

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Proyecto Final de Graduación para optar por el grado de  
Licenciatura en Ingeniería Ambiental

**Estrategia de biorremediación con microalgas para la  
recuperación de cuerpos de agua superficial**

Annelice Corrales Núñez

Cartago, Diciembre, 2024

**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica

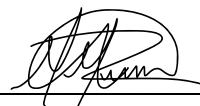
**ingeniería  
ambiental**

Esta obra está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/) © 2 por [Annelice Corrales Núñez](#) 

## **Estrategia de biorremediación con microalgas para la recuperación de cuerpos de agua superficial**

Informe presentado a la Escuela de Química del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Ingeniera Ambiental con el grado de licenciatura

### **Miembros del tribunal**



---

**M.Sc Mauricio Chicas Romero**  
**Director(a)**

---

**Lic. Francinie Murillo Vega**  
**Lectora 1**



---

**Dra. Thamara Fariñas Torres**  
**Lectora 2**

---

**M. Sc. David Isasi Hernández Parra**  
**Coordinador(a) COTRAFIG**

---

**Dr. Guillermo Calvo Brenes**  
**Director Escuela de Química**

---

**M.Sc. Diana Zambrano Piamba**  
**Coordinadora Carrera de Ingeniería Ambiental**

## DEDICATORIA

El esfuerzo que he realizado para lograr obtener mi título universitario se lo dedico a mi pequeño amor *Ylang Fariñas Corrales*.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco la oportunidad de trabajar en un tema que me apasionó desde el inicio de la carrera cuando nos presentaron un mundo de posibilidades para dejar este planeta mejor de como la encontramos.

Gracias al Ing. Mauricio Chicas Romero quién me acompañó e inspiró durante este proceso de tesis, un agradecimiento al equipo de trabajo del CIB, a José Daniel Castro por guiarme en el laboratorio de microalgas para encontrar todo lo que necesitaba, a Valeska Bennett por acompañarme a montar los ensayos y a los demás compañeros que me ayudaron a sacar los conteos celulares en tiempo récord.

Gracias a las lectoras que me ayudaron a dar más de mí, con sus correcciones constructivas. Estoy agradecida con el personal de la escuela de ambiental que hicieron de mi estancia en el TEC un espacio agradable y seguro.

Gracias a mis compañeros que cuidaron de mí y de Ylang el último semestre, complaciendo antojos, preocupándose por nuestra comodidad y cuidándonos en las giras; ahora es él quien me acompaña a escribirles a ustedes.

Gracias a mi familia que me ha brindado el apoyo necesario para poder estudiar lo que me apasionaba, especialmente a Kristyabel Núñez que me ha enseñado a esforzarme para conseguir lo que sueño y a Marianella Corrales que siempre me recuerda como encontrarme a mí misma.

Gracias a Erick Fariñas por motivarme cuando perdía el enfoque, por abrazarme cuando mis pensamientos me sobrepasaban y por acompañarme mis últimos tres años de vida universitaria recordándome siempre de todo lo que soy capaz.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Resumen</b> .....	<b>10</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>11</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>12</b>
1.1 <i>Objetivos</i> .....	13
1.1.1 Objetivo general .....	13
1.1.2 Objetivos específicos .....	13
<b>2 Marco Teórico</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 <i>Contaminación ambiental en cuerpos de agua superficial</i></b> .....	<b>14</b>
2.1.1 <i>Causas de contaminación en cuerpos de agua superficial</i> .....	14
2.1.2 <i>Tipos de contaminantes en cuerpos de agua superficial</i> .....	15
<b>2.2 <i>Métodos para medir la contaminación</i></b> .....	<b>16</b>
2.2.1 Prueba de inhibición del crecimiento.....	17
<b>2.3 <i>Recuperación de cuerpos de agua superficial mediante biorremediación</i></b> .....	<b>18</b>
2.3.1 Técnicas de biorremediación.....	19
2.3.2 Tipos de organismos utilizados en la biorremediación .....	19
2.3.3 Microalgas recomendadas .....	21
2.3.4 Proceso de biorremediación .....	23
<b>3 Metodología</b> .....	<b>24</b>
<b>3.1 <i>Lugares de estudio</i></b> .....	<b>24</b>
3.1.1 Lagunas del Parque de La Paz en San Sebastián, San José.....	24
3.1.2 Río Toyogres en Oriental, Cartago.....	25
<b>3.2 <i>Metodología Lagunas del Parque de la Paz</i></b> .....	<b>26</b>
3.2.1 Análisis de toxicidad de las lagunas del Parque La Paz .....	27
<b>3.3 <i>Metodología Río Toyogres</i></b> .....	<b>29</b>
3.3.1 Construcción de cámaras de sedimentos.....	30
3.3.2 Elaboración de bolitas de arcilla.....	30
3.3.3 Montaje del ensayo .....	31
3.3.4 Análisis de toxicidad de sedimento del Río Toyogres .....	32
3.3.5 Análisis estadístico ANOVA.....	33
<b>3.4 <i>Metodología de biorremediación a gran escala</i></b> .....	<b>34</b>

3.4.1	Cultivo y escalamiento de <i>Chlorella sp.</i> .....	34
3.4.2	Consideraciones económicas .....	34
<b>4</b>	<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Pruebas de inhibición del crecimiento de La Paz</i> .....</b>	<b>36</b>
4.1.1	Época seca La Paz .....	36
4.1.2	Época lluviosa La Paz .....	37
4.1.3	Microalga seleccionada para biorremediación .....	38
<b>4.2</b>	<b><i>Pruebas de inhibición del crecimiento en Rio Toyogres</i>.....</b>	<b>39</b>
4.2.1	Época seca Toyogres.....	39
4.2.2	Época lluviosa Toyogres .....	40
<b>4.3</b>	<b><i>Biorremediación a gran escala</i> .....</b>	<b>41</b>
4.3.1	Dosis de inoculación .....	41
4.3.2	Cosecha de microalga <i>Chlorella sp.</i> .....	42
4.3.3	Aplicación del inóculo.....	43
4.3.4	Costo económico de la estrategia de biorremediación.....	44
	<b>Conclusiones .....</b>	<b>47</b>
	<b>Recomendaciones .....</b>	<b>48</b>
	<b>Referencias .....</b>	<b>49</b>
	<b>Apéndices .....</b>	<b>53</b>
	<b>Apéndice 1: Registro fotográfico de la investigación .....</b>	<b>53</b>
	<b>Apéndice 2: Bitácora de trabajo de laboratorio.....</b>	<b>54</b>
	<b>Apéndice 3: Resultados inhibición La Paz época seca .....</b>	<b>55</b>
	<b>Apéndice 4: Resultados inhibición La Paz época LLuviosa .....</b>	<b>56</b>
	<b>Apéndice 5: Resultados inhibición Toyogres época seca.....</b>	<b>57</b>
	<b>Apéndice 6: Resultados inhibición Toyogres época LLuviosa .....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

Fig 1. Dinámica de los contaminantes por fuentes difusas .....	15
Fig 2. Representación de conteos celulares al microscopio. ....	17
Fig 3. Tipos de Biorremediación. (a) Fitorremediación. (b) Micorremediación. (c) Ficorremediación. ....	20
Fig 4. Mecanismos de degradación. (a) Bioadsorción. (b) Bioabsorción. (c) Biodegradación. ....	21
Fig 5. Microalgas autóctonas utilizadas en la investigación. ....	22
Fig 6. Proceso de biorremediación . ....	23
Fig 7. Laguna del Parque La Paz .....	24
Fig 8. Punto de muestreo Puente TEC en Rio Toyogres. ....	25
Fig 9. Puntos de muestreo en Lagunas del Parque de La Paz. ....	26
Fig 10. Representación de prueba de toxicidad La Paz. ....	28
Fig 11. Punto de muestreo en Rio Toyogres. ....	29
Fig 12. Representación del flujo. ....	30
Fig 13. Dimensiones de cámara de sedimento. ....	30
Fig 14. Preparación de bolitas de arcilla. ....	31
Fig 15. Montaje de estructuras en el río. ....	32
Fig 16. Representación de bandejas para prueba de toxicidad de sedimento. ....	33
Fig 17. Porcentaje de inhibición para La Paz en Época Seca. ....	37
Fig 18. Porcentaje de inhibición para La Paz en Época Lluviosa .....	38
Fig 19. Porcentaje de inhibición del Toyogres en Época Seca. (A) <i>Chlorella sp.</i> (B) <i>Scenedesmus sp.</i> (C) <i>Anabaena sp.</i> ....	40
Fig 20. Porcentaje de inhibición del Toyogres en época lluviosa. (A) <i>Chlorella sp.</i> (B) <i>Scenedesmus sp.</i> (C) <i>Anabaena sp.</i> ....	41
Fig 21. Sección del rio Toyogres a biorremediar. ....	42
Fig 22. Cosecha de <i>Chlorella sp.</i> ....	43
Fig 23. Elaboración de bolas de arcilla. ....	43
Fig 24. Porcentaje del costo total de la estrategia de biorremediación. ....	45
Fig 25. Porcentaje costo de biorremediar 1 Km de río. ....	46
Fig 26. Polvo de <i>Chlorella sp.</i> ....	46

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Resultados ANOVA de inhibición en el Toyogres.....	39
Cuadro 2. Dosis de inóculos a pequeña escala. ....	41
Cuadro 3. Dosis de inóculos para cubrir 1 Km de río. ....	42
Cuadro 4. Costo total de la estrategia de biorremediación. ....	44
Cuadro 5. Costo para biorremediar el cuerpo de agua superficial.....	45

## **LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS**

ODS	Objetivos de Desarrollo Sostenible
ICA	Índice de Calidad del Agua
BG11	Blue-Green 11 medium
DQO	Demanda Química de Oxígeno
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
GAM	Gran Área Metropolitana

## RESUMEN

Los cuerpos de agua superficial en áreas urbanas de Costa Rica, como las lagunas del Parque de La Paz y el río Toyogres, enfrentan severos problemas de contaminación debido a fuentes puntuales y difusas. En respuesta a estos desafíos y alineándose con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 6.6, esta investigación evalúa la viabilidad de una estrategia de biorremediación con microalgas autóctonas. Se realizaron pruebas de inhibición del crecimiento con microalgas para evaluar la reducción de toxicidad en el agua y el sedimento de estos cuerpos de agua. A través de estas pruebas, se identificó a *Chlorella sp.* como la microalga más prometedora para la remediación debido a su adaptabilidad y eficacia en condiciones estresantes. El estudio revela que la toxicidad en el Parque de la Paz aumenta en la temporada lluviosa, atribuible al arrastre de contaminantes por escorrentía; mientras que en el río Toyogres disminuye, probablemente por la dilución debida al aumento de caudal por las precipitaciones. Se desarrolló una metodología de biorremediación a gran escala que contempla la aplicación semanal de inóculos de microalgas en bolitas de arcilla para optimizar la reducción de la toxicidad y contribuir a la restauración de la salud ecológica del sistema. Esta estrategia se presenta como una solución replicable para contribuir en la recuperación de cuerpos de agua urbana en conjunto con medidas de acción como la reducción de contaminación por fuentes puntuales y la participación comunitaria en la protección del ecosistema.

**Palabras clave:** Biorremediación, Microalga *Chlorella sp.*, Cuerpo de agua superficial, Toxicidad, Inhibición del crecimiento.

## ABSTRACT

Surface water bodies in urban areas of Costa Rica, such as the lagoons of Parque de La Paz and the Toyogres River, face severe pollution problems due to point and diffuse sources. In response to these challenges and aligning with Sustainable Development Goal (SDG) 6.6, this research evaluates the feasibility of a bioremediation strategy using native microalgae. Growth inhibition tests were conducted with microalgae to evaluate the reduction of toxicity in the water and sediment of these water bodies. Through these tests, *Chlorella sp.* was identified as the most promising microalgae for remediation due to its adaptability and efficacy under stressful conditions. The study reveals that toxicity in Parque de La Paz increases during the rainy season, attributable to the entrainment of pollutants by runoff, while in the Toyogres River, toxicity decreases, probably due to dilution caused by increased water flow during rainfall. A large-scale bioremediation methodology was developed, involving the weekly application of microalgae inoculums in clay pellets to optimize the reduction of toxicity and contribute to the restoration of the ecological health of the system. This strategy is presented as a replicable solution to contribute to the recovery of urban water bodies in conjunction with action measures such as the reduction of point source pollution and community participation in the protection of the ecosystem.

**Keywords:** Bioremediation, *Chlorella sp.* Microalgae, Surface Water Body, Toxicity, Growth Inhibition.

## 1. INTRODUCCIÓN

El Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) 6.6 establece la necesidad de recuperar los ecosistemas asociados al agua, para lo cual, es necesaria la adopción e implementación de prácticas sostenibles del recurso hídrico y la mejora de su calidad a través de la reducción de la contaminación [1]. Para conseguir este objetivo, la recuperación de un cuerpo de agua que atraviesa una zona urbana requiere dos niveles de acción: la reducción de las fuentes de contaminación como los vertidos, y la remediación de la contaminación existente que puede afectar al cuerpo de agua a largo plazo.

La contaminación a largo plazo de los cuerpos de agua tiene como fuente principal la acumulación de sustancias o residuos contaminantes en los sedimentos y en las zonas aledañas [2], la cual puede resultar de una contaminación directa o difusa [3].

Esta investigación se enfoca en el estudio de dos tipos de cuerpos de agua superficial situados en áreas urbanas de Costa Rica, las lagunas del Parque de La Paz, ubicadas en San José y el río Toyogres, localizado en Cartago. Las lagunas son caracterizadas por ser cuerpos de agua estáticos, sin entradas ni salidas identificables, y de las cuales no se tiene información actualizada sobre su estado de contaminación. Por otro lado, el río Toyogres, se ha caracterizado por niveles de contaminación muy severa, según un informe disponible desde 1982 [4]. Este informe señala como principales fuentes de contaminación los vertidos de aguas domésticas y las descargas provenientes de las zonas agropecuarias situadas en la parte alta del río. Además, un estudio reciente del Índice de Calidad del Agua (ICA), realizado sobre el río Toyogres indica que, en el punto de muestreo de esta investigación, conocido como Puente TEC, hay una contaminación crítica y persistente[5].

El proceso de biorremediación en cuerpos de agua hace referencia al uso de microorganismos que tienen la capacidad de desintoxicar, reducir, degradar, mineralizar o transformar contaminantes tóxicos o inestables en formas menos perjudiciales y más estables [6]. Además, se ha comprobado que las microalgas pueden descomponer múltiples compuestos contaminantes orgánicos e inorgánicos como los medicamentos, metales pesados, plaguicidas, entre otros [7].

Teniendo en cuenta los datos disponibles sobre los cuerpos de agua previamente mencionados y las investigaciones previas sobre la efectividad de procesos de biorremediación, se plantea la posibilidad de enfrentar los problemas de contaminación

presentes en las lagunas del Parque de la Paz y el río Toyogres, mediante un enfoque de biorremediación, proporcionando un ejemplo replicable para otros entornos urbanos contaminados. Se utilizó una prueba de inhibición del crecimiento con microalgas para evaluar la toxicidad de las muestras de agua y sedimento, estos organismos se utilizan como indicadores efectivos de la calidad del agua debido a su sensibilidad [8].

En conclusión, este proyecto de investigación propone una estrategia de biorremediación que contribuye a la recuperación de cuerpos de agua al reducir la toxicidad de estos cuerpos de agua y restaurar el equilibrio ecológico, alineándose con el ODS 6.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo general

Formular una estrategia de biorremediación con microalgas para la recuperación de cuerpos de agua superficial usando como modelos las lagunas del Parque de La Paz y el río Toyogres.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Evaluar la toxicidad de cuerpos de agua superficial mediante una prueba de inhibición del crecimiento con microalgas.
- Definir microalgas adecuadas para la biorremediación de cuerpos de agua superficial según su tolerancia a la contaminación del agua.
- Determinar la viabilidad de la biorremediación de cuerpos de agua superficial con microalgas a gran escala según criterios técnicos.

## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Contaminación ambiental en cuerpos de agua superficial**

Los ecosistemas acuáticos son fundamentales para el bienestar del planeta y de todos los seres vivos, ya que proporcionan vida, sustento y oportunidades de recreación. Entre ellos se encuentran los cuerpos de agua superficiales conformados por la masa de agua, el lecho de sedimento y el entorno que lo rodea; los cuales en conjunto proporcionan hábitats para una gran diversidad de formas de vida y cumplen funciones cruciales en los ciclos hidrológicos [9]. Ejemplos de estos cuerpos de agua incluyen los ríos, quebradas, lagos, lagunas, embalses (naturales o artificiales), así como turberas o pantanos de agua dulce que se distribuyen sobre la superficie terrestre <sup>1</sup>.

