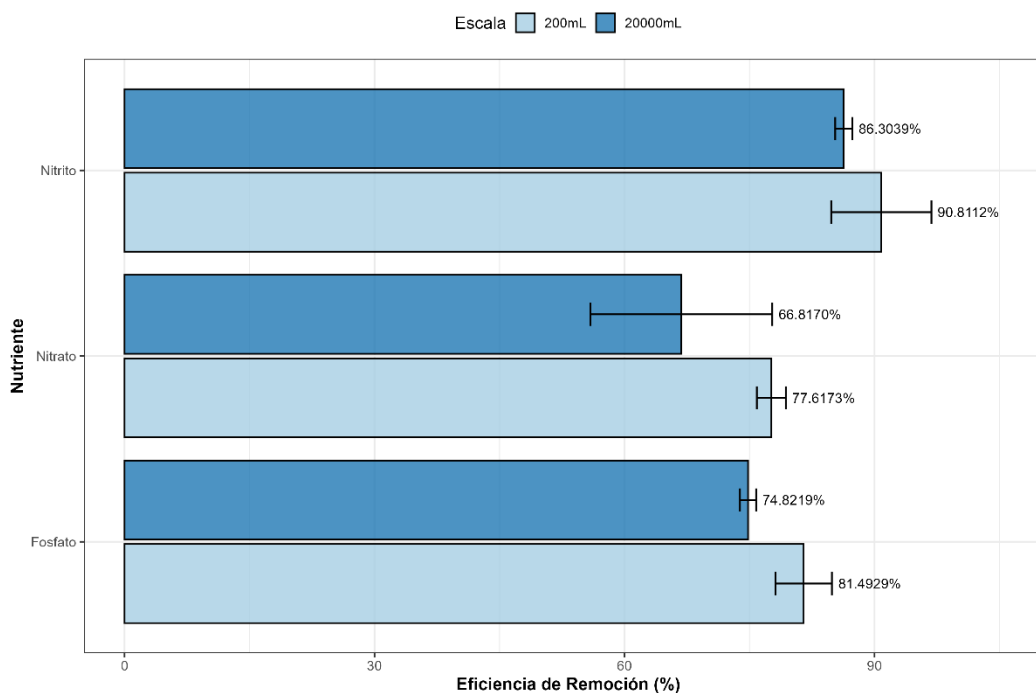
en el Día 10. El análisis post hoc (Prueba de Tukey HSD) confirmó que la concentración en cada punto de muestreo fue estadísticamente diferente de todos los demás puntos. Al comparar el estado final con las referencias visuales del gráfico, se constató que la concentración al Día 10 (2,06 µg/L) se situó por encima del límite superior reportado para agua de mar natural (0,6 µg/L, línea azul), pero muy por debajo del Límite Máximo Permisible (LMP = 1000 µg/L, indicador rojo).

9.5.2 Comparación de Eficiencia de Remoción entre Escalas (200 mL vs 20000 mL)

Se comparó la eficacia de remoción porcentual final al día diez del tratamiento Consorcio 50:50 en los dos ensayos experimentales (Tabla 18). En donde se utilizó el porcentaje de remoción para normalizar los datos, lo que permitió una evaluación estadística directa de cómo el escalado de 200 mL a 20000 mL impactó en el rendimiento del tratamiento.

Figura 23

Comparación de Eficiencia de Remoción Final (Escala botellas vs Escalado)



Nota. Comparación de la eficacia de remoción (%) de Fosfato, Nitrato y Nitrito entre la escala de laboratorio (200mL) y el sistema de escalado (20000mL). Las barras representan la media las líneas de error indican la desviación estándar (\pm DE).

Se realizaron pruebas estadísticas con el fin de comparar ambas escalas experimentales para cada nutriente. Primero, se evaluó la normalidad usando la prueba de Shapiro-Wilk. Segundamente, dependiendo del cumplimiento de supuesto, se aplicó la prueba t-Student para muestras independientes (datos normales) o la prueba U de Mann-Whitney (datos no son normales).

Tabla 18

Resumen estadístico de la comparación de la eficacia de remoción final (%) entre las escalas de 200 mL y 20000 mL.

Nutriente	Prueba Estadística Utilizada	Media 200mL (%)	Media 20000mL (%)	Estadístico (t o U)	p-valor	Significancia
Fosfato (PO ₄)	t-test (Welch's)	81.49	74.82	$t = 5.729$	$2,84 \times 10^{-4}$	Significativo
Nitrato (NO ₃)	Mann-Whitney U	77.62	66.82	$U = 0$	$1,43 \times 10^{-4}$	Significativo
Nitrito (NO ₂)	t-test (Welch's)	90.81	86.30	$t = 2.247$	0,055	No Significativo

Como se evidencia en la Figura 23 y se confirma en la Tabla 18, la eficacia de remoción del Fosfato ($p = 2,84 \times 10^{-4}$) y del Nitrato ($p = 1,43 \times 10^{-4}$) fue estadísticamente significativa en ambos casos, observándose una eficiencia considerablemente mayor en la escala de laboratorio (81.49% para PO_4 y 77.62% para NO_3) en comparación con el sistema de escalado (74.82% para PO_4 y 66.82% para NO_3). Por el contrario, para el Nitrito, aunque la media de remoción fue mayor en 200mL (90.81%) que en 20000 mL (86.30%), esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p = 0.055$). Estos resultados indican que el proceso de escalado impactó de forma negativa el rendimiento para la remoción de fosfatos y nitratos, mientras que el rendimiento para la remoción de nitritos se mantuvo estadísticamente similar entre ambas escalas.

10.DISCUSIÓN

La caracterización fisicoquímica del efluente proveniente del canal de descarga nos permitió establecer la calidad base antes del tratamiento. Las muestras de agua recolectada en la poza presentaron una abundante materia orgánica particulada, restos de alimento, mudas de camarón, restos de *Artemia* y microalgas, entre ellas especies como *Thalassiosira* y *Tetraselmis*. Los datos fisicoquímicos se midieron mediante un método de fotometría para el caso de los nutrientes (nitratos, nitritos y fosfatos), mientras que el pH, la salinidad y la temperatura se midieron in situ con equipos multiparámetro (pHmetro y refractómetro) calibrados.

Los resultados mostraron pH $7,77 \pm 0,05$, temperatura $25,33 \pm 1,12$ °C y salinidad $39 \pm 0,82$ ups, además de concentraciones de NO_2^- $15,15 \pm 0,92$ µg/L, NO_3^- $2,52 \pm 0,18$ mg/L y PO_4^{3-} $0,88 \pm 0,01$ mg/L. Aunque estos valores estuvieron dentro de los límites máximos permisibles del TULSMA (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015), superaron significativamente las condiciones del agua marina natural, que en el Pacífico tropical oriental presenta salinidades de 30–35 ups, pH entre 7,8 – 8,2 y bajas concentraciones de nutrientes (nitrato < 1 µmol/L; fosfato $\approx 0,3$ µmol/L) (Torres et al., 2019). En zonas costeras ecuatorianas como el Estero Salado, los valores de nitrato y fosfato son cercanos a 3,4 y 0,5 µM, respectivamente (Ormaza-González et al., 2024). En comparación, las concentraciones obtenidas en este

estudio (NO_3^- 40 μM ; PO_4^{3-} 28 μM) reflejaron un enriquecimiento de nutrientes atribuible a los residuos orgánicos del cultivo de camarón.

Esta sobrecarga evidenció un predominio de procesos de mineralización y nitrificación por descomposición de materia orgánica y excretas, lo que coincide con lo descrito por Cao et al. (2024) para ambientes hipersalinos, donde la evaporación y el escaso recambio aumentan la concentración de nutrientes y alteran la estructura microbiana. La presencia simultánea de *Thalassiosira* y *Tetraselmis* confirmó un ambiente eutrófico, ya que ambos géneros son bioindicadores de enriquecimiento en nitrógeno y fósforo (Akinawo, 2023). El pH ligeramente inferior al marino (7,77 frente a 7,8–8,2) se atribuyó a la respiración bacteriana y a la descomposición de compuestos nitrogenados que consumen alcalinidad y liberan CO_2 (Belliard et al., 2022). En conjunto, aunque el efluente cumplió con los límites del TULSMA, su comparación con el agua marina natural evidenció una carga de nutrientes 20 a 40 veces mayor, suficiente para generar eutrofización y alterar ecosistemas costeros, como se ha observado en el Pacífico colombiano (Duque et al., 2022).

La inmovilización facilitó la retención de biomasa y protegió a las células frente a las condiciones adversas como la diferencia de salinidad del efluente, permitiendo un contacto sostenido con los nutrientes disueltos. Este enfoque ha sido ampliamente descrito como ventajoso en comparación con cultivos libres, debido a

su mayor estabilidad y a la facilidad de recuperación de la biomasa (de-Bashan & Bashan, 2010; Han et al., 2023).

Los resultados mostraron que los tratamientos con microalgas inmovilizadas lograron remociones significativas, con porcentajes que variaron entre 65 % y 92 %, dependiendo del nutriente y la proporción de microalgas. El tratamiento consorciado (50:50) fue el más eficiente, con $74,8 \pm 2,8$ % de PO_4^{3-} , $71,4 \pm 3,4$ % de NO_3^- y $92,5 \pm 5,3$ % de NO_2^- , superando a los monocultivos. Estos valores coincidieron con los rangos de eficiencia descritos por Divya Meril et al. (2022), Khatoon et al. (2021) y Severo et al. (2024) para sistemas de *Chlorella* y *Tetraselmis* inmovilizadas en alginato, donde las remociones de N y P oscilaron entre 70–90 %. La mayor remoción de nitrito indicó una preferencia metabólica por compuestos nitrogenados más reducidos, mientras que la afinidad por el fósforo se atribuyó a la capacidad de *Chlorella* para acumular polifosfatos intracelulares (Li et al., 2020).

El comportamiento sinérgico del consorcio se interpretó como un resultado de la integración metabólica entre ambas especies. En donde *Chlorella* mostró una afinidad por el fósforo, mientras que *Tetraselmis* destacó por su elevada tasa de asimilación de nitratos, característica reconocida en este género en bajo condiciones salinas según lo descrito en Khatoon et al. (2021) y Mahsa Ghadamzadeh et al. (2024). Esta interacción permitió una remoción más equilibrada de nutrientes, lo que concuerda con lo reportado por Göncü et al. (2025) y Abinandan et al. (2017),

quienes demostraron que los consorcios de microalgas mejoran la asimilación total de Nitrógeno y Fósforo mediante una cooperación metabólica. De esta forma se confirmó que la inmovilización y el uso de consorcios mejoraron la estabilidad y la eficiencia de remoción de nutrientes, lo que establece una base para su evaluación a mayor escala.

