



Efecto del diésel sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *Chlorella* spp.: mixotrofía y consorcios microalga-bacteria

Diesel effect on the growth and biochemical composition of *Chlorella* spp.: mixotrophy and microalgae-bacteria consortium

Laugeny Díaz-Borrego*

Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Venezuela

Facultad de Ingeniería, Universidad Rafael Urdaneta, Venezuela

0000-0002-8263-081X | ldiaz@fec.luz.edu.ve

*Autor para correspondencia

Julio Marín-Leal

Facultad de Ingeniería

Universidad del Zulia, Venezuela

0000-0003-2770-5978 | jmarin@fing.luz.edu.ve

Soiré Huerta-Méndez

Facultad Experimental de Ciencias

Universidad del Zulia, Venezuela

0009-0009-4258-7325 |

Ever Morales-Avendaño

Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí

“Manuel Félix López” (ESPAM MFL), Ecuador

0000-0001-9006-4996 | evermster@gmail.com

Cita APA: Díaz-Borrego, L., Marín-Leal, J., Huerta-Méndez, S. y Morales-Avendaño, E. (2025). Efecto del diésel sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *Chlorella* spp.: mixotrofía y consorcios microalga-bacteria. *Revista Arbitrada de Ciencias Ambientales*, 1(1), 23-49. <https://doi.org/10.5281/zenodo.18487497>

Resumen

La contaminación ambiental por compuestos orgánicos se agrava constantemente al aumentar las actividades mineras e industriales, lo que requiere el desarrollo de tecnologías de tratamiento para minimizar el impacto antropogénico sobre los ecosistemas. En este sentido, en el presente trabajo se evaluó el efecto del diésel sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *Chlorella* spp., mediante ensayos discontinuos a escala de laboratorio con tratamientos de 0.25 (T1), 0.50 (T2) y 1.00 (T3) % v/v de diésel. Las concentraciones de clorofila a estuvieron entre 0.51 y 8.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de clorofila b entre 0.15 y 3.09 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de clorofila total entre 0.66 y 11.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de carotenoides entre 0.24 y 3.66 $\mu\text{g mL}^{-1}$; mientras que las de proteínas totales se presentaron entre 160.32 y 818.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de carbohidratos totales entre 43.80 y 209.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y de lípidos totales entre 110.30 y 715.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se evidenciaron cambios en los contenidos de pigmentos fotosintéticos de las microalgas (T1 y T2), así como una estimulación del crecimiento (T1) y de la producción de biomoléculas (todos los tratamientos), probablemente debido al crecimiento mixotrófico de la microalga y/o a la acción simbiótica con las bacterias asociadas (consorcio microbiano). El mejor desempeño en la degradación de hidrocarburos totales del petróleo se obtuvo a la menor proporción aplicada de diésel (T1: 75.8 %). El uso de microalgas bajo la forma de cultivo mixotrófico o en consorcios microbianos resulta altamente versátil para la degradación de hidrocarburos, reduciendo la contaminación y permitiendo la obtención de metabolitos con importancia comercial.

Palabras clave: efecto tóxico, diésel, macromoléculas orgánicas, microalgas, remoción de hidrocarburos.

Abstract

Environmental pollution by organic compounds is constantly worsening with the increase in mining and industrial activities, which requires the development of treatment technologies to minimize the anthropogenic impact on ecosystems. Therefore, in this study, the effect of diesel on the growth and biochemical composition of *Chlorella* spp. was evaluated using batch tests at laboratory scale with treatments of 0.25 (T1), 0.50 (T2) and 1.00 (T3) % v/v of diesel. Chlorophyll a concentrations were between 0.51 and 8.52 $\mu\text{g mL}^{-1}$, chlorophyll b between 0.15 and 3.09 $\mu\text{g mL}^{-1}$, total chlorophyll between 0.66 and 11.32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and carotenoids between 0.24 and 3.66 $\mu\text{g mL}^{-1}$; while total protein concentrations ranged from 160.32 to 818.44 $\mu\text{g mL}^{-1}$, total carbohydrates from 43.80 to 209.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and total lipids from 110.30 to 715.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Changes in the photosynthetic pigment contents of the microalgae (T1 and T2) were observed, as well as stimulation of growth (T1) and production of biomolecules (all treatments), probably due to the mixotrophic growth of the microalgae and/or the symbiotic action with the associated bacteria (microbial consortium). The best performance in the degradation of total petroleum hydrocarbons was obtained at the lowest proportion of diesel applied (T1: 75.8 %). The use of microalgae in the form of mixotrophic culture or in microbial consortia is highly versatile for hydrocarbon degradation, reducing pollution and enabling the production of commercially important metabolites.

Key words: diesel, hydrocarbon removal, microalgae, organic macromolecules, toxic effect.

Introducción

Los hidrocarburos se presentan en gran diversidad estructural como productos biosintéticos de organismos vivos en la biósfera o como sustancias de transformación abiótica de materia orgánica biogénica en la geosfera. Son los principales constituyentes del petróleo y, por lo tanto, extremadamente abundantes en los sistemas geológicos. En la era moderna, los hidrocarburos tienen una amplia gama de usos, principalmente como combustibles y materia prima para la producción de diversos productos. Son esenciales en la industria, el transporte y la generación de energía (Chaudhuri, 2011; Wilkes *et al.*, 2020). El uso extensivo y diverso de estos combustibles fósiles en los diferentes ámbitos está relacionado con graves problemas de contaminación ambiental, debido a su inadecuada manipulación, por accidentes relacionados con su extracción, transporte, contención o distribución, acciones indebidas sin la correspondiente conciencia ambiental requerida, falta de control y fiscalización (Jiménez-Guanipa y Viedma, 2018). En los ecosistemas acuáticos, por ejemplo, la mancha generada por los hidrocarburos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles y a la afección de la comunidad; la primera población afectada por un derrame es el plancton, seguido de los macroinvertebrados, y por último el bentos o población de macroinvertebrados que viven en los fondos de los océanos, lagos, ríos y ciénagas (Bento *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006).

Esta situación puede generar diversos efectos adversos sobre los organismos vivos, como su acumulación en los tejidos grasos del cuerpo, permitiendo su presencia en las cadenas tróficas que llegan hasta el ser humano. Los impactos visibles de los derrames se manifiestan en el corto plazo como mortandad de las especies más sensibles, pero existen otras complicaciones de largo plazo no perceptibles como la afectación del sistema reproductivo y de la alimentación. Estos impactos también tienen una incidencia negativa en las actividades de pesca y del turismo en la zona afectada (Sánchez, 2021). Por ello, en el mejor de los casos, deben implementarse acciones correctivas que minimicen dichos efectos en pro de la conservación y sustentabilidad de los ecosistemas naturales. Entre las tecnologías de descontaminación usadas en la recuperación de zonas degradadas por el derrame de hidrocarburos, se encuentran: procesos físicos, como contención y recolección mecánica, separación y reciclaje, solidificación, vitrificación, estabilización, desorción térmica, incineración y extracción por vapor; procesos químicos, como oxidación-reducción, oxidación fotocatalítica y ultravioleta, adsorción con carbón activado y sistemas electroquímicos; y procesos biológicos, como biorremediación (uso de microorganismos, especialmente bacterias y hongos) y fitorremediación (con plantas, microalgas

y especies simbiotes) (Ambaye *et al.*, 2022; Okeke *et al.*, 2022; Manasseh y Humphrey, 2024).

Las microalgas desempeñan un papel fundamental en la fitorremediación de compuestos tóxicos, incluidos los hidrocarburos, mediante el desarrollo de varios mecanismos de desintoxicación, entre ellos: bioabsorción, bioacumulación, biotransformación, biomineralización y biodegradación (Chekroun *et al.*, 2014; El-Sayed-Touliabah *et al.*, 2022). Diversos estudios sobre la degradación microalgal de hidrocarburos han develado que varias especies son capaces de utilizar dichos compuestos como fuente de carbono (de-Bashan y Bashan, 2010; Hammed *et al.*, 2016; Hamouda *et al.*, 2023), siendo *Prototheca zopfii* la especie más conocida (Yamaguchi *et al.*, 1999; El-Sayed-Touliabah *et al.*, 2022). También se ha reportado que las microalgas desempeñan un papel importante en la degradación de hidrocarburos usando consorcios microbianos (alga-bacteria), aportando el oxígeno producido en la fotosíntesis y ciertas sustancias orgánicas para que las bacterias aerobias puedan actuar sobre los hidrocarburos (Hammed *et al.*, 2016; Radice *et al.*, 2023; León-Vaz *et al.*, 2025). Así, Hamouda *et al.* (2023), por ejemplo, destacaron la capacidad de *Chlorella vulgaris* y de *Synechococcus* sp. (cianobacteria) para degradar el queroseno, utilizando además la biomasa para producir biocombustible. Tras 15 días de cultivo se detectó la presencia de subproductos de la degradación, con valores de 19.9 % para *C. vulgaris* y de 82.2 % para *Synechococcus* sp. No obstante, la capacidad fitorremediadora de las microalgas para absorber y transformar contaminantes puede impactar su metabolismo y composición bioquímica, generando cambios en su constitución celular, como la alteración en la producción de pigmentos fotosintéticos y la variación en las proporciones de ciertas biomoléculas, como proteínas, carbohidratos y lípidos (Cortez-Mago *et al.*, 2007; Díaz-Borrego *et al.*, 2012; Hamouda *et al.*, 2023).