En Costa Rica el crecimiento poblacional y la industrialización han intensificado la contaminación de los cuerpos de agua a un ritmo alarmante. Se estima que estos reciben diariamente alrededor de 450 000 m<sup>3</sup> de aguas residuales, lo que equivale al 84% de las aguas residuales domésticas y al 54% de las aguas residuales industriales generadas en el país [10]. Esta contaminación no solo afecta la vida acuática, sino que también pone en riesgo la salud humana, al introducir sustancias y agentes externos que alteran el equilibrio natural de estos ecosistemas <sup>2</sup>. La degradación del agua compromete su capacidad para mantener funciones ecológicas esenciales y genera efectos negativos a largo plazo para el ambiente.

#### **2.1.1 CAUSAS DE CONTAMINACIÓN EN CUERPOS DE AGUA SUPERFICIAL**

La contaminación presente en cuerpos de agua superficial puede tener varias causas, entre las cuales se incluyen procesos naturales, como las erupciones volcánicas que emiten gases y partículas, y deslizamientos de tierra que aportan sedimentos. Asimismo, también existen las causas antropogénicas como la generación de aguas residuales domésticas e industriales [10].

El proceso de contaminación en un cuerpo de agua puede introducirse directamente o de forma difusa. La contaminación directa ocurre cuando las fuentes de contaminación son claramente identificables y están ubicadas las descargas en un sitio específico [3]. Ejemplos

<sup>1</sup> Reglamento para la Evaluación y Clasificación de la Calidad de Cuerpos de Agua Superficiales N° 33903," Sistema Costarricense de Información Jurídica.

<sup>2</sup> Ley Orgánica del Ambiente N° 7554, Sistema Costarricense de Información Jurídica.

comunes incluyen vertidos de fábricas y de plantas de tratamiento de aguas residuales residenciales.

La contaminación difusa es aquella que proviene de múltiples fuentes dispersas a través de procesos de escurrimiento terrestre, precipitación, infiltración o deposición atmosférica, que resultan difíciles de rastrear porque no están localizadas ni son continuas [11]. Las principales fuentes se encuentran relacionadas con actividades agrícolas y ganaderas ya que por medio de la escorrentía superficial se disuelven y arrastran plaguicidas y fertilizantes hacia los cuerpos de agua (Figura 1) . En áreas urbanas la contaminación difusa deriva principalmente del tráfico vehicular y las sustancias tóxicas de actividades industriales [3].

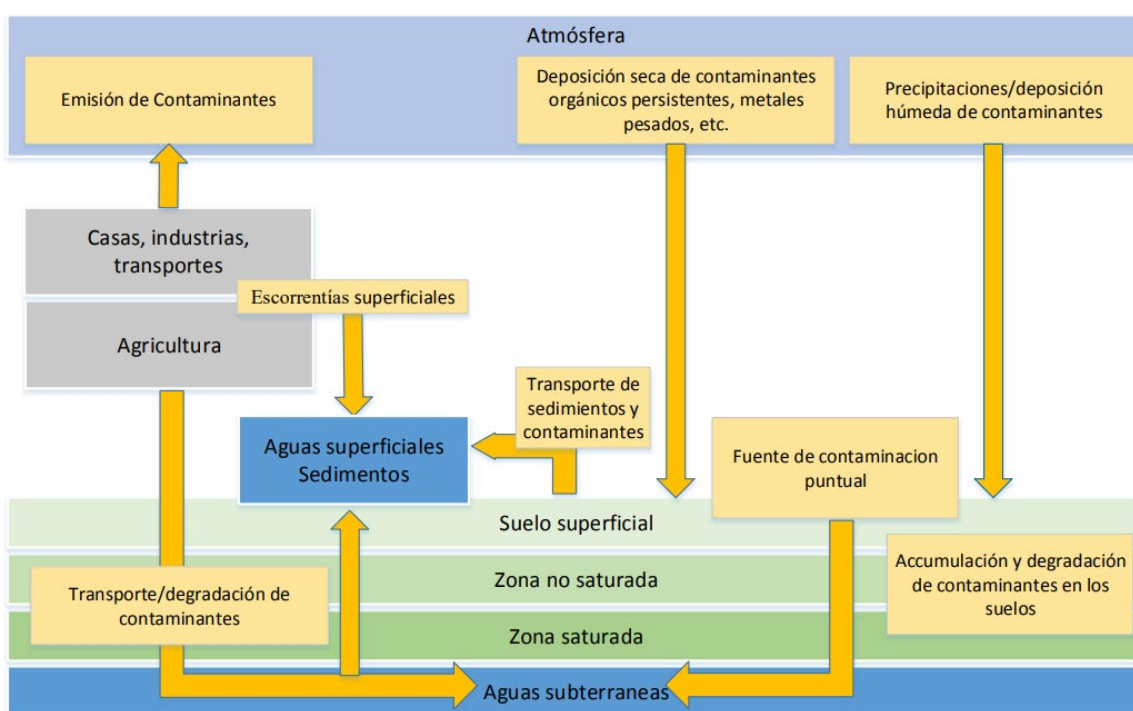


Fig 1. Dinámica de los contaminantes por fuentes difusas [11].

## 2.1.2 TIPOS DE CONTAMINANTES EN CUERPOS DE AGUA SUPERFICIAL

Los cuerpos de agua superficial pueden estar contaminados por una amplia variedad de sustancias que pueden afectar negativamente tanto al medio ambiente como a la salud humana, estos pueden clasificarse según sus características químicas en inorgánicos y orgánicos. Algunas familias de contaminantes inorgánicos incluyen las sales, minerales, ácidos, bases y metales pesados como el mercurio y el plomo [12]. El origen de estos

compuestos puede proceder de minerales presentes en la corteza terrestre, procesos volcánicos, así como también de la acción humana [13].

Por otra parte, algunos ejemplos de contaminantes orgánicos son los hidrocarburos, alcoholes, aminas y polímeros [14]. También existen compuestos orgánicos sintéticos como los contaminantes emergentes, que se pueden categorizar en plaguicidas, medicamentos, productos farmacéuticos y de cuidado personal [15]. La mayoría de los compuestos sufren diversos grados de transformaciones en el medio ambiente debido a procesos abióticos y bióticos que incluyen hidrólisis, fotólisis y oxidación [16].

## **2.2 MÉTODOS PARA MEDIR LA CONTAMINACIÓN**

La medición de la contaminación es fundamental para evaluar su magnitud e impactos en el medio ambiente y la salud humana. Por lo que se han desarrollado distintos métodos para realizar estas estimaciones, los cuales se pueden agrupar en métodos físicos, químicos y biológicos.

Los métodos físicos se centran en la medición de características físicas del agua, como la temperatura, la turbidez (que indica la transparencia), los sólidos totales (material sólido suspendido), la conductividad eléctrica (que refleja la cantidad de iones) y el pH (que indica la acidez o alcalinidad) [17].

Los métodos químicos se utilizan para analizar la composición química del agua y detectar la presencia y concentración de diversos contaminantes. Por ejemplo, se puede medir la concentración de nutrientes mediante espectroscopía, metales pesados mediante espectrometría de llama y compuestos orgánicos como plaguicidas mediante cromatografía [17].

La aplicación de métodos químicos para medir la contaminación en cuerpos de agua de flujo continuo como el río Toyogres, es compleja debido a que cada año se liberan nuevas sustancias al ambiente. Estas sustancias presentan concentraciones y una diversidad de compuestos difíciles de medir, ya que en su mayoría se encuentran como mezclas diversas [18]. Por esta razón, esta investigación se plantea el uso de microorganismos para la detección de toxicidad en las fuentes de agua.

Los métodos biológicos utilizan organismos vivos, como bacterias, algas o peces, para evaluar la toxicidad y detectar la presencia de contaminantes. Entre estos métodos se incluyen

las pruebas de toxicidad, en las cuales los organismos son expuestos a entornos contaminados. Los bioensayos que evalúan el efecto tóxico de mezclas de compuestos mediante la exposición de organismos a muestras de agua o sedimento contaminados. Además, se utiliza el biomonitoreo activo que consiste en introducir organismos sensibles en un sitio contaminado durante un periodo de tiempo definido, para observar y evaluar su desarrollo [19]. Las microalgas, en particular, son bioindicadores de contaminación y de la calidad del agua, debido a su alta sensibilidad a los cambios ambientales, la facilidad de muestreo y el amplio conocimiento de su metabolismo [20].

### 2.2.1 Prueba de inhibición del crecimiento

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó la Prueba de Inhibición del Crecimiento de Algas de Agua Dulce y Cianobacterias como metodología principal. La misma tiene como objetivo evaluar el efecto de una sustancia sobre el crecimiento de estos organismos. Durante el experimento, se cuantifica el aumento de biomasa (tasa de crecimiento específica promedio) a lo largo del periodo de exposición mediante conteos celulares al microscopio. Esto permite comparar la respuesta de los organismos expuestos a la sustancia con aquellos no expuestos (Figura 2), las cuales se mantienen en condiciones óptimas de nutrientes y luz continua [21].



Fig 2. Representación de conteos celulares al microscopio.

Se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones para el diseño del ensayo [21]: El diseño de la prueba debe incluir tres réplicas para el tratamiento y mínimo tres réplicas del control. Cuando se utiliza un disolvente para solubilizar la sustancia de prueba, se deben incluir en el diseño de la prueba controles adicionales que contengan el disolvente a la misma concentración que la utilizada en los cultivos de prueba.

La biomasa inicial debe ser lo suficientemente baja como para permitir un crecimiento exponencial durante todo el período de incubación se recomienda  $10^4$ . Se utiliza medio de cultivo óptimo para el crecimiento y mantenimiento de microalgas conocido como Blue-Green 11 medium (BG11), el cual asegura la cantidad de nutrientes necesarios incluso para 3 semanas de crecimiento.

Una tasa de crecimiento específica significativamente más baja en el primer día, en comparación con la tasa de crecimiento promedio total, puede indicar una fase de latencia. Esto sugiere que los organismos están ajustando su fisiología para adaptarse a las condiciones del nuevo medio. También puede reflejar un proceso de recuperación después de un estrés tóxico inicial.

### **2.3 RECUPERACIÓN DE CUERPOS DE AGUA SUPERFICIAL MEDIANTE BIORREMEDIACIÓN**

La recuperación de cuerpos de agua superficial no implica necesariamente devolver el sistema a su estado original exacto. En cambio, se pueden realizar esfuerzos para mejorar la calidad, funcionalidad y salud ecológica del sistema afectado [22]. Para lograrlo, se requiere un enfoque multidimensional que combine regulaciones ambientales efectivas, tecnologías sostenibles, sistemas de tratamiento de aguas residuales y la gestión adecuada de residuos. La integración de prácticas agrícolas e industriales responsables, junto con la preservación de ecosistemas naturales, es fundamental para minimizar el impacto de las fuentes de contaminación. Además, la participación comunitaria y la educación ambiental desempeñan un papel crucial en la protección y restauración de estos ecosistemas [23].

Una estrategia para recuperar cuerpos de agua es la biorremediación, una herramienta que permite recuperar el equilibrio natural de un sitio contaminado [24]. Esto se logra utilizando organismos vivos para degradar, neutralizar, desintoxicar o inmovilizar contaminantes [6]. Estos organismos, como bacterias, hongos, plantas o microalgas, aprovechan los contaminantes como fuente de alimento y energía, lo que facilita su eliminación. Una de las principales ventajas de la biorremediación es que es un proceso natural que no perturba demasiado el sitio ni afecta la comunidad circundante. Además, genera pocos subproductos, los cuales no representan una amenaza para el ecosistema [25]. Un ejemplo común es el uso

de microorganismos para la biorremediación de derrames de petróleo. Los organismos absorben el petróleo mientras consumen oxígeno y otros nutrientes, liberando agua y gases como subproductos. Este proceso es eficaz y menos invasivo que otros métodos de limpieza, como la excavación o el uso de químicos. Además, la biorremediación es una alternativa rentable, ya que requiere menos maquinaria, mano de obra y energía en comparación con otros enfoques de descontaminación [25].

### **2.3.1 Técnicas de biorremediación**

Existen dos técnicas de biorremediación *ex situ* la cual consiste en el transporte del material contaminado para ser tratado en biorreactores, compostaje, biopilas o biolabranza. Así como también se puede realizar el tratamiento de los contaminantes *in situ*, es decir, que ocurren en el lugar [6]. Lo cual puede lograrse al agregar aire (bioventeo), nutrientes (bioestimulación) y la bioaumentación consiste en la adición de microorganismos competentes, bien sean autóctonos o exógenos, para la degradación de contaminantes [26]. La bioaumentación puede ser exitosa al considerar la biodisponibilidad, concentración, y toxicidad de los contaminantes sobre los microorganismos, así como la presencia de depredadores y competencia entre especies [27].

### **2.3.2 Tipos de organismos utilizados en la biorremediación**

Los diferentes tipos de biorremediación se pueden clasificar por los organismos utilizados, como por ejemplo la fitorremediación (Figura 3.a) utiliza plantas para reducir la movilidad de los contaminantes o extraerlos de la matriz contaminada, logrando esto mediante dos mecanismos la acumulación e inmovilización en las raíces y en la parte aérea de las plantas, o la volatilización a la atmósfera [28]. En la micorremediación (Figura 3.b) se utilizan hongos para la descomposición y transformación de contaminantes orgánicos, entre ellos, plaguicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, residuos de diésel, productos farmacéuticos [29].

La ficorremediación (Figura 3.c) utiliza la capacidad de las microalgas para realizar la fotosíntesis, aprovechando los sustratos de carbono orgánico e inorgánico, posicionándose como productoras primarias en las cadenas tróficas [30]. Son útiles por su capacidad de biorremediar contaminantes como hidrocarburos poliaromáticos, plaguicidas como

clorpirifós, metales pesados como cadmio y contaminantes emergentes como medicamentos o productos de cuidado personal que se clasifican como disruptores endocrinos [31], [32].



**Fig 3. Tipos de Biorremediación. (a) Fitorremediación. (b) Micorremediación. (c) Ficorremediación.**

Las microalgas son un grupo de organismos procariotas y eucariotas, capaces de aprovechar la energía lumínica y el dióxido de carbono para producir biomasa y oxígeno [33]. Su cultivo comienza en biorreactores cerrados a pequeña escala, y luego se escala a sistemas de cultivo abiertos tipo *raceway*, los cuales permiten cosechar grandes volúmenes de microalgas de manera más eficiente [33]. Para optimizar el cultivo de microalgas y lograr que dupliquen su biomasa en un rango de 3.5 a 24 horas, es fundamental controlar factores como el pH, la salinidad, la disponibilidad y concentración de nutrientes, la intensidad y el tipo de luz, la densidad celular del cultivo, la temperatura, la depredación por otros organismos y la contaminación del medio [34].

Las microalgas emplean tres mecanismos para el proceso de remediación la bioadsorción, bioabsorción y la biodegradación [7]. La bioadsorción ocurre cuando las sustancias se adsorben en la pared celular (Figura 4.a), es un proceso pasivo en el cual el contaminante no actúa metabólicamente con la microalga [35]. El segundo mecanismo es la bioabsorción o bioacumulación que implica el transporte del contaminante al interior de la célula (Figura 4.b), ya sea por difusión pasiva, difusión facilitada o absorción activa. Por último, la biodegradación, que consiste en la transformación de compuestos complejos en moléculas de descomposición más simples mediante degradación metabólica catalítica (Figura 4.c), esto puede ocurrir intracelular o extracelularmente [7]. Además, las microalgas producen enzimas y compuestos bioactivos, que las hacen ideales para la recuperación de entornos contaminados porque aceleran los procesos naturales de restauración [36].

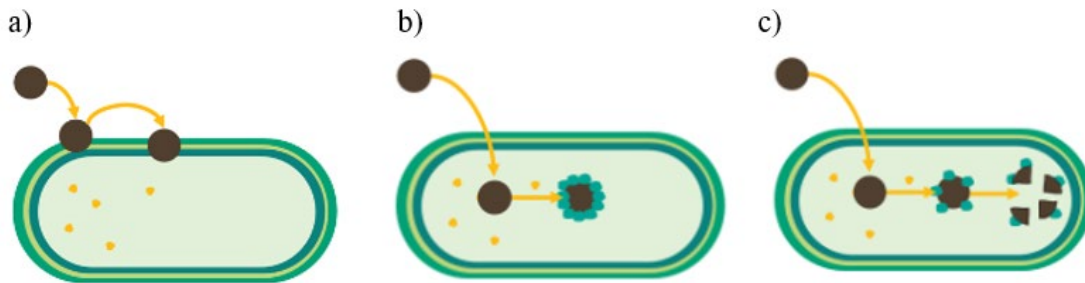


Fig 4. Mecanismos de degradación. (a) Bioadsorción. (b) Bioabsorción. (c) Biodegradación.

