

Optimización del fotoperiodo y tiempo de cultivo en fotogranulos para la generación de biomasa, remoción de contaminantes en aguas agroindustriales y su valorización en bioplásticos compostables.

Optimization of Photoperiod and Cultivation Time in Photogranules for Biomass Generation, Contaminant Removal in Agro-industrial Waters, and Their Valorization in Compostable Bioplastics.

Chante Barrero Diana Lucia & Quintana Rodríguez Luisa

dchantre@ucundinamarca.edu.co & luisaflozano@ucundinamarca.edu.co

Resumen

El presente estudio evaluó el uso de agregados microalgales-bacterianos cultivados en agua residual agroindustrial como relleno para bioplásticos híbridos biodegradables. Se recolectó agua residual del distrito rural de Berlín, Cundinamarca, y se desarrollaron cultivos en floculadores abiertos, variando el fotoperiodo y el tiempo de residencia en diez tratamientos, optimizados mediante un modelo de superficie de respuesta (RSM). Se analizaron parámetros fisicoquímicos y microbiológicos (DQO, fosfatos, amonio, E. coli) antes y después del tratamiento, junto con la cuantificación de la biomasa producida. Posteriormente, se formularon bioplásticos combinando almidón, glicerol y la biomasa obtenida, y se caracterizaron sus propiedades térmicas, mecánicas y biológicas, incluyendo ensayos de compostabilidad y tracción según la norma ASTM D882-02.

Los tratamientos 4 y 6 (9 días de residencia, fotoperiodo 10:14 h luz/oscuridad) mostraron la mayor producción de biomasa y remoción completa de fosfatos, amonio y E. coli, así como una alta eficiencia de remoción de DQO. En los bioplásticos, la variación del

contenido de glicerol influyó significativamente en la deformación de ruptura y energía absorbida, mejorando la ductilidad sin afectar la resistencia máxima. El ensayo de compostabilidad evidenció una rápida degradación del material, aunque sin diferencias claras entre bioplástico con y sin biomasa.

En conclusión, el uso de consorcios microalgales en agua residual no solo permite la biorremediación eficiente, sino que también provee biomasa viable para la fabricación de bioplásticos con propiedades mecánicas ajustables, representando una alternativa sostenible y funcional frente a los polímeros convencionales.

Palabras clave: Bioplásticos, microalgas, biodegradación, agua residual, biomasa.

Introducción

Los campos agrícolas son la principal fuente de contaminación difusa en zonas rurales, afectando aguas superficiales y subterráneas. Se utilizan fertilizantes inorgánicos, pesticidas y estiércol, ricos en nutrientes como nitrógeno, fósforo y potasio. Estos materiales son altamente solubles, lo que facilita su llegada a las raíces de las plantas, pero también su posible lixiviación hacia los recursos hídricos (1). Las aguas residuales agroindustriales presentan altos de contaminantes que pueden impactar en la calidad del agua, el suelo y el aire (2), no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica, constituida por diferentes porcentajes de celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina etc (1). El alto potencial eutrófico y contaminante de las aguas residuales agroindustriales requiere tratamiento químico y biológico antes de ser vertidas al medio ambiente (4).

Estos efluentes tienen el potencial de ser utilizados como materia prima y procesados para generar bioenergía y otros bioproductos diferentes con un valor económico significativo (5). En este contexto, las microalgas, incluidas las cianobacterias, son una fuente de biomasa renovable. Han ganado importancia debido a su uso potencial en la producción de bioplásticos. Específicamente, es posible utilizar las microalgas completas o los polímeros sintetizados por las células (es decir, celulosa, almidón, PHA, proteínas) para la producción de bioplásticos (7,8). Adicionalmente, las microalgas y las cianobacterias tienen la capacidad de tratar aguas residuales, permitiendo que la biomasa resultante se aproveche como materia prima para la elaboración de bioplásticos (9). Géneros como *Chlorella* y *Scenedesmus* han demostrado ser eficaces en el tratamiento de efluentes, asimilando nutrientes y adsorbiendo contaminantes orgánicos e inorgánicos (10,11).

Paralelamente, la creciente preocupación global por la contaminación plástica ha impulsado la investigación y el desarrollo de bioplásticos y plásticos compostables como alternativas sostenibles a los polímeros convencionales (12). Estos materiales, diseñados para degradarse en condiciones ambientales específicas, ofrecen una solución crucial para mitigar la acumulación de residuos plásticos persistentes. Aunque los bioplásticos representan una fracción menor de la producción mundial de plásticos (13), su popularidad aumenta debido a su capacidad de descomposición en compostaje industrial (14). Ejemplos en Europa muestran el uso de residuos agroalimentarios para producir polímeros biodegradables para la industria del embalaje (16).

En la búsqueda de fuentes sostenibles, la biomasa microalgal se destaca para la producción de biocombustibles y otros productos de alto valor (17). Las microalgas ofrecen ventajas sobre la biomasa vegetal tradicional, como un mayor rendimiento, cultivo en

tierras no agrícolas, recuperación de nutrientes de aguas residuales, captura de carbono eficiente y adaptación a diversas condiciones (17). El cultivo en fotobiorreactores permite utilizar desechos industriales y domésticos, contribuyendo a biocombustibles con menores emisiones y al tratamiento de aguas residuales (18). A pesar de los desafíos en la producción a gran escala (19), la exploración y optimización de fuentes alternativas y sostenibles es crucial para reducir la dependencia de recursos fósiles y minimizar la acumulación de residuos plásticos (20). La investigación en bioplásticos y biomasa microalgal se presenta como un campo vital para desarrollar soluciones efectivas contra la contaminación y la búsqueda de recursos renovables.

En respuesta a la necesidad de explorar estas alternativas, el presente estudio aborda la producción de bioplásticos a partir de agregados microalgales-bacterianos en cultivos que utilizan el agua residual agroindustrial como fuente de nutrientes. Para ello, se optimizaron las condiciones de cultivo utilizando el modelo de superficie de respuesta (RSM), considerando el régimen de luz y el tiempo de residencia, con el fin de maximizar la tasa de crecimiento y la concentración de biomasa en los agregados. Posteriormente, se desarrolló un bioplástico híbrido a partir de un relleno compuesto de los agregados combinado con almidón y glicerol, evaluando sus propiedades térmicas, mecánicas y biológicas para determinar su viabilidad como material biodegradable.

Materiales y métodos

Cultivo de la biomasa

Para el cultivo se recolecto agua residual agroindustrial del distrito del centro poblado rural de la vereda Berlín (“4°23'33.6"N 74°45'40.6"W”) luego se trasladó a el laboratorio de aguas de la Universidad de Cundinamarca para medir los siguientes parámetros al inicio y final de cada tratamiento: DQO, OD, pH, turbidez, tamaño y biomasa del agregado microalgal-bacterial, *E. coli*, fosfatos, amonio. Se desarrollaron cultivos abiertos en dos floculadores a una velocidad de agitación de 50rpm. El régimen de luz natural varió y se controló con dispositivos manuales que cubrían los floculadores. El diseño central de compuesto arrojado por el modelo estadístico- matemático del modelo RSM utilizando el software Statgraphics Centurion 19 arrojo como como resultados 10 combinaciones de fotoperiodos y tiempo total en el floculador (Tabla 1).

