



Efecto de lixiviado sobre el crecimiento de consorcios de microalgas marinas y dulceacuícolas

Martha J. Torres-Virviescas¹ ; Alejandro Henao-Castro^{1*} ;
Johana P. Coulson-Reinel² ; Lesly Tejeda-Benitez³ .

¹Universidad del Sinú, Facultad de Ciencias Naturales y Biotecnologías, Programa de Biología Marina, Cartagena, Colombia.

²Universidad de Cartagena, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Programa de Biología, Cartagena, Colombia.

³Universidad de Cartagena, Facultad de Ingeniería, Programa de Ingeniería Química, Grupo de Investigación en Diseño de Procesos y Aprovechamiento de Biommasas, Cartagena, Colombia.

*Correspondencia: hernanhenao@unisinu.edu.co

Recibido: Marzo 2023; Aceptado: Julio 2023; Publicado: Agosto 2023.

RESUMEN

Objetivo. En este estudio se evaluó la cinética de crecimiento de consorcios de microalgas marinas y de agua dulce en diferentes concentraciones de lixiviado extraído de un relleno sanitario.

Materiales y métodos. Se realizó un diseño experimental por cada consorcio (marino *Chlorella marina* y *Nannochloropsis oculata* y de agua dulce *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus falcatus*) en concentraciones de lixiviado de 5, 10, 15% y un control (0%), con una inóculo principal y tres réplicas para cada concentración (K=4), en cultivo discontinuo. **Resultados.** Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento microalgal a distintas concentraciones de lixiviado para los dos consorcios utilizados ($H=12.9768$; $p<0.05$ para microalgas marinas y $H=20.0097$; $p<0.05$ para microalgas dulceacuícolas), debido principalmente a un mayor crecimiento en el grupo control. También se encontró una correlación negativa significativa ($p<0.01$) entre la tasa de crecimiento y la división celular con la concentración de lixiviado, observándose un menor crecimiento en concentraciones superiores al 5% en ambos consorcios. **Conclusiones.** El consorcio marino logró generar mayor densidad celular, por lo que podría incrementar la efectividad de los procesos de biorremediación de contaminantes, a pesar del efecto negativo observado en mayores cantidades del compuesto.

Palabras clave: Algas dulceacuícolas; algas marinas; bioprospección; contaminación; recursos hidrobiológicos (Fuentes: *Tesoro ambiental marino-costero*, *Tesoro ambiental para Colombia*).

ABSTRACT

Objective. This study evaluated the growth kinetics of marine and freshwater microalgae consortia in different concentrations of leachate extracted from a landfill. **Materials and methods.** An experimental design was carried out for each consortium (marine *Chlorella marina* and *Nannochloropsis oculata* and freshwater *Chlorella vulgaris* and *Ankistrodesmus falcatus*) in leachate concentrations of 5, 10, 15% and a control (0%), with one main experiment and three replicates for each concentration

Como citar (Vancouver).

Torres Virviescas MJ, Henao-Castro A, Coulson Reinel JP, Tejeda-Benitez L. Efecto de lixiviado sobre el crecimiento de consorcios de microalgas marinas y dulceacuícolas. Rev MVZ Córdoba. 2023; 28(3):e3202. <https://doi.org/10.21897/rmvz.3202>

©El (los) autor (es) 2023. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

(K=4), in batch culture. **Results.** Significant differences were found in the microalgal growth at different concentrations of leachate for both consortia ($H=12.9768$; $p<0.05$ for marine microalgae and $H=20.0097$; $p<0.05$ for freshwater microalgae), attributed to a higher growth in the control sample. A significant negative correlation ($p<0.01$) was also found between leachate concentration and both growth rate and cell division. A lower growth was observed at concentrations above 5% in both consortia. **Conclusions.** The marine consortium was able to generate a higher cell density, which may increase the effectiveness of the pollutant bioremediation process, despite the negative effect observed at higher amounts of the compound.

Keywords: Freshwater algae; marine algae; bioprospection; contamination; hydrobiological resources (*Sources: Tesauro ambiental marino-costero, Tesauro ambiental para Colombia*).

INTRODUCCIÓN

Los lixiviados son líquidos que provienen principalmente de rellenos sanitarios, caracterizados por su fuerte olor y coloración oscura, y pueden contener diferentes elementos como metales pesados, contaminantes orgánicos, sales inorgánicas, compuestos de azufre, compuestos nitrogenados, compuestos oxigenados, hidrocarburos aromáticos, compuestos halogenados y terpenos, que son los principales contaminantes del aire debido a su mal olor y propiedades peligrosas (1,2). El aumento en las actividades antropogénicas ha contribuido con un incremento en la generación de residuos sólidos, relacionado directamente con mayor producción de lixiviado, los cuales, debido a los contaminantes que los constituyen, resultan difíciles de tratar o purificar, y al ser descargados en los cuerpos de agua, se convierten en un problema para los ecosistemas y la salud humana (2,3,4).

Por su parte, las microalgas son microrganismos fotosintéticos acuáticos, caracterizados por su gran diversidad metabólica, al ser capaces de producir diferentes compuestos como proteínas, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y sustancias específicas como ácidos grasos, entre otros (5,6). Asimismo, estos organismos son empleados para la eliminación de una gran variedad de sustancias tóxicas como plaguicidas, metales pesados e hidrocarburos, entre otros, debido a su capacidad de almacenar altas concentraciones de compuestos venenosos, sin afectar su actividad biológica (7,8), gracias a sus propiedades de bioadsorción, bioacumulación y biodegradación (9). Incluso, en algunos estudios se han utilizado algunas especies como son *Chlorella sp.*, *Nannochloropsis sp.*, *Ankistrodesmus sp.*, entre otras, en tratamientos de aguas residuales, así como procesos de remediación en lixiviados de rellenos sanitarios, para la eliminación de nutrientes nocivos (p.

ej. nitritos y nitratos), metales pesados y contaminantes orgánicos, mediante diferentes ensayos (1,2,3,6,7,8,9,10,11,12).