En la comparación entre escalas, se observó una disminución moderada de eficiencia al pasar de 200 mL (botellas) a 20000 mL (peceras). Las remociones en microescala alcanzaron $90,81 \pm 6,01$ % de NO_2^- , $77,62 \pm 1,75$ % de NO_3^- y $81,49 \pm 3,39$ % de PO_4^{3-} , mientras que en la escala mayor fueron de $86,28 \pm 2,77$ %, $66,92 \pm 3,23$ % y $74,81 \pm 1,32$ %, respectivamente. La reducción ($\approx 4 - 11$ puntos porcentuales) coincidió con lo descrito por Banerjee et al. (2019) y Han et al. (2023), quienes reportaron pérdidas similares por limitaciones difusivas y gradientes de concentración dentro de las perlas de alginato en reactores estáticos. Estudios como los de Divya Meril et al. (2022) y Hu et al. (2021) confirman que la falta de mezcla activa provoca la sedimentación parcial de las perlas y menor remoción de nutrientes, reduciendo la tasa de asimilación.

Los valores obtenidos en microescala se ubicaron dentro del rango alto para microalgas inmovilizadas en alginato en efluentes acuícolas (70–90 %) (Khatoun et al., 2021; Li et al., 2020; Severo et al., 2024). La eficiencia del consorcio se mantuvo alta pese a la mayor carga volumétrica, lo que refleja la estabilidad del

sistema y su capacidad de adaptación a condiciones difusivamente limitantes. El análisis comparativo con cultivos libres evidenció que el sistema inmovilizado alcanzó eficiencias equivalentes o superiores a las de *Chlorella* y *Tetraselmis* en suspensión (Andreotti et al., 2020; Martelli et al., 2024; Nie et al., 2020). La sinergia funcional entre ambas especies permitió una mayor remoción de nitrógeno y fósforo, respaldando el potencial de los consorcios inmovilizados frente a monocultivos (Göncü et al., 2025).

Las concentraciones finales que se obtuvieron estuvieron muy por debajo de los límites establecido por el TULSMA (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015) y cercanos a los valores reportados para el agua de mar natural por Torres et al. (2019); Ormaza-González et al., (2024), registrándose niveles de NO_3^- entre 0,53–0,86 mg/L y PO_4^{3-} entre 0,16–0,22 mg/L. Aunque las concentraciones de fosfato se encontraron elevadas en comparación con las condiciones del agua de mar natural ($\approx 0,009$ mg/L), estos se mantuvieron dentro de los rangos considerados aceptables para evitar procesos de eutrofización según Li et al. (2020). Por lo que, el sistema inmovilizado conservó una alta eficiencia operativa y permaneció con los estándares ambientales, demostrando una viabilidad técnica para la remoción de nutrientes en efluentes marinos o salobres.

El sistema de biorremediación con microalgas inmovilizadas demostró un alto rendimiento en la eliminación de compuestos nitrogenados y fosforados, validando

su potencial como alternativa tecnológica en el tratamiento de efluentes camaroneros. Las remociones promedio superiores al 70 % en todas las escalas confirmaron la eficiencia del consorcio *Chlorella–Tetraselmis*, cuyas eficiencias de NO_2^- (90,8–86,3 %), NO_3^- (77,6–66,9 %) y PO_4^{3-} (81,5–74,8 %) se situaron dentro o por encima de los valores reportados para sistemas inmovilizados similares (Khatoon et al., 2021; Divya Meril et al., 2022; Li et al., 2020; Severo et al., 2024). La ligera pérdida de rendimiento observada al escalar coincidió con lo descrito por Banerjee et al. (2019) y Han et al. (2023), quienes atribuyen este comportamiento a la reducción de la relación área-volumen y la resistencia difusiva interna de las perlas.

El consorcio presentó un equilibrio funcional entre ambas especies: *Chlorella* mostró mayor afinidad por el fósforo, mientras *Tetraselmis* favoreció la asimilación de nitrato en condiciones salinas (Li et al., 2020; Khatoon et al., 2021; Göncü et al., 2025). Esta sinergia permitió mantener una remoción estable y homogénea, lo que respalda las observaciones de de-Bashan & Bashan (2010) sobre la eficiencia de los consorcios microalgales inmovilizados. Los resultados finales cumplieron ampliamente con los LMP del TULSMA (Ministerio del Ambiente del Ecuador, 2015) y se acercaron a las condiciones del agua marina natural (Ormaza-González et al., 2024), evidenciando la eficacia del tratamiento y su potencial para reducir la carga eutrofizante en sistemas costeros.

11. CONCLUSIÓN

Se caracterizó el agua residual de acuicultura, determinando que, si bien el efluente cumplía con la normativa TULSMA vigente (LMP PO_4^{2-} : 10 mg/L; NO_3^- : 200 mg/L), presentó un grave desequilibrio ecológico. Las concentraciones iniciales de Fosfato (0.88 mg/L), Nitrato (2.52 mg/L) y Nitrito (15.15 $\mu\text{g/L}$) superaron drásticamente los niveles de referencia del agua de mar natural (0.3 mg/L, <1 mg/L y 0.1-0.6 $\mu\text{g/L}$, respectivamente), confirmando que el efluente era un agente causal de eutrofización y justificó plenamente la necesidad de un tratamiento.

Los ensayos realizados a una escala de laboratorio en 200 mL, permitió determinar que la densidad celular y la proporción alginato/microalgas son factores determinantes en la eficiencia de remoción. El consorcio de *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. en una proporción de 50:50 fue el tratamiento más eficaz, que alcanzo una remoción de $77.62\% \pm 1.75$ para nitrato, $93.48\% \pm 5.01$ para nitrito y $85.63\% \pm 2.14$ para fosfato. También, fue el único tratamiento capaz de reducir las concentraciones finales a niveles similares o inferiores del agua marina de referencia: PO_4^{3-} 0.13 mg/L, NO_3^- 0.53 mg/L y $\text{NO}_2^- \approx 15 \mu\text{g/L}$.

El escalado a 20000 mL nos permitió compara las concentraciones iniciales y finales, demostrando una disminución significativa de nitrato, nitrito y fosfato durante los 10 días de operación. No obstante, se notó una reducción en la eficiencia de remoción de nitrato y fosfato en comparación con el ensayo de 200 mL, lo que indica limitaciones asociadas a la transferencia de nutrientes y distribución de luz en volúmenes mayores, aspectos que deben ser optimizados para su implementación en escalas aún mayores.

Los resultados obtenidos validan la viabilidad técnica y económica del uso de microalgas inmovilizadas como un sistema de tratamiento terciario. Su simplicidad del biorreactor y la estabilidad de las perlas de alginato permiten su implementación con modificaciones mínimas de infraestructura, adicionalmente que cuenta con la valorización de la biomasa residual, que es rica en lípidos y carbohidratos sintetizados a partir de los contaminantes removidos, que al estar inmovilizados en el alginato permite su fácil extracción y viabilidad para la producción de subproductos como biocombustibles, amortiguando los costos operativos de tratamiento.

Por lo que, la utilización de un sistema de biorremediación que emplea microalgas inmovilización como son el género *Chlorella* sp. y *Tetraselmis* sp. en perlas de alginato resulta en una tecnología altamente efectiva y ambientalmente sostenible. La evidencia experimental nos permite rechazar la hipótesis nula y confirmar la

hipótesis alterna que indica que el sistema especialmente en proporciones de 50:50 es capaz de reducir la cantidad de nutrientes del agua residual a condiciones ecológicamente seguras, lo que le permite convertirse en una alternativa de tratamiento de efluentes prometedora. Adicionalmente, nuestro p calculado fue $< 0,001$ siendo menor al $\alpha (0,05)$ lo cual nos permite aceptar la hipótesis.

12. RECOMENDACIONES

Optimizar el diseño del biorreactor de escalado. Dado que se observó una disminución en la eficiencia al pasar de 200mL a 20000mL, se recomienda que futuras investigaciones se enfoquen en la optimización de la ingeniería del sistema. Se necesario evaluar configuraciones que mejoren la transferencia de masa y la penetración de luz, tales como la implementación de sistemas de agitación suave o aireación controlada, con el fin de asegurar que todas las perlas de alginato tengan acceso equitativo a los nutrientes y la luz.

Probar el sistema en un biorreactor de flujo continuo. El presente estudio se realizó en un sistema por lotes (batch). Para simular de manera más fidedigna la descarga constante de un efluente industrial, se recomienda probar el tratamiento de Consorcio 50:50 en un biorreactor de flujo continuo, determinando los tiempos de retención hidráulica óptimos.

Profundizar en los mecanismos sinérgicos del consorcio. El Consorcio 50:50 demostró ser el tratamiento más robusto en términos integrales, superando a los monocultivos en la remoción de nitrato. Se sugiere desarrollar estudios a identificar si la mayor eficiencia se debe a mecanismos de cooperación metabólica entre

Chlorella sp. y *Tetraselmis sp.* o si responde a simplemente división complementaria en el uso de recursos y rutas bioquímicas.

Evaluar la robustez del tratamiento bajo diferentes cargas. Aunque el fluente caracterizado cumplió con la normativa TULSMA, su composición refleja un desequilibrio ecológico. Por ello, se recomienda analizar la resiliencia del Consorcio 50:50 frente a efluentes con cargas de iniciales considerablemente elevadas, con el objetivo de determinar los umbrales de o inhibición del sistema.

Realizar un análisis tecno-económico del proceso. Una vez optimizado el proceso de escalado, se sugiere llevar a cabo un análisis tecnoeconómico que compare los costos de implementación y operación (cultivo de microalgas, producción de perlas de alginato, mantenimiento del reactor) frente a los costos asociados a métodos fisicoquímicos convencionales de tratamiento de efluentes.