En el presente trabajo se evaluó el efecto del diésel sobre el crecimiento y la composición bioquímica (contenido de clorofila, carotenoides, proteínas, carbohidratos y lípidos) de la microalga clorofita *Chlorella* spp., aislada de aguas del puerto de lanchas de Isla de Toas (municipio insular Almirante Padilla del estado Zulia, Venezuela). Esta localidad presenta problemas ambientales recurrentes debido al derrame constante de diésel y otros hidrocarburos en las zonas adyacentes al puerto y al taller lacustre, develado por la formación de una gran mancha superficial de combustible. Dicha situación genera inquietud entre los habitantes y visitantes de la isla por posibles problemas relacionados con la salud pública, turismo, pesca comercial y de subsistencia, así como el funcionamiento del ecosistema en general, por tratarse de una comunidad dedicada a la actividad turística y pesquera. También se discute sobre las evidencias observadas respecto al

crecimiento mixotrófico de la microalga y de las versatilidades del uso de consorcios microbianos en la degradación de contaminantes del petróleo.

Materiales y métodos

Recolección de muestras de agua

Se recolectaron muestras de agua en las inmediaciones del puerto de lanchas de Isla de Toas (coordenadas geográficas: 10°57'36.52"N - 71°40'54.12"O), Lago de Maracaibo (Venezuela), tomando como referencia los derrames de combustible (manchas tornasoladas). La colecta se hizo manualmente utilizando envases de vidrio (capacidad de 5 L) previamente desinfectados con hipoclorito de sodio 5 %, haciendo inmersión completa de los envases hasta una profundidad de aprox. un metro. Las muestras se rotularon y se trasladaron en una cava con hielo hasta el laboratorio.

Crecimiento de la comunidad de microalgas

Para estimular el crecimiento de los microorganismos fotosintéticos presentes en las muestras de agua, se prepararon cultivos en frascos de vidrio estériles de 250 mL de capacidad con 150 mL de muestra, 16 mL L⁻¹ de medio algal (composición (Fabregas *et al.*, 1984): ZnCl₂ 100 µM, ZnSO₄ 100 µM, MnCl₂•4H₂O 100 µM, Na₂MoO₄•2H₂O 100 µM, CoCl₃ 10 µM o CoCl₂•6H₂O 10 µM, CuSO₄•5H₂O 10 µM, EDTA 640 µM, citrato férrico 2 mM + EDTA 2 mM, tiamina, biotina, B12, NaNO₃ 0.2 M y NaH₂PO₄•2H₂O 10 mM) y fertilizante foliar Nitrofoska® (0.5 mL L⁻¹) (composición: N 10.0 %, P 4.0 %, K 7.0 %, Mg 0.2 %, S 0.8 %, Fe 70 ppm, B 11 ppm, Cu 12 ppm, Mn 8 ppm, Zn 2 ppm, Co 12 ppm y Mo 1 ppm), a una salinidad a 3 ups. Los frascos fueron monitoreados frecuentemente e incubados bajo condiciones de temperatura ambiental de 30 ± 2 °C, fotoperíodo luz: oscuridad de 12:12 h a 78 µmol m⁻² s⁻¹ y agitación manual diaria, durante 30 días.

Aislamiento e identificación taxonómica de microalgas

Para el aislamiento de las microalgas se empleó la técnica de rayado en placas de medio algal con agar a una salinidad a 3 ups, a partir de los frascos de cultivos microalgales. Después de un periodo de incubación de aprox. 8 días bajo las condiciones ambientales descritas anteriormente, se evidenció el crecimiento de microalgas en las placas por la presencia de colonias verdes, las cuales fueron sembradas en medio algal con agar hasta obtener cultivos puros, realizando verificaciones bajo el microscopio óptico.

Para identificar taxonómicamente las microalgas aisladas se realizaron preparaciones al fresco y fijadas con lugol para su observación al microscopio óptico, haciendo uso de claves taxonómicas (pictóricas y dicotómicas) para su clasificación hasta el nivel de género, de acuerdo con Yacubson (1969), Needham y Needham (1978), Hanif *et al.* (2024).

Bioensayos con *Chlorella* spp. en presencia de diésel

De las microalgas aisladas a partir de las muestras de aguas, la más abundante fue identificada como *Chlorella* spp., perteneciente al orden Chlorellales (Needham y Needham, 1978; Hanif *et al.*, 2024). A partir de esta cepa contenida en tubos de vidrio estériles de 25 mL con medio algal, se escalaron progresivamente cultivos microalgales en medio algal + fertilizante Nitrofoska® a 0.5 mL L⁻¹, con una salinidad a 3 ups, hasta obtener aproximadamente 2.5 L de cultivo en fase exponencial, para iniciar los bioensayos de exposición al diésel.

Los bioensayos se realizaron por triplicado con volumen de 250 mL en frascos de vidrio estériles que contenían el cultivo de *Chlorella* spp., fertilizante Nitrofoska® y diésel como contaminante de referencia, previamente filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm para su esterilización. El hidrocarburo se obtuvo de una estación de suministro de combustible de la ciudad y se aplicó a concentraciones de 0.25, 0.50 y 1.00 % v/v por 32 días, de acuerdo con la matriz experimental que se presenta en la tabla 1. Los bioensayos siguieron un régimen discontinuo y se iniciaron a una densidad microalgal de 2x10⁶ cél mL⁻¹ a partir de cultivos desarrollados hasta fase exponencial, siendo incubados bajo condiciones de temperatura ambiental de 30 ± 2 °C, fotoperíodo luz:oscuridad de 12:12 h a 78 µmol m⁻² s⁻¹ y agitación manual diaria (figura 1).

Tabla 1. Matriz experimental para los bioensayos con *Chlorella* spp. en presencia de diésel.

Tratamiento	<i>Chlorella</i> spp.	Fertilizante (0.5 mL L ⁻¹)	Diésel (% v/v)
T1	X	X	0.25
T2	X	X	0.50
T3	X	X	1.00
Control	X	X	0



Figura 1. Diferentes fases del cultivo de *Chlorella* spp. y bioensayos de exposición al diésel

Análisis de parámetros físicoquímicos y microbiológicos

El análisis de pH se utilizó como medida de control para monitorear cada 2 días las condiciones óptimas de tratamiento, mediante el uso de tiras indicadoras pH-Fix marca I.C.T, S.L.; recomendadas para la medida rápida del pH en muestras de agua. Las determinaciones de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), por su parte, se realizaron al inicio y al final de los ensayos, aplicando el método gravimétrico estándar (APHA *et al.*, 2023), usando cloroformo (marca Merck) como solvente de extracción.

Para estimar la densidad celular microalgal en los bioensayos se utilizó la técnica de conteo directo (Lobban *et al.*, 1988; APHA *et al.*, 2023), realizando observaciones cada 4 días con un microscopio óptico y una cámara Neübauer de 0.1 mm de profundidad. Con los valores obtenidos en fase exponencial, se calcularon los parámetros de crecimiento: velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación (Madigan *et al.*, 2015), además del porcentaje de inhibición con respecto al control (densidad celular media). Adicionalmente, se realizó la estimación de bacterias heterótrofas asociadas a los cultivos por la técnica de recuento en placas (APHA *et al.*, 2023), mediante diluciones seriadas a los días 16, 24 y 32 de ensayo. El protocolo para la cuantificación de pigmentos fotosintéticos (clorofila *a*, *b*, total (*a+b*) y carotenoides), estuvo basado en la extracción con una mezcla de acetona:metanol 2:1 y mediciones espectrofotométricas a 480, 665 y 649 nm, cada 4 días, para carotenoides, clorofila *a* y *b*, respectivamente (Strickland y Parsons, 1972; Jeffrey y Humphrey, 1975; APHA *et al.*, 2023).

Considerando la estabilidad de los cultivos de *Chlorella* spp., a partir del día 16 (final de la fase de crecimiento exponencial), también se monitorearon cada 4 días las siguientes macromoléculas orgánicas: proteínas, carbohidratos y lípidos, con la finalidad de observar su variabilidad en el tiempo bajo la influencia del diésel. Las proteínas totales se determinaron según el método colorimétrico de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), modificado por Herbert *et al.* (1971), tratando las muestras con el reactivo Folin-Ciocalteu y realizando las lecturas espectrofotométricas a 700 nm. El análisis de carbohidratos totales estuvo basado en el método colorimétrico fenol-sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956; Kochert, 1978), con mediciones espectrofotométricas a 490 nm, mientras que los lípidos totales de la biomasa microalgal fueron cuantificados según el método de carbonización simple descrito por Marsh y Weinstein (1966), previa extracción de acuerdo con el método de Bligh y Dyer (1959).

Análisis estadístico de datos

En el conjunto de datos se comprobaron los supuestos de normalidad de residuos utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas con la prueba de Levene, haciendo énfasis en esta última para discernir entre el uso de estadística paramétrica y no paramétrica. Realizadas

estas pruebas, se estableció un análisis de varianza y la prueba de Tukey ($p < 0.05$) *a posteriori*, para observar si existían diferencias significativas entre el control y los tratamientos aplicados, en cuanto a la densidad celular, producción de pigmentos, contenido de biomoléculas y remoción de HTP. También se aplicó un análisis de correlación de Pearson, para observar las relaciones significativamente lineales entre las variables estudiadas. Estos análisis estadísticos fueron realizados con el paquete IBM SPSS Statistics 25.

Resultados

Los valores de pH al inicio de los bioensayos se mantuvieron cerca de la neutralidad en todos los tratamientos, pero a partir del día 12, se incrementaron ligeramente en los controles y en los tratamientos con menor presencia de diésel (T1 y T2). Durante el resto del tiempo de experimentación, el pH osciló entre 7 y 8 en todas las unidades de ensayo.