Numero de tratamiento	Tiempo total (d)	Fotoperiodo (h) luz/oscuridad
1	2	10 - 14
2	4	8 - 16
3	4	12 - 12
4	9	10 - 14
5	9	7 - 17
6	9	10 - 14
7	9	12 - 12
8	14	12 - 12
9	14	8 - 16
10	16	10 - 14

Tabla 1. Tratamientos de fotoperiodo y tiempo residencia en el floculador.

Cada tratamiento se desarrolló por triplicado y al final, se procedió a separar la biomasa para lo cual se utilizó un embudo de decantación. La biomasa fue trasladada a un tubo falcón, el cual paso por un vortex de 5 a 10 min hasta que la biomasa estuvo completamente homogénea. La biomasa se secó a 60°C durante 8 horas, se trituró en un mortero y por último se cuantifico la biomasa por gravimetría.

Análisis químico y microbiológico

Los análisis de fosfatos, amonio y demanda química de oxígeno (DQO) se realizaron mediante un método espectrofotométrico en el rango visible, utilizando un espectrofotómetro HANNA Instruments HI 83399 y los kits correspondientes. La medición STS y SVS se realizó de acuerdo con el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Se filtraron 100 mL de agua de la entrada y salida de los fotobiorreactores utilizando un equipo de filtración MF-31 Marca Sterlitech y papel filtro. Los filtros fueron secados a 105 °C durante una hora, estabilizados en un desecador y posteriormente pesados. Para el control del pH, se utilizó un potenciómetro calibrado HANNA (HI 9124), el cual se dejó en el floculador del agua residual durante un minuto para permitir la estabilización de la temperatura antes de la lectura. La turbidez se midió con un turbidímetro portátil calibrado (HI98703) Hanna, siguiendo un tiempo de estabilización de un minuto antes del registro de los valores. Para la medición del oxígeno disuelto (OD), se empleó un medidor de oxígeno disuelto HANNA (HI 9146).

El procedimiento para la detección de *Escherichia coli* se llevó a cabo utilizando agar chromogenic como medio de cultivo. Se preparó disolviendo el sustrato deshidratado

en agua destilada con agitación constante. La mezcla se calentó en un horno a 105 °C hasta su completa disolución. Posteriormente, la solución se enfrió hasta alcanzar la temperatura adecuada y se dispensó en placas de Petri estériles.

Para la siembra, la muestra fue filtrada mediante una membrana (0.45um), la cual se colocó sobre la superficie del agar selectivo. Las placas se incubaron a 37°C durante un periodo de 24 horas. Tras la incubación, se realizó el conteo de colonias bacterianas. Las colonias de color azul oscuro a violeta se identificaron como *E. coli*. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Desarrollo y caracterización del bioplástico

Para la elaboración del bioplástico, se estudiaron dos formulaciones variando las proporciones de glicerina. El objetivo principal fue identificar la combinación que permitiera la formación de una película de bioplástico con características adecuadas.

En la primera formulación, se preparó una mezcla inicial de almidón al 3% que se sometió a agitación magnética a una velocidad de agitación de 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura exterior de 150°. Posteriormente, se incorporó el glicerol en una proporción almidón-glicerol de 1:0.33 y ácido acético en una proporción almidón-ácido acético de 1:0.66, manteniendo la agitación constante a 1500 rpm. A una de las mezclas se le añadió 0.04 gramos de biomasa microalgal y se agitó durante 5 minutos adicionales, mientras a otra dispersión sin microalgas se utilizó como blanco para comparar los resultados.

En un segundo ensayo, se repitió el procedimiento anterior, modificando únicamente la proporción de glicerol a 1:0.50. De igual manera, se prepararon dos muestras, una con biomasa microalgal y otra como blanco.

Finalmente, todas las muestras obtenidas en los ensayos se vertieron uniformemente en moldes y se introdujeron en un horno a una temperatura de 60°C durante un período de entre 2 y 3 días para su secado y formación de las películas de bioplástico.

Ensayo de compostabilidad

Para evaluar la biodegradación de los bioplásticos generados se adaptó el ensayo descrito en la norma ASTM D6400-23. Se preparó una matriz de compostaje utilizando una mezcla 50/50 de tierra y estiércol, la cual se introdujo en recipientes de vidrio. Posteriormente, tanto las muestras de bioplástico como las muestras de control (blanco) se cortaron en cuadrados de 1 cm x 1 cm. Se dispusieron tres réplicas de bioplástico y tres réplicas de control, enterrándolas a una misma profundidad dentro de los recipientes con la mezcla de la matriz de compostaje. Tras un período de una semana, se realizó una observación para determinar el estado de degradación de las muestras que consistió en medir el área con ayuda del software libre J- image. Adicionalmente, se sembraron semillas de *Coriandrum sativum* (cilantro) para una evaluación cualitativa de la fitotoxicidad potencial de los productos de degradación.

Ensayo mecánico

Este ensayo se realizó según la norma ASTM D882-02 la cual establece un método de ensayo para determinar las propiedades de tracción de plásticos en forma de láminas delgadas, incluyendo películas con un espesor menor a 1,0 mm (0.04 pulgadas). Este ensayo mecánico fue hecho con el equipo texturómetro TA.XT.plusC Texture Analyzer, por triplicado en la Universidad de Loja Ecuador. Los resultados se obtuvieron a partir de

curvas de esfuerzo-deformación y se promediarán en múltiples réplicas de muestras de las películas.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Statgraphics Centurion 19 (21). Para la optimización del proceso, se empleó la metodología de Superficie de Respuesta (RSM, por sus siglas en inglés). En este estudio, las variables independientes consideradas fueron el fotoperiodo y el tiempo residencia, mientras que la variable dependiente correspondió a la producción de biomasa microalgal. A través de la construcción de un modelo matemático, la RSM permitió evaluar la influencia de cada factor y sus interacciones sobre la respuesta del sistema.

Se aplicó un análisis de varianza simple (ANOVA) utilizando R para evaluar los resultados de los ensayos mecánicos y biológicos de los bioplásticos desarrollados con los agregados de microalgas y los blancos, así como de las dos formulaciones de bioplástico generadas. Este análisis se llevó a cabo utilizando el software R. Para verificar los supuestos del modelo, se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk a los residuos del modelo, empleando la función `shapiro.test()` de R. Además, se evaluó la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene, utilizando la función `Levene Test()` del paquete `car`. Esta evaluación estadística permitió identificar diferencias significativas entre tratamientos.

Resultados y discusión

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A-Tiempo	0.0172439	1	0.172439	1.24	0.3282
B:Fotoperiodo	0.00228358	1	0.00228358	0.16	0.7063
AA	0.0251601	1	0.0251601	1.81	0.2501
AB	0.00002025	1	0.00002025	0.00	0.9714
BB	0.031635	1	0.031635	2.27	0.2063
Total error	0.0557181	1	0.0139295		
Total (corr)	0.115217	1			

Tabla 2. Análisis de varianza siguiendo modelo RSM

Para la producción de biomasa a partir de agua residual agroindustrial, la aplicación del modelo de superficie de respuesta (RSM) no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones evaluadas de fotoperiodo y tiempo de cultivo. Sin embargo, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se han reportado estudios previos que utilicen este enfoque estadístico para optimizar las condiciones de formación de fotogranulos en este tipo de matriz residual.