13.BIBLIOGRAFÍA

- Abinandan, S., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., & Megharaj, M. (2017). Microalgae–bacteria biofilms: a sustainable synergistic approach in remediation of acid mine drainage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(3), 1131–1144. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8693-7>
- Akinnawo, S. O. (2023). Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. *Environmental Challenges*, 12, 100733–100733. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2023.100733>
- Algatex Biotechnology. (2025, July 11). *Chlorella Vulgaris* | *Qué es y para qué sirve*. Microalgas En Perú. <https://www.microalgas.algatex.org/chlorella-vulgaris/>
- Ali, N.; Mohammad, A.W.; Jusoh, A.; Hasan, M.R.; Ghazali, N.; Kamaruzaman, K. 2005. Treatment of aquaculture wastewater using ultra-low pressure asymmetric polyethersulfone (PES) membrane. *Desalination* 185, 317-326. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.03.084>.
- Alonso Fernández, A. M., Palacios Arrieta, D., & Guadalupe Martínez, N. 2023. Biorremediación en Aguas Residuales Acuícolas: Una Revisión. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 7(4), 8538-8568. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i4.7577
- Andreotti, V. (2019). Microalgae in aquaculture wastewater : a new forecasting method of production in a marine system. *Tesisenred.net*. <http://hdl.handle.net/10803/667235>

- Andreotti, V., Solimeno, A., Rossi, S., Ficara, E., Marazzi, F., Mezzanotte, V., & García, J. (2020). Bioremediation of aquaculture wastewater with the microalgae *Tetraselmis suecica*: Semi-continuous experiments, simulation and photo-respirometric tests. *Science of the Total Environment*, 738, 139859. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139859>
- Arredondo-Vega, B. O., & Domenico Voltolina. (2007). *CONCENTRACIÓN, RECUENTO CELULAR Y TASA DE CRECIMIENTO*. https://www.researchgate.net/publication/253237563_CONCENTRACION_RECUENTO_CELULAR_Y_TASA_DE_CRECIMIENTO
- Banerjee, S., et al. (2019). Effect of alginate concentration in wastewater nutrient removal using alginate-immobilized microalgae beads: uptake kinetics and adsorption studies. *Biochemical Engineering Journal*, 149, 107241. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107241>
- Bashan, Y., Hernandez, J.-P., Leyva, L., & Bacilio, M. (2002). Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 35(5), 359–368. <https://doi.org/10.1007/s00374-002-0481-5>
- Beijerinck, M.W. (1890). Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
- Belliard, J.-P., Hernandez, S., Stijn Temmerman, Suello, R. H., Dominguez-Granda, L. E., Rosado-Moncayo, A. M., Ramos-Veliz, J. A., Parra-Narera, R. N., Karem Pollete-Ramirez, Govers, G., Borges, A. V., & Bouillon, S. (2022). Carbon dynamics and CO₂ and CH₄ exchange in the mangrove dominated Guayas river delta, Ecuador. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 267, 107766–107766. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2022.107766>
- Bobbitt, Z. (2019). *How to Check ANOVA Assumptions*. Statology. https://www.statology.org/anova-assumptions/?utm_

- Borowitzka, M. A. (2018). Chapter 3 - Biology of Microalgae. *Elsevier EBooks*, 23–72. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811405-6.00003-7>
- Cao, T. T., Nguyen, K. L. P., Le, H. A., & Eppe, G. (2024). The integrating impacts of extreme weather events and shrimp farming practices on coastal water resource quality in Ninh Thuan Province, Vietnam. *Sustainability*, 16(13), 5701. <https://doi.org/10.3390/su16135701>
- Cárdenas, G., & Sánchez, I. (2013). Nitrógeno en aguas residuales: orígenes, efectos y mecanismos de remoción para preservar el ambiente y la salud pública. *Universidad Y Salud*, 15(1), 72–88. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0124-71072013000100007
- Cardona, J., & García, L. 2008. *Evaluación Del Efecto De Los Microorganismos Eficaces (EM®) Sobre La Calidad De Un Agua Residual Doméstica*. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8207/tesis204.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Carrasquero-Ferrer , C.-S. J., Rincón-Lizardo , N. C., Díaz-Montiel , A. R., & Pire-Sierra, M. C. (2014). Monitoreo de la remoción biológica de nitrógeno en efluentes de tenerías usando un reactor por carga secuencial. *Ingeniería Investigación Y Tecnología*, 15(2), 287–298. [https://doi.org/10.1016/s1405-7743\(14\)72217-6](https://doi.org/10.1016/s1405-7743(14)72217-6)
- Cely-Calixto, N. J., Carrillo-Soto, G. A., & Bonilla, C. A. (2022). Tratamientos de aguas residuales. In *ResearchGate*. ECOE Ediciones. https://www.researchgate.net/publication/376375373_Tratamientos_de_aguas_residuales
- Chevalier, P., & de la Noüe, J. (1985). Removal of nutrients from wastewater by *Scenedesmus obliquus* immobilized in carrageenan. *Applied and Environmental Microbiology*, 49(6), 1371–1377.

- Cognita. (2023). *Modos de cultivo de las microalgas*. Cognita Conecta. <https://cognitaconecta.com/modos-de-cultivo-de-microalgas/>
- Cohen, Y., 2001. Biofiltration— the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresour. Technol.* 77, 257–274.
- Copete-Pertuz, L., Plácido, J., Serna-Galvis, E., Torres-Palma, R., & Mora, A. (2018). Elimination of Isoxazolyl-Penicillins antibiotics in waters by the ligninolytic native Colombian strain *Leptosphaerulina* sp. *Science of The Total Environment*, 630, 1195-1204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.244>
- Correia, G., Sánchez, I., Gebara, D., Dall’Aglio Sobrinho, M., & Matsumoto, T. (2013). Remoción de fósforo de diferentes aguas residuales en reactores aeróbios de lecho fluidizado trifásico con circulación interna. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*, 67, 172–182. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-62302013000200015
- Cripps, S. J., & Bergheim, A. (2000). Solids management and removal for intensive land-based aquaculture production systems. *Aquacultural Engineering*, 22(1–2), 33-56. [https://doi.org/10.1016/S0144-8609\(00\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0144-8609(00)00031-5)
- Datanovia. (2019). *ANOVA in R: The Ultimate Guide - Datanovia*. Datanovia. https://www.datanovia.com/en/lessons/anova-in-r/?utm_
- de la Noüe, J., & de Pauw, N. (1988). The potential of microalgae for wastewater treatment. *Biological Wastes*, 26(4), 263–276.
- de-Bashan, L. E., & Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(10), 1611–1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- DHN. (2021). *Normas Técnicas Hidrográficas N° 10: Procedimiento de muestreo y análisis de agua y sedimentos* (1.^a ed.). Dirección de Hidrografía y

Navegación. <https://www.dhn.mil.pe/files/pdf/normas-tecnicas/NormasTecnicasHidrograficasN%C2%B010.pdf>

- Divya Meril, R., Piliyan, R., Perumal, S., Sundarraj, D. K., & Binesh, A. (2022). Efficacy of alginate immobilized microalgae in the bioremediation of shrimp aquaculture wastewater. *Process Biochemistry*, 122, 196–202. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.08.030>
- Dolan, E., Murphy, N., & O’Hehir, M. (2013). Factors influencing optimal micro-screen drum filter selection for recirculating aquaculture systems. *Aquacultural Engineering*, 56, 42-50. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2013.04.005>
- Dunn, O. J. (1964). Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6(3), 241-252.
- Duque, G., Gamboa-García, D. E., Molina, A., & Cogua, P. (2022). Influence of water quality on the macroinvertebrate community in a tropical estuary (Buenaventura Bay). *Integrated Environmental Assessment and Management*, 18(3), 796–812. <https://doi.org/10.1002/ieam.4521>
- Ecomar. 2020. *Fundacion Ecomar - ¿Qué son las aguas residuales?* Fundación Ecomar. <https://fundacionecomar.org/que-son-las-aguas-residuales/>
- Fan, J., et al. (2021). Microalgal-bacterial granular sludge for aquaculture wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 41, 102029. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102029>
- Fisher, R. A. (1934). *Statistical methods for research workers*.
- Foo, S. C., Mok, C. Y., Ho, S. Y., & Khong, N. M. H. (2023). Microalgal culture preservation: Progress, trends and future developments. *Algal Research*, 71, 103007–103007. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103007>

- Friedman, M. (1937). The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. *Journal of the American Statistical Association*, 32(200), 675-701.
- García, F., & Miraba, V. 2018. *Eutrofización, Una Amenaza Para El Recurso Hídrico*. https://ru.iiec.unam.mx/4269/1/2-Vol2_Parte1_Eje3_Cap5-177-Garc%C3%ADa-Miranda.pdf
- Ghadamzadeh, M., Karimi, A., & Mohebbi, M. (2024). Investigating the growth rate of Tetraselmis algae and its effect on nitrogen removal from aquaculture wastewater. *Journal of Applied Environmental Hygiene & Remediation*, 12(1), 8–15.
- Göncü, S., Şimşek Uygun, B., & Atakan, S. (2025). Nitrogen and phosphorus removal from wastewater using *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* microalgae with a batch bioreactor. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 22(12), 11877–11892. <https://doi.org/10.1007/s13762-025-06380-x>
- Gorito, A. M., et al. (2018). Constructed wetland microcosms for the removal of organic micropollutants from freshwater aquaculture effluents. *Science of The Total Environment*, 644, 1171-1180. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.371>
- Gribble Lab. (2019). *One Way ANOVA*. https://gribblelab.org/teaching/stats2019/notes/One_Way_ANOVA.pdf?utm
m
- Guevara, M. (2016). CULTIVO DISCONTINUO DE LA MICROALGA *Coenochloris* sp. CON FRACCIÓN SOLUBLE DE PAPA (*Solanum phureja*) EN CONDICIONES MIXOTRÓFICAS. In *Dspace UPS*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13226/1/UPS-QT10476.pdf>

- Guillard, R. R. L. & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.*, 8: 229–39.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: WL Smith MH Chanley (Eds.). *Culture of marine invertebrates' animals*. Plenum Publishing Corp. New York, 29- 60 pp.
- Hammer, D., Ryan, P., Hammer, Ø., Harper, D., Museum, Ø., & Voldgade. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 178. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Han, M., Zhang, C., & Ho, S.-H. (2023). Immobilized microalgal system: An achievable idea for upgrading current microalgal wastewater treatment. *Environmental Science and Ecotechnology*, 14, 100227. <https://doi.org/10.1016/j.es.2022.100227>
- Hanna Instruments. (4 de febrero de 2021). *HANNA® instruments Ecuador*. HANNA® Instruments Ecuador. <https://hannainst.ec/blog/analisis-de-agua-boletines/control-de-fosforo-en-los-acuarios-de-agua-salada/>
- Hanna Instruments. 2021. *Marine Master Waterproof Multiparameter Photometer*. https://cdn.hannacolombia.com/hannacdn/support/manual/2022/01/Manual_en_Ingles_HI_97105.pdf
- Hernández, S. (2011). Inmovilizacion de. In *Cibnor*. https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/223/1/hernandez_s.pdf
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. In *Revista de Biología Marina y Oceanografía* (Vol. 49, Issue 2). <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