Los cultivos microalgaes son una herramienta efectiva en ensayos de fitorremediación y bioprospección, dado que el crecimiento de las microalgas está estrechamente relacionado con las condiciones lumínicas, concentraciones de oxígeno, disponibilidad de nutrientes, pH, entre otras (13,14), permitiendo la exploración de los efectos de diversos compuestos y condiciones ambientales (14).

Por todo lo anterior, el presente estudio evaluó la cinética de crecimiento de dos consorcios de microalgas marinas y de agua dulce, en tres concentraciones de lixiviados del relleno sanitario regional La Paz, del municipio de Turbana, partiendo de la hipótesis que las microalgas pueden ser cultivadas empleando lixiviados como nutriente esencial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización del Lixiviado. La muestra de lixiviado fue tomada directamente de una poza de recolección del Relleno Sanitario Regional "La Paz", ubicado en las coordenadas 10.23746 N y -75.46976 O, en el norte del Departamento de Bolívar, a una distancia adecuada de los cascos urbanos de Cartagena (17 Km), Turbana (8 Km), Turbaco (12 Km) y Arjona (20 Km). El lixiviado fue entregado por la empresa Ingeambiente S.A.S. y su caracterización fue realizada por el Laboratorio Microbiológico Barranquilla S.A.S.

Obtención y cultivo de microalgas. Las microalgas se obtuvieron a partir del banco de cepas monoalgaes del laboratorio de Biotecnología Microalgal de la Universidad del Sinú. Las cepas se cultivaron bajo condiciones controladas y siguiendo el sistema de

escalamiento tipo batch, donde el crecimiento se presentó en cinco fases de desarrollo: inducción o adaptación, exponencial, declinamiento relativo del crecimiento, estacionaria y muerte, partiendo desde tubos de ensayo. Una vez alcanzada su fase logarítmica, se transfirieron a Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL y 1000 mL, hasta llegar a un volumen de 2 L en fotobiorreactores (15).

Preparación de los ensayos. El consorcio de agua de mar se conformó a partir de las especies *Chlorella marina* y *Nannochloropsis oculata* y el consorcio de agua dulce por *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus falcatus*, las cuales fueron elegidas por su capacidad de adaptación, generación de biomasa aprovechable, disponibilidad y resistencia, de acuerdo con los trabajos de (3,16,17,18).

Se establecieron cuatro tratamientos para cada consorcio, tres de ellos enriquecidos con diferentes concentraciones de lixiviados (5%, 10% y 15%), y un tratamiento control (0% de lixiviado), cada uno contemplando una muestra original y tres réplicas ($K=4$) (19). Estos fueron preparados empleando un medio de cultivo Conway modificado, el cual contiene principalmente sales para el suministro de nitrógeno y fósforo (15,20), usando frascos de borosilicato de 500 mL como fotobiorreactores, con un volumen de 400 mL de cada consorcio de microalgas, aireación constante por 24 horas (proporcionada por un compresor de membrana ActiveAQUA para 110L), un fotoperiodo de 12:12 horas (luz: oscuridad), una intensidad de luz de 5000 lux (proporcionada por cuatro lámparas fluorescentes T8 36W/865) y una temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (20). Para el consorcio marino, el agua utilizada en el cultivo se obtuvo directamente del mar, mientras que para el de agua dulce, se utilizó agua potable de acueducto. Ambas muestras de agua fueron filtradas con una membrana de 0.1 μm , y esterilizadas.

Los experimentos iniciaron con una densidad celular aproximada de 762000 cel/mL para el consorcio de agua de mar y 727500 cel/mL para el consorcio de agua dulce, en una relación aproximada de 50:50 por cepa. No se evaluó recambio del cultivo.

Determinación del crecimiento celular. Para obtener la curva de crecimiento, se realizó la cuantificación celular a través de una cámara de Neubauer WILDCO (0.1 mm) (21) y con

un espectrofotómetro Fisher Scientific Modelo EVOLUTION 60S PC a 680 nm. La densidad de células por mililitro (cel/mL) se calculó de acuerdo con la ecuación 1 (20):

$$\text{cel/mL} = (\sum(\text{cuatro cuadrantes de cámara Neubauer})/4) * 10000 \quad (\text{ecuación 1})$$

Asimismo, se obtuvo la tasa específica de crecimiento poblacional, divisiones por día y tiempo de generación, utilizando las ecuaciones 2, 3 y 4, respectivamente, en la fase exponencial de la curva de crecimiento de cada consorcio (20):

$$\mu = (\ln(N_f/N_0)) / ((T_f - T_0)(\text{días}^{-1})) \quad (\text{ecuación 2})$$

$$\text{Div/días} = \mu / \ln(2) \quad (\text{ecuación 3})$$

$$\text{TG} = 1 / (\text{Div/días}) \quad (\text{ecuación 4})$$

Dónde: μ (tasa de crecimiento); T_0 (tiempo inicial); T_f (tiempo final); N_f (densidad celular en T_f); N_0 (densidad celular en T_0) y TG (tiempo de generación).