Producción de biomasa a partir de aguas residuales agroindustriales

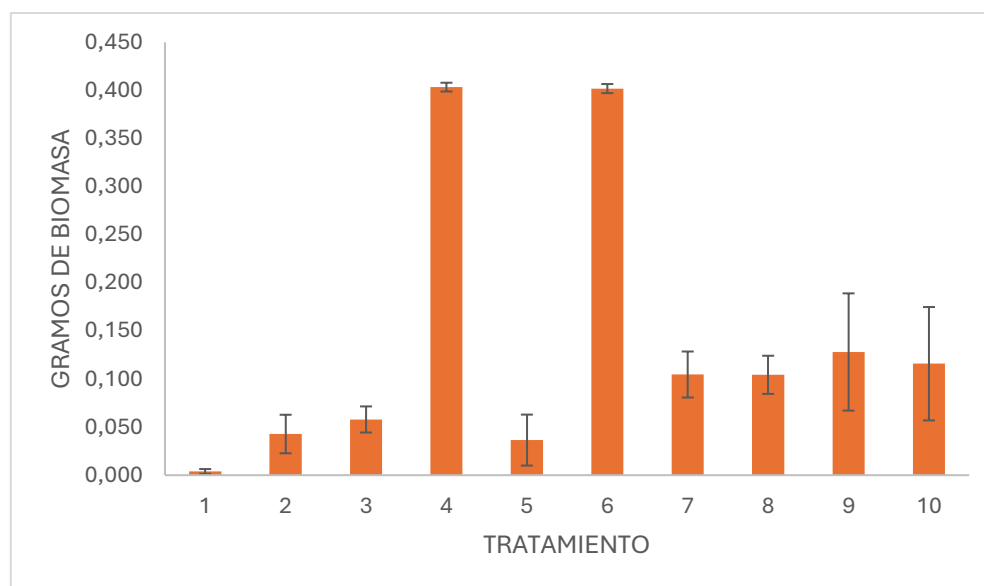


Figura 1. Producción de biomasa a través de los diferentes tratamientos.

La mayor producción de biomasa fue a los 9 días con un fotoperiodo de 10h luz y 14h de oscuridad correspondientes al tratamiento 4 y 6. Por otra parte, la menor producción fue en el fotoperiodo de 10h de luz y 14h de oscuridad con un tiempo total de 2 días.

Estudios previos han mostrado resultados divergentes. Por ejemplo, (22) la microalga aislada *Tetraselmis chui* exhibió la máxima producción de biomasa celular bajo un ciclo de luz/oscuridad de 24:0 h, superando los ciclos de 12:12 h y 18:6 h. De manera similar, Co et al. (23) reportaron que *Phaeodactylum tricornutum* creció más rápidamente con un ciclo de luz continua (24:0 h) en comparación con un ciclo de 12:12 h.

Sin embargo, estos resultados contrastan con lo observado en *Nannochloropsis sp.* En ese estudio, la extensión del fotoperiodo a 24:0 h resultó en una disminución de la tasa de crecimiento debido a la fotoinhibición(24). Este fenómeno, la inhibición de la

fotosíntesis por exceso de luz, es un factor crucial para considerar al optimizar las condiciones de cultivo de microalgas.

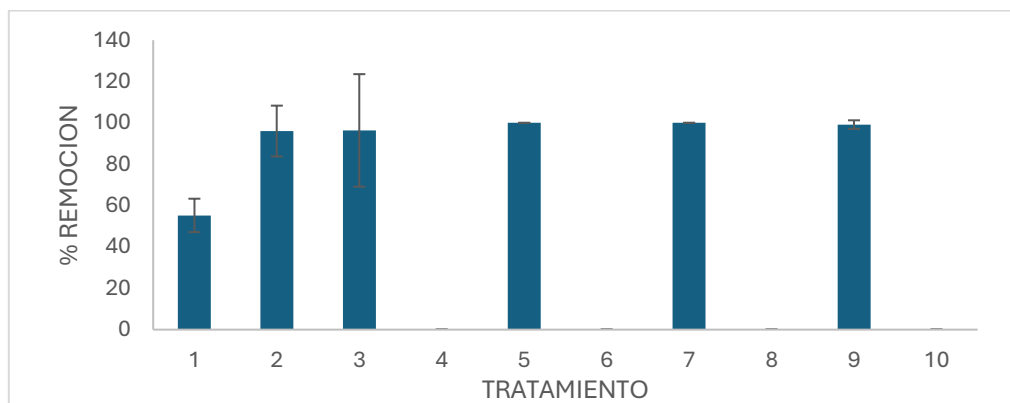


Figura 2. Remoción de DQO en los diferentes tratamientos. Los valores en 0 corresponden a un aumento de DQO.

Los resultados de este estudio sobre la eliminación de DQO por microalgas revelan una compleja interacción entre el crecimiento algal y la carga orgánica del agua residual. Si bien se observa una reducción de la DQO, es crucial considerar que las microalgas también pueden liberar compuestos orgánicos durante su crecimiento, lo que potencialmente aumenta la DQO. Esta dinámica subraya la importancia de optimizar las condiciones de cultivo para maximizar la eliminación neta de DQO (25).

La eficiencia de las microalgas en la reducción de DQO está intrínsecamente ligada a las condiciones de cultivo. Concentraciones subóptimas de nutrientes o intensidad de luz pueden limitar la capacidad de las microalgas para consumir compuestos orgánicos (26). Es importante destacar que, en nuestros ensayos de jarras para el tratamiento 4, 6 y 8 se observó un aumento en la DQO. Este incremento sugiere que la agitación por sí sola

favoreció la ruptura de la materia orgánica compleja, especialmente aquellas con paredes celulares más débiles (19)..

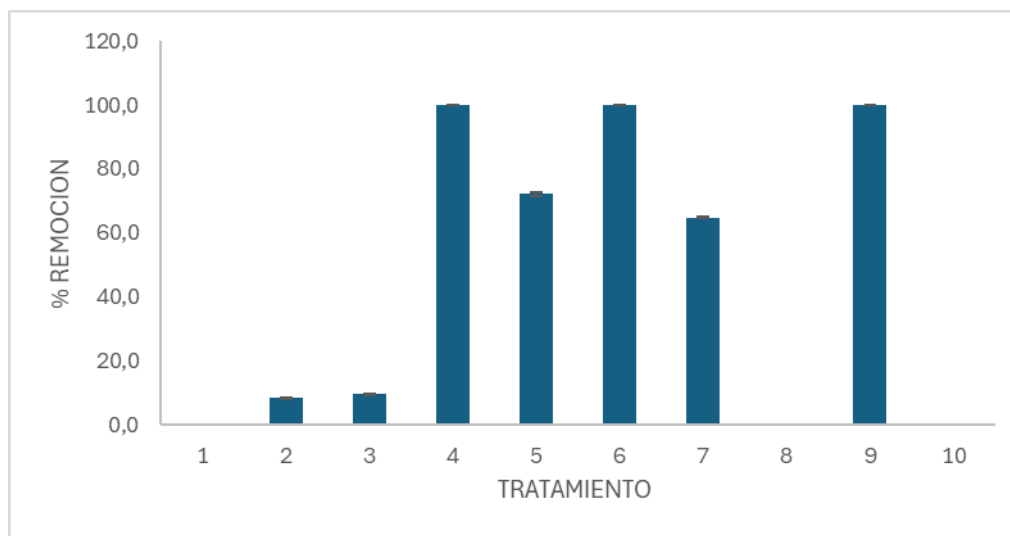


Figura 3. Remoción de Fosfato en Función del tratamiento. Los valores que se presentan en cero corresponden a un aumento del fosfato.

