



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ingeniería
Carrera de Ingeniería Civil

Remoción de metales pesados (cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre) en aguas industriales utilizando algas coimmobilizadas con alginato de sodio.

*Trabajo de titulación
previo a la obtención del
título de Ingeniero Civil.*

Autores:

Lady Angélica Naula González

CI: 1104754484

Correo electrónico: ladynaula1996@gmail.com

Paola Arminda Zúñiga Delgado

CI: 0105681944

Correo electrónico: paoazd@live.com

Directora:

Dra. Gladys Guillermina Pauta Calle

CI: 0300691045

Cuenca, Ecuador
10 de agosto de 2021



1 Resumen

Las microalgas desempeñan un papel importante en la biorremediación. La biorremediación se encarga de remover los contaminantes de agua, suelo o aire utilizando microorganismos vivos. El uso de las microalgas actualmente ha tomado relevancia debido a su bajo costo de implementación. Por lo que una rama de investigación se ha abierto en este campo, con el fin de hacer estos procesos más aplicables. Es decir, pasar de una escala de laboratorio a una escala de producción masiva.

En este trabajo de titulación se plantea la remoción de metales pesados en aguas residuales industriales utilizando la especie de microalga *Chlorella* coinmovilizada en alginato de sodio. Esta especie de alga ha presentado en diferentes estudios un alto grado de efectividad al momento de eliminar contaminantes de efluentes. Para esto, se realiza el cultivo de la microalga en el laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Cuenca, para determinar su cinética de crecimiento. En el apogeo del cultivo se procederá a coinmovilizar las algas y ponerlas en contacto con diferentes soluciones de metales pesados y con las aguas residuales industriales. Finalmente, se determina el porcentaje de remoción para los diferentes ensayos determinando así la influencia de las concentraciones de los metales pesados.

Los resultados obtenidos muestran que, efectivamente la especie de alga *Chlorella* es una solución viable para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados. Se logró obtener porcentajes de remoción entre 70% y 97% para las diferentes pruebas con soluciones sintéticas, mientras que para los ensayos con aguas residuales industriales los porcentajes de remoción oscilan entre 30% y 85%.

Palabras clave: Microalgas. Coinmovilización. Remoción de metales pesados. *Chlorella*. Alginato de sodio.



Abstract

Microalgae play an important role in bioremediation. Bioremediation is responsible for removing contaminants from water, soil or air using live microorganisms. The use of microalgae has now become relevant due to its low cost of implementation. So a branch of research has been opened in this field, in order to make these processes more applicable. That is, to go from a laboratory scale to a mass production scale.

In this titration work, the elimination of heavy metals in industrial wastewater is proposed using the microalgae species *Chlorella* co-immobilized in sodium alginate. This species of algae has shown in different studies a high degree of effectiveness at the time of eliminating pollutants from effluents. For this, the microalgae culture is carried out in the Sanitary laboratory of the Faculty of Engineering of the University of Cuenca, to determine its growth kinetics. At the height of the cultivation, the algae will be co-immobilized and put in contact with different solutions of heavy metals and with industrial wastewater. Finally, the removal percentage is determined for the different tests, thus determining the influence of heavy metal concentrations.

The results obtained show that, indeed, the *Chlorella* algae species is a viable solution for the treatment of water contaminated with heavy metals. Removal percentages between 70% and 97% were obtained for the different tests with synthetic solutions, while for the tests with industrial wastewater the removal percentages ranged between 30% and 85%.

Key words: Microalgae. Immobilization. Removal of heavy metals. *Chlorella*. Sodium Alginate.



ÍNDICE DE CONTENIDO

1	Resumen	2
CAPÍTULO 1		16
1	INTRODUCCIÓN	16
1.1	Objeto de estudio	16
1.2	Antecedentes	16
1.3	Justificación	17
1.4	Objetivos	18
1.4.1	Objetivo general	18
1.4.2	Objetivos específicos	18
1.5	Hipótesis	18
CAPÍTULO 2		19
2	MARCO TEÓRICO	19
2.1	Metales pesados	19
2.1.1	Generalidades	19
2.1.2	Toxicidad	20
2.1.3	Aplicación de los metales pesados y fuentes de emisión	20
2.1.4	Remoción de metales pesados	21
2.2	Microalgas	21
2.2.1	Generalidades	21
2.2.2	Crecimiento de microalgas.	21
2.2.2.1	Fases de crecimiento	22
2.2.3	Determinación de la cinética de crecimiento	23
2.2.3.1	Recuento celular	23
2.2.3.2	Turbiedad	23
2.2.3.3	Sólidos totales	23
2.2.4	Chorella	23
2.2.4.1	Enzimas	24
2.2.4.2	Uso de las microalgas Chlorella	25
2.3	Coinmovilización de microalgas	25
2.3.1	Generalidades	25
2.3.2	Perlas de alginato	25
2.3.2.1	Propiedades y usos	26
CAPÍTULO 3		27
3	MATERIALES Y METODOLOGÍA	27
3.1	Diseño experimental para el cultivo y crecimiento de microalgas.	27



3.1.1	Materiales para el montaje del cultivo	27
3.1.1.1	Inóculo	27
3.1.1.2	Fotobioreactor	28
3.1.2	Medio de cultivo	29
3.1.2.1	Macronutrientes	29
3.1.2.2	Micronutrientes	30
3.1.2.3	Vitaminas	31
3.1.3	Procedimiento para el montaje del cultivo	31
3.2	Determinación de la cinética de crecimiento	32
3.2.1	Análisis de crecimiento mediante Recuento celular	32
3.2.1.1	Materiales	32
3.2.1.2	Preparación de la muestra	32
3.2.1.3	Recuento con cámara de Neubauer:	33
3.2.1.3.1	Análisis de tasas de crecimiento.	34
3.2.2	Análisis de crecimiento mediante Turbiedad	34
3.2.2.1	Materiales	34
3.2.2.2	Preparación de la muestra	35
3.2.2.3	Medición de turbiedad:	35
3.2.3	Análisis de crecimiento mediante obtención de biomasa algal	35
3.2.3.1	Materiales	35
3.2.3.2	Preparación de la muestra	36
3.2.3.3	Filtración y secado al horno	36
3.3	Elaboración de perlas de alginato.	36
3.4	Coinmovilización de algas Chlorella en perlas de alginato de sodio	37
3.5	Remoción de metales pesados de soluciones sintéticas con algas coinmovilizada en perlas de alginato de sodio	38
3.5.1	Preparación de soluciones sintéticas de metales pesados	38
3.5.2	Remoción de metales pesados	38
3.6	Remoción de metales pesados de aguas residuales industriales con algas coinmovilizada en perlas de alginato de sodio.	40
CAPÍTULO 4		40
4	RESULTADOS	40
4.1	Cinética de crecimiento	40
4.1.1	Condiciones para el crecimiento de las microalgas	40
4.1.2	Recuento de células en cámara de Neubauer	41
4.1.2.1	Determinación de la tasa de crecimiento	42
4.1.3	Ensayo de turbiedad	43