### 2.3.3 Microalgas recomendadas

La aplicación de ficorremediación implica seleccionar especies de microalgas que soporten las condiciones del medio y las posibles concentraciones de contaminantes, a continuación, se muestran investigaciones de los 4 tipos de microalgas que se utilizaron en la investigación: La microalga *Chlorella sp.* crece en agua dulce e incluso en suelos encharcados y está presente en la Tierra desde hace 2 500 millones de años y desde entonces su integridad genética se mantiene constante. Se caracteriza por ser un alga unicelular que posee un único cloroplasto y un núcleo, tiene forma esférica o elipsoide, mide entre 2-10  $\mu\text{m}$  de diámetro, en la Figura 4 se muestra cómo se ven las células al microscopio [30].

Estos microorganismos son adecuados para la biorremediación debido a su robustez y adaptabilidad, ya que tienen la capacidad de crecer con diferentes tipos de alimentación, pueden tolerar ambientes hostiles en términos de temperatura, deficiencia de nutrientes, pH y salinidad [30]. Además, se ha encontrado que estas microalgas forman parte de la microflora autóctona de aguas naturales y establece sinergias con otros microorganismos para lograr la biorremediación [8].

*Chlorella sp.* se considera uno de los géneros con mayor tolerancia, ha demostrado una notable capacidad para eliminar nutrientes, carga orgánica y metales como aluminio, calcio, hierro, magnesio y manganeso, con porcentajes entre el 56 y el 100% [37]. También se ha utilizado para remover contaminantes emergentes, como el florfenicol, un antibiótico comúnmente utilizado en la acuicultura, logrando una eliminación superior al 95%, principalmente a través de la biodegradación. Asimismo, se ha demostrado su capacidad para

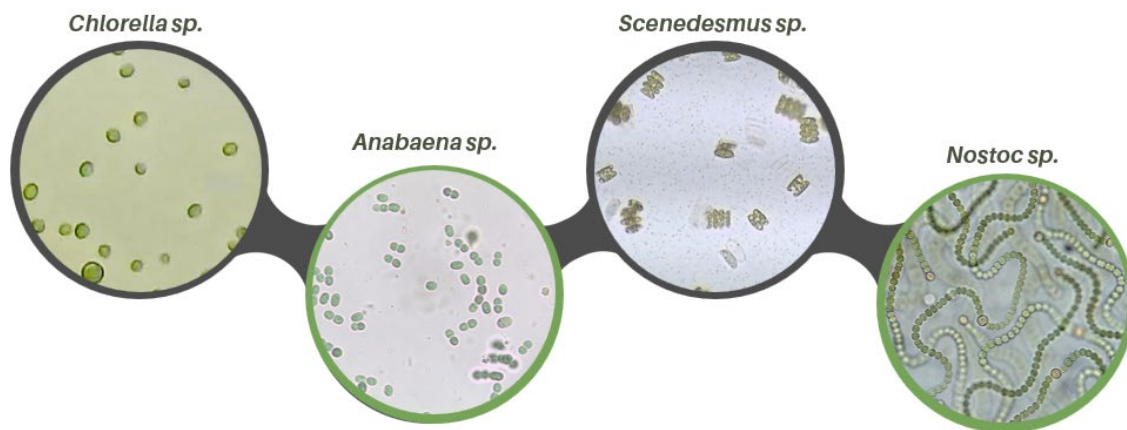
eliminar medicamentos como el ibuprofeno  $94\% \pm 1\%$ , el ácido salicílico  $98\% \pm 2\%$  y el triclosán  $100\% \pm 0\%$  [38].

*Scenedesmus sp.* es una especie de microalgas de agua dulce estudiada por su capacidad para remover nutrientes inorgánicos de aguas residuales. Al usar nitrato o urea como fuente de nitrógeno se logró remover 90% de nitrógeno total y casi el 87.8% de fósforo total [39]

De acuerdo con [40], *Scenedesmus sp.* tuvo un buen desempeño en el tratamiento de aguas residuales de una tenería, demostró una relación inversa entre el aumento de la biomasa y la disminución en la concentración de compuestos como cromo 98%, nitratos 90%, fosfatos 99% y la demanda bioquímica de oxígeno 88%, por lo que concluyó que esta microalga emplea el agua residual como un sustrato de crecimiento óptimo.

Otra especie de microalga que ha resultado exitosa en la biorremediación es *Anabaena sp.*, se reporta su capacidad de remover un 93% la Demanda Química de Oxígeno (DQO), 98% cromo, aceites, grasas y una reducción considerable de Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), turbidez y sólidos disueltos en aguas residuales [41]. Otro caso de estudio mostró que *Anabaena sp.* logró remover un 91,18% DBO, 82,54% DQO y 70,88% de metales pesados en efluentes de aguas farmacéuticas y textiles [42].

*Nostoc sp.* se destaca por ser capaz de prosperar en condiciones extremas como altas temperaturas, pH ácidos, altas concentraciones de sal y metales pesados, por lo que el estudio [43] evaluó su potencial para remediar las aguas del río Yamuna. Principalmente ha sido utilizada para la recuperación de cuerpos de agua por su capacidad de remoción de nutrientes, en una laguna con actividad piscícola logró remover más del 50% de nitratos y fosfatos [44].



**Fig 5. Microalgas autóctonas utilizadas en la investigación.**

### 2.3.4 Proceso de biorremediación

El proceso de biorremediación es un conjunto de acciones y procedimientos diseñados para recuperar cuerpos de agua afectados por la contaminación, llevándolos a un estado seguro y saludable para el ecosistema [45].

Se proporciona un marco general para desarrollar un proceso de biorremediación con microalgas [45], abordando los siguientes aspectos clave:

1. Investigación y caracterización de la contaminación y el sitio a remediar determinación de la composición química de los contaminantes, concentración, identificación de los microorganismos nativos, niveles de oxígeno, pH y temperaturas; así como de las características hidrogeológicas.
2. Propuesta de biorremediación en función del estudio realizado se debe determinar la técnica de biorremediación que se ajuste a las condiciones encontradas y los recursos necesarios.
3. Desarrollo del inóculo de los organismos seleccionados para realizar el cultivo y escalamiento respectivo.
4. Aplicar el tratamiento adecuado en la zona afectada, se debe seguir el mecanismo que favorezca las condiciones de los organismos seleccionados.
5. Control y seguimiento de la efectividad del sistema elegido se debe contar con técnicas de evaluación, por ejemplo, medición de la concentración de contaminantes, pruebas de inhibición del crecimiento.



Fig 6. Proceso de biorremediación [45].

### 3 METODOLOGÍA

La metodología se divide en tres secciones la primera es del parque La Paz, para evaluar la toxicidad del agua y definir cuales microalgas son adecuadas para la biorremediación. En segundo lugar, la del Rio Toyogres para simular la biorremediación del sedimento. Finalmente, la tercera sobre la viabilidad de la estrategia a gran escala.

#### 3.1 LUGARES DE ESTUDIO

Los lugares de estudio de esta investigación son cuerpos de agua superficial del Gran Área Metropolitana (GAM) de Costa Rica los cuáles están expuestos a fuentes de contaminación que afectan sus condiciones naturales.

##### 3.1.1 Lagunas del Parque de La Paz en San Sebastián, San José

El Parque de la Paz es uno de los pocos sitios con áreas verdes que presta servicios ecosistémicos en el distrito de San Sebastián en la ciudad de San José. Este sitio fue seleccionado porque está interconectado con el Corredor Biológico Interurbano María Aguilar un espacio que contribuye al mantenimiento de la biodiversidad, posibilitando la migración y la dispersión de especies de flora y fauna [23]. Este parque cuenta con dos lagunas de agua estancada o de movimiento lento [46], que se encuentran rodeadas de tierra y no cuentan con entradas o salidas de agua visibles, por lo que su volumen depende de la estación lluviosa o seca. Ambas lagunas cuentan con gran área superficial y poca profundidad de 1m aproximadamente, por lo tanto, constituye un excelente modelo para el estudio de la contaminación difusa y de contaminantes con capacidad de acumulación.



**Fig 7. Laguna del Parque La Paz [46].**

### 3.1.2 Río Toyogres en Oriental, Cartago

El río Toyogres ubicado en Cartago, se ha caracterizado por niveles de contaminación muy severa, según un informe disponible desde 1982 [4]. Este informe señala como principales fuentes de contaminación los vertidos de aguas domésticas debido a la falta de alcantarillado sanitario para su tratamiento [10] y también la contaminación difusa por escorrentías de las zonas agropecuarias situadas en la parte alta del río.

Además, en [4] se realizó el Índice de Calidad del Agua (ICA), sobre el río Toyogres el cual indica que, en el punto de muestreo de esta investigación, conocido como Puente TEC, donde predomina la zona urbanizada, hay una contaminación crítica y persistente. Los indicadores más relevantes incluyen los coliformes fecales, demanda biológica de oxígeno ( $DBO_5$ ), oxígeno disuelto, nitratos, amonio y fosfatos los más importantes.

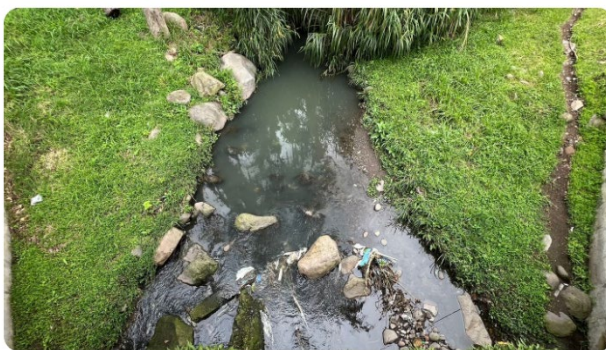
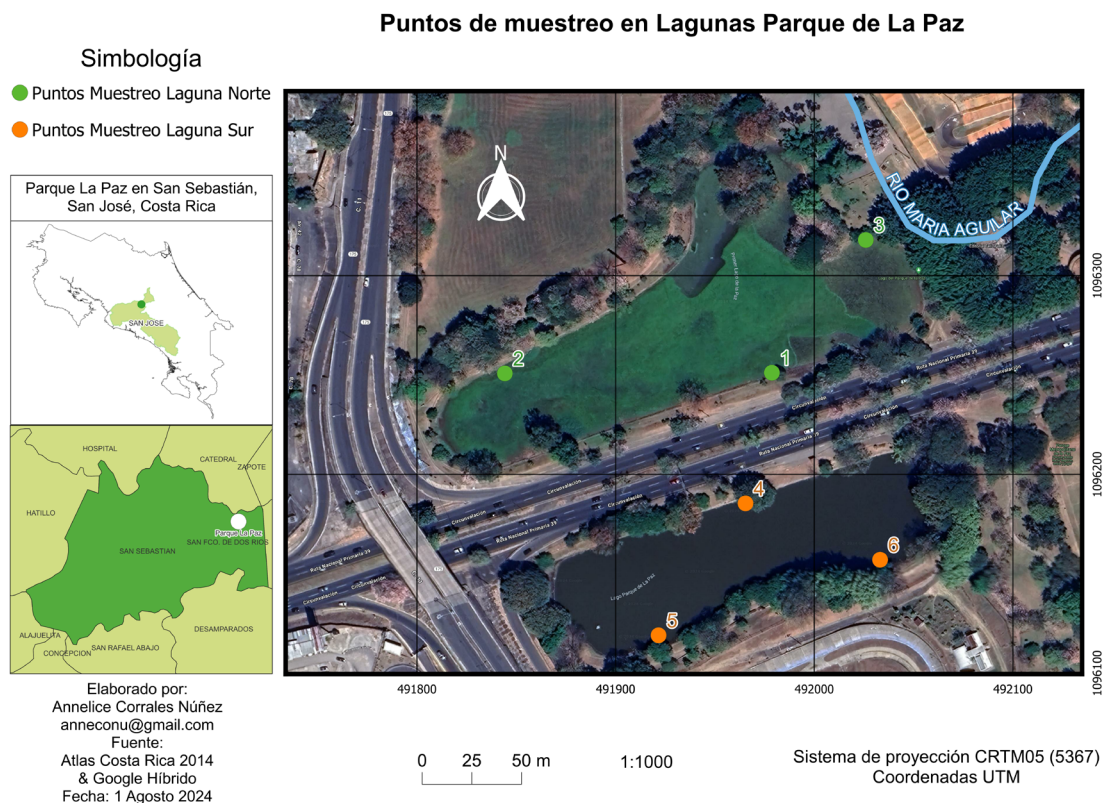


Fig 8. Punto de muestreo Puente TEC en Río Toyogres.

### 3.2 METODOLOGÍA LAGUNAS DEL PARQUE DE LA PAZ

Se realizaron muestreos en época seca y en época lluviosa, de cada una de las lagunas como se muestra en la Figura 8. En cada punto se tomó 1 L de agua y se refrigeró a 4 °C.



**Fig 9. Puntos de muestreo en Lagunas del Parque de La Paz.**

En el estudio preliminar [36], se analizaron más de 80 compuestos químicos mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas, incluyendo metales, compuestos orgánicos volátiles y antibióticos de uso humano. De estos, solo se cuantificaron 0.2 ppm de Estroncio, 19 ppm de Potasio y 75 ppm de Sílice, sin que ninguno alcanzara niveles alarmantes. Los demás compuestos se detectaron a una concentración inferior al límite de cuantificación de 1 ug/L. Sin embargo, es posible que la mezcla de varios compuestos en pequeñas cantidades genere toxicidad lo cual se podrá comprobar en las pruebas de inhibición del crecimiento.

Por otra parte, se cultivaron las cepas autóctonas *Chlorella sp.*, *Scenedesmus sp.* y *Anabaena sp.*, las cuales pertenecen a la colección de microalgas del Centro de Investigación en

Biotecnología del Instituto tecnológico de Costa Rica (CIB-ITCR). Estas cepas fueron cosechadas y dosificadas para los ensayos.

Finalmente, se llevó a cabo un análisis de toxicidad utilizando la prueba de Inhibición del Crecimiento para Algas y Cianobacterias de Agua Dulce propuesta por la OECD [21], en este caso se seleccionaron los géneros de microalgas sugeridas por el método, que incluyen *Chlorella sp*, *Scenedesmus sp* y *Anabaena sp*. Además, se hizo simulando las lagunas en pozos pequeños que tenían una similitud en la proporción de extensión y profundidad.

### 3.2.1 Análisis de toxicidad de las lagunas del Parque La Paz

El procedimiento implicó realizar conteos celulares cada 24 horas durante un período de 72 horas para estimar la tasa de crecimiento y el porcentaje de inhibición.

1. Se esterilizaron 8 placas de 6 pozos, mediante radiación UV a 60 W durante 30 min.
2. Se agregaron 5 ml de medio de cultivo BG11 en los pozos de los controles C's.
3. Se agregaron 2.5 ml de medio de cultivo BG11 en los pozos de tratamiento R's.
4. Se agregaron 2.5 ml de muestra de agua de las lagunas en los pozos de tratamiento del R1 al R5. Solo el pozo N6 contuvo 2.5 ml de agua estéril.
5. Se inocularon todos los pozos con 250 µl de *Chlorella sp*. a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml, excepto el pozo 6 del tratamiento.
6. Se tomaron muestras de 100 µl de todos los pozos y se realizó el conteo inicial 0 h.
7. Se repitieron los pasos del 1 al 6 con *Scenedesmus sp* y *Anabaena sp*.
8. Las 8 bandejas se dejaron incubando de manera estática, expuestas a una intensidad lumínica de 700 lux y una temperatura de 22°C.
9. Luego de 24, 48 y 72 horas, se tomaron muestras de 100 µl y se realizó el conteo de todos los pozos.
10. Se calculó la tasa de crecimiento y la inhibición mediante las siguientes fórmulas:

$$C_{0-i} = \frac{\ln X_i - \ln X_0}{t_i - t_0} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Donde:

$C_{0-i}$  tasa de crecimiento específico promedio desde tiempo 0 hasta i;

$X_0$  es la biomasa al tiempo 0;

$X_i$  es la biomasa al tiempo i.

$$\%I_r = \frac{\mu_c - \mu_T}{\mu_c} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2}$$

Donde:

$I_r$  porcentaje de inhibición en la tasa de crecimiento específico promedio;

$\mu_c$  valor promedio de la tasa de crecimiento del grupo control;

$\mu_T$  tasa de crecimiento específico promedio para la réplica del tratamiento.