Densidad celular de *Chlorella* spp. y recuento de bacterias asociadas en los bioensayos de exposición al diésel

La densidad celular microalgal se encontró entre 1.02×10^6 y 1.99×10^7 cél mL⁻¹, con los mayores niveles en el control y T1 y los menores en T3 (figura 2A). Los valores medios para T1, T2, T3 y el control fueron de $1.13 \times 10^7 \pm 7.10 \times 10^6$, $9.01 \times 10^6 \pm 5.16 \times 10^6$, $5.41 \times 10^6 \pm 3.37 \times 10^6$ y $1.16 \times 10^7 \pm 6.12 \times 10^6$ cél mL⁻¹, respectivamente. Fue notorio el aumento de la densidad celular con relación a la edad del cultivo, sin diferencias significativas entre los tratamientos en los primeros 24 días ($p > 0.05$) y registrando el desarrollo de la fase exponencial entre los días 4 y 16; fase en la que el control mostró los mayores recuentos celulares, alcanzando valores de $1.19 \times 10^7 \pm 7.46 \times 10^6$ cél mL⁻¹, seguido por T1 con $8.01 \times 10^6 \pm 6.40 \times 10^6$ cél mL⁻¹, T2 con $7.40 \times 10^6 \pm 5.36 \times 10^6$ cél mL⁻¹ y T3 con la densidad más baja de *Chlorella* spp. de $6.56 \times 10^6 \pm 4.12 \times 10^6$ cél mL⁻¹.

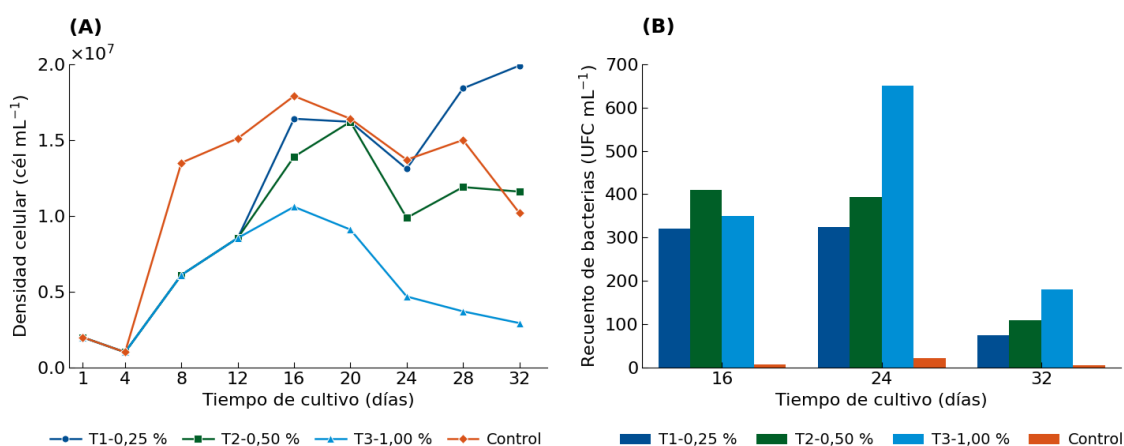


Figura 2. Densidad celular de *Chlorella* spp. (A) y recuento de bacterias heterótrofas asociadas (B) en los cultivos expuestos al diésel. Tratamientos: T1-0.25, T2-0.50 y T3-1.00 % de diésel.

La fase estacionaria pudo identificarse entre los días 16 y 24, con $1.60 \times 10^7 \pm 2.19 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para T1, $1.30 \times 10^7 \pm 2.70 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para T2, $7.02 \times 10^6 \pm 3.33 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para T3 y $1.57 \times 10^7 \pm 1.78 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para el control (figura 2A). A partir del día 28 decrecieron los recuentos celulares en T2, T3 y el control, obteniéndose densidades celulares de $1.91 \times 10^7 \pm 1.04 \times 10^6$, $1.17 \times 10^7 \pm 2.47 \times 10^5$, $3.33 \times 10^6 \pm 5.44 \times 10^5$ y $1.26 \times 10^7 \pm 3.37 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para T1, T2, T3 y el control, respectivamente. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.01$; factor $F = 6.916$) entre los tratamientos, incluyendo el control, para esta última fase del ensayo, con la conformación de tres grupos distinguibles (prueba de Tukey, $p < 0.05$): T3, T2 y T1-control. Del mismo modo, se detectó una relación significativa e inversa entre la densidad celular de *Chlorella* spp. y las concentraciones de diésel aplicadas ($r = -0.450$, $p = 0.001$), revelando su efecto inhibitorio general el crecimiento de la microalga.

En el recuento de bacterias asociadas a los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel (figura 2B), se observó la presencia y en densidad creciente de unidades formadoras de colonias por mililitro, a medida que aumentaba la concentración de diésel, alcanzándose los mayores recuentos en T3 durante el día 24 de ensayo (fase estacionaria para el crecimiento de la microalga), con un valor medio de 650.0 ± 216.9 UFC mL⁻¹, seguido por T2 con 392.8 ± 15.3 UFC mL⁻¹, T1 con 324.8 ± 3.5 UFC mL⁻¹ y el control con 21.8 ± 11.6 UFC mL⁻¹. Las menores densidades bacterianas se observaron a los 32 días, debido posiblemente al agotamiento de la fuente de carbono y/o energía (diésel).

Niveles de pigmentos fotosintéticos en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel

Con respecto a la producción de pigmentos fotosintéticos por parte de *Chlorella* spp. durante los bioensayos, se observaron fluctuaciones en sus concentraciones (figura 3), corroborando una fase estacionaria para el crecimiento de la microalga entre los días 16 y 24, cuando finalmente disminuyen las magnitudes. Las concentraciones de clorofila *a* estuvieron entre 0.51 y 8.52 µg mL⁻¹, clorofila *b* entre 0.15 y 3.09 µg mL⁻¹, clorofila total entre 0.66 y 11.32 µg mL⁻¹ y carotenoides entre 0.24 y 3.66 µg mL⁻¹. De manera general, los tenores de clorofila *a* se incrementaron con el tiempo para luego decrecer en el día 24, presentándose las mayores concentraciones en T1 con una media aritmética de 4.55 ± 2.72 µg mL⁻¹ y las menores en T3 con 2.77 ± 1.42 µg mL⁻¹ (figura 3A), mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$, factor $F = 4.995$) entre todos los tratamientos y su separación en tres grupos distintivos: T3, control y T2-T1.

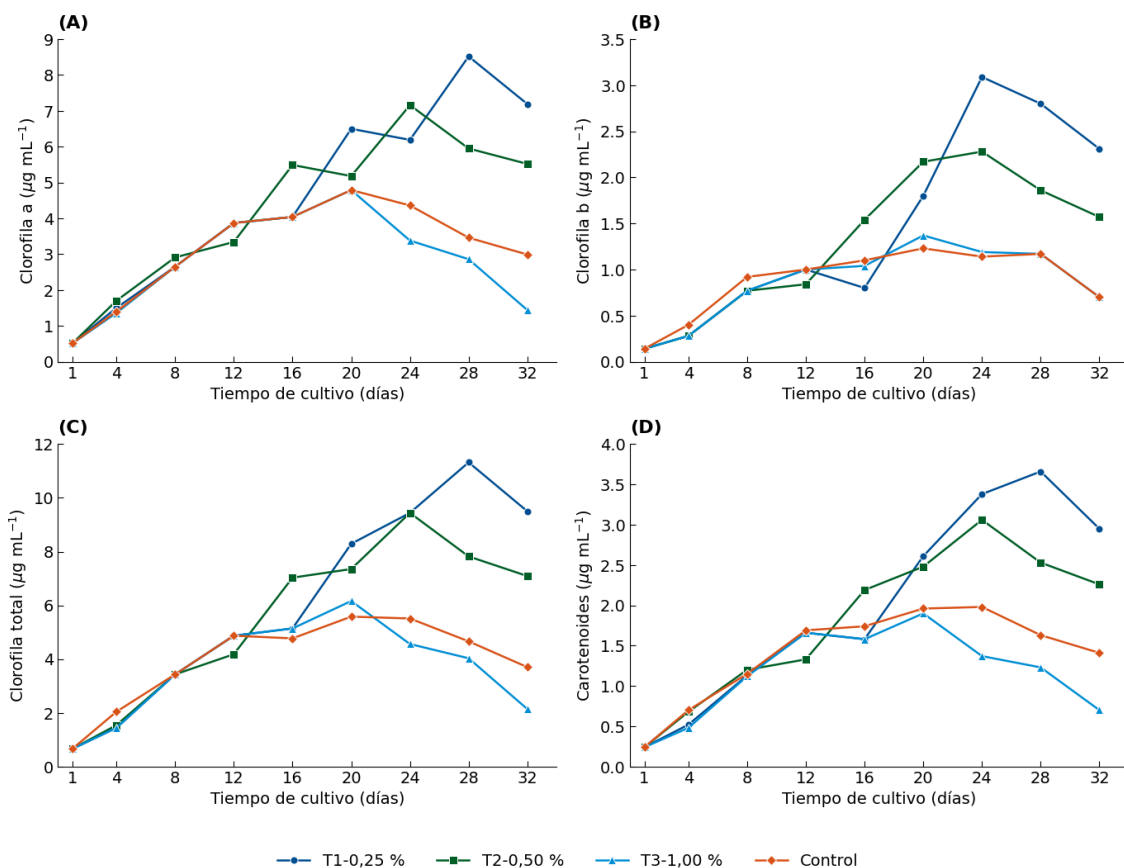


Figura 3. Concentraciones de pigmentos fotosintéticos en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel. (A) Clorofila *a*, (B) Clorofila *b*, (C) Clorofila total, (D) Carotenoides. Tratamientos: T1-0.25, T2-0.50 y T3-1.00 % de diésel.