4.1.4	Determinación de sólidos totales	43
4.2	Obtención de perlas de alginato de sodio	44
4.3	Coinmovilización de Chlorella en perlas de alginato	44
4.4	Remoción de metales pesados	45
4.4.1	Ensayos con soluciones sintéticas de metales pesados en concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm.	45
4.4.1.1	Resumen de ensayos de los metales pesados en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.	60
4.4.1.2	Ensayos a las 24 horas de los metales pesados en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.	61
4.4.2	Ensayos con aguas residuales industriales.	63
CAPÍTULO 5		67
5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1	Conclusiones	67
5.2	Recomendaciones	68
REFERENCIAS		69



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Macronutrientes para el medio de cultivo.....	30
Tabla 2. Micronutrientes para el medio de cultivo.	30
Tabla 3. Vitaminas para el medio de cultivo.	31
Tabla 4. Recuento celular y tasa de crecimiento de los cultivos.	42
Tabla 5. Remoción de Níquel en solución sintética a 1ppm.	46
Tabla 6. Remoción de Níquel en solución sintética a 3ppm.	46
Tabla 7. Remoción de Níquel en solución sintética a 5ppm.	46
Tabla 8. Remoción de Cromo en solución sintética a 1ppm.....	49
Tabla 9. Remoción de Cromo en solución sintética a 3ppm.....	49
Tabla 10. Remoción de Cromo en solución sintética a 5ppm.....	50
Tabla 11. Remoción de Zinc en solución sintética a 1ppm.....	52
Tabla 12. Remoción de Zinc en solución sintética a 3ppm.....	52
Tabla 13. Remoción de Zinc en solución sintética a 5ppm.....	53
Tabla 14. Remoción de Aluminio en solución sintética a 1ppm.....	55
Tabla 15. Remoción de Aluminio en solución sintética a 3ppm.....	55
Tabla 16. Remoción de Aluminio en solución sintética a 5ppm.....	55
Tabla 17. Remoción de Cobre en solución sintética a 1ppm.	57
Tabla 18. Remoción de Cobre en solución sintética a 3ppm.	57
Tabla 19. Remoción de Cobre en solución sintética a 5ppm.	58
Tabla 20. Concentración inicial del agua residual industrial de la fábrica galvanizadora 1.....	63
Tabla 21. Concentración inicial del agua residual industrial de la fábrica galvanizadora 2.....	63
Tabla 22. Remoción de Níquel en agua residual industrial.....	64
Tabla 23. Remoción de Zinc en agua residual industrial.....	65



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Inóculo de microalgas Chlorella.....	27
Figura 2. Componentes para el montaje del Bioreactor EPENDORF.....	28
Figura 3. Complementos para el montaje del Bioreactor EPENDORF.	29
Figura 4. Materiales para realizar recuento celular.....	32
Figura 5. Preparación de muestra para recuento celular.	32
Figura 6. Recuento celular con Cámara de Neubauer.....	33
Figura 7. Materiales para realizar turbiedad.	34
Figura 8. Materiales para obtención de biomasa algal.....	36
Figura 9. Obtención de perlas de alginato de sodio.	37
Figura 10. Coinmovilización de algas Chlorella.....	37
Figura 11. Preparación de soluciones sintéticas de metales pesados.	38
Figura 12. Remoción de metales pesados en muestras de soluciones sintéticas.	39
Figura 13. Remoción de metales pesados en muestra de agua residual industrial con luz y aereación.	40
Figura 14. Cinética de crecimiento.....	42
Figura 15. Turbiedad.....	43
Figura 16. Sólidos totales.....	44
Figura 17. Perlas de alginato de sodio sin Chlorella.....	44
Figura 18. Perlas de alginato de sodio con Chlorella.....	45
Figura 19. Remoción en el tiempo para el Níquel en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.	48
Figura 20. Remoción en el tiempo para el Cromo en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.	51
Figura 21. Remoción en el tiempo para el Zinc en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.	54
Figura 22. Remoción en el tiempo para el Aluminio en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.....	56
Figura 23. Remoción en el tiempo para el Aluminio en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.....	59
Figura 24. Resumen de ensayos de los metales pesados en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.	61
Figura 25. Ensayos de los metales pesados transcurridas 24 horas en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.	63
Figura 26. Remoción en el tiempo para el Níquel de la muestra de agua residual industrial.	65
Figura 27. Remoción en el tiempo para el Zinc de la muestra de agua residual industrial.....	66



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Lady Angélica Naula González, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación **“Remoción de metales pesados (cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre) en aguas industriales utilizando algas coimmobilizadas con alginato de sodio”**, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 10 de Agosto del 2021

Lady Angélica Naula González

C.I: 1104754484



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Paola Arminda Zúñiga Delgado, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “**Remoción de metales pesados (cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre) en aguas industriales utilizando algas coinmovilizadas con alginato de sodio**”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 10 de Agosto del 2021

Paola Arminda Zúñiga Delgado

C.I: 0105681944



Cláusula de Propiedad Intelectual

Lady Angélica Naula González, autora del trabajo de titulación **“Remoción de metales pesados (cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre) en aguas industriales utilizando algas coinmovilizadas con alginato de sodio”** certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 26 de Julio de 2020

Lady Angélica Naula González

C.I: 1104754484



Cláusula de Propiedad Intelectual

Paola Arminda Zúñiga Delgado, autora del trabajo de titulación **“Remoción de metales pesados (cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre) en aguas industriales utilizando algas coinmovilizadas con alginato de sodio”** certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 10 de Agosto del 2021



Paola Arminda Zúñiga Delgado

C.I: 0105681944



AGRADECIMIENTO

A la Doctora Guillermina Pauta nuestra directora de tesis, por su guía y dedicación en cada una de las etapas de este trabajo de titulación.