Análisis de datos. Los datos de crecimiento celular diario fueron analizados inicialmente utilizando estadística básica descriptiva (22). Adicionalmente, se aplicó la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis de una vía, una vez se probaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad (Tests Shapiro-Wilks y Levene, respectivamente; $p < 0.05$) (22,23), para determinar si existían diferencias significativas entre las densidades de cada consorcio. Posteriormente, para conocer cuáles muestras eran diferentes, se ejecutó una prueba *post hoc* de Dunn (24). Finalmente, para determinar posibles asociaciones entre la concentración de lixiviados y el crecimiento microalgal de cada consorcio, se aplicó la prueba no paramétrica de correlaciones de rangos de Spearman (25). Se utilizó el programa estadístico Past 4.10 (26) para la evaluación de dichos análisis.

RESULTADOS

Caracterización del lixiviado. A continuación, se muestra la tabla con los resultados obtenidos en el laboratorio correspondientes a la caracterización de parámetros fisicoquímicos de las muestras de aguas de la laguna de lixiviados recolectadas del relleno sanitario "La paz" (Tabla 1). Adicionalmente, se logró medir en campo un pH de 8.05.

Tabla 1. Caracterización fisicoquímica de la muestra de lixiviados. LCM= Límite de cuantificación del método

Parámetro	Unidades	LCM	Valor
Cianuro total	mg CN/L	-	0.035
Cloruros	mg Cl/L	-	913.72
Demandas biológicas de oxígeno DBO5	mg O ₂ /L	-	73.22
Demandas químicas de oxígeno DQO	mg O ₂ /L	-	369.8
Surfactantes aniónicos SAAM	mg SAAM/L	-	1.026
Fenoles	mg/L	0.1	<0.1
Fosforo reactivo Total (Leído como Ortofosfato)	PO ₄ ³⁻ /L	0.46	<0.46
Hierro	mg Fe/L	-	0.97
Magnesio	mg Mg/L	-	23.57
Mercurio	mg Hg/L	-	0.0016
Nitratos	mg NO ₃ -N/L	-	12.45
Nitritos	mg NO ₂ -N/L	-	5.092
Nitrógeno amoniacal	mg NH ₃ -N/L	-	235.78
Sodio	mg Na/L	-	503.92
Sulfatos	mg SO ₄ ²⁻ /L	-	10.76
Sulfuros	mg S ²⁻ /L	1	<1.0
Zinc	mg Zn/L	-	0.18

Determinación del crecimiento celular del consorcio de agua de mar. Los ensayos del consorcio de agua de mar, compuesto por *Chlorella marina* y *Nannochloropsis oculata*, iniciaron con una concentración de 762000 cel/mL, y presentaron un periodo de adaptación de ~2 días, teniendo una duración de 9 días desde la fase de inducción hasta la fase muerte (Figura 1) y alcanzando la densidad celular máxima al cuarto día del estudio.

Analizando el crecimiento celular, se observó que los tratamientos alcanzaron densidades superiores a 2000000 cel/L al tercer día, a excepción del tratamiento al 15%, cuya densidad celular máxima fue inferior. En los tratamientos con lixiviados, se evidenció la mayor densidad celular en el tratamiento al 5% (3257500±177500 cel/mL), mientras que los ensayos con 15% de lixiviado presentaron las menores densidades (1995000±123000 cel/mL). Asimismo, el grupo alcanzó una densidad celular máxima de 7472500±555000 cel/mL al cuarto día del ensayo.

A partir del séptimo día, la densidad se mantuvo constante en los tratamientos al 5% y 10%, mientras que para el grupo control y el tratamiento al 15%, la densidad celular continuó disminuyendo hasta el día nueve (Figura 1).

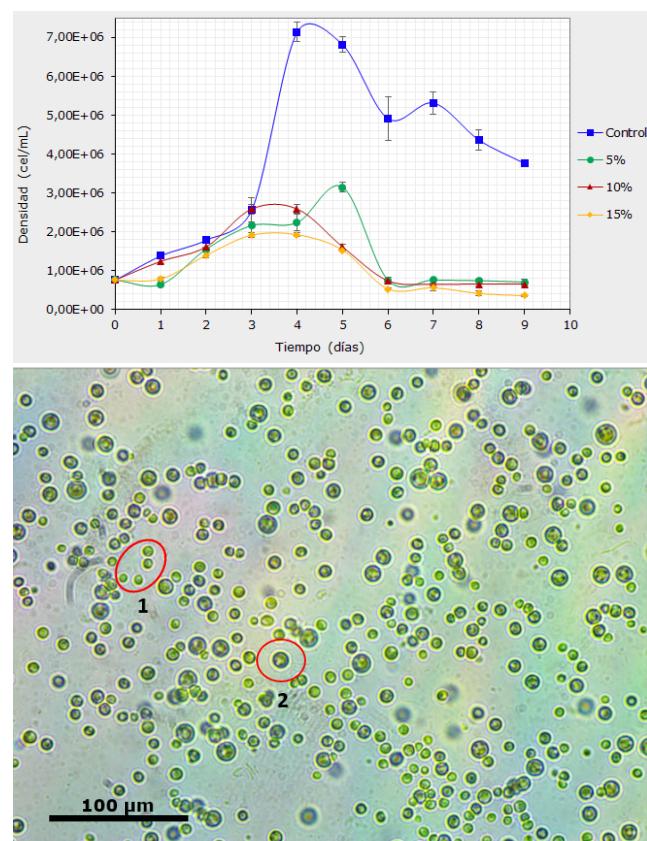


Figura 1. (a) Curvas de crecimiento poblacional del consorcio de agua de mar expuesto a concentraciones de lixiviados de 5%, 10% y 15% (A, B, C y D, corresponden a las réplicas de los diferentes experimentos). (b) Micrografía de las microalgas que conforman el consorcio (1-*Chlorella marina* y 2-*Nannochloropsis oculata*). Aumento de 10x