Los mayores niveles de clorofila *b* en las unidades experimentales se obtuvieron en T1 con $1.44 \pm 1.09 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de T2 con $1.27 \pm 0.79 \mu\text{g mL}^{-1}$, el control con $0.87 \pm 0.38 \mu\text{g mL}^{-1}$ y por último T3 con $0.86 \pm 0.42 \mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 3B), sin diferencias significativas entre todos los casos ($p > 0.05$, factor $F = 3.440$). En el control la clorofila *b* correlacionó significativamente con la clorofila *a* ($r = 0.983$, $p < 0.05$). Las concentraciones de clorofila total, por su parte, develaron el siguiente orden de magnitud: T1 ($6.01 \pm 3.80 \mu\text{g mL}^{-1}$) > T2 ($5.39 \pm 3.05 \mu\text{g mL}^{-1}$) > control ($3.91 \pm 1.65 \mu\text{g mL}^{-1}$) > T3 ($3.60 \pm 1.84 \mu\text{g mL}^{-1}$) (figura 3C). Durante la fase estacionaria los niveles de clorofila total fueron de $7.63 \pm 2.23 \mu\text{g mL}^{-1}$ en T1, $7.94 \pm 1.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ en T2, $5.29 \pm 0.81 \mu\text{g mL}^{-1}$ en T3 y $5.28 \pm 0.45 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el control, mostrando diferencias significativas ($p < 0.01$, factor $F = 6.086$) y cuatro grupos distinguibles (prueba de Tukey, $p < 0.05$): T3, control, T2 y T1. En el control, se obtuvieron correlaciones significativas de las concentraciones de clorofila total respecto a clorofila *a* ($r = 0.977$, $p < 0.05$) y clorofila *b* ($r = 0.960$, $p < 0.05$), al igual que en T3 ($r = 0.999$, $p < 0.001$ y $r = 0.964$, $p < 0.05$, respectivamente). En T2 la clorofila total correlacionó significativamente con la clorofila *a* ($r = 0.958$; $p < 0.05$). Finalmente, los carotenoides siguieron la misma tendencia de las concentraciones mayores en T1 ($1.97 \pm 1.24 \mu\text{g mL}^{-1}$) y menores

en T3 ($1.14 \pm 0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$), mientras que T2 y el control mostraron niveles de 1.77 ± 0.95 y $1.39 \pm 0.59 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente (figura 3D), con diferencias significativas en todos los casos ($p < 0.05$, factor $F = 5.223$) y la conformación de tres grupos distintivos, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0.05$): T2, T1 y T3-control. Realizando un análisis general, se observó una estimulación del crecimiento microalgal en el tratamiento con 0.25 % (T1) de diésel (figura 2A) y de la producción de pigmentos fotosintéticos con 0.25 (T1) y 0.50 % (T2) de diésel (figura 3).

Niveles de macromoléculas orgánicas en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel

Las concentraciones de proteínas totales en las unidades experimentales estuvieron entre 160.32 y $818.44 \mu\text{g mL}^{-1}$, con diferencias significativas ($p < 0.05$, factor $F = 5.867$) entre los tratamientos con diésel y el control (figura 4A), siendo T2 el que develó los mayores valores con una media de $655.75 \pm 131.78 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de T3 con $476.50 \pm 97.70 \mu\text{g mL}^{-1}$, T1 con $474.25 \pm 289.43 \mu\text{g mL}^{-1}$ y el control con $177.50 \pm 17.08 \mu\text{g mL}^{-1}$ (tres grupos diferentes según la prueba de Tukey ($p < 0.05$): control, T1-T3 y T2). Durante la fase estacionaria, la mayor producción de proteínas se obtuvo en T2 y T1 con 724.50 ± 65.05 y $720.01 \pm 132.23 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Las proteínas totales correlacionaron de manera inversa con los carotenoides ($r = -0.997$, $p < 0.001$) en el control.

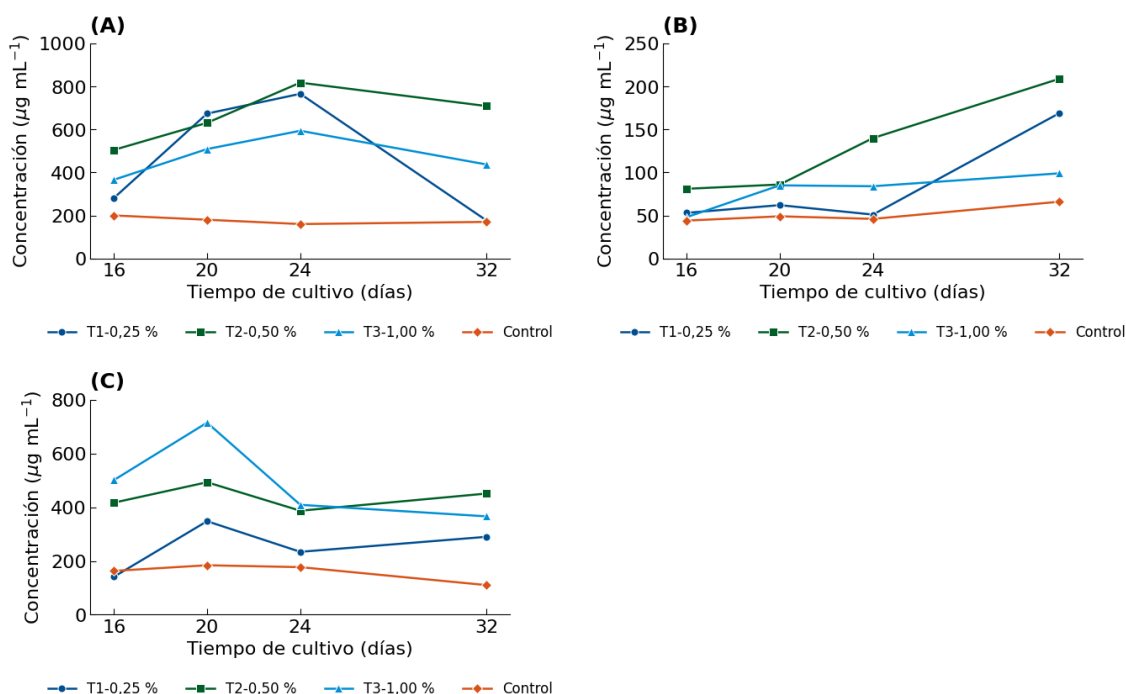


Figura 4. Concentraciones de macromoléculas orgánicas en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel. (A) Proteínas totales, (B) Carbohidratos totales, (C) Lípidos totales. Tratamientos: T1-0.25, T2-0.50 y T3-1.00 % de diésel.

La producción de carbohidratos totales se presentó entre 43.80 y 209.22 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La mayor concentración en fase estacionaria se obtuvo en T2 y T3, con medias aritméticas de 112.90 ± 37.76 y $84.62 \pm 0.57 \mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 4B), respectivamente. Los valores medios generales en T1, T2, T3 y el control fueron de 83.58 ± 57.01 , 129.05 ± 59.61 , 79.18 ± 21.71 y $50.93 \pm 9.92 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sin diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$, factor $F = 2.246$). Los carbohidratos totales correlacionaron inversamente con los carotenoides ($r = -0.952$, $p < 0.05$) en T2. En cuanto a los lípidos totales en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel, sus niveles variaron entre 110.30 y 715.31 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (figura 4C), con diferencias significativas ($p < 0.001$, factor $F = 11.350$) entre las cuatro condiciones experimentales (cuatro grupos diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, $p < 0.05$: control, T1, T2 y T3). Las mayores magnitudes en fase estacionaria se presentaron en T3 con $562.25 \pm 216.45 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de T2 con $439.90 \pm 75.09 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los valores medios de lípidos totales fueron de $253.03 \pm 88.31 \mu\text{g mL}^{-1}$ en T1, $437.10 \pm 45.65 \mu\text{g mL}^{-1}$ en T2, $498.08 \pm 155.44 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $158.45 \pm 33.27 \mu\text{g mL}^{-1}$ en el control. Las concentraciones de lípidos totales correlacionaron significativamente con las de clorofila *a* ($r = 0.985$, $p < 0.05$), clorofila *b* ($r = 0.995$, $p < 0.01$) y clorofila total ($r = 0.982$, $p < 0.05$) en el control. De manera general, se presentó una estimulación en la producción de las macromoléculas orgánicas analizadas a todos los niveles aplicados de diésel en los cultivos microalgales (figura 4).

Discusión

Dinámica de la comunidad microbiana en los cultivos de Chlorella spp. expuestos al diésel

Durante los ensayos de exposición al diésel con la microalga *Chlorella* sp., se pudieron identificar las diferentes fases del crecimiento microbiano mediante el conteo directo de células al microscopio (figura 2A). Una primera fase de adaptación de 4 días fue característica para todos los tratamientos, incluyendo el control, donde la microalga se adaptó a las nuevas condiciones ambientales imperantes; una segunda fase de crecimiento exponencial de aprox. 12 días, con máximo aprovechamiento de los recursos disponibles; una tercera fase estacionaria de aprox. 8 días, donde se intensificaron las condiciones de productividad mediante la estabilidad del crecimiento; y finalmente, una fase de senescencia con desaceleración del crecimiento y escasez de nutrientes (Madigan *et al.*, 2015). Este desarrollo por parte de *Chlorella* spp. estuvo favorecido por las condiciones ambientales y nutricionales establecidas, como indicaron las mediciones de pH durante el ensayo, pero perjudicado por la presencia del diésel, particularmente a las concentraciones de 0.50 (T2) y 1.00 % (T3); mientras que con 0,25 % (T1) de diésel se observó la estimulación del crecimiento microalgal hacia el final de los bioensayos. Comparativamente, Muñoz-Peñuela *et al.* (2012) obtuvieron una

densidad celular de $10.9 \times 10^6 \pm 1.6 \times 10^6$ cél mL⁻¹ para un cultivo de *C. vulgaris* de 22 días, aplicando un fertilizante complejo de N, P y K, la cual resulta inferior a la observada en el presente estudio, debido posiblemente a la edad del cultivo, a las condiciones de crecimiento y a la densidad del inóculo inicial, entre otros factores (Madigan *et al.*, 2015; Hammed *et al.*, 2016).