Los tratamientos 8 y 10 que mostraron un aumento neto de fosfato (0% de remoción) se caracterizaron por concentraciones iniciales relativamente bajas de fosfato (0.43 mg/L), y una duración prolongada. El tratamiento 1, con una concentración inicial de 6.57 mg/L, experimentó un aumento significativo de fosfato. Los tratamientos 2 y 3, que iniciaron con concentraciones elevadas de fosfato (15.57 mg/L), tampoco lograron una remoción significativa en tan corto período. Estos resultados sugieren que, en condiciones de baja concentración de fósforo, las microalgas tienden a priorizar la supervivencia y el mantenimiento básico, en lugar de la asimilación activa y el almacenamiento de fósforo (28,29), también factores como la presencia de ciertos iones como calcio, hierro, y bicarbonato, y la concentración de materia orgánica, afectan la solubilidad y disponibilidad del fosfato en el agua residual agroindustrial (30–32). En los casos de altas concentraciones

de fosfato pueden superar la capacidad de absorción de las microalgas presentes, especialmente si la biomasa inicial es baja o si las condiciones de cultivo (luz, nutrientes, pH) no son óptimas para un rápido crecimiento algal (33–35).

Por otro lado, los tratamientos con una duración de 9 días mostraron una mayor capacidad de remoción, incluso con concentraciones iniciales variables. Los tratamientos 5 y 7, que iniciaron con concentraciones de fosfato de 3.97 mg/L, lograron reducciones significativas a 1.1 mg/L y 1.4 mg/L respectivamente. Los tratamientos 4 y 6, con concentraciones iniciales más bajas (2.1 mg/L), alcanzaron una remoción completa. Esto indica que un tiempo de tratamiento de 9 días permitió al consorcio microalgal asimilar el fosfato de manera efectiva. La eficiencia pareció estar influenciada por la concentración inicial presentes en el agua residual residuales y del tiempo de duración, ya que, presentan variabilidad en los parámetros, lo que puede favorecer o inhibir la asimilación de fosfato por el consorcio microalgal (36,37).

El tratamiento 9, que comenzó con una concentración de fosfato de 6.63 mg/L, logró una remoción completa al final del tratamiento. Esto sugiere que, un mayor tiempo de tratamiento permite que las microalgas completen varios ciclos de crecimiento, aumentando la biomasa y, por lo tanto, la capacidad total de asimilación de fosfato, incluso si la luz diaria es limitada (25,36,38)

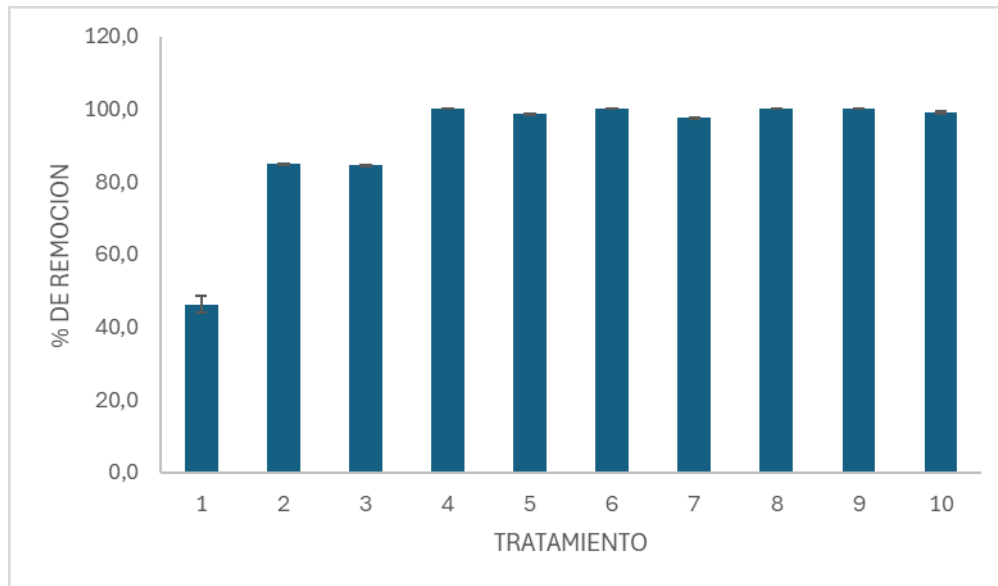


Figura 4. Remoción de Amonio en Función del tratamiento.

La eficiencia en la remoción de amonio varió significativamente entre los tratamientos aplicados, desde un mínimo del 46.3% hasta un máximo del 100%. El tratamiento 1, que se caracterizó por una concentración inicial de amonio de 22.9 mg/L y un período de tratamiento de solo 2 días, exhibió la menor eficiencia (46,3 %). Esta baja eficiencia podría atribuirse a la potencial toxicidad del amonio a concentraciones elevadas en las etapas iniciales del cultivo. Si bien el amonio es la fuente de nitrógeno preferida por las microalgas, concentraciones elevadas pueden inducir estrés fisiológico e inhibir las vías metabólicas responsables de su asimilación, limitando la remoción durante los primeros días del tratamiento (39,40). En contraste, los tratamientos 2 y 3, a pesar de iniciar con una elevada concentración de amonio (53.9 mg/L) y un tiempo de tratamiento de 4 días, lograron una remoción sustancial (84.8% y 84.4% respectivamente), lo que sugiere que, en presencia de suficiente luz, carbono y otros nutrientes, las microalgas pueden crecer rápidamente y aumentar su biomasa, lo que incrementa la capacidad total de asimilación de amonio en un corto periodo (41–43). Alternativamente, en estos consorcios microbianos, la

presencia de bacterias nitrificantes puede complementar la remoción de amonio, aunque en estos casos la asimilación directa por microalgas suele ser el mecanismo dominante (44,45).

Los tratamientos 5 y 7, con una concentración inicial de amonio de 17.7 mg/L y 9 días de tratamiento, exhibieron una remoción casi completa (98.7% y 97.61%), resaltando el beneficio de un tiempo de tratamiento más prolongado permite que las microalgas completen varios ciclos de crecimiento, aumentando la biomasa y, por tanto, la capacidad total de asimilación de amonio (36,46). De manera notable, los tratamientos 4, 6, 8 y 9 alcanzaron una remoción total del 100% de amonio, independientemente de las diferentes concentraciones iniciales (que variaron desde 6.63 mg/L hasta 22.53 mg/L) y los fotoperíodos aplicados. Este hallazgo subraya que un tiempo de exposición suficiente permite que la biomasa algal crezca y asimile gradualmente todo el amonio disponible (42).