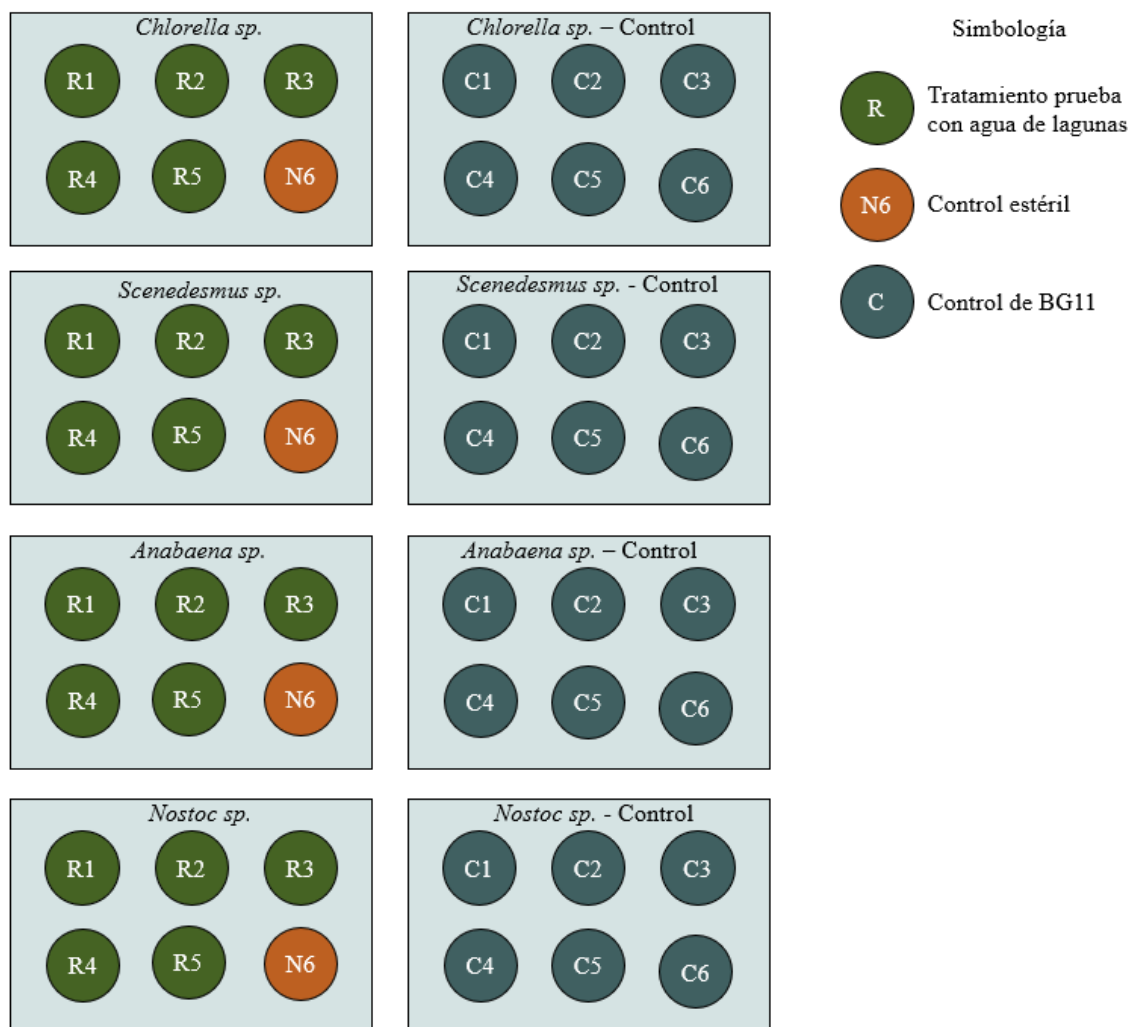
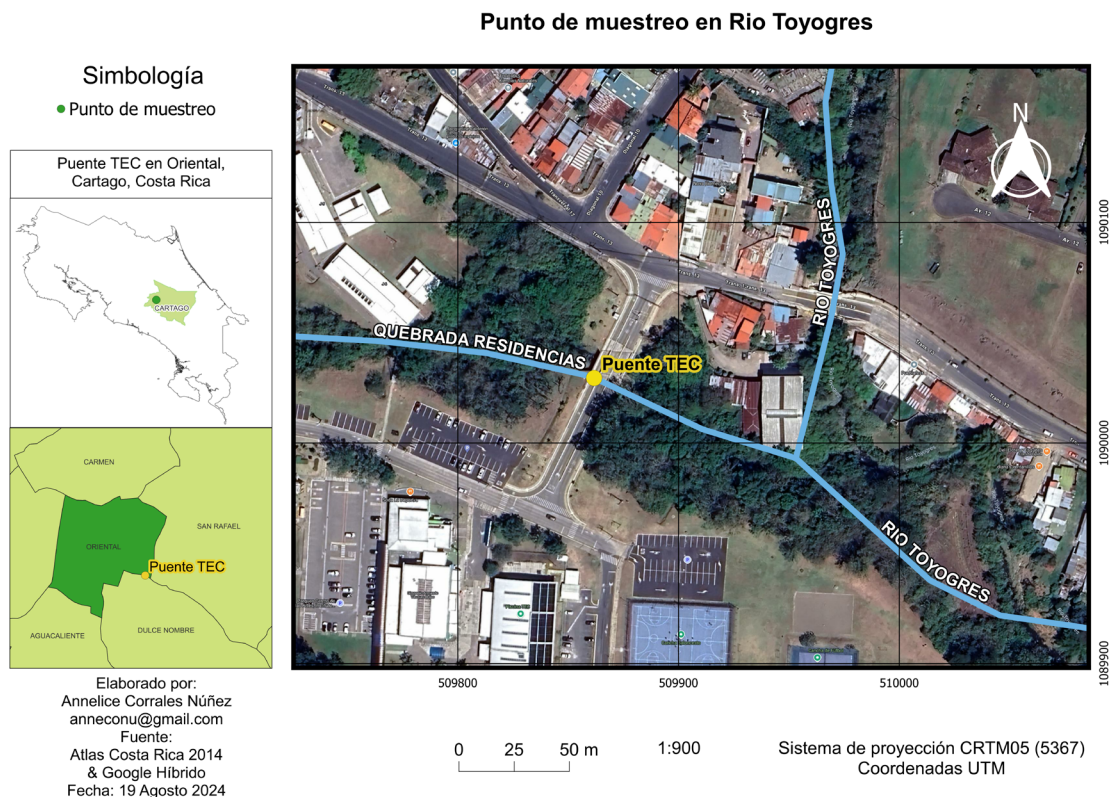


Fig 10. Representación de prueba de toxicidad La Paz.

### 3.3 METODOLOGÍA RIO TOYOGRES

El punto de muestreo seleccionado está ubicado 100m noroeste de la piscina del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), sobre la Quebrada Residencias bajo el puente de la entrada lateral como se muestra en la Figura 10. Este sitio fue elegido porque de acuerdo con el índice de calidad del agua superficial aplicado, se determinó que era el sitio con la contaminación más severa, entre varios puntos de muestreo [5].



El enfoque en este cuerpo de agua se centró en reducir la toxicidad de las muestras de sedimento del río, dado que *Chlorella sp.* es el género más comúnmente empleado en procesos de biorremediación [8], se optó por utilizar esta cepa en los inóculos.

Para realizar los ensayos de biorremediación de sedimento, se detallan cuatro procedimientos. Primero, se construyeron 6 estructuras conocidas como cámaras de sedimentos. En segundo lugar, se prepararon las bolitas de arcilla. Luego, se incorporaron las bolitas inoculadas con *Chlorella sp.* y otras sin inocular en las cámaras de sedimento. Por

último, se tomaron muestras de sedimento para realizar pruebas de inhibición del crecimiento, con modificaciones de tiempo de la prueba original (Apéndice 1). Se realizaron conteos al inicio 0 horas y a las 24 horas durante 7 semanas y se utilizaron los tres géneros de microalgas recomendadas [21].

### 3.3.1 Construcción de cámaras de sedimentos

Para la realización de los ensayos, se construyeron 6 cámaras que contenían sedimentos del río, permitiendo que el agua del río pasara por encima del sedimento contenido en la cámara como se muestra en la Figura 11. Para esto, se requirieron tubos de PVC de 3 pulgadas, tapones, hules y varillas de acero, según las dimensiones de la Figura 12.

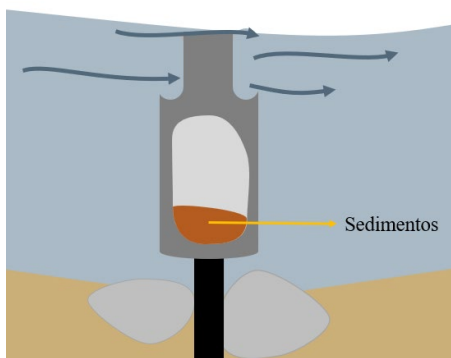


Fig 12. Representación del flujo.

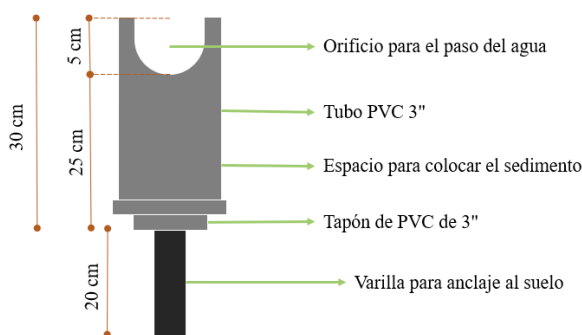


Fig 13. Dimensiones de cámara de sedimento.

### 3.3.2 Elaboración de bolitas de arcilla

Se utilizó la técnica de bolas de arcilla con microorganismos para inocular el sedimento, permitiendo una liberación lenta de las microalgas.

1. Se prepararon inóculos de *Chlorella sp.* en una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml.
2. Se hicieron y pesaron 6 bolas de arcilla de 10 gramos, y luego se colocaron en la estufa hasta que el peso fue inferior a 8 gramos.
3. Se dejaron enfriar las bolas de arcilla, y solo a tres se les añadió lentamente 2 ml del inóculo de *Chlorella sp.* a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/ml. Al mezclar cada bola de arcilla con 200 ml de sedimento, se alcanzó una concentración final de  $5 \times 10^4$  células/ml, que

correspondía a la utilizada en los ensayos de La Paz y se ajusta a la recomendación de la prueba original.

Si bien se considera que para una liberación más lenta de las microalgas es mejor pulverizar la arcilla seca y luego mezclarla con el inóculo. El procedimiento que se utilizó aseguró que los inóculos tuvieran la misma cantidad de células, ya que la mezcla de microalgas con la arcilla podría no ser homogénea o podría provocar la ruptura de muchas células durante el proceso de homogenización.

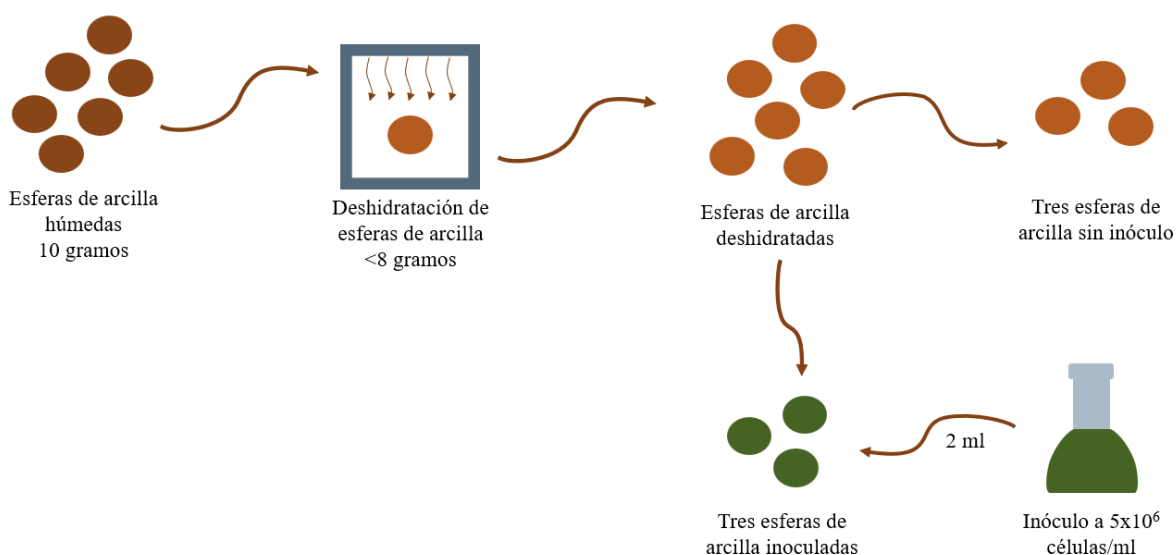


Fig 14. Preparación de bolitas de arcilla.

### 3.3.3 Montaje del ensayo

1. Se tomaron muestras del sedimento del río para un volumen de 3 litros en total.
2. Se mezclaron los sedimentos y se removió el agua sobrenadante o en exceso.
3. Dentro de cada cámara se colocaron 200 ml de sedimento y se anclaron en el río.
4. Se extrajeron 5 ml de sedimento de cada cámara y se reservaron en tubos falcon de 50 ml para realizar el ensayo de toxicidad del estado inicial.
5. Se colocaron las 3 bolas de arcilla inoculadas en cada una de las cámaras del tratamiento de Prueba P<sup>s</sup> y las otras 3 bolitas sin inocular se colocaron en las cámaras de control C<sup>s</sup>.

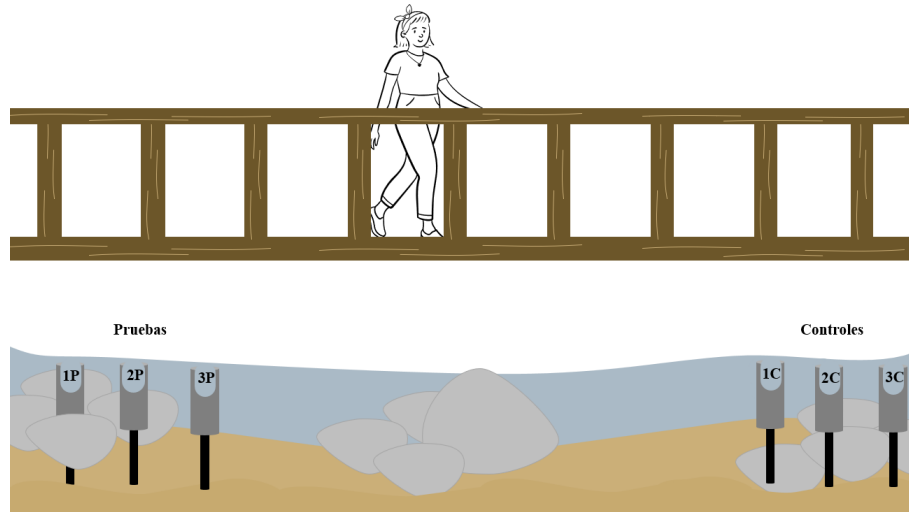


Fig 15. Montaje de estructuras en el río.

### 3.3.4 Análisis de toxicidad de sedimento del Río Toyogres

1. Para cada muestra de sedimento extraída de las cámaras (1P, 2P, 3P, 1C, 2C y 3C), se mezclaron 5 ml del sedimento con 15 ml de medio de cultivo BG11. Se agitó bien y se dejó reposar por unos minutos para que la arena sedimentara.
2. Se tomaron 5 ml del sobrenadante de la mezcla y se agregó en los pozos correspondientes P's y C's de la bandeja de tratamiento.
3. Se inocularon los pozos de la bandeja de tratamiento con 250  $\mu$ l de inóculo de *Chlorella sp.* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.
4. Se agregaron 5 ml de medio BG11 a 3 pozos de la bandeja control (1T, 2T y 3T) y se inocularon con 250  $\mu$ l de *Chlorella sp.* a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml.
5. Se tomaron muestras de 100  $\mu$ l de todos los pozos y se realizó el conteo inicial 0 h.
6. Se repitieron los pasos del 1 al 6 con *Scenedesmus sp.* y *Anabaena sp.*
7. Las bandejas de tratamiento y control de cada microalga se dejaron incubando con luz durante 24 horas.
8. Luego de 24 horas, se tomaron muestras de 100  $\mu$ l y se realizó el conteo de todos los pozos.
9. Se calculó la tasa de crecimiento y la inhibición usando las ecuaciones 3.1 y 3.2.