También los pigmentos fotosintéticos experimentaron gran variabilidad durante los ensayos (figura 3), debido al desarrollo de la población microalgal. El incremento de los niveles de clorofilas (figuras 3A, 3B y 3C) y carotenoides (figura 3D) en T1 y T2 por encima de los valores del control a partir del día 16 de cultivo, responde al estímulo provocado por el diésel sobre las tasas de crecimiento de *Chlorella* spp. De modo contrastante, en T3 se evidenció la inhibición en la producción de pigmentos, como resultado del alto contenido de diésel (1.00 %). Esta respuesta estaría relacionada con el tipo de crecimiento mixotrófico en microalgas, en el que se combina el metabolismo autotrófico con el heterotrófico, permitiendo que estos microorganismos usen también compuestos de carbono orgánico como fuentes de carbono y/o energía, lo que puede aumentar significativamente la productividad primaria (Hammed *et al.*, 2016; Proietti-Tocca *et al.*, 2024). Bajo condiciones de cultivo con bajas intensidades de luz, con una cantidad adecuada de carbono orgánico y nutrientes, el crecimiento mixotrófico puede predominar sobre el crecimiento autotrófico (Ji *et al.*, 2014; Hammed *et al.*, 2016). No obstante, a veces resulta difícil diferenciar el crecimiento mixotrófico del crecimiento sinérgico de las microalgas y las bacterias asociadas al sistema de tratamiento (cultivo no axénico o mixto) (Hammed *et al.*, 2016). En tal sentido, Das *et al.* (2019) reportaron que *Chlorella* sp. alcanzó el mayor rendimiento de biomasa (1.72 g L⁻¹) en condiciones mixotróficas con la adición de agua de producción petrolera pretratada, en comparación con los cultivos a régimen autotrófico y heterotrófico, eliminando el 92 % del nitrógeno total y el 73 % del carbono orgánico total presentes.

El efecto de los hidrocarburos sobre la proliferación de las microalgas puede ser diverso, estando asociado, entre otros factores, al tipo de hidrocarburo, su concentración, condiciones de exposición, disponibilidad de nutrientes y al tipo de microorganismo (El-Sayed-Touliabah *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022; Hamouda *et al.*, 2023; Hammed *et al.*, 2023). Por una parte, a concentraciones relativamente elevadas, pueden generar muerte o inhibición del crecimiento mediante estrés oxidativo que daña las biomoléculas, alteración de la permeabilidad y fluidez de membranas que interfiere sobre la función celular, al igual que daños en orgánulos celulares como mitocondrias y cloroplastos que dificultan la producción de energía y la fotosíntesis, respectivamente, etc. (Satpati *et al.*, 2023; Lee *et al.*, 2023); y por otra, a bajas concentraciones, pueden estimular el crecimiento debido a su uso como fuente de carbono o por asociación simbiótica con bacterias en consorcios

microbianos para la degradación aeróbica de estas sustancias (Hammed *et al.*, 2023; Radice *et al.*, 2023; León-Vaz *et al.*, 2025), como ha sido comentado al inicio de este trabajo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, la inhibición del crecimiento de *Chlorella* spp. expuesta al diésel respecto al control, fue de 3.1 % en T1, 22.6 % en T2 y de 53.6 % en T3. Similarmente, Otero-Paternina *et al.* (2013) reportaron un 59 % de inhibición del crecimiento de *C. vulgaris* para concentraciones de fenantreno por encima de 1 µg L⁻¹, mencionando además que los niveles de clorofila *a* no se afectaron por acción de las diferentes concentraciones del hidrocarburo aplicado (desde 0.001 hasta 10 mg L⁻¹). De esta manera, los datos de inhibición encontrados son congruentes con los parámetros de crecimiento de *Chlorella* spp., calculados en la fase de crecimiento exponencial (tabla 2). Estos valores evidencian la disminución de la velocidad de crecimiento y el aumento del tiempo de duplicación celular desde T1 hasta T3, como consecuencia del efecto del diésel sobre el crecimiento microbiano. En concordancia, la correlación significativa y negativa entre la densidad microalgal y la abundancia de las bacterias heterótrofas asociadas a las unidades experimentales (*r* = -0.948, *p* < 0.05, figura 2), evidenció la proliferación bacteriana conforme aumentaba la proporción de diésel añadido, participando activamente en los procesos de degradación aeróbica del contaminante, gracias a la disponibilidad de una mayor cantidad de materia orgánica.

Tabla 2. Parámetros de crecimiento para los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel.

Tratamiento	Diésel (% v/v)	Velocidad de crecimiento (div/días)	Tiempo de duplicación (días)
T1	0.25	0.813	0.848
T2	0.50	0.607	1.137
T3	1.00	0.668	1.033
Control	0	0.782	0.882

La estimulación del crecimiento de microalgas a ciertas concentraciones de hidrocarburos ha sido reportada en la literatura. Hamouda *et al.* (2016) demostraron que *Chlorella kessleri* crece a concentraciones de petróleo crudo de 0.5, 1 y 1.5 %, pero 1 % fue la concentración óptima para su máximo crecimiento. También señalaron que el contenido de clorofila *a* aumentó desde el primer día de incubación con 0.5 y 1 % de crudo hasta los 14 días. El contenido de carotenoides se incrementó al aumentar la concentración de crudo desde 0.5 hasta 1 %. De igual manera, se detectó que algunos compuestos alifáticos, como: 3-metil-decano, heptadecano, octadecano, nonadecano, docosano y tetracosano, desaparecieron por

completo tras el periodo de incubación con 1 % de petróleo crudo. Por su parte, Hamouda et al. (2023) indicaron que la mayor cantidad de biomasa (peso seco) producida por *C. vulgaris* se obtuvo después de diez días de cultivo aplicando 1.5 % de queroseno; mientras que, después de 15 días de cultivo con 1 % de queroseno, se produjo la máxima cantidad de lípidos (32 %).

Variabilidad de macromoléculas orgánicas en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel

El crecimiento y desarrollo metabólico de *Chlorella* spp. durante los ensayos de exposición estuvo acompañado de una variabilidad en los niveles de las biomoléculas analizadas (figura 4). La estimulación en la producción de estos componentes celulares a las diferentes cantidades de diésel aplicadas con respecto al control, actúa como una variable de respuesta ante un factor de estrés, que provoca cambios metabólicos. Estos cambios influyen en la forma en que las microalgas sintetizan y almacenan biomoléculas. Por lo tanto, el uso de hidrocarburos como fuente de carbono y energía puede alterar significativamente la composición interna de las microalgas al modificar el tipo y la cantidad de sus proteínas, la composición y las reservas de carbohidratos, y el perfil de sus lípidos, que se acumulan como reserva de energía o como respuesta al estrés. Por ejemplo, las microalgas pueden producir enzimas específicas para descomponer los contaminantes hidrocarbonados, lo que altera la producción de proteínas, y sus vías metabólicas se adaptan para utilizar estos compuestos, lo que puede afectar sus reservas de carbohidratos e influir en la acumulación de lípidos (Hachicha et al., 2022; Roy et al., 2023).

Muñoz-Peñuela et al. (2012) estudiaron el efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento y el contenido proteico de *C. vulgaris*, encontrando variaciones desde 18.6 hasta 56.8 % en correspondencia con la fuente nutritiva disponible. A su vez, Guldhe et al. (2017) estudiaron el potencial de medios de cultivo alternativos para la generación de biomasa microalgal de alto valor comercial a partir de *Chlorella sorokiniana* en modo heterotrófico; bajo condiciones específicas se mejoró el crecimiento de *C. sorokiniana*, así como la productividad de lípidos, carbohidratos y proteínas. Hamouda et al. (2023), por su parte, reportaron una máxima producción de lípidos de 32 % en *C. vulgaris* después de 15 días de cultivo con 1 % de queroseno, como resultado del régimen mixotrófico utilizado por la microalga para la degradación del carbono orgánico disponible. También se debe tomar en cuenta que la proliferación bacteriana pudo haber intervenido sobre las magnitudes encontradas de estas biomoléculas en las unidades experimentales, como en el caso de las proteínas totales, considerando que en la pared celular bacteriana las proteínas se encuentran en alta proporción (Lucana y Huanca, 2014), pudiéndose generar sobrestimaciones de los valores.

La producción de biomoléculas por microalgas ofrece ventajas como el cultivo rápido en sistemas controlados sin requerir grandes extensiones de terreno ni instalaciones complejas; la capacidad de producir compuestos de alto valor nutricional y terapéutico (lípidos, proteínas, vitaminas, pigmentos), y la fijación de CO₂, hace que esta tecnología sea un recurso valioso para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética, además de las relacionadas con los biocombustibles y la biorremediación de aguas residuales. Estas microalgas se aprovechan en modos de cultivo que pueden variar desde estanques hasta fotobiorreactores, adaptando las condiciones de producción para optimizar la obtención de biomoléculas específicas con aplicaciones en alimentos funcionales, piensos, cosméticos, biofertilizantes y otros materiales de alto valor humano y tecnológico (Miazek *et al.*, 2017; Lopes da Silva *et al.*, 2021; Hachicha *et al.*, 2022).