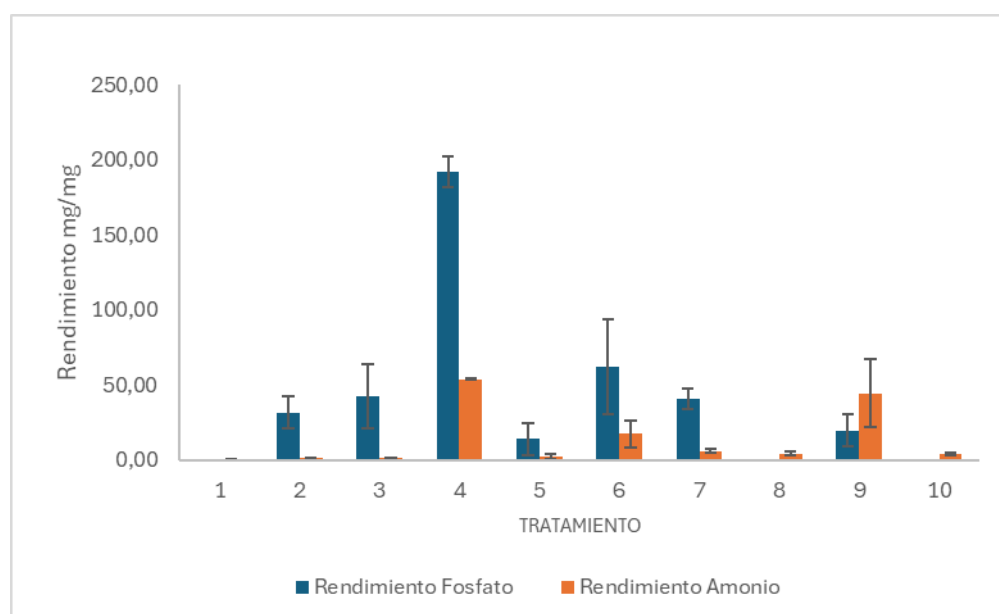


Figura 5. Rendimiento de biomasa en función de fosfato y amonio.

El análisis del rendimiento de amonio y fosfato, calculado como la biomasa producida por la cantidad de nutriente removido (mg biomasa/mg nutriente), revela

patrones diferenciados entre los tratamientos y entre ambos nutrientes. Específicamente, los tratamientos 1, 8 y 10 no demostraron remoción de fosfato, lo que podría deberse a la baja concentración inicial (tratamientos 8 y 10), que no incentivó la asimilación algal, y a la corta duración del tratamiento (tratamiento 1), que impidió el establecimiento de una biomasa activa (34). En contraste, el tratamiento 4 se distingue por un rendimiento de fosfato excepcionalmente alto (192,16 mg biomasa/mg P), superando significativamente a los demás tratamientos. Los tratamientos 2, 3, 5, 6, 7 y 9 exhiben rendimientos positivos, aunque notablemente inferiores en comparación con el tratamiento 4.

En cuanto al rendimiento de amonio, se observa una variabilidad significativa a lo largo de los tratamientos. Los tratamientos con los rendimientos promedio más elevados fueron el 4 (53,71 mg biomasa/mg N), el 6 (17,52 mg biomasa/mg N) y el 9 (44,3 mg biomasa/mg N), con una duración de 9 y 14 días respectivamente. Estos valores permiten que los procesos biológicos (nitrificación, asimilación y desnitrificación) se completen, logrando una mayor reducción de amonio, especialmente cuando las concentraciones iniciales no son excesivamente altas (47,48). Por otro lado, los tratamientos 1 (0,41 mg biomasa/mg N) y 8 (0,31 mg biomasa/mg N) exhibieron los rendimientos promedio de amonio más bajos, lo que señala una menor eficiencia en la conversión del amonio removido en biomasa. Esta observación se atribuye, en el tratamiento 1, al corto período de asimilación disponible para las microalgas en el entorno experimental, y en el tratamiento 8, a las bajas concentraciones iniciales de nitrógeno que pudieron haber limitado el crecimiento algal.

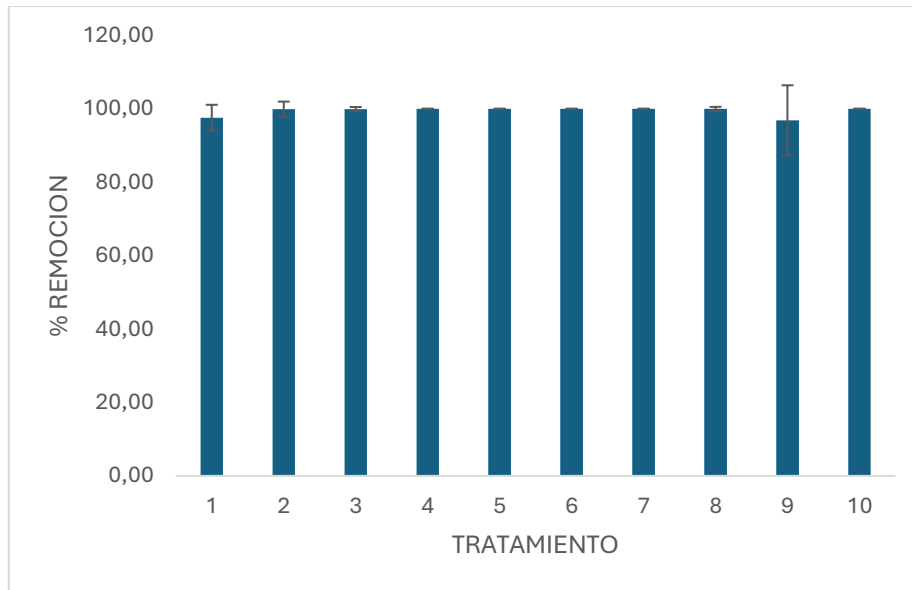


Figura 6. Remoción de *Escherichia coli* en función del tratamiento.

El análisis de la eficiencia de remoción de *Escherichia coli* en diversos tratamientos revela resultados prometedores en la mayoría de las condiciones evaluadas. La representación gráfica de los porcentajes de remoción exhibe consistentemente valores cercanos al 100% para los tratamientos numerados del 1 al 8 y el tratamiento 10. Esta marcada tendencia subraya la alta efectividad de estos métodos para eliminar la bacteria *E. coli* bajo las condiciones experimentales establecidas. La baja variabilidad observada entre las réplicas de estos tratamientos, evidenciada por las pequeñas barras de error, refuerza la robustez y confiabilidad de los resultados obtenidos.

No obstante, el tratamiento número 9 se desvía ligeramente de esta tendencia general. Si bien aún muestra una remoción considerable de *E. coli*, se observa una leve disminución en su eficiencia en comparación con el resto de los tratamientos. Adicionalmente, la mayor barra de error asociada a este tratamiento sugiere una variabilidad más pronunciada en su capacidad de remoción.

En conjunto, los datos presentados en la gráfica indican que la mayoría de los tratamientos investigados demuestran una alta capacidad y consistencia en la remoción de *Escherichia coli*. Factores como el pH, el oxígeno disuelto (OD) y la producción de metabolitos naturales producidos por los fotogranulos pueden tener un impacto en la población de *E. coli* (13). Žitnik et al. (14) demostró que valores de pH superiores a 7.5 y una concentración de *C. vulgaris* mayor a 1×10^7 células/mL son parámetros clave para la reducción de *E. coli* en aguas negras (15).

Evaluación propiedades mecánicas de los bioplásticos generados con los fotogranulos

	Resistencia (Mpa)	Deformación de ruptura (%)	Energía por unidad de volumen para romper (MJ/m³)
<i>Blanco VS biomasa y 1,5</i>	0,0664	0,953	0,199
<i>Blanco VS biomasa y 1</i>	0,0937	0,3	0,414
<i>Tratamientos biomasa y diferentes ml glicerol</i>	0,939	*0,0385	**0,00226

Tabla 3. Valores F análisis de varianza entre diferentes formulaciones de bioplástico. (*) Diferencia significativas, () ddiferencias muy significativas**

Los ensayos de resistencia mecánica, evaluados mediante el análisis de varianza (ANOVA) de los valores F, revelaron comportamientos diferenciados entre las formulaciones de bioplástico con distintas concentraciones de glicerol (1 ml y 1.5 ml).