- Hlordzi, V., et al. (2020). The use of *Bacillus* species in maintenance of water quality in aquaculture: A review. *Aquaculture Reports*, 18, 100503. <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100503>
- Hu, X., Meneses, Y. E., Hassan, A. A., Stratton, J., & Huo, S. (2021). Application of alginate-immobilized microalgae in treating real food industrial wastewater and design of annular photobioreactor: A proof-of-concept study. *Environmental Technology & Innovation*, 24, 102524. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102524>
- INEN 2013. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2169:2013 Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Instituto Ecuatoriano de Normalización 2169. Primera Edición. Quito-Ecuador. 2013.
- ISA. (s. f.). *La importancia de clasificar y tratar aguas residuales de forma correcta*. ISA. Recuperado el 16 de agosto de 2025, de <https://isa.ec/la-importancia-de-clasificar-y-tratar-aguas-residuales-de-forma-correcta-2/>
- Jácome-Pilco, C., Ballesteros, C., Rea, E., & Rea Cayambe, L. M. (2021). Microalgas en el tratamiento de aguas residuales generadas en industrias de curtiembres. *Ciencia y Tecnología*, 14(2). <https://doi.org/10.18779/cyt.v14i2.502>
- Kaloudas, D., Pavlova, N., & Penchovsky, R. (2021). Phycoremediation of wastewater by microalgae: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 2905–2920. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01203-0>
- Khatoon, H., Kwan, P., Banerjee, S., & Rahman, M. R. (2021). Immobilized *Tetraselmis* sp. for reducing nitrogenous and phosphorous compounds from aquaculture wastewater. *Bioresource Technology*, 338, 125529. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125529>

- Kishida, N., Kim, J., Tsuneda, S., & Sudo, R. (2003). Anaerobic/oxic/anoxic granular sludge process for enhanced nitrogen removal. *Water Science and Technology*, 47(11), 17–23. <https://doi.org/10.2166/wst.2003.0617>
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Kurade, M. B., et al. (2021). Phytoremediation as a green biotechnology tool for environmental pollution. *Chemical Engineering Journal*, 415, 129040. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129040>
- Lalitha, N., et al. (2019). Usage of *Pleurotus ostreatus* for degradation of oxytetracycline in aquaculture systems. *Journal of Coastal Research*, 86(1), 138-141. <https://doi.org/10.2112/SI86-021.1>
- Lananan, F.; Abdul, S.H.; Sakinah, W.N.; Ali, N.; Khatoon, H.; Jusoh, A.; Endut, A. 2014. Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella* sp.). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 95, 127-134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.06.013>.
- Leo, C. P., et al. (2013). Potential of nanofiltration and low pressure reverse osmosis in the removal of phosphorus for aquaculture. *Water Science and Technology*, 67(4), 831–837. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.625>
- Levene, H. (1960). Robust tests for equality of variances. En *Contributions to Probability and Statistics: Essays in Honor of Harold Hotelling* (pp. 278-292). Stanford University Press.
- Li, B., & Irvin, S. (2007). The comparison of alkalinity and ORP as indicators for nitrification and denitrification in a sequencing batch reactor (SBR). *Biochemical Engineering Journal*, 34(3), 248–255. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2006.12.019>
- Li, T., Shen, R., He, B., & Zhang, Y. (2020). Enhancing phosphate and nitrate removal by *Chlorella pyrenoidosa* immobilized in alginate beads under

- different salinity conditions. *Environmental Technology*, 41(24), 3168–3177. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1592663>
- Luna, M. 2011. Efluente Piscícolas: Características Contaminantes, Impactos y Perspectivas de Tratamiento. *JOURNAL de CIENCIA E INGENIERÍA*, 3(1), 12–15. <https://jci.uniautonoma.edu.co/2011/2011-2.pdf>
- Mann, H. B., & Whitney, D. R. (1947). On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *The annals of mathematical statistics*, 50-60.
- Marconi, P. L., Zawoznik, M. S., Groppa, M. D., & de Cabo, L. I. 2022. Inmovilización de microalgas en perlas de alginato para su uso en procesos de biorremediación. *Conicet.gov.ar*. <https://doi.org/978-84-15413-46-2>
- Martelli, A., et al. (2024). Phytoremediation of aquaculture effluents through the use of six marine microalgae. *Revista de Biología Tropical*, 72(S1), e58979. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-77442024000200007&lng=en&nrm=iso
- Mauchly, J. W. (1940). Significance test for sphericity of a normal n-variate distribution. *The Annals of Mathematical Statistics*, 11(2), 204-209.
- Maza, J. (2017). Control de fósforo en los acuarios de agua salada. In *Universidad Politecnica Salesiana*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/14968/1/UPS-CT007384.pdf>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (2015). *Acuerdo Ministerial N.º 097-A: Reforma del Anexo 1 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente (TULSMA)*. Registro Oficial Edición Especial 387. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu155128.pdf>
- Mitsch, W. J., & Jørgensen, S. E. (2003). Ecological engineering: A field whose time has come. *Ecological Engineering*, 20(5), 363–377. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2003.05.001>

- Moheimanim, N., McHenry, M., Boer, K., Bahri, P. 2015. Biomass and Biofuels from Microalgae. DOI 10.1007/978-3-319-16640-7
- Montaño, S. (2015). Clasificación taxonómica de microalgas presentes en un consorcio microbiológico que biorremedia el efluente de una planta de sacrificio de bovinos y porcinos. Uniandes. <https://hdl.handle.net/1992/18343>
- Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: current techniques and uses. *Bioresour. Technol.* 99, 3949–3964.
- Naciones Unidas. 2018. La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible Una oportunidad para América Latina y el Caribe Objetivos, metas e indicadores mundiales. <https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/cb30a4de-7d87-4e79-8e7a-ad5279038718/content>
- Nebicela, C., & Palma, L. (2023). *DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES HIDROQUÍMICAS EN LOS ARRECIFES ROCOSOS (ANCONCITO Y SAN LORENZO) PROVINCIA DE SANTA ELENA.* <https://institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2023/03/Hidroquimica-Arrecifes-Sta-Elena-2022.pdf>
- Nie, X., et al. (2020). Current progress, challenges and perspectives in microalgae-based nutrient removal for aquaculture waste. *Journal of Cleaner Production*, 277, 124209. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124209>
- NIH. 2018. *Floración De Algas*. National Institute of Environmental Health Sciences. <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/enfermedades/algas>
- Núñez Mork, Brenda Kristell, Núñez Lozada, Brenda Tatiana, Medina Cabrera, Edilberto Vicente, Abril Ramírez, Ricardo Alonso, Vincent Lozano, Tiffany Lynne, Paredes Zavala, Joshelyn Mariangela, & Cárdenas García, Jaime Dante. (2024). DEVELANDO EL POTENCIAL DE *Chlorella* sp. PARA LA ELIMINACIÓN DE BTEX: UN ENFOQUE INNOVADOR

PARA LA BIORREMEDIACIÓN. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 90(2), 62-80. Epub 30 de junio de 2024. <https://doi.org/10.37761/rsqp.v90i2.465>

Okoro, V., Azimov, U., Munoz, J., Hernandez, H. H., & Phan, A. N. (2019). Microalgae cultivation and harvesting: Growth performance and use of flocculants - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 115, 109364. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109364>

OMS. 13 de septiembre de 2023. *Agua para consumo humano*. Who.int; World Health Organization: WHO. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/drinking-water#:~:text=El%20agua%20contaminada%20y%20el,fiebre%20tifoidea%20y%20la%20poliomielitis>.

ONU. 2020. *ONU-Habitat - Comprender las dimensiones del problema del agua*. Onu-Habitat.org. <https://onu-habitat.org/index.php/comprender-las-dimensiones-del-problema-del-agua>

Ormaza-González, F. I., Campi-Alvarez, P. A., Cárdenas-Condoy, J. W., Caiza-Quinga, R. J., & Statham, P. J. (2024). Further evidence for increasing global near-shore eutrophication from the Estero Salado, Guayaquil, Ecuador. *Continental Shelf Research*, 278, 105271. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2024.105271>

Pástor Guerrero, V. P., & Pozo Castro, A. C. (2013). *Evaluación del rol de la iluminancia, el pH y la cantidad de nutrientes en el crecimiento de la microalga Scenedesmus sp. en condiciones de laboratorio* (Trabajo de titulación, Universidad Politécnica Salesiana). Quito, Ecuador.

Pesantes, F., & Pérez, E. (1993). ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CONDICIONES FÍSICAS y QUÍMICAS DE LAS AGUAS COSTERAS ECUATORIANAS. 1981-1983. In *Revista de Ciencias del Mar y Limnología*. <https://institutopesca.gob.ec/wp-content/uploads/2017/08/Estudio-comparativo-de-las-condiciones.pdf>

- Presidencia de la República del Ecuador. (2003). Texto Unificado de Legislación Secundaria del Medio Ambiente (TULSMA) [Actualizado al 29 de marzo de 2017]. Registro Oficial Edición Especial 2. <https://www.gob.ec/sites/default/files/regulations/2018-09/DECRETO%20EJECUTIVO%203516%20-%20TULSMA.pdf>
- Qin, J. J., et al. (2005). Treatment of aquaculture wastewater using reverse osmosis membranes. *Desalination*, 185(1–3), 317–326. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2005.03.084>
- Quispe, M., Piñas, L., Del Valle, J., & Chávez, F. (2020). *Aplicaciones tecnológicas de tratamiento de aguas residuales A*. <https://biblio.flacsoandes.edu.ec/libros/digital/58476.pdf>
- Rosales, D. (2017). Evaluación de un sistema de tratamiento continuo para la biorremediación del efluente de la producción de aceite de oliva (alpechín) de la localidad de Atico, con un hongo aislado del alpechín y microalga *Chlorella vulgaris*, Arequipa, 2017. In *Repositorio UAP*. https://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12990/5121/Tesis_Tratamiento_Biorremediaci%3%b3n_Aceite.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- RStudio. (2020). RStudio: Integrated Development Environment for R. <https://posit.co/download/rstudio-desktop/>
- Sandoval Herrera, J. A., Malo Malo, B. O., Cartagena Arévalo, J. C., y Rubio Fernández, D. (2018). Evaluación a nivel laboratorio de la capacidad de remoción de materia orgánica de *Chlorella vulgaris* en las aguas residuales de la PTAR Salitre. *Revista Mutis*, 8(1), 34–42. <https://doi.org/10.21789/22561498.1368>
- Severo, I. A., Azevedo, O. G. de A., Silva, P. A. S. da, Jacob-Furlan, B., Mariano, A. B., Ordonez, J. C., & Vargas, J. V. C. (2024). Wastewater treatment process using immobilized microalgae. *Water Science and Technology*, 90(4), 1306–1320. <https://doi.org/10.2166/wst.2024.283>