Remoción de hidrocarburos totales del petróleo en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel

Las concentraciones finales de HTP fueron de 0.43 ± 0.12 , 1.12 ± 0.23 y 2.30 ± 0.37 mg L⁻¹ para T1, T2 y T3, respectivamente (figura 5), originando remociones de 75.8 % en T1, 70.6 % en T2 y de 69.3 % en T3, con diferencias significativas entre ellas ($p < 0.001$, factor $F = 419.9$). La prueba de Tukey ($p < 0.05$) indicó la conformación de tres grupos distintos respecto a los niveles de remoción de HTP (T1, T2 y T3), demostrando que fueron dependientes de los contenidos iniciales de diésel en las unidades de ensayo (1.79, 3.85 y 7.50 mg L⁻¹, respectivamente).

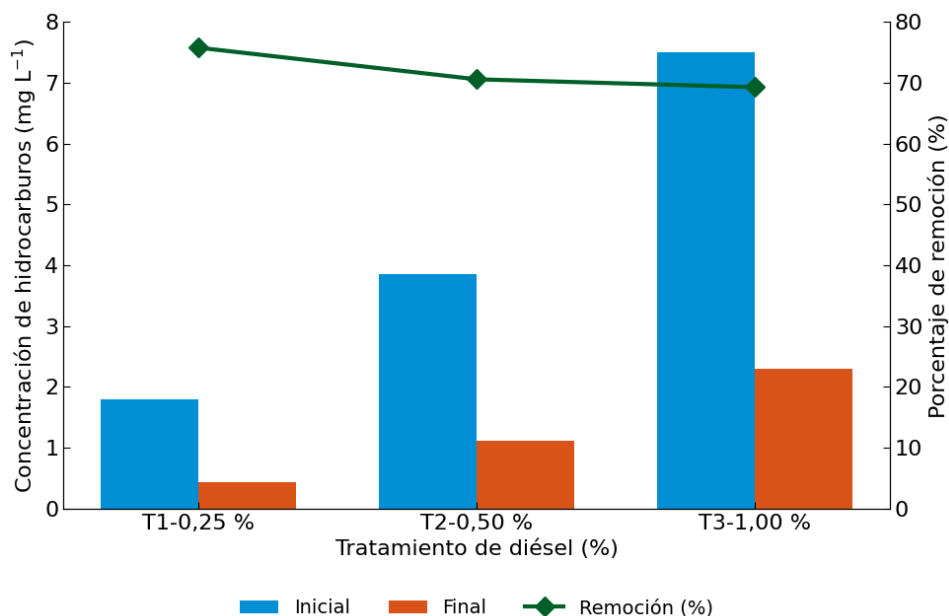


Figura 5. Concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en los cultivos de *Chlorella* spp. expuestos al diésel. Tratamientos: T1-0.25, T2-0.50 y T3-1.00 % de diésel.

Diferentes estudios han reportado la remoción de HTP utilizando microalgas y señalando la versatilidad metabólica de estos microorganismos. En tal sentido, Aldaby y Mawad (2019) denotaron la capacidad de degradación por *Chlorella* spp. sobre el hidrocarburo aromático pireno, con valores de 78.71 % después de 30 días de cultivo con luz y una concentración inicial de 50 mg L⁻¹. Bajo estas mismas condiciones, obtuvieron también los mayores contenidos de peso seco, clorofila total y carotenoides, debido a la intensificación del proceso de fotosíntesis (estimulación del crecimiento). Similarmente, Egberomoh y Fagade (2016) experimentaron con consorcios microbianos que contenían *Chlorella minutissima* y *Aphanocapsa* sp. como componentes microalgales, así como *Citrobacter* sp. SB9, *Pseudomonas aeruginosa* SA3 y *Bacillus subtilis* SA7 como componentes bacterianos. Los tres tipos de consorcios configurados: BCC (inóculos bacterianos y *Chlorella minutissima*), BCCA (todos los inóculos) y BCA (inóculos bacterianos y *Aphanocapsa* sp.), exhibieron porcentajes de degradación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA) de 92.09, 67.76 y 47.19 %, respectivamente en 10 días, demostrando que se puede lograr una sinergia microbiana efectiva y una excelente degradación de HPA con un consorcio microalga-bacteria adecuado. Estos valores resultan comparables a los observados con el diésel en el presente trabajo, donde *Chlorella* spp. junto a las bacterias asociadas, lograron degradar >70 % del hidrocarburo presente, a concentraciones iniciales entre 0.25 y 1.00 %.

De manera general, las microalgas tienen tres formas específicas de eliminar los contaminantes orgánicos de su entorno, incluyendo los HTP: *i*) adsorción en los sitios activos de la pared celular a través de atracción electrostática y formación de complejos; *ii*) bioacumulación dentro de la célula, cuya capacidad de bioabsorción y acumulación está relacionada con sus grupos funcionales, incluyendo grupos hidroxilo, carboxilato, sulfato, fosfato y amino, e involucrando diversas reacciones químicas que ocurren en la superficie celular, como intercambio iónico con grupos activos en la superficie de las algas, reacciones de acomplejamiento superficial, quelación y microprecipitación; y *iii*) conversión en sustancias químicas beneficiosas, como dióxido de carbono y agua, mediante enzimas redox involucradas en reacciones enzimáticas de oxidación-reducción (Schmitt *et al.*, 2001; Mona *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2020; El-Sayed-Touliabah *et al.*, 2022).

Los consorcios microbianos, por su parte, presentan ciertas ventajas en comparación al uso de cultivos de organismos individuales, como: versatilidad ambiental, ya que se han aplicado en sistemas de naturaleza diversa con otros beneficios asociados (remoción conjunta de N y P, captura de CO₂ y producción de biomasa de importancia económica); y base funcional robusta, considerando que la degradación descansa en enzimas oxigenasas, peroxidasas y reductasas bacterianas; además, en consorcios, las interacciones

interespecíficas (*cross-feeding*, consumo de intermediarios tóxicos, etc.) mitigan el estrés y evitan la acumulación de metabolitos (Patowary *et al.*, 2016; González-González y de-Bashan, 2023; Hamouda *et al.*, 2023). A este respecto, en la tabla 3 se presenta una comparación de la eficiencia en la degradación de hidrocarburos por cultivos bacterianos uniespecíficos y consorcios microbianos (bacteria-bacteria y microalga-bacteria). La fortaleza de los consorcios microalgas-bacterias radica en: *i*) autosuficiencia de oxígeno, ya que la fotosíntesis disminuye o elimina la necesidad de aireación externa, un problema típico en la biorremediación aerobia; *ii*) mayor espectro de sustratos, considerando la diversidad enzimática y el cometabolismo, que permiten atacar mezclas complejas del petróleo (alcanos+HPA); *iii*) más rapidez y rendimiento global, observándose frecuentemente tasas y conversiones superiores a las de monocultivos; *iv*) estabilidad y resiliencia, porque los consorcios amortiguan las fluctuaciones de luz, nutrientes, salinidad y toxicidad; los miembros consumen intermediarios que inhibirían el crecimiento de una población individual; *v*) mayor biodisponibilidad, en este sentido, los exopolisacáridos y biosurfactantes aumentan el contacto con microgotas de petróleo y facilitan la emulsificación; *vi*) cotratamiento de distintos contaminantes, removiendo simultáneamente nutrientes y sustancias orgánicas para mejorar la calidad del efluente; *vii*) sinergias metabólicas dirigibles, ya que es factible diseñar consorcios específicos para rutas objetivo y estabilidad funcional; y *viii*) valorización de la biomasa, mediante la generación de bioproductos por parte de la fracción algal (biocombustibles y biofertilizantes), cerrando así los ciclos de economía circular (Hamouda *et al.*, 2023; Radice *et al.*, 2023; Vo *et al.*, 2024).

Tabla 3. Comparación de la eficiencia de degradación de hidrocarburos por cultivos bacterianos uniespecíficos y consorcios microbianos (bacteria-bacteria y microalga-bacteria).