Adicionalmente, la prueba de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en las tasas de crecimiento microalgal entre los cuatro tratamientos ($H=12.9768$; $p=0.0046$). Dichas diferencias estuvieron ocasionadas principalmente por la prevalencia del grupo control con respecto a los demás tratamientos (PostHoc Dunn $p<0.05$) y al experimento con lixiviado al 15% (PostHoc Dunn $p<0.01$) (Tabla 2), el cual presentó los valores de densidad más bajos del estudio.

Tabla 2. Comparaciones de prueba post hoc de Dunn (Valor p) entre el grupo control y tratamientos de concentraciones de lixiviados del consorcio de agua marina.

Lixiviado (%)	Control	5%	10%	15%
Control	-			
5	0.0115*	-		
10	0.0082*	0.909	-	
15	0.0007*	0.4	0.467	-

*Diferencias significativas

El grupo control presentó la mayor tasa de crecimiento, mayor división por día y por ende menor tiempo de generación, entre todos los tratamientos durante la fase exponencial (Tabla 3). En cuanto a los tratamientos con lixiviado, se observó que el tratamiento con 15% presentó el mayor tiempo de generación, menor tasa de crecimiento y menor número de divisiones por día, mientras que los tratamientos al 5% y 10% presentaron valores similares.

Tabla 3. Densidad (cel/mL) máxima por tratamiento del consorcio de agua de mar *Chlorella marina* y *Nannochloropsis oculata*.

L	DM	μ	Div/día	TG
0%	7143750 ±121026.4	0.55 ±0.0042	0.8 ±0.006	1.23 ±0.0092
5%	3151500 ±61984.2	0.28 ±0.0039	0.4 ±0.0056	2.44 ±0.034
10%	2592625 ±61386.88	0.3 ±0.0058	0.44 ±0.0084	2.26 ±0.0429
15%	1929875 ±25609.55	0.23 ±0.0033	0.33 ±0.0047	2.98 ±0.0423

L= Lixiviado (%); DM= Densidad máxima (promedio); μ = Tasa de crecimiento poblacional; Div/día= Divisiones por día; TG= Tiempo de generación; Densidad inicial= 762 000 cel/mL

Determinación del crecimiento celular consorcio de agua dulce. Los ensayos del consorcio de agua dulce compuesto por *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus falcatus* iniciaron con una concentración de 727500 cel/mL, y presentaron un periodo de adaptación de ~2 días, teniendo una duración de 10 días desde la fase de inducción hasta la fase muerte (Figura 2), comportándose de forma similar al consorcio de agua de mar, solo con una diferencia de 34500 cel/mL en el inoculo inicial (Figura 2).

En cuanto a densidad celular, el tratamiento al 5% alcanzó la mayor densidad entre los tratamientos con lixiviado (2397500±160000 cel/mL), seguido de tratamiento al 10% (1735000±230000 cel/mL). Sin embargo, para el tratamiento con 15% de lixiviado, se observó una disminución del 28% en la densidad celular inicial, alcanzando una densidad celular de 525000 cel/mL (±87000) (Tabla 4; Figura 2).

Adicionalmente, el grupo control tuvo el comportamiento esperado con la tasa de crecimiento más alta, más divisiones por día y, por ende, menos tiempo de generación, así como una densidad celular máxima de 4077500±375000 cel/mL (Figura 2).

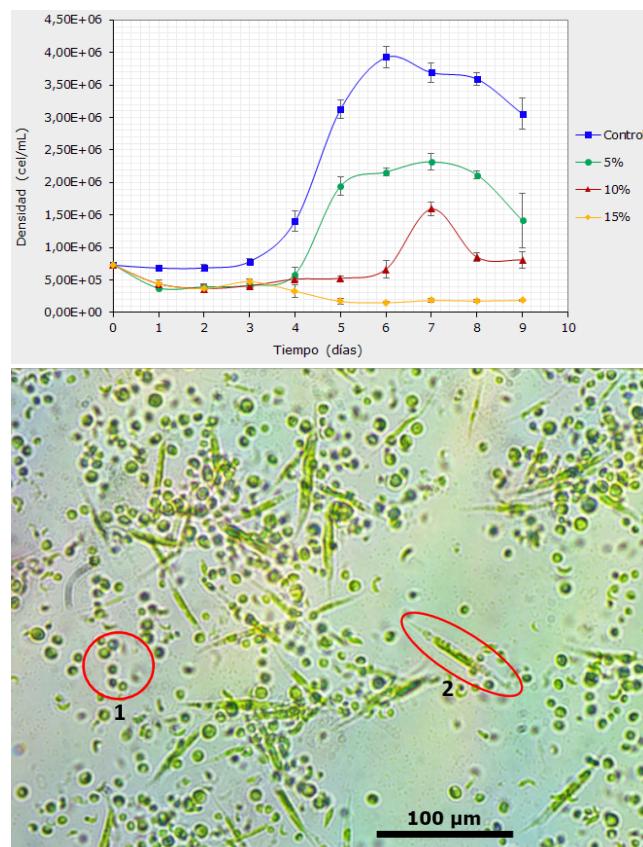


Figura 2. (a) Curvas de crecimiento poblacional del consorcio de agua de dulce expuesto a concentraciones de lixiviados de 5%, 10% y 15%. (b) Micrografía de las microalgas que conforman el consorcio (1-*Chlorella vulgaris* y 2-*Ankistrodesmus falcatus*). Aumento de 10x

Tabla 4. Densidad (cel/mL) máxima por tratamiento del consorcio de agua dulce *Chlorella vulgaris* y *Ankistrodesmus falcatus*.