En cuanto a la resistencia (MPa), el análisis no arrojó diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones ($p > 0.05$ para ambos, tratamiento vs el blanco). Este hallazgo sugiere, cambios pequeños en la concentración de pueden no ser suficientes para alterar significativamente la red polimérica y, por tanto, la resistencia mecánica (49–51). En otras palabras, la rigidez o la fuerza máxima que el material puede resistir antes de ceder no se vio significativamente afectada por la concentración de biomasa utilizada en este estudio (0.4% en peso).

La ausencia de un efecto significativo del glicerol en la resistencia del bioplástico podría explicarse por el hecho de que la resistencia estructural inicial del material está principalmente determinada por la matriz polimérica base (la biomasa microalgal en este caso). Esta idea se ve respaldada por estudios que señalan que la biomasa microalgal, rica en proteínas y polisacáridos, forma la estructura principal del bioplástico y determina su resistencia mecánica básica. Se ha observado que un mayor contenido de biomasa mejora la resistencia y el módulo del material, independientemente del plastificante (52,53). El glicerol, actuando como un plastificante, tiende a aumentar la flexibilidad y reducir la fragilidad del material, lo que se manifiesta principalmente en su comportamiento ante la deformación y la absorción de energía, más que en su límite de resistencia inicial (53).

Sin embargo, al analizar la deformación de ruptura (%) y la energía por unidad de volumen para romper (MJ/m^3), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones ($p < 0.05$ para el contraste "Tratamientos biomasa y diferentes ml glicerol"). La formulación con 1.5 ml de glicerol demostró valores significativamente mayores tanto en la deformación máxima que el material puede soportar antes de fracturarse. La razón de esto radica en que una mayor concentración de glicerol induce la

separación y el aumento de la movilidad de las cadenas poliméricas, lo que consecuentemente permite una mayor elongación antes de la ruptura (54,55). Igualmente, se constató una mayor cantidad de energía que puede absorber por unidad de volumen antes de la ruptura. Debido a este incremento en la deformación y la energía absorbida, el material se vuelve más resistente a impactos y deformaciones, lo cual resulta favorable en aplicaciones que exigen flexibilidad y durabilidad (56,57).

Tratamiento	% de compostabilidad		Geminación <i>Coriandrum sativum</i>	
1	100 %		Germinó	
2	100%		Germinó	
Blanco	100%		Germinó	

Tabla 4. Ensayo de compostabilidad e inhibición de germinación con *Coriandrum sativum*

Una semana después de la disposición de las muestras en la matriz de compostaje, se observó la ausencia visual de las réplicas tanto del bioplástico como del material de

control (blanco). Este hallazgo sugiere que ambos materiales experimentaron una degradación significativa o bajo las condiciones del ensayo. También se pudo comprobar que las semillas de *Coriandrum sativum* pudieron germinar, lo que comprueba que los productos de biodegradación no inhiben la germinación (58).



Figura 7. Replica de bioplástico con relleno de microalga.

Conclusiones

Aunque el modelo de RSM, no arrojó diferencias significativas entre los tratamientos para la generación de biomasa, si se lograron ver amplias diferencias en las demás condiciones. Las condiciones de cultivo óptimas para un crecimiento significativo de biomasa y una eficiente remoción de contaminantes (DQO, fosfato, amonio y *E. coli*) se identificaron en los tratamientos 4 y 6, caracterizados por un fotoperíodo de 10 horas luz y 14 horas oscuridad durante un tiempo de residencia de 9 días. Si bien la remoción de DQO es compleja, el robusto crecimiento algal sugiere una actividad metabólica favorable para la degradación orgánica. Finalmente, la eliminación total de *E. coli* en estos tratamientos

también destaca su potencial para la desinfección. Por lo tanto, la combinación de un fotoperíodo de 10:14 Luz:Oscuridad y un tiempo de residencia de 9 días parece establecer un equilibrio favorable para la producción de biomasa y la biorremediación integral en este sistema. Con la biomasa generada fue posible generar un bioplástico, que, aunque no presento diferencias significativas con los blancos, tiene potencial para estudios posteriores en donde se aumente la concentración de biomasa. También se probó que era completamente compostable en una semana y los productos de degradación no inhibieron la germinación de plantas (*Coriandrum sativum*).

Bibliografía

1. García-Galán MJ, Gutiérrez R, Uggetti E, Matamoros V, García J, Ferrer I. Use of full-scale hybrid horizontal tubular photobioreactors to process agricultural runoff. *Biosyst Eng* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2025 May 15];166:138–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1537511017308644>
2. Fuess LT, Garcia ML. Implications of stillage land disposal: A critical review on the impacts of fertigation. *J Environ Manage* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2025 Apr 26];145:210–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479714003351>
3. Farooq U, Kozinski JA, Khan MA, Athar M. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents – A review of the recent literature. *Bioresour Technol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2025 Apr 26];101(14):5043–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852410003019>

4. Ferreira LC, Fernandes JR, Peres JA, Tavares PB, Lucas MS. Wireless UV-A LEDs-driven AOP in the treatment of agro-industrial wastewaters. *Environ Res* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2025 Apr 26];200:111430. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935121007246>
5. Dahiya S, Kumar AN, Shanthi Sravan J, Chatterjee S, Sarkar O, Mohan SV. Food waste biorefinery: Sustainable strategy for circular bioeconomy. *Bioresour Technol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2025 Apr 26];248:2–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852417312920>
6. Rosa D, Medeiros ABP, Martinez-Burgos WJ, do Nascimento JR, de Carvalho JC, Sydney EB, et al. Biological hydrogen production from palm oil mill effluent (POME) by anaerobic consortia and *Clostridium beijerinckii*. *J Biotechnol* [Internet]. 2020 Nov 10 [cited 2025 Apr 26];323:17–23. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165620301620>
7. Noreen A, Zia KM, Zuber M, Ali M, Mujahid M. A critical review of algal biomass: A versatile platform of bio-based polyesters from renewable resources. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2025 Apr 26];86:937–49. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301630068X>
8. Chia WY, Ying Tang DY, Khoo KS, Kay Lup AN, Chew KW. Nature's fight against plastic pollution: Algae for plastic biodegradation and bioplastics production. *Environmental Science and Ecotechnology* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2025 Apr 26];4:100065. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666498420300570>

9. López-Pacheco IY, Rodas-Zuluaga LI, Cuellar-Bermudez SP, Hidalgo-Vázquez E, Molina-Vazquez A, Araújo RG, et al. Revalorization of Microalgae Biomass for Synergistic Interaction and Sustainable Applications: Bioplastic Generation. Vol. 20, *Marine Drugs*. MDPI; 2022.
10. Sousa CA, Sousa H, Vale F, Simões M. Microalgae-based bioremediation of wastewaters - Influencing parameters and mathematical growth modelling. *Chemical Engineering Journal* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2025 Apr 26];425:131412. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894721029934>
11. Wicker RJ, Kumar G, Khan E, Bhatnagar A. Emergent green technologies for cost-effective valorization of microalgal biomass to renewable fuel products under a biorefinery scheme. *Chemical Engineering Journal* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Apr 26];415:128932. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894721005258>
12. Goel V, Luthra P, Kapur GS, Ramakumar SSV. Biodegradable/Bio-plastics: Myths and Realities. Vol. 29, *Journal of Polymers and the Environment*. Springer; 2021. p. 3079–104.
13. European bioplastics. European Bioplastics defines bioplastics as plastics that are biobased, biodegradable, or both. 2023;
14. Giovanni Dolci. Influence of the Collection Equipment on Organic Waste Treatment: Technical and Environmental Analyses [Internet]. 2022. Available from: <https://link.springer.com/bookseries/11159>
15. Slompo NDM, Quartaroli L, Fernandes TV, Silva GHR da, Daniel LA. Nutrient and pathogen removal from anaerobically treated black water by microalgae. *J Environ Manage*