- Shah, M. P., & Shah, A. (2020). Bioremediation: A sustainable approach for environmental management. *Springer Nature*.
- Silva, J., Vásquez, V., & Merino, F. (2011). Producción de biomasa de *Tetraselmis suecica* empleando agua de mar con sanguaza. In *Universidad Nacional de Trujillo*. <https://www.redalyc.org/pdf/3576/357633697002.pdf>
- Smith, V. (2009). Eutrophication. In *Elsevier eBooks* (pp. 61–73). <https://doi.org/10.1016/b978-012370626-3.00234-9>
- Stein, F. (1878). *Der Organismus der Infusionsthier*e nach eigenen forschungen in systematischere Reihenfolge bearbeitet. III. Abtheilung. Die Naturgeschichte der Flagellaten oder Geisselinfusorien. I. Hälfte, Den noch nicht abgeschlossenen allgemeinen Theil nebst erklärang: Der sämmtlichen Abbildungen enthaltend. pp. i-x, 1-154, pls I-XXIV. Leipzig: Verlag von Wilhelm Engelmann.
- Student. (1908). The probable error of a mean. *Biometrika*, 1-25.
- Tam, N. F. Y., & Wong, Y. S. (2000). Effect of immobilized microalgal beads on nutrient removal in wastewater. *Environmental Technology*, 21(6), 577–584.
- Tampion, J., Tampion, M.D., 1987. *Immobilized Cells: Principles and Applications*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. 257 pp.
- Tenorio, C., Hernández, H., & Aguirre, M. (2018). Manual para obtención de cepas de microalgas. *Imarpe.gob.pe*. <https://repositorio.imarpe.gob.pe/handle/20.500.12958/3285>
- Torrentera Blanco, L., Tacon, A.G.J.; Fisheries and Aquaculture Management Division. 1989. La producción de alimento vivo y su importancia en acuicultura. <https://www.fao.org/4/ab473s/AB473S00.htm#TOC>
- Torres, G., Carnicer, O., Canepa, A., De, P., Recalde, S., Narea, R., Pinto, E., & Borbor-Córdova, M. J. (2019). Spatio-Temporal Pattern of Dinoflagellates

Along the Tropical Eastern Pacific Coast (Ecuador). *Frontiers in Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00145>

Tukey, J. W. (1949). Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*, 5(2), 99-114.

Tuset, S. (19 de febrero de 2017). *Sistemas con reactores aeróbicos para tratar aguas residuales*. Condorchem Enviro Solutions. <https://condorchem.com/es/blog/sistemas-con-reactores-aerobicos-para-tratar-aguas-residuales/#:~:text=SISTEMAS%20MEDIANTE%20REACTORES%20AER%20BICOS,las%20bacterias%20en%20condiciones%20aer%C3%B3bicas.>

Vásquez, N., & Chávez, H. 2010. Protocolo cultivo de microalgas. In *Fondo Nacional de Desarrollo Pesquero FONDEPES*. <https://rnia.produce.gob.pe/wp-content/uploads/2019/09/Protocolo-de-Cultivo-de-Microalgas.pdf>

Verdugo Castro, K. B. (2016). *Cultivo discontinuo de la microalga Coenochloris sp. con fracción soluble de papa (Solanum phureja) en condiciones mixotróficas* (Trabajo de titulación, Universidad Politécnica Salesiana). Quito, Ecuador.

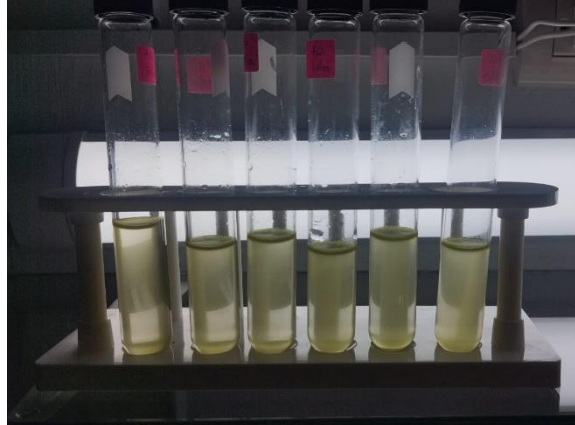
Wilcoxon, F. (1945). Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics bulletin*, 1(6), 80-83.

Wingerter, K. (13 de junio de 2017). *Tetraselmis: The Big and Fatty Alga*. AlgaeBarn. <https://www.algaebarn.com/blog/phytoplankton/tetraselmis-the-big-and-fatty-alga/>

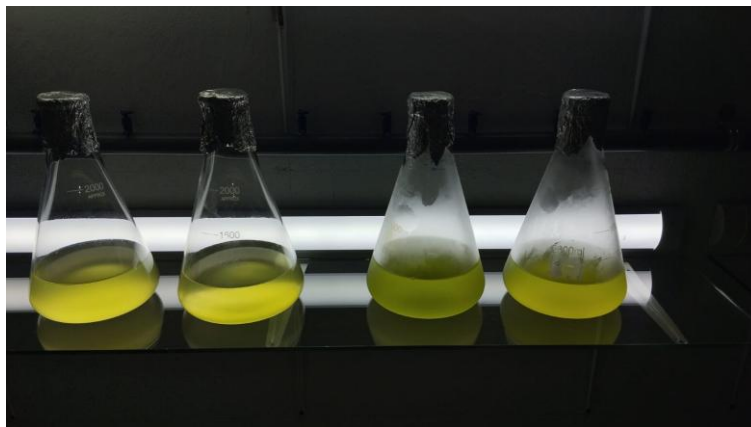
ANEXOS



Anexo 1 Cultivo de microalga en matraz Erlenmeyer de 100 mL



Anexo 2 Tubos de 10 mL con subcepa de microalgas



Anexo 3 Matraz erlenmeyer de 2000 mL de cultivos de microalgas



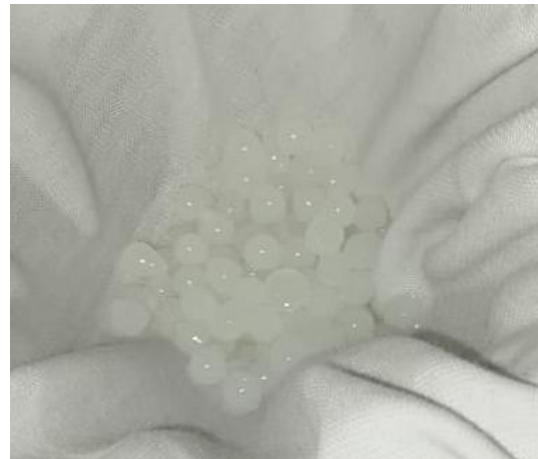
Anexo 4. Filtración del agua residual en las botellas.



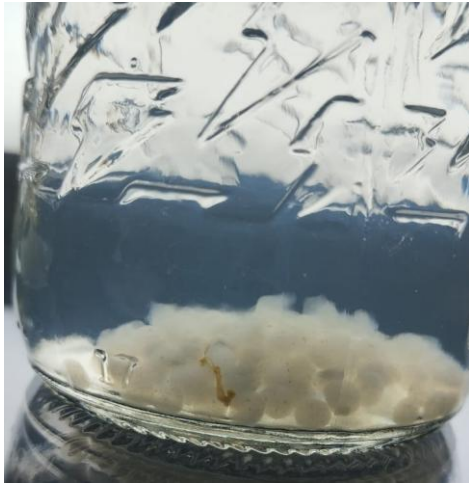
Anexo 5. Preparación de Alginato:Microalga con las tres distintas proporciones



Anexo 6. Formación de perlas de alginato al reaccionar con el cloruro de calcio



Anexo 7. Limpieza del exceso de cloruro de calcio en las perlas por medio de agua destilada.



Anexo 8. Perlas de alginato en botellas de 200mL (Día 1).



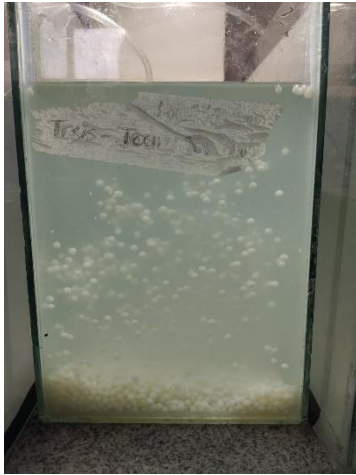
Anexo 9. Perlas de alginato en botellas de 200mL (Día 6).



Anexo 10. Perlas de alginato en botellas de 200mL (Día 10).



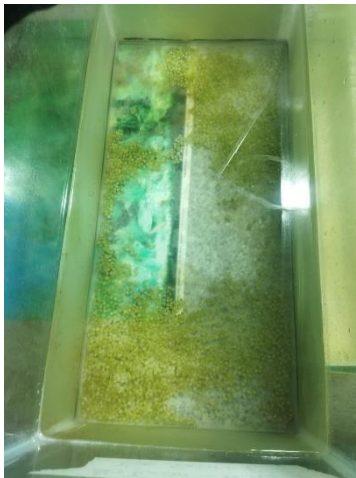
Anexo 11. Réplicas de diseño experimental en botellas



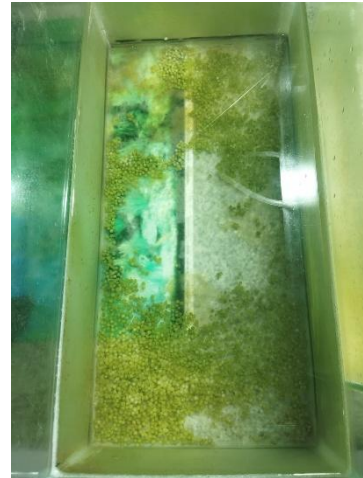
Anexo 12. Perlas de alginato en peceras (20000 mL) día 0



Anexo 13 Perlas de alginato un día después de colocarlas.