A la Doctora Gabriela Vásquez, Técnico Docente del Laboratorio de Sanitaria de la Facultad de Ingeniería, por la experiencia compartida, lo que ha permitido el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la Universidad de Cuenca y a los docentes de la Escuela de Civil, por los valiosos conocimientos impartidos a lo largo de estos años; su ética inculcada se convertirá en las bases para nuestra vida profesional.

A todas las amistades formadas a lo largo de la etapa universitaria, que lograron mezclar lo académico y lo social en un álbum de inolvidables recuerdos, haciendo de esta experiencia una de las mejores.

Lady y Paola



DEDICATORIA

A mis padres, Fredy y Rosa, por ser mi ejemplo, mi fortaleza y mi cimiento. Por su apoyo siempre incondicional. Por su esfuerzo y confianza en darme las alas para volar.

A mis hermanas, Ximena, Eileen y Miley por su cariño y alegrías a pesar de la distancia. Por el ánimo y la motivación para ser su mejor ejemplo. Por creer en mí y ser mi columna siempre.

A mis amigos, con quienes compartí dentro y fuera de las aulas, por su compañía y amistad. Por hacerme sentir en casa. Más aun a quienes se convirtieron en mi mejor equipo. Llevo en mí, agradables recuerdos plasmados en una colección de únicas e inolvidables experiencias.

Lady Naula G.



DEDICATORIA

Este trabajo de titulación dedico en especial a mis padres, quienes son el pilar fundamental en mi vida, que de su mano y con su guía, fueron el apoyo incondicional que me ha permitido poder culminar mis estudios universitarios.

A mis hermanos y mis tíos, que con su afecto y cariño siempre están acompañándome y pendientes de mi crecimiento, impulsándome a seguir adelante en todo momento.

A mis amigos, quienes han sido personas con las que he compartido momentos inolvidables, he aprendido de ellos y junto a ellos que la vida con amigos como ellos, es mucho mejor.

Paola Zúñiga D.



CAPÍTULO 1

En este capítulo se realiza una introducción general hacia el uso de las microalgas como método de biorremediación; se analiza la problemática actual de la contaminación del agua con una revisión de los antecedentes, y se exponen los objetivos que se pretende alcanzar con este proyecto.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Objeto de estudio

En este trabajo de titulación se pretende aplicar biotecnología con el objeto de remover metales pesados de aguas residuales. Para esto se utilizará algas coinmovilizada con alginato de sodio. Los microorganismos escogidos son microalgas pertenecientes a la familia Chlorella y el procedimiento consistirá en poner a prueba una alternativa de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados.

1.2 Antecedentes

A partir de la segunda mitad del siglo XX, los diferentes ejes ambientales se han vuelto de gran interés para la sociedad en general. Los problemas de degradación ambiental no tienen su origen en las últimas décadas, la contaminación es tan antigua como el hombre. La alteración de los cursos de agua, el deterioro del suelo o las emisiones de gases contaminantes son problemática prehistórica heredada (Pérez Cebada, 2001). Los procesos industriales demandan materias primas de todo tipo incrementando el impacto ambiental, tanto por la actividad extractiva en sí mismo, cuanto por la generación de residuos, emisiones y efluentes que se generan por su uso (Ponting, 1992). Los componentes tóxicos introducidos al medio natural han logrado superar su capacidad de resiliencia, deteriorando los factores ambientales: aire, agua, suelo, biota, etc. En este sentido se otorga especial interés a los tóxicos “*metales pesados*” denominados así por su elevada densidad y sus particularidades toxicológicas dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición.

Las actividades agrícolas con el uso de insecticidas, la minería, la metalurgia, los centros de recolección de chatarra, la fabricación de plásticos y otros, generan lixiviados; estos generalmente terminan en el suelo o en el medio hídrico con afección directa al ecosistema (Cahuasqui Toscano, 2011). Un grupo de sustancias presentes en dichos lixiviados son los metales pesados, de reconocido efecto tóxico, por lo que es necesaria su eliminación (Srivastava & Majumder, 2008). Entre los más conocidos están el cadmio, plomo, zinc, arsénico, níquel, mercurio, cromo y cobalto, bario, vanadio y selenio (Triviño Tonato, 2018). Estos metales se pueden acumular en el



ecosistema por extensos periodos sin biodegradarse afectando a la cadena trófica (Vera Cabezas et al., 2016). En pequeñas concentraciones son nocivos para la mayor parte de los organismos, aunque algunos de ellos son esenciales para cumplir las funciones metabólicas en los seres vivos porque actúan como micronutrientes; su presencia en niveles superiores a los permitidos representa un peligro para la salud (Verma & Dwivedi, 2013).

1.3 Justificación

Con la industrialización se ha incrementado el nivel de descarga de metales pesados en los sistemas de recolección de agua (Abdel-Raouf et al., 2012; Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012). Surge así la necesidad de trabajar en nuevas alternativas de biorremediación; la relación coste-beneficio hace de ella una opción factible a futuro. En los trabajos realizados en (Arias Vinuesa, 2017; Wilde & Benemann, 1993) dentro del campo de saneamiento ambiental, la eliminación de metales pesados usando procedimientos biológicos se considera un método de biorremediación efectivo.

Muchas especies de microalgas han sido estudiadas por su capacidad de remover metales pesados disueltos en aguas contaminadas (Kaplan, 2013; Rawat et al., 2011; Srivastava & Majumder, 2008; Wilde & Benemann, 1993). La mayoría de los estudios experimentan con soluciones sintéticas o aguas industriales que contienen elevadas concentraciones de estos contaminantes, entre 10 y 100 ppm; no obstante, en nuestro medio las industrias y las aguas residuales domésticas presentan concentraciones más bajas; esto se concluye de los estudios de caracterización de las aguas residuales domésticas que ingresan a las lagunas de estabilización para su tratamiento. Estas microalgas poseen una alta afinidad por los iones positivos de metales pesados debido a su carga superficial negativa que conduce a una neutralización (Voltolina et al., 1999). De esta manera, las partículas de metales pesados se introducen en las microalgas por formación de fitoquelatinas como también por adsorción y absorción (Wilde & Benemann, 1993). La capacidad biorremediadora que caracteriza a las microalgas, consiste en la biotransformación de contaminantes presentes en un medio líquido o gaseoso en otras sustancias de menor toxicidad que ya pueden ser asimiladas. La bioadsorción de los metales pesados en las algas va a depender de su taxonomía y del tipo de metal a remover.