[Internet]. 2020 Aug 15 [cited 2025 May 15];268:110693. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479720306253>

16. Visco A, Scolaro C, Facchin M, Brahim S, Belhamdi H, Gatto V, et al. Agri-Food Wastes for Bioplastics: European Prospective on Possible Applications in Their Second Life for a Circular Economy. *Polymers* 2022, Vol 14, Page 2752 [Internet]. 2022 Jul 5 [cited 2025 May 5];14(13):2752. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/14/13/2752/htm>
17. Alrashidi W, Alhazmi S, Sayegh F, Edris S. Microalga-Based Electricity Production: A Comprehensive Review. Vol. 18, *Energies*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2025.
18. Dębowski M, Zieliński M, Kazimierowicz J, Kujawska N, Talbierz S. Microalgae Cultivation Technologies as an Opportunity for Bioenergetic System Development—Advantages and Limitations. *Sustainability* 2020, Vol 12, Page 9980 [Internet]. 2020 Nov 29 [cited 2025 May 5];12(23):9980. Available from: <https://www.mdpi.com/2071-1050/12/23/9980/htm>
19. Kumar R, Lalnundiki V, Shelare SD, Abhishek GJ, Sharma S, Sharma D, et al. An investigation of the environmental implications of bioplastics: Recent advancements on the development of environmentally friendly bioplastics solutions. *Environ Res* [Internet]. 2024 Mar 1 [cited 2025 May 5];244:117707. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935123025112>
20. utilitalia. Managing and recovering bioplastics. 2020;
21. STATGRAPHICS | Data Analysis Solutions [Internet]. [cited 2025 May 4]. Available from: <https://www.statgraphics.com/>

22. Meseck SL, Alix JH, Wikfors GH. Photoperiod and light intensity effects on growth and utilization of nutrients by the aquaculture feed microalga, *Tetraselmis chui* (PLY429). *Aquaculture* [Internet]. 2005 May 18 [cited 2025 Apr 27];246(1–4):393–404. Available from: [https://www.sciencedirect-com.ucundinamarca.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S0044848605001225](https://www.sciencedirect.com/ucundinamarca.basesdedatosezproxy.com/science/article/pii/S0044848605001225)
23. Co (A C T, Villa A, Herazo D, Torregroza AC. Efecto Del Fotoperiodo Sobre El Crecimiento De La Diatomea *Chaetoceros calcitrans* (Clon C-Cal) En Cultivos Estáticos. *Intropica: Revista del Instituto de Investigaciones Tropicales*, ISSN-e 2389-7864, ISSN 1794-161X, Vol 9, N° 1, 2014, págs 111-117 [Internet]. 2014 [cited 2025 May 11];9(1):111–7. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5111593&info=resumen&idioma=ENG>
24. Wahidin S, Idris A, Shaleh SRM. The influence of light intensity and photoperiod on the growth and lipid content of microalgae *Nannochloropsis* sp. *Bioresour Technol* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2025 Apr 27];129:7–11. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852412017063?via%3Dihub>
25. Lee CS, Lee SA, Ko SR, Oh HM, Ahn CY. Effects of photoperiod on nutrient removal, biomass production, and algal-bacterial population dynamics in lab-scale photobioreactors treating municipal wastewater. *Water Res* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2025 May 4];68:680–91. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135414007271?via%3Dihub>
26. Riaño B, Hernández D, García-González MC. Microalgal-based systems for wastewater treatment: Effect of applied organic and nutrient loading rate on biomass composition. *Ecol*

- Eng [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2025 Apr 27];49:112–7. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925857412002819>
27. Rajabu YR, Manyele SV, Rajabu YR, Manyele SV. Performance Improvement for Sisal Waste Anaerobic Biodegradation by Digester Redesign and Feed Size Reduction. *Engineering* [Internet]. 2015 Sep 21 [cited 2025 May 5];7(9):553–66. Available from:
<https://www.scirp.org/journal/paperinformation?paperid=59775>
28. Guo L, Wu Q, Lai YJS, Eustance E, Rittmann BE. Revealing the role of phosphorus supply on the phosphorus distribution and lipid production in *Scenedesmus obliquus* UTEX 393 during nitrogen starvation. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2023 Feb 1 [cited 2025 May 4];858:159811. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896972206911X?via%3Dihub>
29. Wu Q, Guo L, Li X, Wang Y. Effect of phosphorus concentration and light/dark condition on phosphorus uptake and distribution with microalgae. *Bioresour Technol* [Internet]. 2021 Nov 1 [cited 2025 May 4];340:125745. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852421010865?via%3Dihub>
30. Ou W, Lan X, Guo J, Cai A, Liu P, Liu N, et al. Preparation of iron/calcium-modified biochar for phosphate removal from industrial wastewater. *J Clean Prod* [Internet]. 2023 Jan 10 [cited 2025 May 4];383:135468. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652622050429?via%3Dihub>
31. Lv N, Li X, Qi X, Ren Y. Calcium-modified granular attapulgit removed phosphorus from synthetic wastewater containing low-strength phosphorus. *Chemosphere* [Internet]. 2022

Jun 1 [cited 2025 May 4];296:133898. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653522003915?via%3Dihub>

32. Deng L, Dhar BR. Phosphorus recovery from wastewater via calcium phosphate precipitation: A critical review of methods, progress, and insights. *Chemosphere* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2025 May 4];330:138685. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653523009529?via%3Dihub>
33. Gentili FG. Microalgal biomass and lipid production in mixed municipal, dairy, pulp and paper wastewater together with added flue gases. *Bioresour Technol* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2025 May 4];169:27–32. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414009158?via%3Dihub>
34. Pham TL, Bui MH. Removal of Nutrients from Fertilizer Plant Wastewater Using *Scenedesmus* sp.: Formation of Bioflocculation and Enhancement of Removal Efficiency. *J Chem* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2025 May 4];2020(1):8094272. Available from:
[/doi/pdf/10.1155/2020/8094272](https://doi/pdf/10.1155/2020/8094272)
35. Ajala SO, Alexander ML. Assessment of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, and *Oocystis minuta* for removal of sulfate, nitrate, and phosphate in wastewater. *International Journal of Energy and Environmental Engineering* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2025 May 4];11(3):311–26. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40095-019-00333-0>
36. Delgadillo-Mirquez L, Lopes F, Taidi B, Pareau D. Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture. *Biotechnology Reports* [Internet].