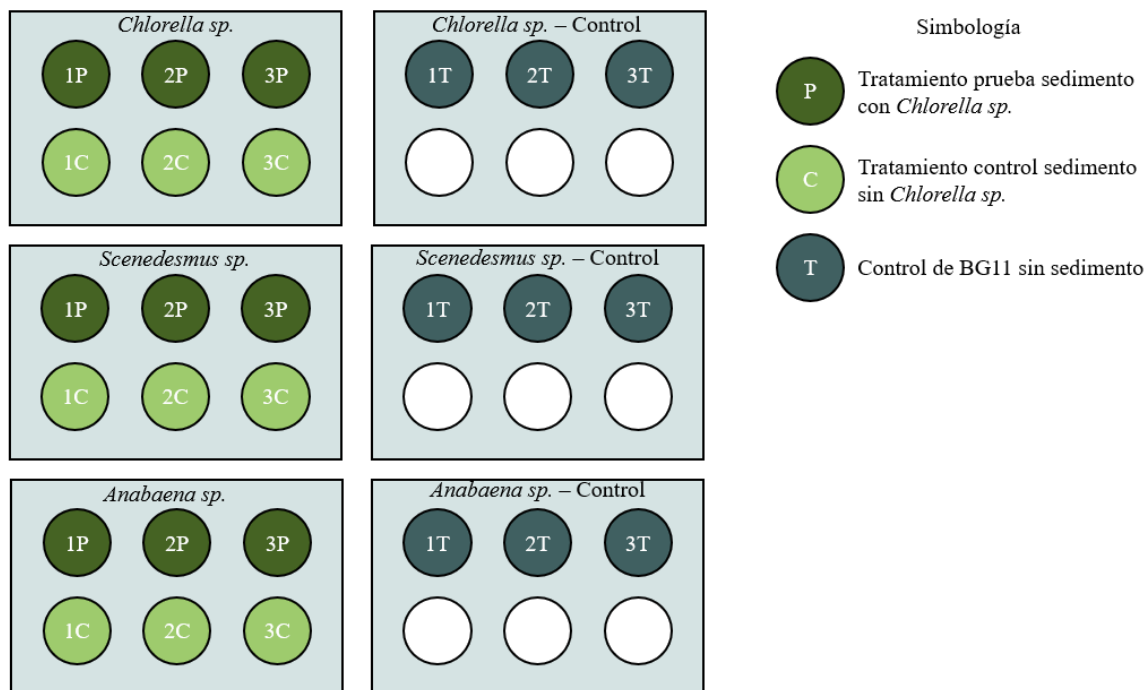


Fig 16. Representación de bandejas para prueba de toxicidad de sedimento.

### 3.3.5 Análisis estadístico ANOVA

Se analizaron los datos de ambas épocas de muestreo y se verificó que los resultados presentaban homocedasticidad y normalidad, seguidamente, se procedió a realizar el análisis de varianza ANOVA con el software estadístico R Studio. Se utilizó el análisis de varianza de un factor para determinar si existía diferencia significativa entre la respuesta promedio de las microalgas en las cámaras de “Prueba” (inoculadas) y las de “Control” (Sin inocular) [47]. Además, se analizó si existía diferencias entre las semanas que se aplicó el inóculo y en las que no se aplicó.

En el análisis se considera que en la hipótesis nula ( $H_0$ ): Los promedios son iguales entonces no hay diferencia significativa; y en la hipótesis alternativa ( $H_1$ ): Hay al menos un promedio distinto, que si genera una variación significativa. Para saber cuál hipótesis se acepta se interpreta la probabilidad (P) de que las muestras pertenezcan a una misma población de datos, cuando ( $p \leq 0,05$ ) indica que la probabilidad de que sean de la misma población es de 5%, es decir, se puede inferir que las respuestas si son distintas cuando se aplica el inóculo, por lo tanto, se acepta  $H_1$  con un 95% de confianza.

### **3.4 METODOLOGÍA DE BIORREMEDIACIÓN A GRAN ESCALA**

Considerando la cantidad de sedimento, la cantidad y concentración del inóculo que se utilizó para el ensayo a pequeña escala, se estimó la cantidad y concentración de inóculo necesario para aplicar en el cuerpo de agua. Se midió el ancho, largo y profundidad de sedimento en la zona del río Toyogres seleccionada para obtener el volumen de sedimento que se desea biorremediar.

#### **3.4.1 Cultivo y escalamiento de *Chlorella sp.***

Para obtener la cantidad de inóculo establecido en la sección anterior se realizó el escalamiento de *Chlorella sp.* en un Erlenmeyer hasta llegar a 800 L de una tanqueta en un período de 3 meses sin considerar inconvenientes por contaminación del cultivo u otros factores. Para realizar el escalamiento se consideró el trabajo de un asistente de laboratorio 15h a la semana (180h total) y un investigador profesional 2 h a la semana (24h total) para supervisar las condiciones del cultivo.

Los materiales necesarios son un microscopio para hacer los conteos celulares, un medidor de pH, una balanza, una máquina de autoclave, medio de cultivo BG11, 800 L de agua y equipo de protección personal. Una vez lista la tanqueta se procedió a centrifugarla para obtener la biomasa a la concentración requerida y de esta forma poder agregarla a las bolas de arcilla.

#### **3.4.2 Consideraciones económicas**

Se realizó un costo global de toda la fase de diagnóstico de los dos cuerpos de agua evaluados en época seca y lluviosa durante el año 2023 hasta agosto 2024. Se contemplaron visitas de campo en ambos sitios, análisis físicoquímicos, materiales para las pruebas de inhibición y para las cámaras de sedimento que se colocaron en el río. Además, para calcular el costo de los equipos se consideró el costo del equipo nuevo, la vida útil, años de garantía y un tiempo de uso aproximado de 180 horas para estimar el costo de uso de cada equipo.

Posteriormente se hizo un presupuesto reducido que contempla lo necesario para biorremediar el sedimento del cuerpo de agua, de manera tal que se pueda tener una perspectiva del costo si se desea replicar en otro cuerpo de agua.

Para esto se consideró que el cultivo de microalgas ya está escalado debido a que es una de las actividades constantes que se realizan en el (CIB-ITCR) que nos aseguran poder tener el cultivo listo para cuando se necesite, se contempló 1 semana de trabajo en el laboratorio de microalgas del (CIB-ITCR) para realizar las pruebas de toxicidad y las pruebas de monitoreo en campo durante 4 semanas.

Finalmente se estimó el costo final por litro de biomasa concentrada para compararlo con los precios de biomasa preparada en China.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados de las pruebas de inhibición del crecimiento de microalgas para los cuerpos de agua superficial en época seca y lluviosa. Posteriormente, se resaltan los aspectos a considerar para la estrategia de biorremediación a escala real.

Para la interpretación de los gráficos se debe considerar que el sombreado de color que tiene cada curva de datos corresponde a la desviación estándar respectiva.

### 4.1 PRUEBAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LA PAZ

Para ambas épocas de muestreo se observa que, ante un aumento en el tiempo de exposición, la tasa de crecimiento de las microalgas aumenta. La inhibición disminuye con el paso del tiempo acercándose a 0% a las 72 horas después de montar el ensayo, lo cual indica que las microalgas se recuperaron después de un estrés tóxico inicial [21].

Al contrastar los promedios de los porcentajes de inhibición de las dos épocas, se resalta que los datos de la época lluviosa son mucho más altos (Zona de líneas discontinuas negras en la Figura 16 y 17) , lo cual puede deberse a que los contaminantes son arrastrados por la escorrentía superficial [11].

#### 4.1.1 Época seca La Paz

Los datos presentan una cinética de crecimiento normal, es decir, las microalgas presentan un crecimiento exponencial debido a que la inhibición disminuye con el tiempo.

De acuerdo con los porcentajes de inhibición, ninguna de las microalgas supera el 100% (Figura 16) . Además, se aprecia que *Anabaena sp.* y *Scenedesmus sp.* manifiestan inhibición durante las primeras horas de exposición, no obstante, a las 72 horas el porcentaje de inhibición se reduce considerablemente para las dos microalgas. Por su parte *Chlorella sp.* al inicio del ensayo no presentó inhibición, ni tampoco se evidencia un posible proceso de latencia a las 24 horas del ensayo.

Por su parte *Nostoc sp.* tuvo un comportamiento de inhibición distinto en comparación con las demás especies, al inicio del ensayo tenía dificultades para crecer, luego se observa una disminución en la inhibición del crecimiento hasta las 72 horas, donde se vuelve a observar

un aumento de inhibición. Esto sugiere que esta microalga prefiere otros hábitats con condiciones extremas como altas temperaturas, pH ácidos o altas concentraciones de sal [43].

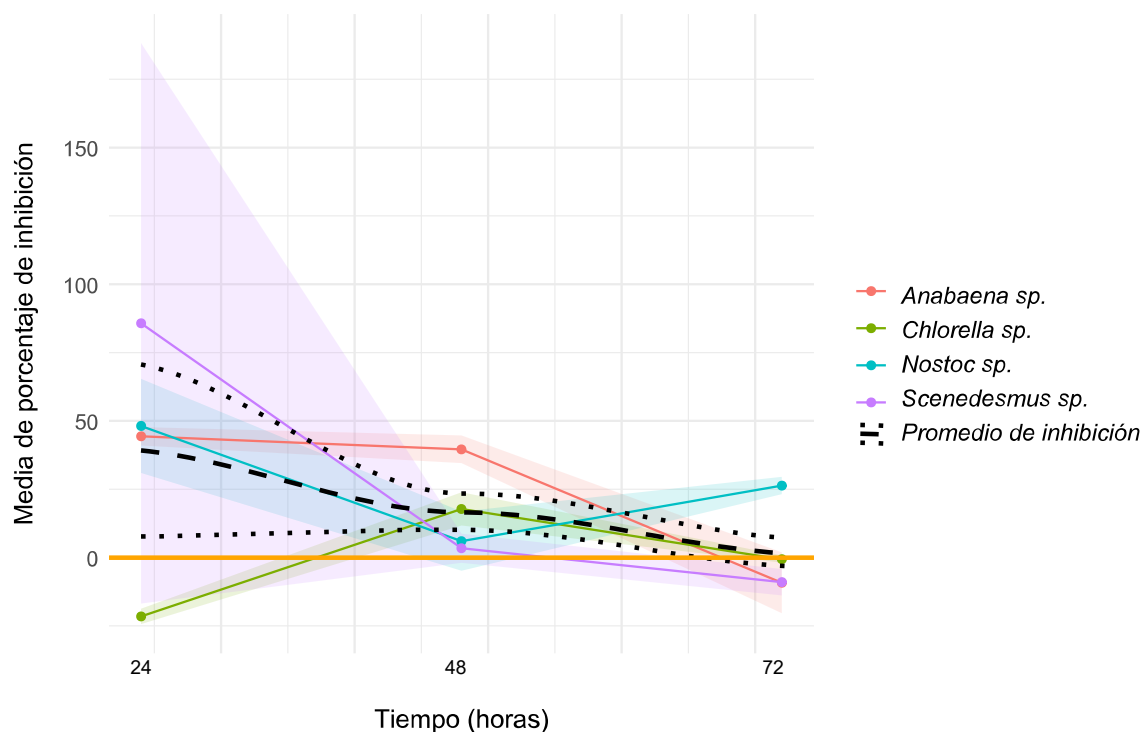
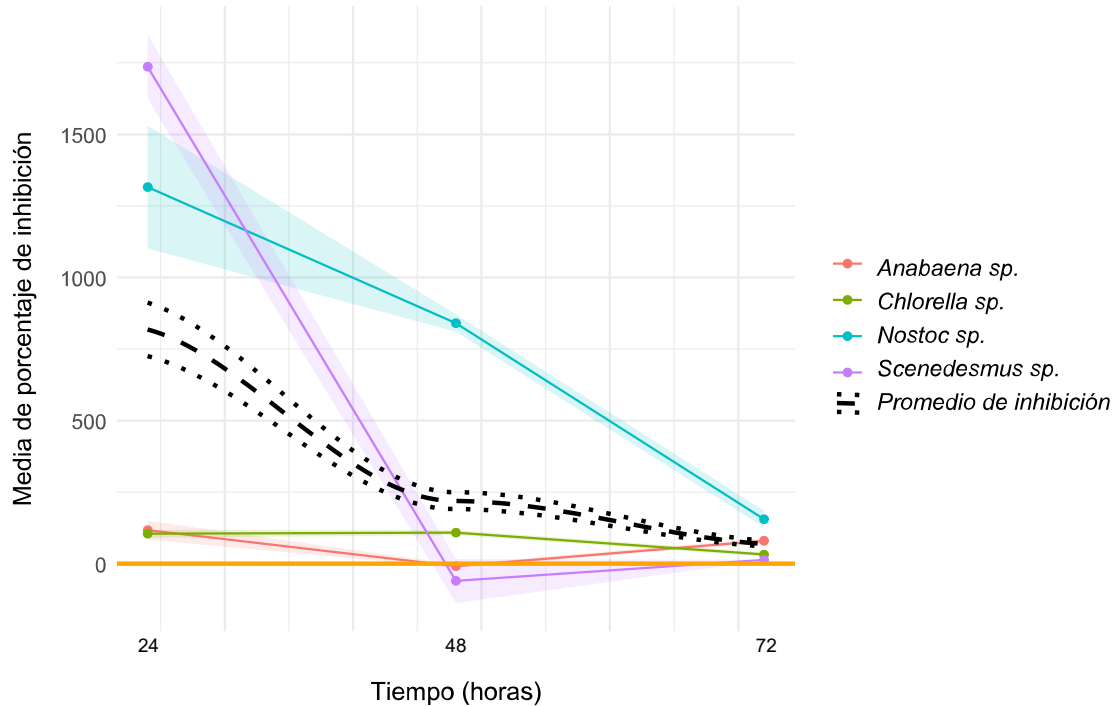


Fig 17. Porcentaje de inhibición para La Paz en Época Seca.

Nota: Cada curva de inhibición es representada con un color sólido y la desviación estándar es el sombreado de color que tiene cada una de las curvas. La línea discontinua negra corresponde al promedio de inhibición, con su respectiva desviación estándar representada con las líneas punteadas negras.

#### 4.1.2 Época lluviosa La Paz

De manera general en la época lluviosa la inhibición disminuye con el tiempo, las microalgas presentan una cinética de crecimiento normal. Se observó que los valores de inhibición al inicio del ensayo en época lluviosa son muy elevados para *Nostoc sp.* y *Scenedesmus sp.* superando el 1000%. Los valores de inhibición de *Anabaena sp.* y *Chlorella sp.* son significativamente más bajos y estables (Figura 17). Esto sugiere que son las microalgas menos afectadas durante la época lluviosa, debido a que fueron capaces de sobrevivir y crecer bajo condiciones de estrés [8], [41].



**Fig 18. Porcentaje de inhibición para La Paz en Época Lluviosa**

Nota: Cada curva de inhibición es representada con un color sólido y la desviación estándar es el sombreado de color que tiene cada una de las curvas. La línea discontinua negra corresponde al promedio de inhibición, con su respectiva desviación estándar representada con las líneas punteadas negras.

#### 4.1.3 Microalga seleccionada para biorremediación

Al comparar las microalgas autóctonas utilizadas en el ensayo y evaluar su tolerancia a la contaminación, se observa que *Chlorella sp.* mantiene los valores más bajos de inhibición, por lo tanto, se determina que tiene mayor adaptabilidad en condiciones ambientales estresantes; razón por la cual se define como el género de microalga adecuado para la biorremediación en las zonas de estudio. Además, en otras investigaciones se ha encontrado que estas microalgas forman parte de la microflora autóctona de aguas naturales y establece sinergias con otros microorganismos para lograr la biorremediación [8].

Considerando que puede existir un periodo de latencia, *Chlorella sp.* representa un buen indicador, dado que no muestra indicios de latencia a las 24 horas del ensayo [21].

## 4.2 PRUEBAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO EN RIO TOYOGRES

En este caso se hizo una simplificación del tiempo de la prueba, debido a que los resultados de las lagunas de La Paz mostraron que la inhibición del primer día es la más alta y la tendencia general es que disminuye con el paso del tiempo.

Los resultados de la época seca demuestran que hay diferencias entre los tratamientos con más de 95% de confianza para *Chlorella sp.* y *Anabaena sp.* y para el caso de *Scenedesmus sp.* hay diferencias con un 90% de confianza. También se observan diferencias entre las semanas de aplicación del inóculo para todos los tipos de microalgas lo cual se puede asegurar con un 95% de confianza. Esto indica que la aplicación de microalgas puede dar resultados positivos a pesar de las variaciones del río en la época seca (Cuadro 1).