L	DM	μ	Div/día	TG
0%	3929375 ±83087.4	0.28 ±0.0035	0.40 ±0.0051	2.46 ±0.0318
5%	2345250 ±37570.21	0.17 ±0.0045	0.25 ±0.0065	3.99 ±0.0989
10%	1596750 ±52691.52	0.11 ±0.0046	0.16 ±0.0067	6.21 ±0.2506
15%	476250 ±18089.48	-0.14 ±0.0125	-0.20 ±0.0180	-5.01 ±0.4840

L= Lixiviado (%); DM= Densidad máxima (promedio); μ = Tasa de crecimiento poblacional; Div/día= Divisiones por día; TG= Tiempo de generación. Densidad inicial 727500 cel/mL

La prueba Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en el crecimiento de las microalgas en los cuatro tratamientos ($H=20.0097$; Valor-p= 0.0001), ocasionado principalmente por la prevalencia del grupo control (PostHoc Dunn $p<0.01$) en comparación con los demás tratamientos (Tabla 5).

Tabla 5. Comparaciones de la prueba post hoc de Dunn (valor p) entre el grupo control y tratamientos de concentraciones de lixiviados.

Lixiviado (%)	Control	5%	10%	15%
Control	-			
5	0.1624	-		
10	0.0251*	0.4	-	
15	1.282E-5*	0.003*	0.033*	-

*Diferencias significativas

Comportamiento consorcio de agua de mar vs consorcio de agua dulce. De forma general, se evidenció una mayor prevalencia del consorcio de agua de mar en las diferentes concentraciones de lixiviado, dado que presentó un mayor crecimiento microalgal desde el periodo de adaptación hasta la fase muerte. Asimismo, se observaron diferencias en los picos máximos de crecimiento poblacional. En el consorcio de agua de mar, estos picos se alcanzaron en todos los tratamientos entre los 3 y 5 días, mientras que, para el consorcio de agua dulce, se alcanzaron entre los 6 y 7 días, con excepción del tratamiento con lixiviado al 15%, el cual tuvo su densidad máxima al tercer día,

y a partir de allí, presentó un comportamiento negativo evidenciando disminución su densidad hasta el final del ensayo.

Al evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de lixiviados sobre la cinética de crecimiento microalgal, se encontró que para el consorcio de agua marina existe una correlación negativa y significativa con la tasa de crecimiento y la división celular (Tabla 6). Por el contrario, se observó una correlación positiva significativa ($R= 0.77$; $p=0.0004$) que sugiere que, a mayor concentración de lixiviados, mayor es el tiempo de generación. Para el consorcio de agua dulce se evidenció una correlación negativa y altamente significativa (Tabla 6), indicando que, a mayor concentración de lixiviados, se tendrá una menor tasa de crecimiento y menos divisiones por día.

Tabla 6. Matriz de correlación de Spearman entre la concentración (%) de lixiviados y el crecimiento microalgal en los consorcios de agua marina y agua dulce.

Consorcio	Variables	R	Valor p
Agua Marina	μ	-0.77611	0.0004*
	Div/día	-0.77611	0.0004*
	TG	0.77611	0.0004*
Agua dulce	μ	-0.97014	5.2416E-10*
	Div/día	-0.97014	5.2416E-10*
	TG	-0.19403	0.4715

μ = Tasa de crecimiento poblacional; Div/día= Divisiones por día; TG= Tiempo de generación.

*Diferencia significativa

Adicionalmente, el análisis de similaridad de medianas Kruskal-Wallis comprobó que existen diferencias altamente significativas entre las densidades de los consorcios de agua dulce y agua de mar ($H=38.86$; $p<0.0001$), las cuales pueden observarse principalmente entre el grupo control de agua de mar con todos los tratamientos de ambos consorcios (PostHoc Dunn $p<0.05$), con excepción del grupo control de agua dulce, y entre el tratamiento al 15% en agua dulce con todos los tratamientos, excepto el tratamiento al 10% en agua dulce (PostHoc Dunn $p<0.01$). Lo anterior puede evidenciarse en el gráfico de densidades promedio (cel/mL), siendo el tratamiento control en agua marina el de mayor densidad, contrastando con una menor densidad en el tratamiento al 15% en agua dulce (Figura 3).

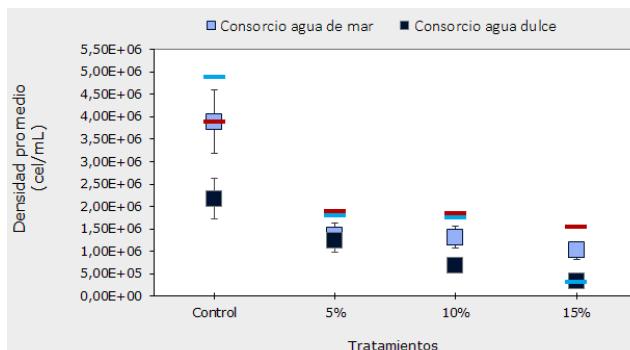


Figura 3. Gráfico de densidad promedio (cel/mL) de los consorcios microalgaes bajo las diferentes concentraciones de lixiviado. Las líneas azules corresponden a valores PostHoc de Dunn <0.05 entre el tratamiento al 15% en agua dulce con todos los tratamientos, mientras que líneas rojas corresponden a PostHoc Dunn <0.01 entre el tratamiento control marino y los demás tratamientos señalados.