Tipo de cultivo	Tipo de hidrocarburo	Microorganismo o consorcio	% de degradación (tiempo)	Características	Referencia
Bacteria	Diésel aceite quemado	y <i>Pseudomonas</i> sp.	Diésel (4 % v/v): 14.19 % y aceite quemado (8 % v/v): 11.97 % (7 días)	Degradación moderada, superior a <i>Acinetobacter</i> sp. y <i>Enterobacter</i> sp.	Hossain et al. (2022)
Bacteria	Diésel aceite quemado	y <i>Acinetobacter</i> sp.	Diésel: 8.2 % y aceite quemado: 6.09 % (7 días)	Baja eficiencia comparativa	Hossain et al. (2022)
Bacteria	Petróleo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Acinetobacter lwoffii</i>	77.8, 76.7 y 74.3 % (28 días)	Degradación progresiva creciente; cada cepa mostró un rango limitado	Al-Wasify y Hamed (2014)

Efecto del diésel sobre el crecimiento y la composición bioquímica de *Chlorella* spp.: mixotrofia y consorcios microalga-bacteria

Tipo de cultivo	Tipo de hidrocarburo	Microorganismo o consorcio	% de degradación (tiempo)	Características	Referencia
Consortio bacteriano	Petróleo	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Acinetobacter lwoffii</i>	88.5 % (28 días)	Mejor rendimiento que las cepas aisladas; sinergia efectiva	Al-Wasify y Hamed (2014)
Consortio bacteriano	Petróleo	<i>Pseudomonas putida</i> (A2), <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (A4), <i>Sphingomonas</i> sp. (L5) y consorcio (C)	A2: 42.8 %, A4: 48.01 %, L5: 26.56 % y C: 81.07 % (28 días)	Consortio supera a cada cepa aislada; efecto sinérgico	Wei et al. (2021)
Consortio bacteriano	HTP	14 consorcios diferentes	Mejor consorcio: 68.12 % (semana 3)	Algunos consorcios presentaron efectos antagonistas; se requiere optimización de condiciones	Patowary et al. (2016)
Consortio bacteriano	Diésel, hexano y hexadecano	Consortios autóctonos	Diésel: 40-92 %, hexano: 45-74 % y hexadecano: 61-87 %	Degradación variable según tipo de hidrocarburo; requiere adaptación previa del consorcio	Rodriguez et al. (2023)
Consortio bacteriano (cocultivo)	Petróleo (saturados + aromáticos)	<i>Bacillus subtilis</i> SL + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WJ-1	Petróleo: >58.6 % y saturados: 75.06 % (7 días)	El cocultivo mejora la adhesión (hidrofobicidad) y emulsificación	Wu et al. (2023)
Consortio microalga-bacteria	HPA	<i>Chlorella</i> spp. + <i>Rhodococcus wratislaviensis</i>	Fenantreno, pireno y benzo[a]pireno: degradados a niveles no detectables (30 días)	La microalga reduce la toxicidad para la bacteria; mejora de crecimiento conjunto	Gonzalez-Gonzalez y de-Bashan (2023)
Consortio microalga-bacteria	Pireno	<i>Selenastrum capricornutum</i> + <i>Mycobacterium</i> spp.	Pireno degradado completamente en 10 días	El alga protegida de toxicidad; sinergia en crecimiento mutuo	Gonzalez-Gonzalez y de-Bashan (2023)
Consortio microalga-bacteria	Diésel	<i>Chlorella</i> spp. + bacterias asociadas	T1: 75.8 % T2: 70.6 % T3: 69.3 % (32 días)	Estimulación del crecimiento y de la producción de biomoléculas	Este trabajo

HTP: hidrocarburos totales del petróleo, HPA: hidrocarburos poliaromáticos; T1: 0.25 %, T2: 0.50 %, T3: 1.00 %.

De lo anterior se desprende que, las microalgas son excelentes organismos para utilizar en los procesos de bioeliminación de los contaminantes del petróleo. Actualmente, se sigue investigado sobre otros

mecanismos específicos mediante los cuales ocurren estos procesos de degradación. No obstante, las microalgas son potencialmente adecuadas para la mitigación de los efectos de diversos compuestos químicos en el ambiente, particularmente en consorcios microbianos, constituyendo un elemento vivo fundamental en los sistemas de tratamiento de aguas contaminadas con hidrocarburos.

Conclusiones

En el presente trabajo sobre el efecto del diésel en el crecimiento y la composición bioquímica (contenido de clorofilas, carotenoides, proteínas, carbohidratos y lípidos) de la microalga clorofita *Chlorella* spp., se observó una estimulación del crecimiento microalgal en el tratamiento con 0.25 % (T1) de diésel y de la producción de pigmentos fotosintéticos con 0.25 (T1) y 0.50 % (T2) de diésel. También se presentó un incremento en la producción de las macromoléculas orgánicas analizadas (proteínas, carbohidratos y lípidos totales) a todos los niveles aplicados de diésel, probablemente debido al crecimiento mixotrófico de la microalga y/o a la acción simbiótica de las bacterias asociadas (consorcio microbiano). Estos procesos resultaron en una reducción de los HTP dependiente de los contenidos iniciales de diésel en las unidades experimentales. El mejor desempeño se obtuvo a la menor proporción aplicada de diésel (75.8 % a 0.25 % v/v).

El uso de microalgas, bajo la forma de cultivo mixotrófico, resulta altamente versátil para el tratamiento de áreas impactadas por derrames de hidrocarburos porque se reduce la contaminación generada a la vez que se obtienen metabolitos de importancia comercial. De igual manera, los consorcios microbianos microalga-bacteria ofrecen mayor rapidez y rendimiento global de los procesos degradativos en comparación a los monocultivos, además de actuar en cotratamiento sobre distintos contaminantes, removiendo simultáneamente nutrientes y sustancias orgánicas para mejorar la calidad del efluente tratado, entre otras ventajas.

Referencias

- Aldaby, E. S. E. y Mawad, A. M. M. (2019). Pyrene biodegradation capability of two different microalgal strains. *Global Nest Journal*, 21(3), 290-295. <https://doi.org/10.30955/gnj.002767>
- Al-Wasify, R. S. y Hamed, S. R. (2014). Bacterial biodegradation of crude oil using local isolates. *International Journal of Bacteriology*, 2014, 863272. <https://doi.org/10.1155/2014/863272>
- Ambaye, T. G., Chebbi, A., Formicola, F., Prasad, S., Gomez, F. H., Franzetti, A. y Vaccari, M. (2022). Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons and its reuse for agriculture: recent progress, challenges, and perspectives. *Chemosphere*, 293, 133572. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133572>

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) y Water Environment Federation (WEF). (2023). Standard methods for the examination of water and wastewater. (24th edition). W. C. Lipps, E. B. Braun-Howland y T. E. Baxter (Eds.). American Public Health Association.
- Bento, F. M., de Oliveira-Camargo, F. A., Okeke, B. y Frankenberger-Júnior, W. T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(1), 65-68. <http://doi.org/10.1590/S1517-83822003000500022>
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Chaudhuri, U. R. (2011). Fundamentals of petroleum and petrochemical engineering. CRC Press.
- Chekroun, K. B., Sánchez, E. y Baghour, M. (2014). The role of algae in bioremediation of organic pollutants. *International Research Journal of Public and Environmental Health*, 1(2), 19-32. <https://journalissues.org/wp-content/uploads/2014/07/Chekourn-et-al.pdf>
- Cortez-Mago, R., Guevara, M., Vásquez, A. y Lodeiros-Seijo, C. (2007). Influencia del petróleo crudo en el crecimiento de microalgas del nororiente de Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 41(4), 471-483. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/100>
- Das, P., AbdulQuadir, M., Thaher, M., Khan, S., Chaudhary, A. K., Alghasal, G. y Al-Jabri, H. M. (2019). Microalgal bioremediation of petroleum-derived low salinity and low pH produced water. *Journal of Applied Phycology*, 31, 435-444. <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1571-6>
- de-Bashan, L. E. y Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101(6), 1611-1627. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- Díaz-Borrego, L., Vera, A., Marín, J., Aiello, C., Briceño, B. y Morales, E. (2012). Efecto del queroseno y de la concentración de nutrientes en el crecimiento de un cultivo mixto de microalgas (Chlorophyta). *Revista de la Universidad del Zulia 3ra Época*, 3(6), 102-118. <https://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/rluz/article/view/31185>
- Dubois, M., Guilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. y Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Egberomoh, G. O. y Fagade, O. E. (2016). Microalgal-bacterial consortium in polyaromatic hydrocarbon degradation of petroleum – based effluent. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 7, 359. <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000359>
- El-Sayed-Touliabah, H., El-Sheekh, M. M., Ismail, M. M. y El-Kassas, H. (2022). A review of microalgae- and cyanobacteria-based biodegradation of organic pollutants. *Molecules*, 27, 1141. <https://doi.org/10.3390/molecules27031141>

- Fabregas, J., Herrero, C. y Veiga, M. (1984). Effect of oil and dispersant on growth and chlorophyll α content of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 445-447. <https://doi.org/10.1128/aem.47.2.445-447.1984>
- Gonzalez-Gonzalez, L. M. y de-Bashan, L. E. (2023). The potential of microalgae-bacteria consortia to restore degraded soils. *Biology*, 12(5), 693. <https://doi.org/10.3390/biology12050693>
- Guldhe, A., Ansari, F. A., Singh, P. y Bux, F. (2017). Heterotrophic cultivation of microalgae using aquaculture wastewater: A biorefinery concept for biomass production and nutrient remediation. *Ecological Engineering*, 99, 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.11.013>
- Hachicha, R., Elleuch, F., Ben-Hlima, H., Dubessay, P., de Baynast, H., Delattre, C., Pierre, G., Hachicha, R., Abdelkafi, S., Michaud, P. y Fendri, I. (2022). Biomolecules from microalgae and cyanobacteria: applications and market survey. *Applied Sciences*, 12, 1924. <https://doi.org/10.3390/app12041924>
- Hammed, A. M., Prajapati, S. K., Simsek, S. y Simsek, H. (2016). Growth regime and environmental remediation of microalgae. *Algae*, 31(3), 189-204. <http://dx.doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.28>
- Hamouda, R. A., Alhumairi, A. M. y Saddiq, A. A. (2023). Simultaneous bioremediation of petroleum hydrocarbons and production of biofuels by the micro-green alga, cyanobacteria, and its consortium. *Heliyon*, 9, e16656. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16656>
- Hamouda, R. A., Sorour, N. M. y Yeheia, D. S. (2016). Biodegradation of crude oil by *Anabaena oryzae*, *Chlorella kessleri* and its consortium under mixotrophic conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 112, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.05.001>
- Hanif, A., Shah, F. H., Mumtaz, A. S., Ullah, T., Azeem, M. A., Ahmad, M. y Shah, A. A. (2024). Taxonomic study of freshwater microalgal diversity and its optimum culturing condition of District Karak, Pakistan. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 24(3), 96-116. <https://www.innspub.net/wp-content/uploads/2024/06/JBES-V24-No3-p97-116.pdf>
- Herbert, D., Phipps, P. J. y Strange, R. E. (1971). Chemical analysis of microbial cells. *Methods in Microbiology*, 5, 209-344. [http://dx.doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70641-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70641-X)
- Hossain, M. F., Akter, M. A., Sohan, M. S. R., Sultana, D. N., Reza, M. A. y Hoque, K. M. F. (2022). Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(1), 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.069>
- Jeffrey, S. W. y Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochimie und Physiologie der Pflanzen*, 167(2), 191-194. [http://doi.org/10.1016/S0015-3796\(17\)30778-3](http://doi.org/10.1016/S0015-3796(17)30778-3)