En este proyecto se pretende investigar la eficacia de los procesos biológicos de adsorción y absorción de metales pesados en fase acuosa mediante las microalgas en aguas residuales. La investigación está dirigida a ensayar a las algas como materiales adsorbentes de carácter biológico; en este sentido las microalgas se convierten en una alternativa eficiente, económica y ambientalmente amigable debido a la afinidad de ellas para con los metales pesados, y además de su gran capacidad para asimilar nutrientes en su organismo debido a que una gran cantidad de



grupos funcionales contenidos en las proteínas, lípidos y carbohidratos conforman su pared celular.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Experimentar la remoción de metales pesados como cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre, presentes en aguas residuales industriales, mediante la utilización de algas coinmovilizadas con alginato de sodio favoreciendo los procesos enzimáticos de estos organismos y aumentando la eficiencia del tratamiento.

1.4.2 Objetivos específicos

- Obtener un cultivo de microalgas de la especie *Chlorella* en condiciones controladas de pH, luz, nutrientes, temperatura, velocidad de agitación.
- Establecer la capacidad biodegradadora de las microalgas coinmovilizadas en perlas de alginato de sodio, de los metales pesados presentes en efluentes industriales y adicionados en soluciones acuosas sintéticas.
- Determinar la eficiencia de la coinmovilización con alginato de sodio en el proceso de remoción de los metales pesados.

1.5 Hipótesis

¿La coinmovilización de las microalgas de la familia *Chlorella* en una matriz de alginato de sodio, optimiza su capacidad para asimilar metales pesados de efluentes industriales sin modificar su actividad fisiológica?



CAPÍTULO 2

En este capítulo se hace una revisión del marco teórico necesario para este proyecto. Se inicia con una introducción general sobre los metales pesados, sus principales aplicaciones, las fuentes de emisión y su toxicidad; luego se procede al análisis de los métodos de remoción enfocados en el manejo de biotecnología y se concluye con una recapitulación sobre la remoción de metales utilizando microalgas coinmovilizada en perlas de alginato para favorecer la efectividad de la remoción.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Metales pesados

2.1.1 Generalidades

Los metales pesados son elementos químicos que se caracterizan por su elevada densidad y un nivel de toxicidad significativo aun en exposición a concentraciones bajas. Los metales pesados como cobre, zinc, cromo, aluminio, níquel y arsénico se consideran unos de los contaminantes más dañinos en el ambiente por sus efectos nocivos. Entre sus principales atributos se citan: la persistencia, la bioacumulación, la biomagnificación y una toxicidad elevada. Su difícil degradación natural conlleva a que se mantengan por largos periodos en el medioambiente (Rodríguez-Heredia, 2017).

La contaminación se produce con la introducción excesiva de agentes tóxicos que en concentraciones determinadas afectan las propiedades físicas, químicas, y biológicas del aire, suelo y agua, afectando directamente a la biosfera. Estos agentes tóxicos son generados por industrias como la minería, fundición de metales, producción de combustibles a partir del petróleo, industria de fertilizantes y pesticidas, e industria de curtido del cuero. Todas estas actividades antropogénicas contienen metales pesados con efectos perjudiciales para la vida. Algunos compuestos tóxicos pueden ser biodegradados por los organismos vivos, mientras que otros, por el contrario, son persistentes en el medio ambiente, es decir no son biodegradables (Bautista, 1999).

En cualquier matriz ambiental donde se encuentren los metales pesados, la exposición prolongada a concentraciones bajas de estos componentes produce la denominada *toxicidad crónica*; en cambio una exposición corta, pero a altas concentraciones, produce una *toxicidad aguda*; por lo tanto, es necesario desarrollar tecnologías alternativas para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados. Estas técnicas se aplican en los países desarrollados a fin de combatir las descargas contaminantes en los cuerpos receptores (Rodríguez-Heredia, 2017).



2.1.2 Toxicidad

Es la capacidad de producir efectos adversos sobre los organismos vivos. Los metales pesados son compuestos tóxicos con tendencia a permanecer de forma indefinida en el ecosistema. Esta toxicidad generada compromete el bienestar y equilibrio medio ambiental, como también la salud de las personas al ingresar a la cadena trófica (Tejada-Tovar et al., 2015).

Los metales pesados presentan diferentes formas de toxicidad. Según (Jjemba, 2004) estos mecanismos afectan la morfología celular, el crecimiento y la actividad biológica de la siguiente manera:

- Desplazamiento en las uniones de los metales esenciales con las moléculas biológicas
- Abstención de la función enzimática
- Rompimiento de la estructura de los ácidos nucleicos

Sin embargo, dependiendo del metal, el individuo y el tiempo de exposición, los efectos sobre el microorganismo variarán. Además, se debe tomar en cuenta la concentración ya que en algunos casos concentraciones elevadas pueden activar una resistencia que incrementan la tolerancia a estas sustancias. Entre los metales pesados altamente tóxicos se encuentra el cromo, zinc, aluminio, arsénico, níquel y cobre.

2.1.3 Aplicación de los metales pesados y fuentes de emisión

Se hace uso de los metales pesados en varios procesos industriales y pueden ser emitidos por diferentes fuentes. A continuación, se detallan los procesos antropogénicos relacionados con ellos. (Rodríguez-Heredia, 2017).

- **Cromo:** Es un metal de transición, duro, frágil y con un color agrisado brillante. Por su resistencia a la corrosión y acabado brillante es muy usado en el campo de la metalurgia, conservación de madera, pintura y galvanizados. Como residuo se lo puede encontrar en los efluentes industriales químicos, ensamblaje de instrumentos radioelectrónicos y maquinarias, elaboración de materiales refractarios.
- **Zinc:** Es un metal maleable, dúctil y moderadamente duro, común en numerosas aplicaciones industriales, usado con frecuencia como parte de aleaciones metálicas con bronce y latón. Es semejante al magnesio y al cadmio y es muy activo químicamente. Se usa para la elaboración de productos galvanizados, pintura y baterías. También se emplea en la industria cosmética y medicinal en forma de lociones, como la de zinc y calamina.
- **Aluminio:** Es un metal no ferromagnético y el tercero más común en la corteza terrestre. Sus propiedades de baja densidad y resistencia a la corrosión los hacen muy útiles en la ingeniería de materiales. En la industria del transporte se usa gracias a su alta resistencia



mecánica, así como en la industria de la electricidad por su buena conductividad y calor. Es el metal más usado después del acero.