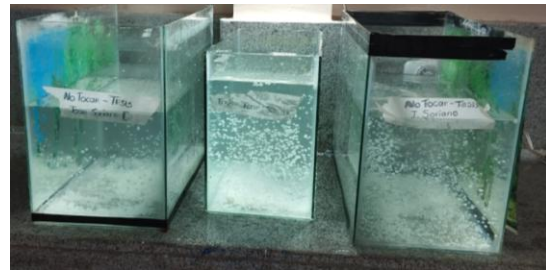
Anexo 14 Perlas de alginato en el agua residual, después del séptimo día



Anexo 15 Perlas e alginato en el agua residual, después del noveno día



Anexo 16. Filtración de 20000 mL de efluente para las peceras



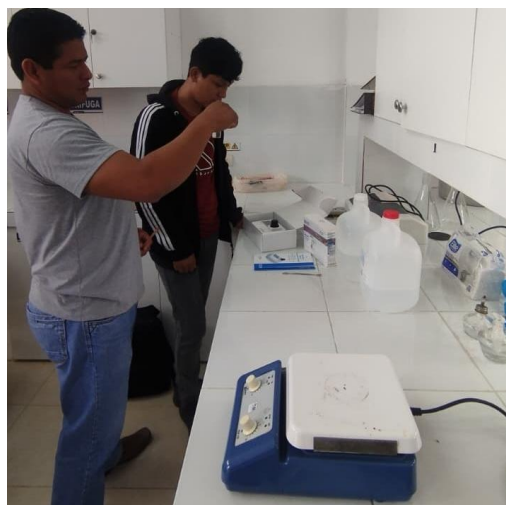
Anexo 17 Triplicado de los tratamientos en peceras



Anexo 18 Resultados de los análisis en el Fotometro



Anexo 19 Coloración de dos distintas muestras para analizar nitrato



Anexo 20 Verificación de datos por parte del tutor

Anexo 21

Tabla 19

Registro de parámetros fisicoquímicos del área de muestreo

Parámetro	Primer muestreo	Segundo muestreo	Tercer muestreo	Cuarto muestreo	Quinto muestreo	Sexto muestreo	Séptimo muestreo
pH	7,8	7,7	7,8	7,8	7,7	7,8	7,8
Salinidad	40	38	39	39	38	40	39
Temperatura	26,4	25,7	25,2	23	26,1	25,7	25,2
Nitrito (NO₂)	14,08	15,49	16,46	14,00	15,00	16,00	15,00
Nitrato (NO₃)	2,25	2,42	2,55	2,50	2,40	2,79	2,70
Fosfato (PO₄)	0,89	0,87	0,86	0,90	0,87	0,89	0,88

Anexo 22

Tabla 20

Registro de Fosfato en las botellas al inicio y final de los distintos tratamientos.

Muestreo	Replica	Tratamiento	Nutriente	Inicio	Final	Reducción Absoluta	Reducción Porcentual
M1	R1	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,87	0,21	0,66	75,8897819
M1	R2	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,87	0,20	0,67	76,7255217
M1	R3	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,90	0,20	0,70	78
M1	R1	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,90	0,24	0,66	73,3555556
M1	R2	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,88	0,23	0,65	73,6224954
M1	R3	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,90	0,23	0,67	74,8888889

M1	R1	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,90	0,34	0,56	62,1555556
M1	R2	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,89	0,33	0,55	62,4535316
M1	R3	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,90	0,30	0,60	66,7555556
M2	R1	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,86	0,19	0,67	77,7029381
M2	R2	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,88	0,21	0,68	76,7045455
M2	R3	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,88	0,22	0,66	74,8806547
M2	R1	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,86	0,24	0,63	72,3140974
M2	R2	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,86	0,26	0,59	69,255928
M2	R3	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,88	0,24	0,64	73,1136364

M2	R1	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,88	0,33	0,55	61,9659091
M2	R2	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,86	0,33	0,53	61,5690401
M2	R3	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,86	0,32	0,54	63,0498192
M3	R1	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,87	0,20	0,67	77,3563218
M3	R2	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,84	0,22	0,63	74,5200284
M3	R3	Tetraselmis 50:50	PO ₄	0,86	0,20	0,66	76,8625636
M3	R1	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,85	0,24	0,61	71,7641532
M3	R2	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,87	0,25	0,62	70,9310345
M3	R3	Tetraselmis 70:30	PO ₄	0,87	0,25	0,62	70,982965

M3	R1	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,87	0,33	0,54	62,1609195
M3	R2	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,87	0,34	0,52	60,1617562
M3	R3	Tetraselmis 90:10	PO ₄	0,87	0,36	0,51	59,0114943
M1	R1	Chlorella 50:50	PO ₄	0,89	0,13	0,76	85,8701766
M1	R2	Chlorella 50:50	PO ₄	0,90	0,10	0,80	88,5777778
M1	R3	Chlorella 50:50	PO ₄	0,90	0,11	0,79	87,5222222
M1	R1	Chlorella 70:30	PO ₄	0,88	0,14	0,74	84,3279357
M1	R2	Chlorella 70:30	PO ₄	0,90	0,17	0,73	80,8555556
M1	R3	Chlorella 70:30	PO ₄	0,90	0,17	0,73	81,4111111

M1	R1	Chlorella 90:10	PO4	0,90	0,22	0,68	76
M1	R2	Chlorella 90:10	PO4	0,89	0,25	0,64	71,4893141
M1	R3	Chlorella 90:10	PO4	0,90	0,22	0,68	75,11111111
M2	R1	Chlorella 50:50	PO4	0,88	0,13	0,75	84,8068182
M2	R2	Chlorella 50:50	PO4	0,88	0,16	0,72	81,7331813
M2	R3	Chlorella 50:50	PO4	0,88	0,09	0,79	89,3977273
M2	R1	Chlorella 70:30	PO4	0,88	0,16	0,72	82,1363636
M2	R2	Chlorella 70:30	PO4	0,88	0,21	0,67	75,9090909
M2	R3	Chlorella 70:30	PO4	0,88	0,18	0,70	79,8636364

M2	R1	Chlorella 90:10	PO4	0,86	0,27	0,59	68,7478321
M2	R2	Chlorella 90:10	PO4	0,88	0,29	0,59	67,2812109
M2	R3	Chlorella 90:10	PO4	0,87	0,23	0,64	73,1859019
M3	R1	Chlorella 50:50	PO4	0,87	0,14	0,73	84,3563218
M3	R2	Chlorella 50:50	PO4	0,87	0,15	0,72	83,2068966
M3	R3	Chlorella 50:50	PO4	0,87	0,13	0,74	85,4482759
M3	R1	Chlorella 70:30	PO4	0,87	0,22	0,64	74,3074792
M3	R2	Chlorella 70:30	PO4	0,87	0,18	0,69	79,3678161
M3	R3	Chlorella 70:30	PO4	0,87	0,18	0,69	79,4137931

M3	R1	Chlorella 90:10	PO4	0,84	0,25	0,59	70,0962338
M3	R2	Chlorella 90:10	PO4	0,87	0,34	0,52	60,1617562
M3	R3	Chlorella 90:10	PO4	0,86	0,33	0,53	62,0340168
M1	R1	Consorcio 50:50	PO4	0,90	0,16	0,74	82,5444444
M1	R2	Consorcio 50:50	PO4	0,88	0,15	0,73	82,5588001
M1	R3	Consorcio 50:50	PO4	0,90	0,15	0,75	83,5777778
M1	R1	Consorcio 70:30	PO4	0,90	0,19	0,71	78,7333333
M1	R2	Consorcio 70:30	PO4	0,90	0,24	0,66	72,9333333
M1	R3	Consorcio 70:30	PO4	0,90	0,19	0,71	79,0333333

M1	R1	Consorcio 90:10	PO4	0,90	0,26	0,64	70,9444444
M1	R2	Consorcio 90:10	PO4	0,90	0,31	0,59	65,9888889
M1	R3	Consorcio 90:10	PO4	0,89	0,29	0,61	67,7823799
M2	R1	Consorcio 50:50	PO4	0,88	0,12	0,75	85,877123
M2	R2	Consorcio 50:50	PO4	0,88	0,14	0,74	84,1414718
M2	R3	Consorcio 50:50	PO4	0,87	0,18	0,69	79,1188619
M2	R1	Consorcio 70:30	PO4	0,88	0,22	0,66	74,9545455
M2	R2	Consorcio 70:30	PO4	0,86	0,21	0,65	75,755814
M2	R3	Consorcio 70:30	PO4	0,87	0,22	0,66	75,194419

M2	R1	Consorcio 90:10	PO4	0,88	0,32	0,56	64,0568182
M2	R2	Consorcio 90:10	PO4	0,87	0,27	0,60	68,8191882
M2	R3	Consorcio 90:10	PO4	0,88	0,27	0,61	69,0568182
M3	R1	Consorcio 50:50	PO4	0,87	0,16	0,71	81,3563218
M3	R2	Consorcio 50:50	PO4	0,87	0,22	0,65	74,3563218
M3	R3	Consorcio 50:50	PO4	0,86	0,17	0,69	79,9051365
M3	R1	Consorcio 70:30	PO4	0,87	0,26	0,61	70,4022989
M3	R2	Consorcio 70:30	PO4	0,87	0,24	0,63	72,2873563
M3	R3	Consorcio 70:30	PO4	0,86	0,22	0,64	74,2263226

M3	R1	Consorcio 50:50	PO4	0,85	0,32	0,52	61,7094219
M3	R2	Consorcio 50:50	PO4	0,86	0,33	0,53	62,0340168
M3	R3	Consorcio 50:50	PO4	0,85	0,30	0,55	64,5210638
M1	R1	Control	PO4	0,90	0,86	0,04	4,130023377
M1	R2	Control	PO4	0,90	0,88	0,02	2,352023186
M1	R3	Control	PO4	0,89	0,87	0,03	2,918157424
M2	R1	Control	PO4	0,87	0,88	-0,01	-1,012192317
M2	R2	Control	PO4	0,87	0,87	0,00	0,011518083
M2	R3	Control	PO4	0,84	0,88	-0,04	-4,339577899
M3	R1	Control	PO4	0,86	0,85	0,01	0,697836706
M3	R2	Control	PO4	0,87	0,85	0,02	1,977011494

M3	R3	Control	PO4	0,87	0,87	0,00	0,528735632
----	----	---------	-----	------	------	------	-------------

Nota. M1: Primer muestreo, M2: Segundo muestreo, M3: Tercer muestreo, R1: Primera replica, R2: Segunda replica, R3: Tercera replica.