DISCUSIÓN

En la presente investigación se realizaron cultivos discontinuos, pues se utilizó una cantidad específica del compuesto esencial en cada ensayo, en este caso el lixiviado, por su contenido de nutrientes como nitritos, nitratos, amonio, ortofosfatos, entre otros (Tabla 1), que pueden ser aprovechables por las microalgas para sus procesos metabólicos y crecimiento (1,27). Teniendo en cuenta la capacidad fitorremediadora de muchas especies microalgaes, que les permite biotransformar compuestos de un medio líquido o gaseoso (28), se esperaba que ambos consorcios pudieran crecer en este medio, lo cual se logró, dado el florecimiento de los consorcios tanto en el grupo control, como en las diferentes concentraciones de lixiviado, obteniéndose curvas de crecimiento de tipo logístico, frecuentes en este tipo de cultivos (29,30).

No obstante, a pesar de que se observó un comportamiento favorable en el crecimiento poblacional a concentraciones bajas de lixiviado, se evidenció una menor tasa de crecimiento en la medida que aumentaban las concentraciones del lixiviado para ambos consorcios. Este fenómeno también es conocido como "Hormesis", el cual consiste en la respuesta bifásica a la concentración de un químico, siendo positiva cuando es baja, y negativa en dosis más altas (1). Si bien, las muestras de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios presentan una alta carga de nitrógeno

y otros compuestos que pueden ser favorables para las microalgas, se han reportado otros componentes que tienen un efecto inhibitorio, e incluso tóxico, en el crecimiento microalgal (1,3,12,30), tales como la presencia de varios tipos de compuestos orgánicos (fósforo, sulfato, entre otros), y contaminantes como amonio y metales pesados, al igual que otros factores como la salinidad, el pH, y la posible reducción en la penetración de la luz debido al color o turbidez, limitando la fotosíntesis, y por ende, el crecimiento poblacional (1,3,12,28,30).

El género *Chlorella* ha sido utilizado en diversos estudios de biorremediación de lixiviados provenientes de rellenos sanitarios, en especial *Chlorella vulgaris*, por su resistencia a muchos de los contaminantes presentes en este tipo de lixiviados, además de su efectividad en procesos de biodegradación (3,31), por lo que se estableció como parte del consorcio de agua dulce del presente estudio. En un estudio realizado por El Ouaer et al (1) se evaluó el crecimiento de *Chlorella vulgaris* en un medio estándar BBM y a diferentes concentraciones de lixiviado, y se observó un mayor crecimiento de la microalga, en términos de densidad celular, al 10%, superando incluso las densidades alcanzadas en el tratamiento control, mientras que en mayores concentraciones del lixiviado (30, 50%, 80% y 100%) se obtuvo un declive en el crecimiento, mostrando la disminución en la densidad celular, comportamiento similar al observado en el presente estudio. Asimismo, Porto et al (3) realizaron ensayos con *Chlorella vulgaris* para evaluar su potencial biorremediador en lixiviados de relleno sanitario utilizando un fotobiorreactor tubular, y encontraron que la microalga presentó un mayor crecimiento en cultivos con concentraciones de lixiviado al 5%, mientras que en concentraciones del 10% y 25%, se obtuvo una tasa de crecimiento más lenta.

En general, la capacidad fitorremediadora y la resistencia a diferentes contaminantes en especies del género *Chlorella* podrían estar relacionadas con la estructura de su pared celular, la cual posee en sus capas más externas esporopolenina, un polímero natural altamente resistente a ataques químicos, y que puede fijar compuestos tóxicos como metales, pesticidas, insecticidas y fertilizantes químicos (1,32). Como tal, no se conoce con exactitud la composición química de la esporopolenina debido a su estabilidad química y resistencia a la degradación por enzimas y por agentes químicos fuertes. Sin embargo, algunos análisis

químicos indican la existencia de una mezcla de biopolímeros, principalmente de ácidos grasos, fenilpropanoides, fenoles, entre otros (32). Adicionalmente, se han reportado algunas especies de este género como mixotróficas, lo que quiere decir que, dada la circunstancia, las células podrían usar simultáneamente CO₂ y otros compuestos orgánicos como fuente de carbono, especialmente en condiciones de poca luz (1), como ocurre en muchas ocasiones en el cultivo con lixiviados.

Considerando estas características, se estableció la especie *Chlorella marina* como parte del consorcio de agua de mar, para evaluar su crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de lixiviados, que si bien no ha sido tan utilizada como su contraparte de agua dulce, si se ha estudiado su potencial biorremediador y para obtención de biodiesel (33,34,35) en conjunto con *Nannochloropsis oculata*, la cual ha sido utilizada en estudios de bioprospección (11,36,37,38), teniendo en cuenta la efectividad de poblaciones mixtas de microalgas en este tipo de ensayos, ya que exhiben mayor resistencia a los cambios en el ambiente, favoreciendo su crecimiento (39), lo cual se presentó en este estudio.