- **Níquel:** Metal denso de transición muy dúctil y maleable, con características de conductor de electricidad y calor. Se encuentra en los efluentes de la minería de metales ferrosos, extracción de minerales. Es uno de los metales más demandados en la industria ya que reacciona con dificultad en medios agresivos y presenta resistencia a la corrosión.
- **Cobre:** Es un metal de transición y se caracteriza por ser un gran conductor de electricidad. Debido a su gran conductividad eléctrica, maleabilidad y ductilidad, es el elemento más usado en la fabricación de cables eléctricos y componentes electrónicos. En la acuicultura el sulfato de cobre se suele emplear como alguicida o microbicida; en este mismo contexto se lo usa para combatir bacterias, protozoos y hongos.

2.1.4 Remoción de metales pesados

En la remoción de metales pesados, el uso de microalgas se considera una técnica de bajo coste generando un efluente de alta calidad (Wilde & Benemann, 1993). Un trabajo reporta una remoción del 99% de partículas metálicas disueltas en agua de minería usando microalgas. (Abdel-Raouf et al., 2012); otros estudios confirman que existe una extensa variedad de especies de microalgas que absorben diferentes metales pesados (Ardila Forero, 2012; Garbisu et al., 1991; Plaza, 2012; Tejada-Tovar et al., 2015; Wilde & Benemann, 1993). Su gran capacidad de adaptación y soporte fisiológico a las condiciones por contaminación por metales pesados las convierte en una expectativa rentable de biorremediación (Perales-Vela et al., 2006; Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012). En otro trabajo realizado se determinó una remoción del 100% del metal pesado utilizando *Scenedesmus* y *Chlorella* para Manganeso, 77-85% para Zinc, 77-95% para Cromo, 52-64% para Cadmio, y 77-81% para Níquel. (Hammouda et al., 1995)

2.2 Microalgas

2.2.1 Generalidades

Las microalgas son microorganismos que se encuentran presentes en todos los ecosistemas tanto acuáticos como terrestres. Su gran capacidad de adaptación permite encontrarlas en una amplia variedad de especies (Richmond, 2004); su aptitud fotosintética facilita su crecimiento utilizando diferentes fuentes de nutrientes. De esta manera los metales pesados en las aguas, constituyen también una fuente de alimento para las actividades fisiológicas de las microalgas.

2.2.2 Crecimiento de microalgas.

Como todo organismo vivo, cada especie de microalgas requiere de ciertas condiciones para el crecimiento; su productividad se ve condicionada por factores como:



- **Luz:** la intensidad luminosa es un factor crucial en el crecimiento y productividad de microalgas.
- **Agitación:** garantiza la distribución de la luz, los gases y la homogenización del pH. Además, evita la sedimentación y adherencia de los microorganismos a la base y paredes del bioreactor (Cabrera & Pulla, 2014).
- **Temperatura:** se requiere una temperatura óptima para alcanzar una buena productividad; existiendo una relación directa entre productividad y temperatura (Hernández-Pérez & Labbé, 2014). Si la temperatura es superior a la óptima existirá una disminución de la productividad por el efecto de la foto inhibición.
- **pH:** para promover un desarrollo adecuado se debe exponer a cada organismo a un pH óptimo. Este pH variará dependiendo del microorganismo (González Céspedes, 2015). La especie de microalga *Chlorella* se desarrolla en un rango de 8.2 a 8.7
- **Nutrientes:** para el adecuado crecimiento de las microalgas es necesario la existencia de macro y micronutrientes. Los nutrientes esenciales son el carbono, los nitratos y fosfatos. Es necesario el control de la calidad nutricional en los cultivos masivos, para no limitar el crecimiento y desarrollo del cultivo. Además, ciertas microalgas requieren de otras sustancias para su desarrollo como las vitaminas, ya que no son capaces de sintetizar todas las que necesitan.

2.2.2.1 Fases de crecimiento

En un cultivo de microalgas se presentan cinco fases de crecimiento según (Cabrera & Pulla, 2014):

- **Fase de latencia o adaptación:** está presente en la fase inicial del crecimiento. Se produce un ajuste a las condiciones del medio de cultivo, por lo que se genera un retardo en el desarrollo de las células mientras se adaptan.
- **Fase exponencial:** también conocida como fase de crecimiento acelerado. En esta fase las células se han acondicionado al nuevo entorno y se inicia un proceso de multiplicación lo que acarrea un crecimiento exponencial.
- **Fase de crecimiento lineal:** en esta fase, como consecuencia del incremento de las células se origina una disminución de nutrientes, cambios de pH y DBO (Romo-Piñera, 2002). La biomasa toma una tendencia lineal constante de crecimiento.
- **Fase estacionaria:** en esta fase ya no es posible observar una división celular neta. El número de células se mantiene constante por cierto período de tiempo, por un equilibrio entre la natalidad y la mortalidad de las mismas.



- **Fase de muerte:** En esta fase las células empiezan a morir; sin embargo, se pueden permanecer en fase estacionaria durante semanas e incluso meses (Romo-Piñera, 2002).

2.2.3 Determinación de la cinética de crecimiento

2.2.3.1 Recuento celular

Es la técnica de conteo más utilizada desde el siglo XIX. Para el recuento celular se emplea la Cámara de Neubauer o hematocímetro. Para este método existe una concentración óptima de células que permite dar una estimación confiable de la concentración celular total. Este valor óptimo es de 10^6 células por mililitro (Bastidas, 2011). Algunos de los errores en este método de conteo celular se deben a la imprecisión en la toma de muestra con la pipeta, a los volúmenes introducidos en la Cámara de Neubauer y a los errores estadísticos cuando la muestra es poco representativa. Sin embargo, como se mencionó al principio, sigue siendo uno de los métodos más empleados a nivel mundial.

2.2.3.2 Turbiedad

Se refiere a la medida del grado de transparencia de un líquido debido a la presencia de partículas en suspensión. El grado de turbiedad aumenta conforme mayor cantidad de partículas suspendidas se encuentren en el líquido. Se mide en Unidades Nefelométrías de Turbiedad (NTU) a través de un equipo llamado turbidímetro.