Anexo 23

Tabla 21

Registro de Nitrato en las botellas al inicio y final de los distintos tratamientos.

Muestreo	Replica	Tratamiento	Nutriente	Inicio	Final	Reducción Absoluta	Reducción Porcentual
M1	R1	Tetraselmis 50:50	NO3	2,31	0,60	1,70	73,8275997
M1	R2	Tetraselmis 50:50	NO3	2,31	0,64	1,67	72,2270252

M1	R3	Tetraselmis 50:50	NO3	2,19	0,65	1,54	70,3296703
M1	R1	Tetraselmis 70:30	NO3	2,33	0,67	1,66	71,0716126
M1	R2	Tetraselmis 70:30	NO3	2,22	0,83	1,39	62,5523672
M1	R3	Tetraselmis 70:30	NO3	2,25	0,76	1,49	66,3658992
M1	R1	Tetraselmis 90:10	NO3	2,29	1,04	1,24	54,4023094
M1	R2	Tetraselmis 90:10	NO3	2,23	1,02	1,22	54,484024
M1	R3	Tetraselmis 90:10	NO3	2,20	0,95	1,25	56,9909574
M2	R1	Tetraselmis 50:50	NO3	2,36	0,72	1,65	69,5968527
M2	R2	Tetraselmis 50:50	NO3	2,39	0,61	1,78	74,3959127

M2	R3	Tetraselmis 50:50	NO3	2,42	0,80	1,62	66,9734236
M2	R1	Tetraselmis 70:30	NO3	2,36	0,90	1,46	61,8137109
M2	R2	Tetraselmis 70:30	NO3	2,53	0,92	1,61	63,5982436
M2	R3	Tetraselmis 70:30	NO3	2,56	0,82	1,74	67,8406692
M2	R1	Tetraselmis 90:10	NO3	2,34	1,06	1,28	54,6948558
M2	R2	Tetraselmis 90:10	NO3	2,42	1,07	1,35	55,6753853
M2	R3	Tetraselmis 90:10	NO3	2,61	0,90	1,71	65,6960037
M3	R1	Tetraselmis 50:50	NO3	2,53	0,78	1,75	69,0892546
M3	R2	Tetraselmis 50:50	NO3	2,55	0,93	1,62	63,3987696

M3	R3	Tetraselmis 50:50	NO3	2,47	0,80	1,67	67,6590753
M3	R1	Tetraselmis 70:30	NO3	2,52	1,16	1,36	54,0535168
M3	R2	Tetraselmis 70:30	NO3	2,46	0,97	1,49	60,6446106
M3	R3	Tetraselmis 70:30	NO3	2,47	1,11	1,36	54,9420724
M3	R1	Tetraselmis 90:10	NO3	2,68	1,21	1,47	54,9443988
M3	R2	Tetraselmis 90:10	NO3	2,46	1,25	1,21	49,1654822
M3	R3	Tetraselmis 90:10	NO3	2,54	1,17	1,38	54,1931934
M1	R1	Chlorella 50:50	NO3	2,31	0,82	1,49	64,630448
M1	R2	Chlorella 50:50	NO3	2,18	0,70	1,48	67,8795944

M1	R3	Chlorella 50:50	NO3	2,23	0,69	1,54	69,2252511
M1	R1	Chlorella 70:30	NO3	2,15	0,86	1,29	60,1164687
M1	R2	Chlorella 70:30	NO3	2,24	0,79	1,46	64,8778748
M1	R3	Chlorella 70:30	NO3	2,37	0,87	1,50	63,4254377
M1	R1	Chlorella 90:10	NO3	2,26	1,09	1,17	51,8294032
M1	R2	Chlorella 90:10	NO3	2,19	1,22	0,98	44,4322945
M1	R3	Chlorella 90:10	NO3	2,16	1,01	1,15	53,1239883
M2	R1	Chlorella 50:50	NO3	2,57	0,88	1,69	65,8803379
M2	R2	Chlorella 50:50	NO3	2,37	0,80	1,58	66,4701423

M2	R3	Chlorella 50:50	NO3	2,46	0,81	1,64	66,8960182
M2	R1	Chlorella 70:30	NO3	2,36	1,04	1,32	56,0897028
M2	R2	Chlorella 70:30	NO3	2,34	0,92	1,42	60,5995809
M2	R3	Chlorella 70:30	NO3	2,34	0,98	1,36	58,2599025
M2	R1	Chlorella 90:10	NO3	2,44	1,20	1,24	50,8889071
M2	R2	Chlorella 90:10	NO3	2,56	1,24	1,32	51,5531591
M2	R3	Chlorella 90:10	NO3	2,49	1,22	1,27	50,8910653
M3	R1	Chlorella 50:50	NO3	2,49	0,87	1,62	65,0108512
M3	R2	Chlorella 50:50	NO3	2,68	0,86	1,82	67,8720861

M3	R3	Chlorella 50:50	NO3	2,57	1,11	1,46	56,8780184
M3	R1	Chlorella 70:30	NO3	2,46	0,97	1,49	60,5785662
M3	R2	Chlorella 70:30	NO3	2,63	1,12	1,51	57,3641346
M3	R3	Chlorella 70:30	NO3	2,58	1,01	1,57	60,9948861
M3	R1	Chlorella 90:10	NO3	2,54	1,30	1,24	48,8909863
M3	R2	Chlorella 90:10	NO3	2,39	1,37	1,02	42,5771128
M3	R3	Chlorella 90:10	NO3	2,61	1,32	1,29	49,4045568
M1	R1	Consorcio 50:50	NO3	2,22	0,47	1,76	79,0141225
M1	R2	Consorcio 50:50	NO3	2,26	0,49	1,77	78,2957416

M1	R3	Consorcio 50:50	NO3	2,28	0,55	1,73	76,0045572
M1	R1	Consorcio 70:30	NO3	2,23	0,57	1,66	74,5398361
M1	R2	Consorcio 70:30	NO3	2,27	0,64	1,64	71,9034428
M1	R3	Consorcio 70:30	NO3	2,22	0,60	1,62	73,0661612
M1	R1	Consorcio 90:10	NO3	2,13	0,78	1,35	63,4992246
M1	R2	Consorcio 90:10	NO3	2,29	0,86	1,43	62,3319951
M1	R3	Consorcio 90:10	NO3	2,41	0,75	1,67	69,0988902
M2	R1	Consorcio 50:50	NO3	2,33	0,48	1,85	79,2826805
M2	R2	Consorcio 50:50	NO3	2,37	0,49	1,88	79,477549

M2	R3	Consorcio 50:50	NO3	2,32	0,51	1,81	78,1422414
M2	R1	Consorcio 70:30	NO3	2,45	0,80	1,65	67,2433491
M2	R2	Consorcio 70:30	NO3	2,34	0,70	1,64	70,186521
M2	R3	Consorcio 70:30	NO3	2,42	0,54	1,88	77,7828316
M2	R1	Consorcio 90:10	NO3	2,30	0,93	1,37	59,4262117
M2	R2	Consorcio 90:10	NO3	2,40	0,88	1,53	63,5996839
M2	R3	Consorcio 90:10	NO3	2,53	1,06	1,47	58,0935038
M3	R1	Consorcio 50:50	NO3	2,52	0,65	1,86	74,0926257
M3	R2	Consorcio 50:50	NO3	2,60	0,60	2,01	77,084454

M3	R3	Consorcio 50:50	NO3	2,40	0,55	1,86	77,1617519
M3	R1	Consorcio 70:30	NO3	2,54	0,83	1,71	67,2013558
M3	R2	Consorcio 70:30	NO3	2,67	0,78	1,88	70,6645665
M3	R3	Consorcio 70:30	NO3	2,54	0,74	1,80	70,7199937
M3	R1	Consorcio 90:10	NO3	2,68	1,08	1,60	59,8185958
M3	R2	Consorcio 90:10	NO3	2,76	1,14	1,62	58,8580538
M3	R3	Consorcio 90:10	NO3	2,40	0,88	1,52	63,4817409
M1	R1	Control	NO3	2,30	2,30	-0,0025	-0,108714559
M1	R2	Control	NO3	2,23	2,28	-0,0531	-2,383517371
M1	R3	Control	NO3	2,21	2,19	0,0209	0,947459087

M2	R1	Control	NO3	2,46	2,29	0,1734	7,042196321
M2	R2	Control	NO3	2,22	2,51	-0,2935	-13,23025604
M2	R3	Control	NO3	2,55	2,42	0,1295	5,083614666
M3	R1	Control	NO3	2,53	2,44	0,0901	3,565633781
M3	R2	Control	NO3	2,46	2,57	-0,111	-4,514580876
M3	R3	Control	NO3	2,68	2,39	0,2902	10,81866985

Nota. M1: Primer muestreo, M2: Segundo muestreo, M3: Tercer muestreo, R1: Primera replica, R2: Segunda replica, R3: Tercera replica.

Anexo 24

Tabla 22

Registro de Nitrito en las botellas al inicio y final de los distintos tratamientos.