Lo anterior se evidencia en los altos valores de densidad celular, mayor tasa de crecimiento, y mayor número de divisiones por día, observados en el consorcio de microalgas marinas, en todas las concentraciones de lixiviado, con respecto a los resultados obtenidos con el consorcio de agua dulce, por lo que se cree que los consorcios marinos podrían llegar a generar una mayor producción de biomasa, incrementando así su efectividad en procesos de biorremediación de contaminantes lixiviados de rellenos sanitarios,

convirtiéndose en una potencial alternativa en la ejecución de estos ensayos, especialmente en zonas costeras.

Finalmente, la producción masiva de cultivos de microalgas usualmente requiere medios nutritivos para su incremento de biomasa, por lo que es común el uso de reactivos de alta pureza o industriales con precios altos y de compleja preparación. Es por esto que el presente estudio plantea una alternativa de suministro de nutrientes a partir de la adición de lixiviado, lo que se traduciría en el aprovechamiento de estos desechos y la reducción de costos de cultivos microalgaes marinas y dulceacuícolas.

Conflictos de intereses

El manuscrito fue preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad del Sinú, Cartagena, por el apoyo financiero del proyecto, al Laboratorio de Biotecnología microalgal de la misma institución por su ayuda logística, y a la empresa Ingeambiente del Caribe SA por facilitar la muestra de lixiviado para este estudio.

Financiación

Esta investigación fue financiada por la Escuela de Biología Marina de la Universidad del Sinú, seccional Cartagena.

REFERENCIAS

- El Ouaer M, Turki N, Kallel A, Halaoui M, Trabelsi I, Hassen A. Recovery of landfill leachate as culture medium for two microalgae: *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. Environ Dev Sustain. 2019; 22:2651-2671 <https://doi.org/10.1007/s10668-019-00314-7>
- Nawas T, Rahman A, Pan S, Dixon K, Petri B, Selvaratnam T. A Review of Landfill Leachate Treatment by Microalgae: Current Status and Future Directions. Processes. 2020; 8(384). <https://doi.org/10.3390/pr8040384>
- Porto B, Gonçalves AL, Esteves AF, De Souza SMA, De Souza, AAU, Vilar VJP, et al. Assessing the potential of microalgae for nutrients removal from a landfill leachate using an innovative tubular photobioreactor. Chem Eng J. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.127546>
- Carrizales LT, Panca CMA. Evaluación del impacto de la contaminación de los residuos sólidos sobre suelo y agua del botadero sanitario de Cancharani-Puno. Ñawparisun. 2020; 2(4):29-36. <https://unaj.edu.pe/revista/index.php/vpin/article/view/104>

5. Baldiris-Navarro I, Virviescas M, Aponte, J. Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* como Biorremediadora de vertimientos de la Industria Acuícola en el Caribe colombiano. *Teknos*. 2019; 19(1):10-15. <https://doi.org/10.25044/25392190.988>
6. Hao T B, Balamurugan S, Zhang Z H, Liu S F, Wang X, Li D W, et al. Effective Bioremediation of Tobacco Wastewater by Microalgae at Acidic PH for Synergistic Biomass and Lipid Accumulation. *J. Hazard. Mater.* 2022; 426:127820. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127820>.
7. Priya A K, Jalil A A, Vadivel S, Dutta K, Rajendran S, Fujii M, et al. Heavy metal remediation from wastewater using microalgae: Recent advances and future trends. *Chemosphere*. 2022; 305:135375. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135375>
8. Vo H N P, Ngo H H, Guo W, Liu Y, Chang S W, Nguyen D D, et al. Identification of the pollutants removal and mechanism by microalgae in saline wastewater. *Bioresour Technol*. 2019; 275:44-52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.12.026>
9. Sousa H, Sousa CA, Simões LC, Simões M. Microalgal-based removal of contaminants of emerging concern. *J Hazard Mater*. 2022; 423:127153. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34543999/>
10. Cobos M, Estela S, Castro C, Grandez M, Tresierra A, Cabezudo C, et al. Potential of Native Microalgae from the Peruvian Amazon on the Removal of Pollutants. *Progress in Microalgae Research - A Path for Shaping Sustainable Futures*. IntechOpen; 2022. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.105686>
11. Viegas C, Nobre C, Mota A, Vilarinho C, Gouveia L, Gonçalves, M. A circular approach for landfill leachate treatment: Chemical precipitation with biomass ash followed by bioremediation through microalgae. *J Environ Chem Eng*. 2021; 9(3):105187. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.105187>
12. Zhao X, Zhou Y, Huang S, Qiu D, Schideman L, Chai X, et al. Characterization of microalgae-bacteria consortium cultured in landfill leachate for carbon fixation and lipid production, *Bioresour Technol*. 2014; 156:322-328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.112>
13. Infante C, Angulo E, Zárate A, Florez J Z, Barrios F, Zapata C. Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética del crecimiento celular. *Av Cien Ing*. 2012; 3(2):159-164. <https://www.executivebs.org/publishing.cl/avances-en-ciencias-e-ingenieria-vol-3-nro-2-ano-2012-articulo-16/>
14. Ruiz-Martinez A, Martin N, Romero I, Seco A, Ferrer J. Microalgae cultivation in wastewater: nutrient removal from anaerobic membrane bioreactor effluent. *Bioresour Technol*. 2012; 126:247-253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.022>
15. Torres M, Sánchez J. Avances del Banco de Cepas de Microalgas en el Centro Internacional Náutico Fluvial y Portuario del SENA. *Rev SENNOVA*, 2016; 2(1):30-41. <https://revistas.sena.edu.co/index.php/sennova/article/view/536>
16. Forero-Cujiño M A, Montenegro, L C, Pinilla-Agudelo G A, Melgarejo-Muñoz L M. Immobilization of microalgae *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) and *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) in calcium alginate beads. *Acta Biol Colomb*. 2016; 21(2):437-442. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n2.51253>
17. Ramos R, Pizarro R. Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generados en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Rev Biol Mar Oceanogr*. 2018; 53(1):75-86. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572018000100075>
18. Das C, Ramaiah N, Pereira E, Naseera K. Efficient bioremediation of tannery wastewater by monostrains and consortium of marine *Chlorella* sp. and *Phormidium* sp. *Int J Phytoremediation*. 2018; 20(3):284-292. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1374338>