En época lluviosa los resultados indican que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, si existe diferencia significativa entre las semanas de aplicación por lo que cualquier tendencia que se muestre en época lluviosa se debe a variaciones al azar de la calidad del agua del río, pero no se deben a los tratamientos aplicados (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados ANOVA de inhibición en el Toyogres.

Microalga	Época seca		Época lluviosa	
	Tratamiento	Semana	Tratamiento	Semana
<i>Chlorella</i>	0,000	0,004	0,447	0,000
<i>Scenedesmus</i>	0,100	0,000	0,278	0,000
<i>Anabaena</i>	0,026	0,004	0,660	0,000

### 4.2.1 Época seca Toyogres

Para este ensayo, se realizaron inoculaciones de bolas de arcilla con *Chlorella sp.* en las semanas 0, 2, 5 y 6. Las semanas en las que no se aplicó el inóculo se representan con un sombreado gris para efectos visuales. Esto permitió evaluar el efecto de la aplicación del inóculo en distintos intervalos: cada dos semanas, en semanas consecutivas y cuando no se aplicaba.

Se observó que para *Chlorella sp.*, en las semanas 6 y 7 los porcentajes de inhibición son más bajos, con un 13% y -128%, respectivamente (Figura 18.A). Esto coincide con la aplicación consecutiva del inóculo en las dos semanas previas. Para *Scenedesmus sp.*, se registra una disminución en la inhibición de -245% en la semana 3, debido a la inoculación realizada la

semana anterior. Posteriormente, la inhibición aumenta cuando no se aplica el inóculo y vuelve a reducirse a valores cercanos al 0% en las semanas 6 y 7 (Figura 18.B)

En el caso de *Anabaena sp.*, los porcentajes de inhibición se mantuvieron cercanos o por debajo del 0% (Figura 18.C), lo cual podría indicar que las microalgas estaban adaptándose al medio tóxico antes de recuperar su crecimiento, podría deberse a las variaciones propias en la calidad del agua del río. Estos resultados sugieren que la adición de los inóculos mejora las condiciones del sedimento, reduciendo la toxicidad y permitiendo que las microalgas en los ensayos de toxicidad en laboratorio crezcan de manera más efectiva.

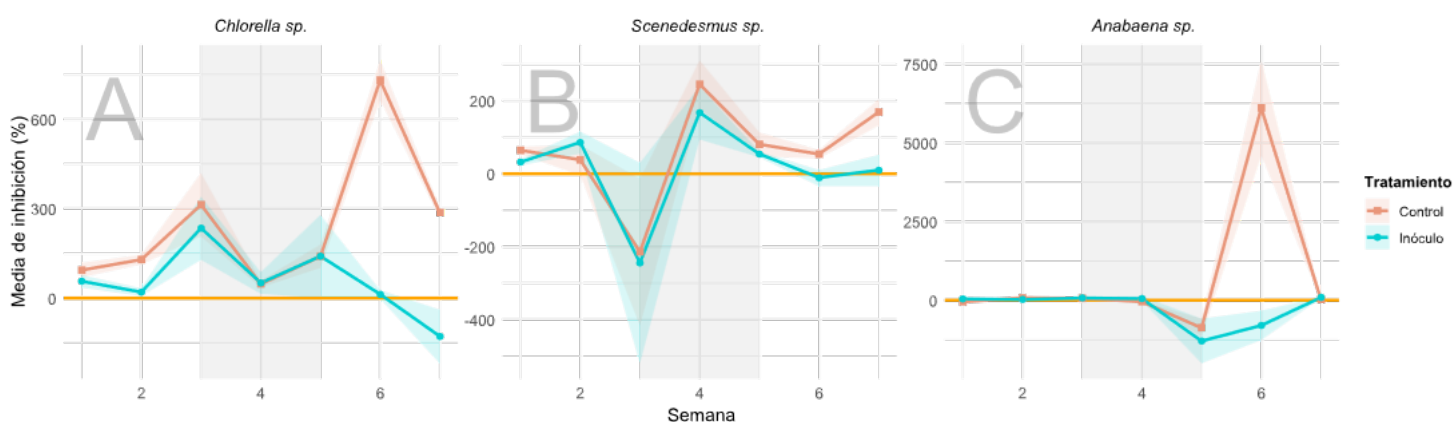


Fig 19. Porcentaje de inhibición del Toyogres en Época Seca. (A) *Chlorella sp.* (B) *Scenedesmus sp.* (C) *Anabaena sp.*

Nota: Cada curva de inhibición es representada con un color sólido y la desviación estándar es el sombreado de color que tiene cada una de las curvas. El sombreado gris corresponde a las semanas en las que no se aplicó el inóculo de *Chlorella sp.*, y las semanas en las que si se aplicó se visualizan con el área de fondo blanco.

#### 4.2.2 Época lluviosa Toyogres

Para este ensayo, se realizaron inoculaciones semanales de bolas de arcilla con *Chlorella sp.*, exceptuando la semana 3, que se representa en la Figura 19 con un sombreado gris para efectos visuales. Se observó que el promedio general de inhibición durante la época lluviosa es mayor que en la época seca. Esto se debe a las variaciones en la calidad del agua del río, causadas por las precipitaciones, el arrastre de sedimentos, las descargas de aguas residuales, y otros factores que, a pesar del esfuerzo por contener el sedimento en las cámaras no se

pueden controlar completamente en el ensayo de campo, debido a que el agua fluye e interactúa constantemente con el sedimento influyendo en los resultados.

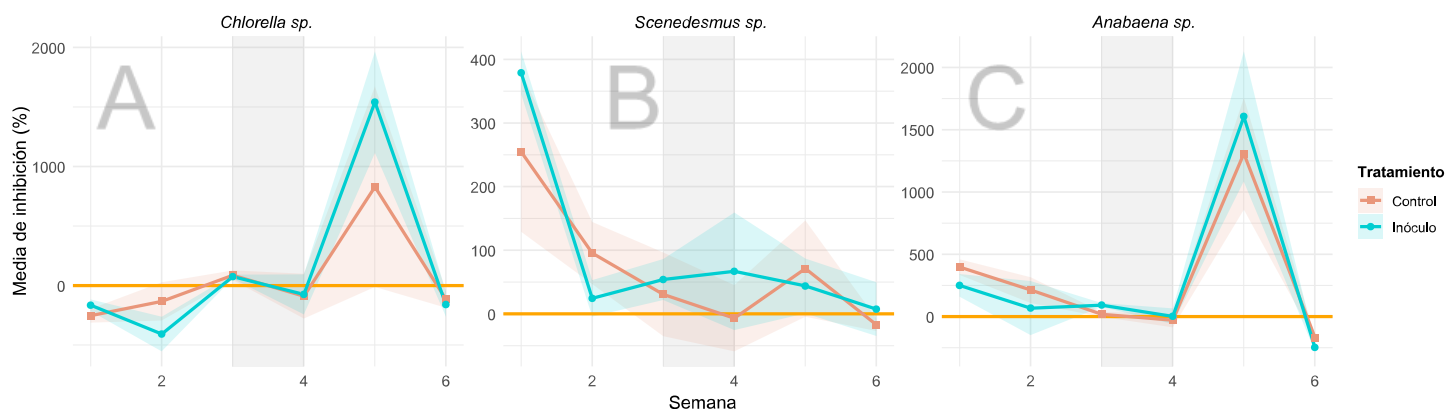


Fig 20. Porcentaje de inhibición del Toyogres en época lluviosa. (A) *Chlorella sp.* (B) *Scenedesmus sp.* (C) *Anabaena sp.*

Nota: Cada curva de inhibición es representada con un color sólido y la desviación estándar es el sombreado de color que tiene cada una de las curvas. El sombreado gris corresponde a las semanas en las que no se aplicó el inóculo de *Chlorella sp.*, y las semanas en las que si se aplicó se visualizan con el área de fondo blanco.

### 4.3 BIORREMEDIACION A GRAN ESCALA

#### 4.3.1 Dosis de inoculación

Para determinar la viabilidad de la biorremediación con microalgas se consideró la dosis utilizada en el ensayo a pequeña escala (Cuadro 2).

Cuadro 2. Dosis de inóculos a pequeña escala.

Elemento	Cantidad	Unidad
Numero de bolas	1	unidad
Arcilla	8	g
Inóculo	1.00x10 <sup>7</sup>	células/ml
Sedimento en cámara	0.0002	m <sup>3</sup>

La zona del río seleccionada (Figura 20) para la aplicación de inóculos tiene 5m de ancho, 1 km de largo y la capa suave de sedimento tiene una profundidad de 5cm, para lo cual se obtuvo un volumen de sedimento de 250 m<sup>3</sup>. Para biorremediar esta cantidad de sedimento se requieren 25 bolas de arcilla de 200g cada una con concentración de 1.00x10<sup>10</sup> células/ml. Logrando cubrir aproximadamente 10 m<sup>3</sup> por cada bola (Cuadro 3).



**Fig 21. Sección del río Toyogres a biorremediar.**

**Cuadro 3. Dosis de inóculos para cubrir 1 Km de río.**

Elemento	Cantidad	Unidad
Numero de bolas	25	unidades
Arcilla	200	g
Cantidad total de arcilla	5	Kg
Concentración inóculo	1.00x10 <sup>10</sup>	células/ml
Volumen inóculo	1250	ml
Sedimento de río	250	m <sup>3</sup>

#### 4.3.2 Cosecha de microalga *Chlorella sp.*

Se logró cultivar *Chlorella sp.* en un periodo de 3 meses hasta obtener la tanqueta con 800L, para pasarlos al proceso de centrifugación que tarda 2 horas trabajando a un caudal de 10 L/min, para poder obtener 6 L de biomasa a una concentración de 1.00x10<sup>10</sup> células/ml la cual posee una textura y color como la que se muestra en la Figura 21.

Considerando que la cantidad requerida para biorremediar 1 Km del cuerpo de agua superficial es de 1.25L de biomasa, entonces de una tanqueta se puede obtener la biomasa necesaria para biorremediar hasta 4.8 Km del cuerpo de agua.



**Fig 22. Cosecha de *Chlorella sp.***

#### 4.3.3 Aplicación del inoculo

Para la elaboración de las bolas de arcilla con inóculo se recolectaron 5 Kg de arcilla que tuvieran una textura homogénea y húmeda, para poder hacer las bolas de 200g con la biomasa cosechada (Figura 22). Se aplicó 1 bola de arcilla de 200 gramos cada 40 metros, se colocó en el río sin lanzarla según lo permitieron las condiciones físicas del entorno.



**Fig 23. Elaboración de bolas de arcilla.**

La aplicación de los inóculos debe realizarse semanalmente, según los resultados obtenidos sobre las variaciones en los tiempos de aplicación. Esta frecuencia asegura bajos porcentajes

de inhibición del crecimiento y contribuye a la reducción efectiva de la toxicidad del sedimento.

Es importante considerar que cuando se agrega la biomasa a las bolas de arcilla, un porcentaje de las células puede sufrir ruptura por lo tanto se debe estudiar la tasa de supervivencia de las microalgas, así como otros métodos para fijar el inóculo.

#### 4.3.4 Costo económico de la estrategia de biorremediación

El costo total de la estrategia de biorremediación fue de ₡6 603 900 de los cuales el 35% corresponde al uso de las instalaciones del (CIB-ITCR), el 31% es para el pago de mano de obra del investigador y asistente y el 28% es de análisis químicos para la detección de aproximadamente 90 contaminantes según se muestra en la Figura 23.

**Cuadro 4. Costo total de la estrategia de biorremediación.**

Categoría	Especificaciones	Costo	Total	% Total
Recursos Humanos	Investigador (150 h)	₡ 1 234 500		31%
	Asistente (450 h)	₡ 630 000	₡ 1 864 500	
Viáticos	Visitas de campo	₡ 150 000	₡ 150 000	2%
Materiales	Medio de cultivo de microalgas BG11	₡ 33 000		1%
	Tubo PVC 3 " 3m	₡ 8 295		
	Tubo PVC 1/2 " 2m	₡ 2 400		
	Reducción de tubo PVC 3 " a 1½"	₡ 13 650		
	Reducción de tubo PVC 1½" a ½"	₡ 6 090		
	Varilla acero ½ 6m	₡ 3 595		
	Segueta	₡ 10 800		
	Guantes latex	₡ 4 620		
	Cobertor zapatos	₡ 4 200		
Cofias cabello	₡ 3 350	₡ 90 000		
Análisis de laboratorio	Análisis fisico-químico muestras de	₡ 1 700 000	₡ 1 700 000	28%
Equipos según tiempo de uso (180 h)	Microscopios	₡ 11 250		1%
	Cámaras Neubauer	₡ 1 300		
	Medidor de pH	₡ 1 720		
	Autoclave	₡ 500		
	Centrifuga	₡ 43 500		
	Balanza analítica	₡ 9 400		
	Micropipetas y puntas	₡ 6 000		
	Horno	₡ 500		
	Bandejas Plásticas	₡ 240		
	Tubos Falcon	₡ 275		
	Beakers	₡ 360	₡ 75 045	
Instalaciones CIB (600 h)	Servicios electricidad, agua, internet, telefonía, limpieza	₡ 2 124 000	₡ 2 124 000	35%
Total			₡ 6 003 545	100%
Imprevistos (10%)			₡ 600 355	
Total con imprevistos			₡ 6 603 900	

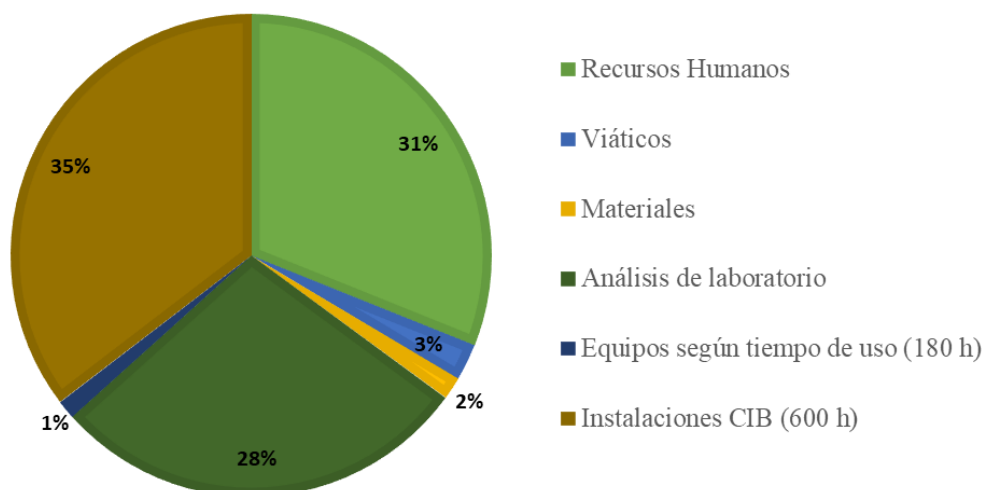
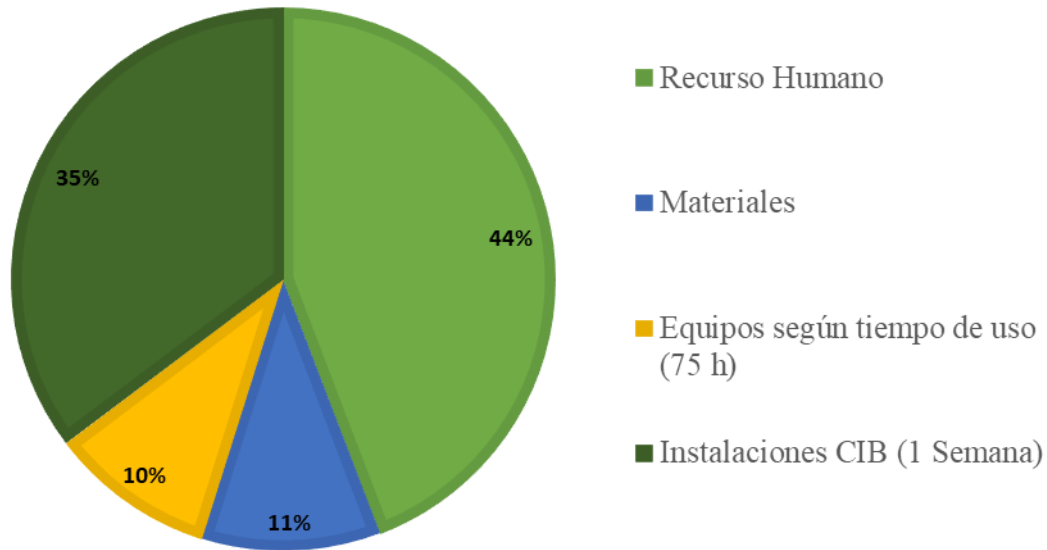


Fig 24. Porcentaje del costo total de la estrategia de biorremediación

El costo económico para biorremediar el cuerpo de agua superficial es de ₡516 230 de los cuales el mayor componente de 44% es del recurso humano y el segundo componente más grande de 35% corresponde al uso de las instalaciones del (CIB-ITCR) según se muestra en la Figura 24.