- Ji, Y., Hu, W., Li, X., Ma, G., Song, M. y Pei, H. (2014). Mixotrophic growth and biochemical analysis of *Chlorella vulgaris* cultivated with diluted monosodium glutamate wastewater. *Bioresource Technology*, 152, 471-476. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.047>
- Jiménez-Guanipa, H. y Viedma, E. (2018). Energía, cambio climático y desarrollo sostenible. Impacto sobre los derechos humanos. Fundación Heinrich Böll.
- Khan, Z. I., Ahmad, K., Siddique, S., Ahmad, T., Bashir, H., Munir, M., Mahpara, S., Malik, I. S., Wajid, K., Ugulu, I., Nadeem, M., Noorka, I. R. y Chen, F. (2020). A study on the transfer of chromium from meadows to grazing livestock: an assessment of health risk. *Environmental Science and Pollution Research International*, 27(21), 26694-26701. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10660-z>
- Kochert, G. (1978). Carbohydrate determination by the phenol-sulfuric acid method. En: J. Hellebust y J. Craigie (Eds.). *Handbook of Phycological Methods. Physiological and Biochemical Methods*. Cambridge University Press.
- Lee, J., Hong, S., An, S. A. y Khim, J. S. (2023). Methodological advances and future directions of microalgal bioassays for evaluation of potential toxicity in environmental samples: a review. *Environment International*, 173, 107869. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107869>
- León-Vaz, A., Torres-Franco, A. F., García-Encina, P. A. y Muñoz, R. (2025). Developing a microalgal-bacterial consortium for the removal of organic pollutants from petrochemical industry. *Journal of Water Process Engineering*, 73, 107663. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.107663>
- Lobban, C., Chapman, D. y Kremer, B. (1988). *Experimental phycology: a laboratory manual*. Cambridge University Press.
- Lopes da Silva, T., Moniz, P., Silva, C. y Reis, A. (2021). The role of heterotrophic microalgae in waste conversion to biofuels and bioproducts. *Processes*, 9, 1090. <https://doi.org/10.3390/pr9071090>
- López, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S. y García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82-90. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>
- Lowry, H., Rosebrough, J., Farr, L. y Randall, J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/>
- Lucana, N. y Huanca, R. (2014). Estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica*, 49, 2589- 2593. http://revistasbolivianas.umsa.bo/pdf/raci/v49/v49_a01.pdf
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. y Stahl, D. A. (2015). *Brock, Biología de microorganismos*. (14ta edición). Pearson Educación S. A.
- Manasseh, I. M. y Humphrey, S. S. (2024). Bioremediation of oil spill: concept, methods and applications. *Discover Chemistry*, 1, 42. <https://doi.org/10.1007/s44371-024-00038-2>

- Marsh, J. y Weinstein, D. (1966). Simple charring method for determination of lipids. *Journal of Lipid Research*, 7(4), 574-576. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)39274-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)39274-9)
- Miazeck K., Kratky, L., Sulc, R., Jirout, T., Aguedo, M., Richel, A. y Goffin, D. (2017). Effect of organic solvents on microalgae growth, metabolism and industrial bioproduct extraction: a review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1429. <https://doi.org/10.3390/ijms18071429>
- Mona, S., Kaushik, A. y Kaushik, C. P. (2011). Biosorption of reactive dye by waste biomass of *Nostoc linckia*. *Ecological Engineering*, 37(10), 1589-1594. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.04.005>
- Muñoz-Peñuela, M., Ramírez, J., Otero-Paternina, A. M., Medina-Robles, V. M., Cruz-Casallas, P. E. y Velasco-Santamaría, V. (2012). Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 25(3), 438-449. <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v25n3/v25n3a12.pdf>
- Needham, J. y Needham, P. R. (1978). *Guía de estudio de los seres vivos de las aguas dulces*. Editorial Reverté, S. A.
- Okeke, E. S., Okoye, C. O., Chidike-Ezeorba, T. P., Mao, G., Chen, Y., Xu, H., Song, C., Feng, W. y Wu, X. (2022). Emerging bio-dispersant and bioremediation technologies as environmentally friendly management responses toward marine oil spill: a comprehensive review. *Journal of Environmental Management*, 322, 116123. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116123>
- Otero-Paternina, A., Cruz-Casallas, P. E. y Velasco-Santamaría, Y. M. (2013). Evaluación del efecto del hidrocarburo fenantreno sobre el crecimiento de *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae). *Acta Biológica Colombiana*, 18(1), 87-98. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/24558/39935>
- Patowary, K., Patowary, R., Kalita, M. C. y Deka, S. (2016). Development of an efficient bacterial consortium for the potential remediation of hydrocarbons from contaminated sites. *Frontiers in Microbiology*, 14(7), 1092. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01092>
- Proietti-Tocca, G., Agostino, V., Menin, B., Tommasi, T., Fino, D. y Di Caprio, F. (2024). Mixotrophic and heterotrophic growth of microalgae using acetate from different production processes. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 23, 93-132. <https://doi.org/10.1007/s11157-024-09682-7>
- Radice, R. P., De Fabrizio, V., Donadoni, A., Scopa, A. y Martelli, G. (2023). Crude oil bioremediation: from bacteria to microalgae. *Processes*, 11, 442. <https://doi.org/10.3390/pr11020442>
- Rodriguez, K. N. D., Santos, R. T., Nagpala, M. J. M. y Opulencia, R. B. (2023). Metataxonomic characterization of enriched consortia derived from oil spill-contaminated sites in Guimaras, Philippines, reveals major role of *Klebsiella* sp. in hydrocarbon degradation. *International Journal of Microbiology*, 2023, 3247448. <https://doi.org/10.1155/2023/3247448>

- Roy, U. K., Wagner, J. y Radu, T. (2023). Production of metabolites in microalgae under alkali halophilic growth medium using a dissolved inorganic carbon source. *Waste and Biomass Valorization*, 14, 3339-3354. <https://doi.org/10.1007/s12649-023-02053-3>
- Sánchez, J. C. (2021). Afectación de los ecosistemas marino-costeros por los derrames de hidrocarburos. *Boletín de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales*, LXXXI(1), 35-39. <https://acfiman.org/wp-content/uploads/2022/07/LXXXI.N1.P35-39.2021.pdf>
- Satpati, G. G., Gupta, S., Biswas, R. K., Choudhury, A. K., Kim, J. W. y Davoodbasha, M. A. (2023). Microalgae mediated bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies, advancement and regulations. *Chemosphere*, 344, 140337. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.140337>
- Schmitt, D., Müller, A., Csögör, Z., Frimmel, F. H. y Posten, C. (2001). The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth. *Water Research*, 35(3), 779-785. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00317-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00317-1)
- Silva, D. A., Cardoso, L. G., Silva, J. S., Oliveira de Souza, C., França-Lemos, P. V., de Almeida, P. F., de Souza-Ferreira, E., Lombardi, A. T. y Druzian, J. I. (2022). Strategy for the cultivation of *Chlorella vulgaris* with high biomass production and biofuel potential in wastewater from the oil industry. *Environmental Technology & Innovation*, 25, 102204. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.102204>
- Strickland, J. y Parsons, T. (1972). A practical handbook of seawater analysis. (2nd edition). Fisheries Research Board Canadian.
- Vo, T. P., Danaee, S., Chaiwong, C., Pham, B. T., Poddar, N., Kim, M., Kuzhiumparambil, U., Songsomboon, C., Pernice, M., Ngo, H. H., Ralph, P. J. y Vo, P. H. N. (2024). Microalgae-bacteria consortia for organic pollutants remediation from wastewater: a critical review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, (6)12, 114213. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114213>
- Wei, X., Peng, P., Meng, Y., Li, T., Fan, Z., Wang, Q. y Chen, J. (2021). Degradation performance of petroleum-hydrocarbon-degrading bacteria and its application in remediation of oil contaminated soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 766, 012096. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/766/1/012096>
- Wilkes, H., Jarling, R. y Schwarzbauer, J. (2020). Hydrocarbons and lipids: an introduction to structure, physicochemical properties, and natural occurrence. En: H. Wilkes (Ed.). *Hydrocarbons, oils and lipids: diversity, origin, chemistry and fate*. Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology. Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90569-3_34
- Wu, B., Xiu, J., Yu, L., Huang, L., Yi, L. y Ma, Y. (2023). Degradation of crude oil in a co-culture system of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1132831. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1132831>
- Yacubson, S. (1969). Algas de ambientes acuáticos continentales, nuevas para Venezuela (Cyanophyta, Chlorophyta). *Boletín del Centro de Investigaciones*

Biológicas, 3, 1-87.
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/boletin/article/view/168>

Yamaguchi, T., Ishida, M. y Suzuki, T. (1999). Biodegradation of hydrocarbons by *Prototheca zopfii* in rotating biological contactors. *Process Biochemistry*, 35, 403-409. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00086-2](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00086-2)