2.2.3.3 Sólidos totales

Los sólidos totales son aquellas partículas que permanecen como residuo después someterlos a un proceso de evaporación y secado a temperaturas entre 103 a 105°C. Este parámetro permite determinar la cantidad de materia sólida presente en un determinado volumen de agua.

2.2.4 Chlorella

Chlorella es una especie de microalga que posee células de tamaño microscópico con un diámetro entre 2-10 μm (Perenguez Ortega & Valdez Álvarez, 2017), son unicelulares y poseen una forma esférica. Cada célula posee una fina pared celular y cloroplasto que le dan el color verde característico (Arias Vinueza, 2017). La microalga Chlorella se reproduce por división binaria (4-8-16) formando autoesporas (Triviño Tonato, 2018). Su crecimiento se da en condiciones autótrofas, heterótrofas y mixotróficas. La Chlorella se ha convertido en la especie de mayor importancia en la industria (Richmond, 1990), y ha sido cultivada y comercializada principalmente como alimento saludable.



2.2.4.1 Enzimas

Las enzimas tienen la capacidad de estimular y acelerar la velocidad de las reacciones catalíticas reversibles en los individuos vivos; estas reacciones son propias de cada enzima. Según (Guzmán Molina, 2015) se dice que todas las enzimas son proteínas, pero no todas las proteínas son enzimas. El mecanismo de acción de las enzimas se produce con una energía de activación, un catalizador y la reacción enzimática hasta conseguir el equilibrio (Figuroa Ceballos et al., 2020).

Los iones de ciertos minerales como magnesio, zinc, cobre actúan como cofactores enzimáticos contribuyendo al adecuado desarrollo de las reacciones (Figuroa Ceballos et al., 2020). Además, existen factores como la temperatura y pH que regulan las actividades enzimáticas. Existe una amplia clasificación de las enzimas según la función que desempeñan. En trabajos similares, se reporta la acción de las siguientes: (Figuroa Ceballos et al., 2020).

- Oxirreductasas, que son las que producen reacciones de transferencia de electrones.
- Transferasas, que son las que transfieren grupos.
- Liasas, que son las encargadas de provocar reacciones de adición de grupos de doble enlace por eliminación de otros grupos.
- Isomerasas, que transfieren grupos de una molécula convirtiéndolo en otro isómero.
- Ligasas, que son las que permiten la formación de enlaces, catalizando la formación de un nuevo enlace por hidrólisis de ATP (adenosín trifosfatado).

La biomasa microalgal tiene la ventaja de que durante el tratamiento producen enzimas que intervienen en la degradación de ciertos compuestos (Ruiz Tovar & Morales Fonseca, 2008). En el Trabajo de (Piotrowska-Niczyporuk et al., 2012) se estudia las microalgas del género *Chlorella* y el efecto de agregar fitohormonas al sistema enzimático antioxidante, encargado de la biosorción de los metales pesados. En (Figuroa Ceballos et al., 2020) se indica que al añadir iones de metales pesados como cobre, mercurio, plomo, actúan como inhibidores cuando se ponen en contacto con la enzima; además el aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes permitió la participación del sistema antioxidante en la desintoxicación bioquímica de Cd, Cu y Pb utilizando *Chlorella vulgaris*. Otras enzimas hidrolizan enzimáticamente los compuestos no solubles del suelo, desmineralizándolo, desintoxicándolo y desalinizándolo (Canales López, 1999).

La producción de enzimas extracelulares, tales como: amilasa, proteasa, lipasa, celulasa y fosfatasa es una característica conocida en microalgas y cianobacterias; la capacidad para hidrolizar gelatina es una propiedad de las microalgas *Chlorella*, *Ankistrodesmus* y *Scenedesmus*. Además, se han encontrado en la especie *Chlorella*, actividades enzimáticas asociadas a la pared



celular de plantas vasculares, hongos y bacterias, ligadas a la existencia de glicosidasas, fosfatasas y esterases (Guzmán Molina, 2015).

2.2.4.2 Uso de las microalgas Chlorella

Las microalgas Chlorella y sus usos se han extendido en las industrias farmacéuticas, agroquímicas, alimenticias y aún más importante en la industria ambiental como agente de biorremediación. En esta última línea de industria, algunos trabajos realizados han demostrado que la microalga Chlorella es eficaz en el tratamiento de aguas residuales ya que remueve compuestos nitrogenados, fosforados y potásicos además de metales pesados como el cadmio, cromo, plomo. (Arias Vinueza, 2017; Mahapatra et al., 2013; Perenguez Ortega & Valdez Álvarez, 2017; Triviño Tonato, 2018)

2.3 Coinmovilización de microalgas

2.3.1 Generalidades

Existe documentación (Noüe & Proulx, 1988) que ubica en Canadá el surgimiento de la coinmovilización de microalgas hace más de 20 años. Su uso desde ya se centró en el tratamiento de aguas residuales. La coinmovilización de algas tiene los beneficios de cuidar los microorganismos encapsulados contra condiciones ambientales extremas, evita el ataque de organismos depredadores externos, además presenta un bajo costo y un alto porcentaje de remoción de metales pesados, sin olvidar que es un método amigable con el medio ambiente. Otro beneficio importante es la capacidad de producir biomasa mientras depura aguas contaminadas, lo que genera una alta capacidad de resiliencia que la convierte en una técnica viable (Martínez-Trujillo & García-Rivero, 2012).

Se denomina coinmovilización activa cuando el encapsulamiento se ejecuta por acción de agente floculante, unión química o por el uso de gel. Este tipo de coinmovilización permite encapsular organismos en matrices (Moreno-Garrido, 2008). De forma comercial se puede encontrar amplia gama de matrices aptas para coinmovilizar microorganismos. Esto permite tener un encapsulamiento con tamaño y estructuras definidas, de tal manera que se garantice el crecimiento y correcto desarrollo. La coinmovilización además no perturba la actividad metabólica esencial del organismo que encapsula (Cañizares-Villanueva, 2000).