Cuadro 5. Costo para biorremediar el cuerpo de agua superficial.

Categoría	Especificaciones	Costo	Total	% Total
Recurso Humano	Investigador (15h)	₡ 123 450	₡ 207 450	44%
	Asistente (60 h)	₡ 84 000		
Materiales	Medio de cultivo de microalgas BG11	₡ 30 000	₡ 50 000	11%
	Guantes, cofias y cobertores de	₡ 20 000		
Equipos según tiempo de uso (75 h)	Microscopios y cámaras Neubauer	₡ 9 000	₡ 46 250	10%
	Medidor de pH	₡ 1 200		
	Autoclave	₡ 200		
	Centrifuga	₡ 28 400		
	Balanza analítica	₡ 4 000		
	Micropipetas y puntas	₡ 2 500		
	Horno	₡ 300		
	Bandejas Plasticas	₡ 200		
	Tubos Falcon	₡ 200		
	Beakers	₡ 250		
Instalaciones CIB (1	Servicios electricidad, agua,	₡ 165 600	₡ 165 600	35%
Total			₡ 469 300	100%
Imprevistos (10%)			₡ 46 930	
Total con imprevistos			₡ 516 230	



**Fig 25. Porcentaje costo de biorremediar 1 Km de río**

Considerando los costos de producción en el laboratorio de microalgas del (CIB-ITCR) se obtuvo un valor aproximado de ¢18 000 L de microalga concentrada y la biomasa preparada e importada de China tiene un costo inferior a ¢7600 por Kg de biomasa de *Chlorella sp.* en polvo [48]. El costo tan elevado de las instalaciones del (CIB-ITCR) es lo que dispara el precio, debido a que no se tiene la infraestructura ni las capacidades de producción masiva dado que es un centro con fines de investigación y experimentación. Por lo tanto, se recomienda considerar la opción de importar la biomasa preparada a un menor costo si se desea biorremediar grandes áreas de cuerpos de agua superficial.



**Fig 26. Polvo de *Chlorella sp.*[48]**

## CONCLUSIONES

Al realizar las pruebas de inhibición del crecimiento con las muestras de los cuerpos de agua superficial, en general se observó que si había un efecto inhibitorio el cuál es posible que se deba a la toxicidad de un conjunto de compuestos. Debido a que el efecto inhibitorio desaparece con el tiempo puede indicar que se trata de sustancias degradables o inmovilizables biológicamente.

Los ensayos de las lagunas del parque de La Paz indican que las microalgas lograron recuperarse después de un estrés tóxico inicial, ya que la inhibición fue disminuyendo progresivamente con el tiempo, acercándose al 0% a las 72 horas después de montar el ensayo.

El promedio de inhibición observado durante la época lluviosa es mayor que en la época seca en los ensayos realizados en las lagunas de La Paz y el río Toyogres. Esto sugiere que la toxicidad incrementa con las precipitaciones, posiblemente debido al arrastre de contaminantes por la escorrentía.

La microalga *Chlorella sp.* se destaca como la especie más adecuada para la biorremediación, debido a su baja inhibición del crecimiento frente a condiciones ambientales estresantes en comparación con otras microalgas autóctonas evaluadas.

La frecuencia óptima de aplicación del inóculo de *Chlorella sp.* se debe hacer semanalmente para asegurar una disminución de la inhibición inferior al 0%, lo cual implica que mejoran las condiciones del sedimento y se reduce la toxicidad de este.

La biorremediación de cuerpos de agua superficial utilizando la microalga *Chlorella sp.* es una alternativa viable según el requerimiento de biomasa microalgal. Para tratar aproximadamente 250 m<sup>3</sup> de sedimento por cada kilómetro de río se debe aplicar una bola de arcilla cada 40 metros, lo que suma un total de 25 bolas por kilómetro. Cada bola tiene un peso de 200 g y contiene una concentración de  $1.00 \times 10^{10}$  células/ml.

El costo económico de la biorremediación es de ₡516 230, el cual se considera accesible para poder financiarlo en otros entornos urbanos. Además, se considera que se pueden reducir costos si se importa la biomasa seca lo cual reduce el tiempo de trabajo, la mano de obra y principalmente el uso de instalaciones del laboratorio de microalgas del (CIB-ITCR).

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda evaluar el uso de otros materiales, como gelatina u otros polímeros naturales y biodegradables, para desarrollar inóculos de microalgas con una mayor concentración, considerando siempre una liberación controlada y gradual en el ambiente acuático. Este enfoque permitiría una liberación prolongada que mejoraría la efectividad de la biorremediación, manteniendo una presencia activa de microalgas en el medio y optimizando su capacidad para degradar y neutralizar contaminantes a lo largo del tiempo.

Se propone realizar pruebas de supervivencia de las microalgas en los inóculos aplicados para asegurar su viabilidad a lo largo del proceso de biorremediación, garantizando así su capacidad de adaptación en condiciones de campo y su eficacia continua en la remoción de contaminantes.

Para fortalecer los resultados de la estrategia de biorremediación, se sugiere evaluar su impacto en el ecosistema mediante un análisis detallado del efecto a largo plazo de las microalgas en la microflora autóctona del cuerpo de agua superficial. Asimismo, se recomienda realizar un balance de masas y nutrientes antes y después del proceso de biorremediación, con el fin de cuantificar los porcentajes de remoción de contaminantes y nutrientes y, de esta forma, obtener una visión integral de la eficiencia del tratamiento.

Para que el proceso de biorremediación sea exitoso se sugiere que antes de iniciar el proceso se tomen acciones preventivas y correctivas. Es fundamental implementar regulaciones ambientales estrictas, sistemas de monitoreo y programas de tratamiento de aguas residuales para controlar fuentes puntuales y difusas de contaminación. Así como también es crucial involucrar a la comunidad a través de la educación ambiental y su participación activa en la protección y restauración de los ecosistemas acuáticos.

## REFERENCIAS

- [1] Ministerio de Planificación Nacional y Política Económica, "Costa Rica: Agua y Saneamiento 2030 análisis relacionado al ODS". San José: CR 2018.
- [2] D. Fu, Y. Yan, X. Yang, E.R. Rene and R.P. Singh, "Bioremediation of contaminated river sediment and overlying water using biologically activated beads: A case study from Shedu river, China", , vol. 23, 2020.doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101492>.
- [3] S. González, "Contaminación difusa de las aguas ", no. 77, pp. 21–25, 2007.
- [4] A. Rodríguez, A. Mata and B. Chacón, "Calidad de las aguas de los ríos Toyogres y San Nicolas, Cartago, Costa Rica 1980-1982", vol. 6, no. 4, pp. 3–7, 2017.doi: <https://doi.org/10.18845/tm.v6i4.3379>.
- [5] Rebeca Camacho Jiménez., comunicación personal, Mar,2024.
- [6] A.K. Patel, R.R. Singhanian, F.P.J.B. Albarico, A. Pandey, C. Chen and C. Dong, "Organic wastes bioremediation and its changing prospects", Sci.Total Environ., vol. 824, pp. 153889, 2022.doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153889>.
- [7] D.L. Sutherland and P.J. Ralph, "Microalgal bioremediation of emerging contaminants - Opportunities and challenges", Water Res., vol. 164, pp. 114921, 2019.doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114921>.
- [8] E.T. Amaral, L.B.Y.C. Bender, T.M. Rizzetti and R.d.C.d.S. Schneider, "Removal of organic contaminants in water bodies or wastewater by microalgae of the genus Chlorella: A review", vol. 8, pp. 100476, 2023.doi: <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2023.100476>.
- [9] A.H.M.A. Sadmani, P. Kuknur, V.L. Pachapur and R. Pulicharla, "Conventional sources of potable water production", in *Handbook of Environmental Engineering*, Rao Y. Surampalli, Tian C. Zhang, Satinder Kaur Brar, Krishnamoorthy Hegde, Rama Pulicharla and Mausam Verma, ed. 1st Edition, New York: McGraw-Hill Education, 2018, ch. 4.1.2.
- [10] AyA, MINAE and MS "Política Nacional de Saneamiento en Aguas Residuales 2016 -2045". San José: Costa Rica2016.
- [11] A. Rojas, "Elaboración de un Mecanismo de Cobertura Nacional para el Manejo de la Contaminación Difusa", Esc. Ing. Agrícola, Universidad de Costa Rica. 2016. [En línea]. Disponible: <https://da.go.cr/wp-content/uploads/2017/01/Informe-Final-Contaminacion-Difusa-UCR.pdf>.
- [12] J.T. Ballinger and G.J. Shugar, "Inorganic chemistry review", in *Chemical Technicians' Ready Reference Handbook*, Anonymous, ed. 5th Edition, New York: McGraw-Hill Education, 2011, ch. 22.
- [13] A. Ferrer, "Intoxicación por metales", , vol. 26, pp. 141–153, 2003.

- [14] J.T. Ballinger and G.J. Shugar, "Organic chemistry review", in *Chemical Technicians' Ready Reference Handbook*, Anonymous, ed. 5th Edition, New York: McGraw-Hill Education, 2011, ch. 23.
- [15] V. Rajput, V. Kumar, K.J. Krishna, S. Gupta, I.K. Anna and S.V. Mikhail, "Microalgae-based Bioremediation of Heavy Metals and Emerging Contaminants", vol. 14, no. 13, pp. 183–200, 2023. doi: <https://doi.org/10.1079/9781800621954.0013>.
- [16] A.H.M.A. Sadmani, W.H. Lee, C. Agnieszka and S.K. Brar, "ECS and transformation products", in *Handbook of Environmental Engineering*, Rao Y. Surampalli, Tian C. Zhang, Satinder Kaur Brar, Krishnamoorthy Hegde, Rama Pulicharla and Mausam Verma, ed. 1st Edition, New York: McGraw-Hill Education, 2018, ch. 4.3.2.
- [17] H.T. Castro Salazar, "Química ambiental básica", ed. 1. Neiva: Colombia: Corporación Universitaria del Huila (CORHUILA), 2021.
- [18] W. Ahlf, T. Braunbeck, S. Heise and H. Hollert, "Sediment and soil quality criteria", in *Environmental Monitoring Handbook*, Frank R. Burden, Ulrich Foerstner, Ian D. McKelvie and Alex Guenther, ed. 1st Edition, New York: McGraw-Hill Education, 2002, ch. 17.
- [19] J. Lovett-Doust, M. Schmidt and L. Lovett-Doust, "Biological assessment of aquatic pollution: A review, with emphasis on plants as biomonitors", *Biol.Rev.Camb.Philos.Soc.*, vol. 69, no. 2, pp. 147–86, 1994. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-185X.1994.tb01504.x>
- [20] N. Wu, X. Dong, Y. Liu, C. Wang, A. Baattrup-Pedersen and T. Riis, "Using river microalgae as indicators for freshwater biomonitoring: Review of published research and future directions", *Ecol.Ind.*, vol. 81, pp. 124–131, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.066>.
- [21] OECD, "Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test", *Directrices de la OCDE para las pruebas de sustancias químicas*, no. 2, 2011. doi: <https://doi.org/10.1787/20745761>.
- [22] L. Zambrano, "La restauración de ríos y lagos", pp. 36–43, 2003.
- [23] MINAE and AyA "Ríos Limpios: Estrategia nacional para la recuperación de cuencas urbanas 2020-2030". San José: CR2020.
- [24] A. Rodríguez, S.G. Zárate Villarroe and A. Bastida Codina, "Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación", *Rev. Cien. Ambientales*, vol. 56, no. 1, pp. 178–208, 2022.
- [25] Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos. *Guía del ciudadano sobre la biorremediación*. (2012). Consultado: 8 octubre, 2024. [En línea]. Disponible: [https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/epa-542-f-12-003s\\_guia\\_del\\_ciudadano\\_sobre\\_la\\_biorremediacion.pdf](https://19january2017snapshot.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/epa-542-f-12-003s_guia_del_ciudadano_sobre_la_biorremediacion.pdf).
- [26] K.T. Gamba and A.M. Pedraza, "Evaluación de estrategias de biorremediación para el tratamiento de aguas residuales industriales contaminadas con aceites usados", *INCI*, vol. 2, no. 2, pp. 18–30, 2018.

- [27] Universidad Abierta y a Distancia de México. (2017). Biorremediación. [En línea]. Disponible: [https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/07/BBRN/unidad\\_03/descargables/BBRN\\_U3\\_Contenido.pdf](https://dmd.unadmexico.mx/contenidos/DCSBA/BLOQUE2/BI/07/BBRN/unidad_03/descargables/BBRN_U3_Contenido.pdf)
- [28] M.C.A. González Chávez, R. Carrillo González, A.S. Sánchez López and A. Ruiz Olivares, "Alternativas de fitorremediación de sitios contaminados con elementos potencialmente tóxicos", vol. 10, no. 4, pp. 8–14, 2018.
- [29] P. Andrade-Hoyos, M.N. Rivera-Jiménez, N. Landero-Valenzuela, H. Silva-Rojas, S.J. Martínez-Salgado and O. Romero-Arenas, "Beneficios ecológicos y biológicos del hongo cosmopolita *Trichoderma* spp. en la agricultura: una perspectiva en el campo mexicano", vol. 55, no. 4, pp. 366–377, 2023.doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.005>.
- [30] L.M. Almeida Saá, , "Estudio de adaptación de la microalga *Chlorella vulgaris* para la remoción del zinc", Maestría, Ing. Energía y Ambiente, Instituto Politécnico de Leiria, Leiria, Portugal, 2020. [ En línea ]. Disponible: <https://iconline.iplleiria.pt/bitstream/10400.8/5697/1/DISERTACION%20MAESTRIA%20PDF%2002-12-2020.pdf>.
- [31] D. Rojas-Villalta, D. Rojas-Rodríguez, M. Villanueva-Ilama, R. Guillén-Watson, F. Murillo-Vega, O. Gómez-Espinoza and K. Núñez-Montero, "Exploring Extremotolerant and Extremophilic Microalgae: New Frontiers in Sustainable Biotechnological Applications", *Biology*, vol. 13, no. 9, pp. 712, 2024.doi: <https://doi.org/10.3390/biology13090712>.
- [32] A.M. Hamed, S.K. Prajapati, S. Simsek and H. Simsek, "Growth regime and environmental remediation of microalgae", , vol. 31, no. 3, pp. 189–204, 2016.doi: <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.8.28>.
- [33] F. Villalta-Romero, F. Murillo-Vega, B. Martínez-Gutiérrez, J. Valverde-Cerdas, A. Sánchez-Kopper and M. Guerrero-Barrantes, "Biotecnología microalgal en Costa Rica: Oportunidades de negocio para el sector productivo nacional", *TM*, vol. 32, no. 9, pp. 85–93, 2019.doi: <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4634>.
- [34] AST Ingeniería SL, "MALGAS Aplicaciones e las microalgas: Estado de la técnica". España: Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. 2013.
- [35] A. Richmond and Q. Hu, "Manual de cultivo de microalgas : ficología y biotecnología aplicadas", ed. 2.Wiley: 2013.
- [36] F. Murillo-Vega, M. Faith-Vargas, M. Chicas-Romero, K. Meneses-Montero and F. Villalta-Romero, "Avances en biotecnología microalgal en Costa Rica: contribuciones del Instituto Tecnológico de Costa Rica", *TM*, vol. 37, no. 9, pp. 48–62, 2024.doi: <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7609>.
- [37] L. Wang, M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, Y. Liu, Y. Wang and R. Ruan, "Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant", *Appl.Biochem.Biotechnol.*, vol. 162, no. 4, pp. 1174–1186, 2009.doi: <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>.