Muestreo	Replica	Tratamiento	Nutriente	Inicio	Final	Reducción Absoluta	Reducción Porcentual
M1	R1	Tetraselmis 50:50	NO2	15,05	1,38	13,67	90,8305648
M1	R2	Tetraselmis 50:50	NO2	14,78	1,19	13,59	91,9485792
M1	R3	Tetraselmis 50:50	NO2	13,59	3,07	10,52	77,4098602
M1	R1	Tetraselmis 70:30	NO2	13,13	2,73	10,40	79,2079208
M1	R2	Tetraselmis 70:30	NO2	14,16	0,69	13,47	95,1271186

M1	R3	Tetraselmis 70:30	NO2	13,56	2,34	11,22	82,7433628
M1	R1	Tetraselmis 90:10	NO2	13,26	0,86	12,40	93,5143288
M1	R2	Tetraselmis 90:10	NO2	15,54	2,80	12,74	81,981982
M1	R3	Tetraselmis 90:10	NO2	13,49	1,39	12,10	89,6960712
M2	R1	Tetraselmis 50:50	NO2	14,82	2,19	12,63	85,2226721
M2	R2	Tetraselmis 50:50	NO2	14,16	0,00	14,16	100
M2	R3	Tetraselmis 50:50	NO2	15,57	0,00	15,57	100
M2	R1	Tetraselmis 70:30	NO2	15,62	1,81	13,81	88,4122919
M2	R2	Tetraselmis 70:30	NO2	16,15	0,98	15,17	93,9318885

M2	R3	Tetraselmis 70:30	NO2	15,29	2,97	12,32	80,5755396
M2	R1	Tetraselmis 90:10	NO2	14,15	1,34	12,81	90,5300353
M2	R2	Tetraselmis 90:10	NO2	15,70	2,73	12,97	82,611465
M2	R3	Tetraselmis 90:10	NO2	15,16	3,05	12,11	79,8812665
M3	R1	Tetraselmis 50:50	NO2	18,00	0,00	18,00	100
M3	R2	Tetraselmis 50:50	NO2	17,44	2,63	14,81	84,9197248
M3	R3	Tetraselmis 50:50	NO2	16,01	0,43	15,58	97,3141786
M3	R1	Tetraselmis 70:30	NO2	16,63	1,99	14,64	88,0336741
M3	R2	Tetraselmis 70:30	NO2	16,57	3,13	13,44	81,1104406

M3	R3	Tetraselmis 70:30	NO2	16,47	1,16	15,31	92,9568913
M3	R1	Tetraselmis 90:10	NO2	17,24	2,36	14,88	86,3109049
M3	R2	Tetraselmis 90:10	NO2	16,73	2,88	13,85	82,7854154
M3	R3	Tetraselmis 90:10	NO2	17,24	3,55	13,69	79,4083527
M1	R1	Chlorella 50:50	NO2	14,47	0,94	13,53	93,503801
M1	R2	Chlorella 50:50	NO2	13,69	0,19	13,50	98,6121256
M1	R3	Chlorella 50:50	NO2	13,36	1,13	12,23	91,5419162
M1	R1	Chlorella 70:30	NO2	13,67	1,70	11,97	87,5640088
M1	R2	Chlorella 70:30	NO2	15,66	2,09	13,57	86,6538953

M1	R3	Chlorella 70:30	NO2	14,29	1,06	13,23	92,5822253
M1	R1	Chlorella 90:10	NO2	12,25	1,19	11,06	90,2857143
M1	R2	Chlorella 90:10	NO2	13,59	1,71	11,88	87,4172185
M1	R3	Chlorella 90:10	NO2	15,04	2,22	12,82	85,2393617
M2	R1	Chlorella 50:50	NO2	15,19	0,29	14,90	98,0908492
M2	R2	Chlorella 50:50	NO2	15,60	0,98	14,62	93,7179487
M2	R3	Chlorella 50:50	NO2	15,36	1,93	13,43	87,4348958
M2	R1	Chlorella 70:30	NO2	15,71	2,08	13,63	86,7600255
M2	R2	Chlorella 70:30	NO2	17,60	1,56	16,04	91,1363636

M2	R3	Chlorella 70:30	NO2	16,59	1,25	15,34	92,4653406
M2	R1	Chlorella 90:10	NO2	14,78	3,67	11,11	75,1691475
M2	R2	Chlorella 90:10	NO2	16,81	3,13	13,68	81,3801309
M2	R3	Chlorella 90:10	NO2	14,69	1,78	12,91	87,8829135
M3	R1	Chlorella 50:50	NO2	16,16	0,00	16,16	100
M3	R2	Chlorella 50:50	NO2	14,62	0,98	13,64	93,2968536
M3	R3	Chlorella 50:50	NO2	18,10	2,70	15,40	85,0828729
M3	R1	Chlorella 70:30	NO2	14,91	2,32	12,59	84,4399732
M3	R2	Chlorella 70:30	NO2	17,33	0,22	17,11	98,7305251

M3	R3	Chlorella 70:30	NO2	17,69	2,99	14,70	83,0977954
M3	R1	Chlorella 90:10	NO2	15,60	3,66	11,94	76,5384615
M3	R2	Chlorella 90:10	NO2	15,42	2,10	13,32	86,381323
M3	R3	Chlorella 90:10	NO2	16,00	2,61	13,39	83,6875
M1	R1	Consorcio 50:50	NO2	13,80	1,32	12,48	90,4347826
M1	R2	Consorcio 50:50	NO2	15,18	0,00	15,18	100
M1	R3	Consorcio 50:50	NO2	13,98	1,73	12,25	87,6251788
M1	R1	Consorcio 70:30	NO2	13,58	1,11	12,47	91,826215
M1	R2	Consorcio 70:30	NO2	14,45	0,84	13,61	94,1868512

M1	R3	Consorcio 70:30	NO2	14,88	0,72	14,16	95,1612903
M1	R1	Consorcio 90:10	NO2	14,78	1,61	13,17	89,1069012
M1	R2	Consorcio 90:10	NO2	12,75	0,26	12,49	97,9607843
M1	R3	Consorcio 90:10	NO2	14,31	2,30	12,01	83,9273235
M2	R1	Consorcio 50:50	NO2	15,42	1,69	13,73	89,0402075
M2	R2	Consorcio 50:50	NO2	15,35	3,04	12,31	80,1954397
M2	R3	Consorcio 50:50	NO2	15,48	0,24	15,24	98,4496124
M2	R1	Consorcio 70:30	NO2	15,71	2,28	13,43	85,486951
M2	R2	Consorcio 70:30	NO2	16,39	2,79	13,60	82,9774253

M2	R3	Consorcio 70:30	NO2	15,74	0,42	15,32	97,3316391
M2	R1	Consorcio 90:10	NO2	13,14	0,94	12,20	92,8462709
M2	R2	Consorcio 90:10	NO2	14,10	2,98	11,12	78,8652482
M2	R3	Consorcio 90:10	NO2	17,84	2,37	15,47	86,7152466
M3	R1	Consorcio 50:50	NO2	17,28	1,09	16,19	93,6921296
M3	R2	Consorcio 50:50	NO2	17,16	2,17	14,99	87,3543124
M3	R3	Consorcio 50:50	NO2	15,91	1,51	14,40	90,5091138
M3	R1	Consorcio 70:30	NO2	16,63	1,57	15,06	90,5592303
M3	R2	Consorcio 70:30	NO2	17,29	0,31	16,98	98,2070561

M3	R3	Consortio 70:30	NO2	15,55	0,52	15,03	96,6559486
M3	R1	Consortio 90:10	NO2	14,80	3,81	10,99	74,2567568
M3	R2	Consortio 90:10	NO2	15,36	2,35	13,01	84,7005208
M3	R3	Consortio 90:10	NO2	16,23	2,73	13,50	83,1792976
M1	R1	Control	NO2	12,79	12,56	0,23	1,798279906
M1	R2	Control	NO2	15,33	12,77	2,56	16,69928245
M1	R3	Control	NO2	13,94	11,47	2,47	17,71879484
M2	R1	Control	NO2	15,96	13,09	2,87	17,98245614
M2	R2	Control	NO2	16,93	14,06	2,87	16,95215594
M2	R3	Control	NO2	14,22	14,09	0,13	0,914205345
M3	R1	Control	NO2	17,24	15,71	1,53	8,874709977

M3	R2	Control	NO2	17,12	16,53	0,59	3,446261682
M3	R3	Control	NO2	16,92	17,26	-0,34	-2,009456265

Nota. M1: Primer muestreo, M2: Segundo muestreo, M3: Tercer muestreo, R1: Primera replica, R2: Segunda replica, R3: Tercera replica.

Anexo 25

Tabla 23

Registro de Fosfato, Nitrato y Nitrito, a lo largo de los diez días de tratamiento.

M1									
Dia	Replica 1			Replica 2			Replica 3		
	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)
0	0,9	2,48	14,2	0,89	2,51	13,8	0,9	2,51	14
2	0,66	1,88	8	0,63	1,92	7,6	0,65	1,9	7,8
4	0,49	1,5	4,3	0,48	1,55	4	0,5	1,52	4,5
6	0,36	1,18	3,1	0,35	1,21	2,9	0,37	1,16	3,3

8	0,28	0,95	2,2	0,27	0,98	2	0,29	0,93	2,4
10	0,23	0,78	1,9	0,22	0,79	1,7	0,24	0,76	2
M2									
	Replica 1			Replica 2			Replica 3		
Dia	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)
0	0,87	2,41	14,8	0,88	2,39	15,3	0,86	2,4	14,9
2	0,61	1,81	8,4	0,62	1,79	8,8	0,6	1,8	8,5
4	0,46	1,46	4,7	0,48	1,43	5,1	0,45	1,45	4,8
6	0,35	1,16	3,4	0,36	1,14	3,7	0,34	1,17	3,5
8	0,27	0,91	2,4	0,28	0,89	2,6	0,26	0,92	2,3
10	0,21	0,71	2	0,23	0,73	2,2	0,2	0,7	1,9
M3									
	Replica 1			Replica 2			Replica 3		
Dia	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)
0	0,87	2,8	16,3	0,9	2,79	15,8	0,89	2,79	15,9
2	0,63	2,13	9,3	0,65	2,1	8,9	0,64	2,11	9
4	0,48	1,71	5,2	0,5	1,68	4,9	0,49	1,69	5
6	0,36	1,36	4,1	0,38	1,33	3,8	0,37	1,34	3,9

8	0,28	1,06	2,9	0,29	1,04	2,6	0,28	1,05	2,7
10	0,22	0,86	2,5	0,23	0,84	2,3	0,23	0,84	2,3
M4									
	Replica 1			Replica 2			Replica 3		
Dia	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)	PO4 (ppm)	NO3 (ppm)	NO2 (ppb)
0	0,89	2,68	14,8	0,87	2,71	15,2	0,88	2,7	15
2	0,62	2,06	8,5	0,64	2,03	8,1	0,63	2,05	8,3
4	0,48	1,61	4,8	0,5	1,58	4,4	0,49	1,6	4,6
6	0,36	1,31	3,5	0,38	1,28	3,2	0,37	1,3	3,4
8	0,27	1,01	2,4	0,29	0,98	2,1	0,23	1	2,3
10	0,23	0,81	2,1	0,21	0,78	1,8	0,22	0,8	2

Nota. M1: Primer muestreo, M2: Segundo muestreo, M3: Tercer muestreo, M4: Cuarto muestreo.