2.3.2 Perlas de alginato

Los alginatos son uno de los elementos más prácticos en la coinmovilización de microalgas. Entre los beneficios de uso se encuentran, un costo reducido, toxicidad nula y manejo sencillo (Lupo et al., 2012); de allí su trascendencia en el campo de la biotecnología para la coinmovilización de microorganismos. Con la coinmovilización en perlas de alginato existe la posibilidad de



recuperación de las células encapsuladas (Simental Valle, 2015). Aplicando esta metodología a las microalgas *Chlorella* se busca elevar la capacidad de resistencia de las microalgas ante las fuentes contaminadas con metales pesados. Así, se puede conservar al organismo vivo y en cumplimiento pleno de todas sus funciones (Arias Vinueza, 2017). Varios estudios realizados, han determinado que la coinmovilización de microalgas en perlas de alginato facilita la separación de los metales pesados como plomo, cromo, cadmio, níquel y zinc que están presentes en aguas residuales industriales. (Triviño Tonato, 2018)

2.3.2.1 Propiedades y usos

Dentro de las propiedades de las perlas de alginato se encuentra su capacidad de encapsular los materiales pesados para luego extraerlos, aplicando esta técnica en ambientes contaminados (Arias Vinueza, 2017; Perenguez Ortega & Valdez Álvarez, 2017; Triviño Tonato, 2018). Se otorga este efecto a la composición de sus estructuras que se encargan de asimilar el componente tóxico para almacenarlo debido a la afinidad iónica (Olarte Gómez & Valencia Giraldo, 2016). En el campo de la biotecnología se añaden compuestos de calcio o sodio a los alginatos formando un gel que es el encargado de favorecer la aglomeración de las células. Así, se introduce la coinmovilización en perlas de alginato como una técnica factible (Perenguez Ortega & Valdez Álvarez, 2017); y el uso de la microalga *Chlorella* como microorganismo ha permitido convertir la técnica en uno de los procesos más eficientes en biorremediación enfocado en la reparación de efluentes contaminados con metales pesado en bajas cantidades (Yagnentkovsky, 2011).

La técnica de coinmovilización de microalgas *Chlorella* en perlas de alginato ha sido poco estudiada dentro del área sanitaria; sin embargo, estudios realizados han demostrado una gran posibilidad de uso en la biorremoción de partículas de metales pesados presentes en aguas contaminadas (Cartagena Arévalo & Malo Malo, 2017; God, 2020; Posso, 2019; Romero Morales et al., 2018; Vela García et al., 2019). La matriz de coinmovilización da estabilidad a las unidades de las microalgas lo que provoca una tolerancia a los diferentes agentes tóxicos a la vez que salvaguarda las propiedades de las células para su correcto funcionamiento.

La resistencia a la toxicidad que ofrece esta técnica, es atribuida a diferentes razones entre las cuales se encuentran las diferencias fisiológicas entre los microorganismos coinmovilizados y los de crecimiento libre; también es atribuido a la concentración de nutrientes alrededor de la matriz, lo cual permite que los microorganismos sobrevivan a las altas concentraciones de compuestos tóxicos (Kourkoutas et al., 2004).

CAPÍTULO 3

En este capítulo se presentan los requerimientos para el diseño experimental. Se identifican los materiales, se describe el método para implantar el proyecto experimental con el fin de obtener los resultados deseados. De los procesos descritos, se hace énfasis en las escogidas para el cultivo de las microalgas *Chlorella* y la determinación de la cinética de crecimiento. Además, se describe la técnica de coinmovilización de microalgas en esferas de alginato de sodio; y la técnica para la remoción de los metales pesados, con su respectiva justificación.

3 MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1 Diseño experimental para el cultivo y crecimiento de microalgas.

En la presente investigación se utiliza la familia de microalgas *Chlorella*; con la finalidad de mantenerlas aisladas y controlar su crecimiento y desarrollo, la producción masiva de ellas se realiza bajo condiciones controladas de luz, temperatura, aereación y agitación. Para la producción de microalgas se requiere inicialmente de un inóculo, un fotobioreactor y el medio de cultivo según los requerimientos de la especie. En el siguiente apartado se detalla cada uno de los materiales y procedimientos utilizados para el cultivo de estos organismos.

3.1.1 Materiales para el montaje del cultivo

3.1.1.1 Inóculo

Para iniciar el cultivo, se utilizaron inóculos de microalgas *Chlorella* entre 10 y 20 ml de una familia previamente aislada. Para los siguientes cultivos se utiliza como inóculo un 20% del cultivo anterior, correspondiente a 250ml del cultivo, como se muestra en la **Figura 1**.

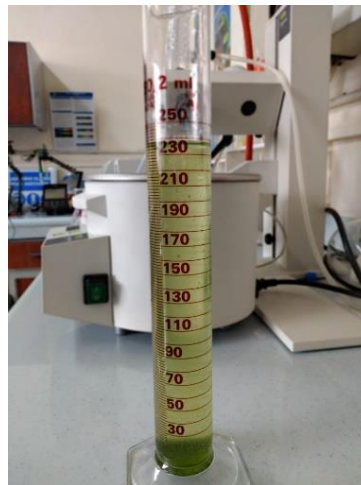


Figura 1. Inóculo de microalgas Chlorella.

3.1.1.2 Fotobioreactor

Este es un sistema diseñado para cultivar organismos fotótrofos como células microbianas, algas o plantas, que limita fuertemente el intercambio de gases y contaminantes entre el cultivo y la atmósfera, por lo que la ventaja de utilizarlo para el cultivo de microalgas es que se minimiza el riesgo de contaminación por microorganismos como protozoos, bacterias y hongos (Richmond, 2004). Es esencial utilizar fotobiorreactores cerrados en los que se puedan mantener los monocultivos durante un tiempo prolongado. Dado que la energía luminosa es el sustrato que limita el crecimiento, el suministro de luz juega un papel clave en el diseño del fotobiorreactor (Janssen, 2002).

En el presente trabajo experimental se utilizan los componentes descritos a continuación.

- Bioreactor marca EPENDORF, con recipiente cilíndrico de acrílico transparente con un volumen útil de 3 litros (Ver Figura 2a). El mismo que tiene los siguientes complementos (Brunswick, n.d.).
 - Estación de control con una pantalla táctil, que permite calibrar el equipo con las condiciones deseadas para el cultivo (Ver Figura 2b).
 - Un sistema de agitación para evitar la sedimentación y homogenizar el cultivo, accionado por un motor de transmisión directa. Este viene ensamblado entre el recipiente cilíndrico del bioreactor y la base (Ver Figura 2a).
 - El equipo dispone de electrodos para medición de: pH, oxígeno disuelto DO (Ver Figura 2c).
 - Un conjunto de muestreo (Ver Figura 2c).