2016 Sep 1 [cited 2025 May 4];11:18–26. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215017X16300182?via%3Dihub>

37. Salgado EM, Esteves AF, Gonçalves AL, Pires JCM. Microalgal cultures for the remediation of wastewaters with different nitrogen to phosphorus ratios: Process modelling using artificial neural networks. *Environ Res* [Internet]. 2023 Aug 15 [cited 2025 May 4];231:116076. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001393512300868X?via%3Dihub>
38. Vazirzadeh A, Jafarifard K, Ajdari A, Chisti Y. Removal of nitrate and phosphate from simulated agricultural runoff water by *Chlorella vulgaris*. *Science of The Total Environment* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 May 4];802:149988. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969721050634?via%3Dihub>
39. Salbitani G, Carfagna S. Ammonium Utilization in Microalgae: A Sustainable Method for Wastewater Treatment. *Sustainability* 2021, Vol 13, Page 956 [Internet]. 2021 Jan 19 [cited 2025 May 4];13(2):956. Available from: <https://www.mdpi.com/2071-1050/13/2/956/htm>
40. Li J, Qian J, Tang J, Jin Z, Lu Q, Cheng J, et al. Enhancement of ammonium removal from landfill leachate using microalgae by an integrated strategy of nutrient balance and trophic mode conversion. *Algal Res* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 May 4];61:102572.
Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221192642100391X?via%3Dihub>
41. Oluwole OR, Tobin CM, Banjo TT, Efunwoye OO, Awoyemi SO. The use of immobilized microalgal bead concentrations in the removal of ammonium nitrogen from synthetic

wastewater. Niger J Biotechnol [Internet]. 2019 Aug 22 [cited 2025 May 4];36(1):171–6. Available from: <https://www.ajol.info/index.php/njb/article/view/189245>

42. Zhou Y, He Y, Zhou Z, Xiao X, Wang M, Chen B. A newly isolated microalga *Chlamydomonas* sp. YC to efficiently remove ammonium nitrogen of rare earth elements wastewater. J Environ Manage [Internet]. 2022 Aug 15 [cited 2025 May 4];316:115284. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030147972200857X?via%3Dihub>
43. Liu X, Wang K, Zhang J, Wang J, Wu J, Peng F. Ammonium removal potential and its conversion pathways by free and immobilized *Scenedesmus obliquus* from wastewater. Bioresour Technol [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2025 May 4];283:184–90. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852419303852?via%3Dihub>
44. Rada-Ariza AM, Lopez-Vazquez CM, van der Steen NP, Lens PNL. Nitrification by microalgal-bacterial consortia for ammonium removal in flat panel sequencing batch photobioreactors. Bioresour Technol [Internet]. 2017 Dec 1 [cited 2025 May 4];245:81–9. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096085241731324X?via%3Dihub>
45. Akizuki S, Kishi M, Cuevas-Rodríguez G, Toda T. Effects of different light conditions on ammonium removal in a consortium of microalgae and partial nitrifying granules. Water Res [Internet]. 2020 Mar 15 [cited 2025 May 4];171:115445. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135419312229?via%3Dihub>
46. Khalid AAH, Yaakob Z, Abdullah SRS, Takriff MS. Analysis of the elemental composition and uptake mechanism of *Chlorella sorokiniana* for nutrient removal in agricultural

wastewater under optimized response surface methodology (RSM) conditions. *J Clean Prod* [Internet]. 2019 Feb 10 [cited 2025 May 4];210:673–86. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652618334991?via%3Dihub>

47. Ardo FM, Khoo KS, Ahmad Sobri MZ, Suparmaniam U, Ethiraj B, Anwar AF, et al. Modelling photoperiod in enhancing hydrogen production from *Chlorella vulgaris* sp. while bioremediating ammonium and organic pollutants in municipal wastewater. *Environmental Pollution* [Internet]. 2024 Apr 1 [cited 2025 May 4];346:123648. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749124003622?via%3Dihub>
48. Chu G, Wang Q, Song C, Liu J, Zhao Y, Lu S, et al. *Platymonas helgolandica*-driven nitrogen removal from mariculture wastewater under different photoperiods: Performance evaluation, enzyme activity and transcriptional response. *Bioresour Technol* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 May 4];372:128700. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852423001268?via%3Dihub>
49. Rusdi S, Nurrahman I, Rizki WN, Chafidz A. The Effect of Beeswax and Glycerol Addition on the Performance of Bioplastic Film Made of Konjac Glucomannan. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. 2022 Nov 30;11(2):100–7.
50. Nurulhasni D. Homemade BIOPLASTICS (Biodegradable Plastic From Cassava Peel Waste) with Analysis of the Effect of Glycerol and Cellulose Ratio on Tensile Strength, Elongation, and Thickness. *JST (Jurnal Sains dan Teknologi)* [Internet]. 2023 Mar 20 [cited 2025 May 10];12(1). Available from: <https://doi.org/10.23887/jstundiksha.v12i1.51464>
51. Nadia Nasir N, Amira Othman S. The Physical and Mechanical Properties of Corn-based Bioplastic Films with Different Starch and Glycerol Content. *Journal of Physical Science*

[Internet]. 2021 [cited 2025 May 10];32(3):89–101. Available from:

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

52. López Rocha CJ, Álvarez-Castillo E, Estrada Yáñez MR, Bengoechea C, Guerrero A, Orta Ledesma MT. Development of bioplastics from a microalgae consortium from wastewater. *J Environ Manage* [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2025 May 11];263:110353. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479720302887?via%3Dihub>
53. Ciapponi R, Turri S, Levi M. Mechanical Reinforcement by Microalgal Biofiller in Novel Thermoplastic Biocompounds from Plasticized Gluten. *Materials* 2019, Vol 12, Page 1476 [Internet]. 2019 May 7 [cited 2025 May 11];12(9):1476. Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/12/9/1476/htm>
54. Rekayasa J, Agroindustri M, Jenis P, Konsentrasi D, Pemplastis B, Glukomanan B, et al. Pengaruh Jenis dan Konsentrasi Bahan Pemplastis terhadap Bioplastik Glukomanan. *JURNAL REKAYASA DAN MANAJEMEN AGROINDUSTRI* [Internet]. 2021 Mar 30 [cited 2025 May 10];9(1):75–84. Available from: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jtip/article/view/71727>
55. Tarique J, Sapuan SM, Khalina A. Effect of glycerol plasticizer loading on the physical, mechanical, thermal, and barrier properties of arrowroot (*Maranta arundinacea*) starch biopolymers. *Scientific Reports* 2021 11:1 [Internet]. 2021 Jul 6 [cited 2025 May 11];11(1):1–17. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-93094-y>
56. Mohammed AABA;, Hasan Z;, Omran AAB;, Dmitrenko E, Penkova A V, Zou L, et al. Effect of Various Plasticizers in Different Concentrations on Physical, Thermal, Mechanical, and Structural Properties of Wheat Starch-Based Films. *Polymers* 2023, Vol

15, Page 63 [Internet]. 2022 Dec 23 [cited 2025 May 11];15(1):63. Available from:
<https://www.mdpi.com/2073-4360/15/1/63/htm>

57. Alonso-González M, Felix M, Romero A. Influence of the plasticizer on rice bran-based eco-friendly bioplastics obtained by injection moulding. *Ind Crops Prod* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 May 11];180:114767. Available from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669022002503?via%3Dihub>

58. He, M., Feng, Z., Xu, Y., Ding, H., Ying, C., Cai, Y., & Zhang, H. (2023). Macro- and microplastic leachates show a slightly toxic effect on seed germination of cotton. *Chemosphere*, 139081 . <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139081>.