19. Hu D, Zhang J, Chu R, Yin Z, Hu J, Kristianto Y, et al. Microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus* co-cultivation with landfill leachate for pollutant removal and lipid production. *Bioresour Technol.* 2021; 342:126003. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34571333/>
20. Coulson JP, Torres MJ, Henao-Castro A, Díaz, G X. Evaluación del potencial de cultivo de cuatro especies microalgales nativas del departamento de Bolívar, Colombia. *Rev Mutis.* 2022; 12(2). <https://doi.org/10.21789/22561498.1821>
21. Arredondo B, Voltolina D, Zenteno T, Arce M, Gomez G. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal 2da edición. La Paz: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste; 2017.
22. Mishra P, Pandey C M, Singh U, Gupta A, Sahu C, Keshri A. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth.* 2019; 22(1):67-72. https://doi.org/10.4103/aca.ACA_157_18
23. Nahm F S. Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean J Anesthesiol.* 2016; 69(1):8-14. <https://doi.org/10.4097/kjae.2016.69.1.8>
24. Dinno A. Nonparametric pairwise multiple comparisons in independent groups using Dunn's test. *Stata J.* 2015; 15(1):292-300. <https://doi.org/10.1177/1536867X1501500117>
25. Rebekić A, Lončarić Z, Petrović S, Marić S. Pearson's or Spearman's correlation coefficient-which one to use?. *Poljoprivreda.* 2015; 21(2):47-54. <https://doi.org/10.18047/poljo.21.2.8>
26. Suchérás-Marx B, Escarguel G, Ferreira J, Hammer Ø. Statistical confidence intervals for relative abundances and abundance-based ratios: Simple practical solutions for an old overlooked question. *Mar Micropaleontol.* 2019; 151:101751. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2019.101751>
27. Gonçalves A, Pires J, Simoes M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. *Algal Res.* 2017; 24(B):403-415. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.11.008>
28. Jacome C, Ballesteros C, Rea E, Rea L, Poma P. Microalgas en el tratamiento de aguas residuales generadas en industrias de curtidores. *Cienc Tecn UTEQ.* 2021; 14(2):47-55. <https://doi.org/10.18779/cyt.v14i2.502>
29. Peleg M, Corradini MG, Normand MD. The logistic (Verhulst) model for sigmoid microbial growth curves revisited. *Food Res Int.* 2007; 40(7):808-818. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.01.012>
30. Paskuliakova A, McGowan T, Tonry S, Touzet N. Microalgal bioremediation of nitrogenous compounds in landfill leachate – The importance of micronutrient balance in the treatment of leachates of variable composition. *Algal Research.* 2018; 32:162–171. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.03.010>
31. Vitola D, Pérez A, Montes D. Utilización de microalgas como alternativa para la remoción de metales pesados. *RIAA.* 2022; 13(1):195-203. <https://doi.org/10.22490/21456453.4568>
32. Baran T, Sargin I, Kaya M, Menteş A, Ceter, T. Design and application of sporopollenin microcapsule supported palladium catalyst: Remarkably high turnover frequency and reusability in catalysis of biaryls. *Colloid Interface Sci.* 2017; 486:194–203. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.071>
33. Liu X, Hong Y, Gu W. Influence of light quality on *Chlorella* growth, photosynthetic pigments and high-valued products accumulation in coastal saline-alkali leachate. *Water Reuse.* 2021; 11(2):301-311. <https://doi.org/10.2166/wrd.2021.088>
34. Nambukrishnan V, Singaram J. Enhanced biodiesel production by optimizing growth conditions of *Chlorella marina* in tannery wastewater. *Fuel.* 2022; 316:123431. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.123431>

35. Shaari AL, Che Sa SN, Surif M, Zolkarnain N, Ghazali R. Growth of Marine Microalgae in Landfill Leachate and Their Ability as Pollutants Removal. *Trop Life Sci Res.* 2021; 32(2):133-146. <https://doi.org/10.21315/tlsr2021.32.2.9>
36. Al Dayel M F, El Sherif F. Evaluation of the effects of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis salina*, and *Enterobacter cloacae* on growth, yield and active compound compositions of *Moringa oleifera* under salinity stress. *Saudi J Biol Sci.* 2021; 28(3):1687-1696. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.007>
37. Mitra M, Mishra S. Effect of glucose on growth and fatty acid composition of an euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* under mixotrophic culture condition, *Bioresour. Technol. Rep.* 2018; 3:147-153. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.07.013>
38. Marques I M, Oliveira A C V, de Oliveira O M C, Sales E A, Moreira I T A. A photobioreactor using *Nannochloropsis oculata* marine microalgae for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and sorption of metals in produced water. *Chemosphere.* 2021; 281:130775. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130775>
39. Hernandez-Perez A, Jabbé JI. Microalgas, cultivo y beneficios. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 2014; 49(2):157-173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>