- [38] R. López-Serna, E. Posadas, P.A. García-Encina and R. Muñoz, "Removal of contaminants of emerging concern from urban wastewater in novel algal-bacterial photobioreactors", *Sci.Total Environ.*, vol. 662, pp. 32–40, 2019.doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.206>.
- [39] L. Xin, H. Hong-ying, G. Ke and Y. Jia, "Growth and nutrient removal properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. LX1 under different kinds of nitrogen sources", *Ecol.Eng.*, vol. 36, no. 4, pp. 379–381, 2010.doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.11.003>.
- [40] M. Ballén Segura, L. Hernández Rodríguez, D. Parra Ospina, A. Vega Bolaños and K. Pérez, "Using *Scenedesmus* sp. for the Phycoremediation of Tannery Wastewater", *Tecciencia*, vol. 11, no. 21, pp. 69–75, 2016.doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2024.061>.
- [41] P. Bhattacharya, S. Jana and S. Banerjee, "Phytoremediation capability of *Anabaena* sp. for high organic and chromium-loaded wastewater in membrane bioreactors", *Water Sci Technol*, vol. 89, no. 5, pp. 1142–1154, 2024.doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2024.061>.
- [42] S.K. Dubey, P. Vyas, P. Tiwari, A.J. Viswas and S.P. Bajpai, "Bioremediation of Industrial Effluent using Cyanobacterial Species: *Phormidium mucicola* and *Anabaena aequalis*", *Ann. Res. Rev. Biol.* , vol. 31, no. 1, pp. 1–8, 2019.doi: <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v31i130037>.
- [43] D. Kumar, S. Qureshi and D. Sahoo, "Bioremediation of complex contaminated Yamuna River India by using selected cyanobacteria", *Bioremediation J.*, pp. 1–18, 2024.doi: <https://doi.org/10.1080/10889868.2024.2382265>.
- [44] Y.D. Benites Alva and N.G. Mori de la Cruz, , "Evaluación de la capacidad de *Nostoc* cf. *sphaericum* para la ficorremediación de aguas con actividad piscícola de la laguna Huaylacancha, Jauja-Junín", Lic., Dept. Ing. Agraria , Univ. Católica Sedes Sapientiae, Lima, Perú, 2023. [ En línea ]. Disponible: <https://repositorio.ucss.edu.pe/handle/20.500.14095/2145>.
- [45] Mauricio Chicas Romero. Programas de remediación. (2009). *Biotecnología Ambiental e Industrial*. Universidad Nacional de Costa Rica.
- [46] E. Jiménez and R. Bustamante, "Galería Parque La Paz," *Instituto Costarricense del Deporte y la Recreación*, <https://www.icoder.go.cr/galeria-parque-la-paz> (Consultado 8 Set, 2024).
- [47] H.M. Park, "Comparing Group Means: The T-test and One-way ANOVA Using STATA, SAS, and SPSS". Indiana University:USA2009.
- [48] Compañía Biotecnológica Anhui Keyново, "Polvo de clorella natural puro sin OGM, súper alimento, con certificación Halal," *Made in China*,[https://keynovo.en.made-in-china.com/product/SOxAtJZbXFkn/China-Super-Food-Non-GMO-Pure-Natural-Chlorella-Powder-with-Halal.html?pv\\_id=1ie7ubgafa61&faw\\_id=1ie7ubi2t1e1](https://keynovo.en.made-in-china.com/product/SOxAtJZbXFkn/China-Super-Food-Non-GMO-Pure-Natural-Chlorella-Powder-with-Halal.html?pv_id=1ie7ubgafa61&faw_id=1ie7ubi2t1e1) (Consultado 3 Dic, 2024).

## APÉNDICES

### APÉNDICE 1: REGISTRO FOTOGRÁFICO DE LA INVESTIGACIÓN

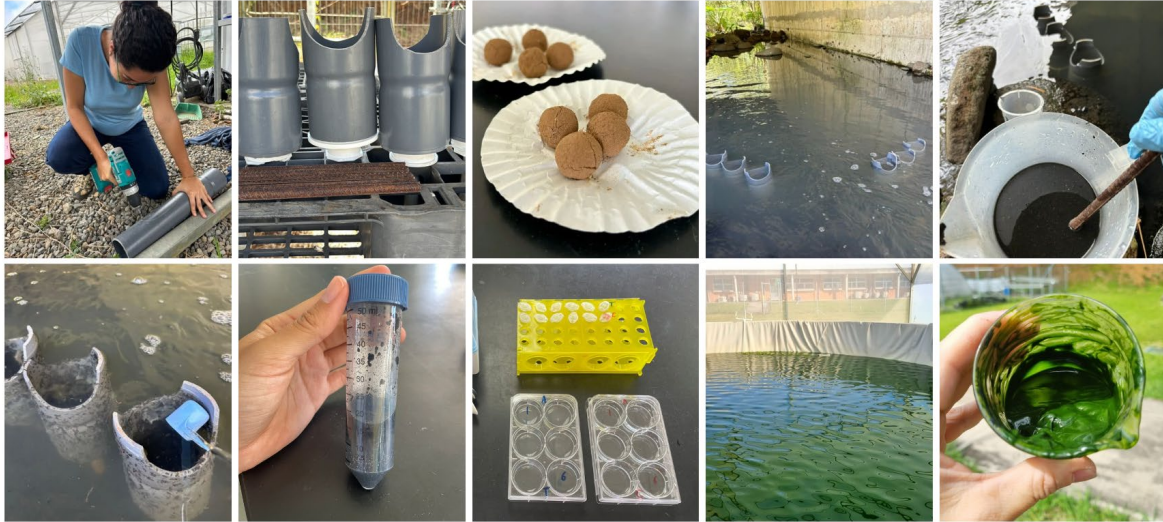


Fig 1. Evidencias de la metodología realizada.

## APÉNDICE 2: BITÁCORA DE TRABAJO DE LABORATORIO

TEC | Tecnológico de Costa Rica

Libro No. \_\_\_\_\_ N° 014

Nombre: Anelice Corrales Núñez Estudiante:  Funcionario:  Otro:

Nombre del Proyecto: GAM cuerpos de agua Número de Proyecto: \_\_\_\_\_

Experimento: Río Toyogres Toxicidad e Inoculo Diluciones Fecha: 30/01/2024

Protección: \_\_\_\_\_ Diseño: \_\_\_\_\_ Modelo de Unidad: \_\_\_\_\_ Patente: \_\_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_\_

Chlorella Biotin  
Tome 100 ul de original y aflore a 10 ml Dilución 1:100  
Cuento: A:100 B:135 C:102 D:113 X:112.5  
Cn original =  $112.5 \times 100000 = 1.13 \times 10^7 \times 100 \Rightarrow 1.13 \times 10^9 \text{ cell/ml}$

Anabaena Erlenmeyer  
100 ul copa original y aflore a 10 ml dilución 1:100  
Cuento: A:54 B:49 C:48 D:57 X:53.25  
Cn original =  $53.25 \times 100000 = 5.33 \times 10^5 \times 100 \Rightarrow 5.33 \times 10^7 \text{ cell/ml}$

Chlorella  
 $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$   
 $1.13 \times 10^9 \cdot V_1 = 5 \times 10^4 \cdot 10000 \text{ ul}$   
 $V_1 = 442.47 \text{ ul}$   
Vol para bolitas arcilla

Scenedesmus Estanque  
100 ul copa original y aflore a 10 ml 1:100  
Cuento: A:22 B:21 C:20 D:23 X:21.5  
Cn orig:  $21.5 \times 10000 = 2.15 \times 10^5 \times 100 \Rightarrow 2.15 \times 10^7 \text{ cell/ml}$

Anabaena  
 $5.33 \times 10^7 \cdot V_1 = 1 \times 10^4 \cdot 10000 \text{ ul}$   
 $V_1 = 187.62 \text{ ul}$   
Vol necesario toxicidad

Scenedesmus  
 $2.15 \times 10^7 \cdot V_1 = 1 \times 10^4 \cdot 10000 \text{ ul}$   
 $V_1 = 465.12 \text{ ul}$   
Vol toxicidad

Autenticaciones: ACN  
Firma Responsable: \_\_\_\_\_ Firma Testigo: \_\_\_\_\_

Fig 2. Registro de diluciones de inóculos.

TEC | Tecnológico de Costa Rica

Libro No. \_\_\_\_\_ N° 015

Nombre: Anelice Corrales Núñez Estudiante:  Funcionario:  Otro:

Nombre del Proyecto: GAM cuerpos de agua Número de Proyecto: \_\_\_\_\_

Experimento: Río Toyogres Ensayo Toxicidad Cuento 0h Fecha: 30/01/2024

Protección: \_\_\_\_\_ Diseño: \_\_\_\_\_ Modelo de Unidad: \_\_\_\_\_ Patente: \_\_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_\_

Chlorella				scenedesmus				Anabaena						
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D			
1P	4	3	2	2	1P	1	0	0	2	1P	1	3	2	2
2P	2	1	1	4	2P	1	1	1	0	2P	1	2	2	2
3P	2	1	2	2	3P	1	2	1	0	3P	2	1	2	2
1C	4	1	3	1	1C	1	3	1	1	1C	1	2	0	1
2C	0	4	2	1	2C	2	0	2	0	2C	1	3	1	0
3C	0	7	3	4	3C	1	2	1	0	3C	1	1	1	2
1T	1	2	4	1	1T	0	0	2	2	1T	1	0	1	0
2T	1	2	2	1	2T	0	1	0	1	2T	1	1	0	1
3T	0	1	1	2	3T	0	0	1	1	3T	1	2	1	1

Se observa que en los pozos T's hay menor presencia leve de chlorella y anabaena en comparación con los pozos P's y C's, una de las posibles causas de esto es por presencia de estas en las muestras de sedimento de río. Es por esta razón que se realizó este conteo a las 0 horas de realizado el ensayo, además se destaca que en este momento no se habían colocado las bolitas de arcilla inoculadas con chlorella.

TEC | Tecnológico de Costa Rica

Libro No. \_\_\_\_\_ N° 016

Nombre: Anelice Corrales Núñez Estudiante:  Funcionario:  Otro:

Nombre del Proyecto: GAM Número de Proyecto: \_\_\_\_\_

Experimento: Río Toyogres Cuento 20 hrs Fecha: 31/01/2024

Protección: \_\_\_\_\_ Diseño: \_\_\_\_\_ Modelo de Unidad: \_\_\_\_\_ Patente: \_\_\_\_\_ Otro: \_\_\_\_\_

Chlorella				Scenedesmus				Anabaena						
A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D			
1P	4	3	4	4	1P	5	3	3	4	1P	3	4	2	2
2P	5	3	4	7	2P	4	3	3	5	2P	2	2	3	2
3P	5	4	5	4	3P	4	4	2	8	3P	1	2	3	4
1C	2	3	2	2	1C	4	1	3	3	1C	6	3	2	3
2C	3	2	5	2	2C	3	3	2	2	2C	3	2	2	4
3C	3	3	3	2	3C	4	3	3	2	3C	2	2	2	3
1T	13	7	9	8	1T	6	5	11	10	1T	2	3	1	2
2T	8	7	2	3	2T	4	4	3	6	2T	1	2	1	0
3T	14	8	5	8	3T	14	6	13	10	3T	1	2	2	1

Se evidencia crecimiento con normalidad en las T's, hay leve inhibición en los P's y C's de chlorella y scenedesmus por lo que se evidencia toxicidad del sedimento del río, en el caso de anabaena no se aprecia positivamente por la presencia de estas en la muestra original del río puede ser que estas ya se hayan adaptado a las condiciones por lo que no se ven afectadas.

Autenticaciones: ACN  
Firma Responsable: \_\_\_\_\_ Firma Testigo: \_\_\_\_\_

Fig 3. Conteos celulares al microscopio de ensayo Toyogres a las 0 y 24 h

### APÉNDICE 3: RESULTADOS INHIBICIÓN LA PAZ ÉPOCA SECA

Cuadro 1. Porcentaje de inhibición a lo largo del tiempo de la Paz en época seca

% Inhibición microalga	Tiempo		
	24 h	48 h	72 h
<i>Anabaena sp.</i>	34,7	31,1	28,9
	55	44,4	-9,6
	44,2	41,9	-37,6
	47,1	54,6	-23,2
	41,1	26,1	-4,4
<i>Chlorella sp.</i>	-19,4	40,2	-3,3
	-26,8	6,2	-0,4
	-11,3	11,9	4,4
	-25,4	20,4	-2,6
	-24,8	10,3	-1,1
<i>Nostoc sp.</i>	-5,3	-14,3	17,1
	25,6	-18,7	30,4
	79,5	41,3	22,5
	54	7,3	35,7
	87,2	14,7	26,3
<i>Scenedesmus sp.</i>	116,5	12,6	8,6
	248,5	16,9	-7,6
	-307,9	-13,5	-11,1
	122,9	-0,8	-14,9
	248,5	2	-19,8

#### APÉNDICE 4: RESULTADOS INHIBICIÓN LA PAZ ÉPOCA LLUVIOSA

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición a lo largo del tiempo de la Paz en época lluviosa.

% Inhibición microalga	Tiempo		
	24 h	48 h	72 h
<i>Anabaena sp.</i>	81,2	-14,0	93,2
	100,0	-17,6	62,3
	114,2	11,5	56,3
	241,5	-22,4	96,5
	49,9	0,0	93,2
<i>Chlorella sp.</i>	53,1	102,7	27,2
	111,0	131,3	25,4
	115,1	92,7	11,0
	140,5	126,7	51,4
	103,5	88,3	44,9
<i>Nostoc sp.</i>	501,6	840,7	80,3
	1606,5	840,0	230,3
	1606,5	743,8	186,4
	1257,9	841,0	94,7
	1606,5	937,6	186,4
<i>Scenedesmus sp.</i>	1520,2	-264,9	8,7
	1520,2	204,3	10,8
	2131,8	-107,8	16,7
	1774,0	-24,0	14,9
	1736,5	-107,8	14,9

## APÉNDICE 5: RESULTADOS INHIBICIÓN TOYOGRES ÉPOCA SECA

Cuadro 3. Porcentajes de inhibición a lo largo del tiempo del Toyogres en época seca.

Microalga	Tratamiento	Semana						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>Chlorella sp.</i>	Inóculo	81,0	34,8	114,2	15,4	25,6	28,8	-56,4
		47,0	10,7	275,3	49,8	295,8	0,0	-229,8
		42,1	14,4	314,6	87,9	100,0	8,8	-99,1
	Control	100,0	132,2	275,3	34,2	179,9	659,5	267,3
		67,0	144,7	434,2	58,2	142,2	792,6	296,5
		114,8	111,5	230,7	49,8	100,0	741,6	296,5
<i>Scenedesmus sp.</i>	Inóculo	22,3	90,6	-349,3	229,3	62,5	0,1	42,3
		34,1	113,5	-451,9	184,8	51,1	2,9	25,2
		38,4	53,1	67,6	87,2	47,1	-36,9	-39,3
	Control	75,2	28,1	-444,4	191,2	103,9	47,4	145,8
		62,5	2,4	-127,2	318,9	95,4	46,6	210,3
		55,0	83,7	-71,2	225,3	42,8	67,3	150,7
<i>Anabaena sp.</i>	Inóculo	45,8	-35,7	105,5	137,9	-1987,7	-1004,6	65,7
		57,2	100,0	100,7	-15,2	-1324,7	-263,3	104,7
		39,3	10,5	26,9	50,3	-572,3	-1121,9	105,2
	Control	-113,1	140,1	68,5	-25,2	-674,6	7754,6	0,3
		-34,1	0,0	53,7	-62,8	-739,8	5812,1	38,0
		0,0	81,7	77,0	-45,0	-1198,1	4758,0	31,4

## APÉNDICE 6: RESULTADOS INHIBICIÓN TOYOGRES ÉPOCA LLUVIOSA

Cuadro 4. Porcentajes de inhibición a lo largo del tiempo del Toyogres en época lluviosa.

Microalga	Tratamiento	Semana					
		1	2	3	4	5	6
<i>Chlorella sp.</i>	Inóculo	-113,6	-244,4	64,9	-140,3	1950,3	-113,7
		-211,9	-453,4	94,3	-199,3	1573,2	-278,5
		-171,1	-525,1	65,5	117,3	1098,5	-86,2
	Control	-315,2	-317,3	56,0	-171,5	1112,5	-98,9
		-201,3	-59,5	73,0	-223,0	1493,2	-53,7
		-244,8	-23,4	131,1	125,4	-118,1	-195,3
<i>Scenedesmus sp.</i>	Inóculo	340,6	45,0	54,2	146,5	0,5	55,2
		404,1	-8,3	21,6	88,6	44,4	-25,3
		392,0	36,6	86,0	-34,6	86,7	-7,5
	Control	355,6	81,0	-44,6	5,8	95,9	-25,8
		295,4	150,1	77,2	-64,1	131,4	-6,5
		113,4	55,6	59,4	37,7	-13,8	-19,1
<i>Anabaena sp.</i>	Inóculo	146,5	253,9	87,4	55,2	1081,0	-259,5
		287,1	119,7	80,4	19,4	1611,4	-272,0
		317,2	-171,0	109,5	-67,5	2126,7	-210,5
	Control	381,3	238,0	37,7	-89,2	1056,4	-151,6
		465,5	300,0	1,0	-21,0	1825,3	-188,8
		345,1	100,0	14,5	20,8	1041,1	-164,2