(a) Bioreactor cilíndrico



(b) Estación de control



(c) Electrodos de temperatura, pH, DO



(d) Conjunto de muestreo

Figura 2. Componentes para el montaje del Bioreactor EPENDORF.

- Lámparas fluorescentes VOLTECH de 250 V - 60Hz 250W 1A (Ver Figura 3a) para suministrar al cultivo la energía luminosa requerida. En estudios anteriores se proporciona iluminación durante un día con intervalos de encendido y apagado cada hora (Cabrera & Pulla, 2014). En este trabajo se realiza una modificación y se aplica la luz en intervalos de encendido y apagado cada doce horas.
- Compresor de aire (Ver Figura 3b), manguera de diámetro ¼" y un aireador de material poroso (tipo pecera para reducir el tamaño de las burbujas), que servirá para la inyección de aire al sistema.
- Recirculador marca THERMO, con regulación electrónica de temperatura. (Ver Figura 3c).



(a) Lámpara fluorescente
VOLTECH



(b) Compresor de aire



(c) Recirculador
THERMO

Figura 3. Complementos para el montaje del Bioreactor EPENDORF.

3.1.2 Medio de cultivo

Para que las microalgas se desarrollen requieren, además de la energía lumínica, un medio de cultivo con nutrientes minerales. Los nutrientes fundamentales para su crecimiento son el carbono, el nitrógeno y el fósforo (Sanz, 2019) además de otros minerales, que son fuente de alimento de las microalgas que se suministran en diferentes proporciones (Cobelas & Gallardo, 1989).

El medio de cultivo para este proyecto estará conformado por:

3.1.2.1 Macronutrientes

Para preparar 10ml de solución se utilizan los reactivos indicadas en la **Tabla 1**, siguiendo el procedimiento indicado en la sección

Preparación.



- *Materiales*

Tabla 1. Macronutrientes para el medio de cultivo.

REACTIVO		CANTIDAD	UNIDAD
Cloruro de calcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.3676	gr
Sulfato de magnesio heptahidratado	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.3697	gr
Bicarbonato de sodio	$NaHCO_3$	0.1260	gr
Fosfato acido de potasio	K_2HPO_4	0.0871	gr
Nitrato de sodio	$NaNO_3$	0.8501	gr
Silicato de sodio nonahidratado	$Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$	0.2842	gr

- *Preparación*

- Pesar las cantidades de los reactivos, utilizando la balanza digital.
- Colocar los macronutrientes en un vaso de precipitación.
- Agregar agua destilada hasta completar los 10ml de solución.

3.1.2.2 Micronutrientes

Para preparar 10ml de solución se utilizan los reactivos indicadas en la Tabla 2, siguiendo el procedimiento indicado en la sección *Preparación*.

- *Materiales*

Tabla 2. Micronutrientes para el medio de cultivo.

REACTIVO		CANTIDAD	UNIDAD
EDTA	$NaEDTA$	0.0436	gr
Tricloruro férrico hexahidratado	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.0315	gr
Sulfato de cobre pentahidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.00010	gr
Sulfato de zinc heptahidratado	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.00022	gr
Clorhidrato de cobalto hexahidratado	$Co_2HCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0001	gr
Cloruro de manganeso tetrahidratado	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.0010	gr
Molibdato de sodio nonahidratado	$Na_2MoO_4 \cdot 9H_2O$	0.0006	gr

- *Preparación*

- Pesar las cantidades de los reactivos, utilizando la balanza digital.
- Colocar los macronutrientes en un vaso de precipitación
- Agregar agua destilada hasta completar los 10ml de solución.



3.1.2.3 Vitaminas

Para preparar 10ml de solución se utilizan los reactivos indicadas en la Tabla 3, siguiendo el procedimiento indicado en la sección *Preparación*.

- *Materiales*

Tabla 3. Vitaminas para el medio de cultivo.

REACTIVO	CANTIDAD	UNIDAD
Tiamina	1.00	gr
Biotina	0.005	gr

- *Preparación*
 - Pesar las cantidades de los reactivos, utilizando la balanza digital.
 - Colocar los macronutrientes en un vaso de precipitación
 - Agregar agua destilada hasta completar los 10ml de solución.

3.1.3 Procedimiento para el montaje del cultivo

- En el bioreactor se coloca el inóculo con la especie de microalgas que se desea cultivar. Aproximadamente un 20% del volumen del reactor correspondiente a 250 ml.
- En caso de ser el cultivo inicial, se completa el volumen del reactor con agua destilada; pero cuando se dispone de agua reciclada de cultivos anteriores se puede completar el volumen del reactor con esta solución, ya que ésta es rica en nutrientes que pueden ser aprovechados.
- Tomar 1 ml de cada una de las soluciones preparadas de macronutrientes, micronutrientes y vitaminas, y colocar en un balón de aforo de 1000 ml, añadiendo agua destilada hasta completar el volumen y colocar esta solución en el bioreactor.
- Se programa en el bioreactor todas las variables requeridas para el desarrollo del cultivo.
 - Temperatura mínima 19°C (para simular la temperatura ambiente).
 - Rango de pH, 6.0 – 8.0
 - Agitación de 150 rpm.
- Alrededor del reactor se colocan lámparas fluorescentes programadas para encenderse y apagarse en períodos de doce horas.
- Se enciende el recirculador para mantener el cultivo en un rango de temperatura establecido, entre 19 y 30 °C.
- Finalmente, con la ayuda de un compresor se adiciona aire al reactor, programadas para encenderse y apagarse en períodos de doce horas.

3.2 Determinación de la cinética de crecimiento

3.2.1 Análisis de crecimiento mediante Recuento celular

3.2.1.1 Materiales

Para determinar la tasa de crecimiento de las microalgas mediante recuento celular se utilizan los materiales descritos a continuación.

- Micropipeta automática para toma de muestra (Ver Figura 4a).
- Cámara de Neubauer BOECO de 0.1 mm de profundidad, para conteo celular con cubreobjetos (Ver Figura 4b).
- Microscopio marca OLIMPO (Ver Figura 4c).



(a) Micropipeta automática



(b) Cámara de Neubauer



(c) Microscopio

Figura 4. Materiales para realizar recuento celular.

3.2.1.2 Preparación de la muestra

Se toma una muestra del cultivo de microalgas del bioreactor utilizando el conjunto de muestreo (Ver Figura 5) previamente agitado a 300 rpm, debido a que las células tienden a adherirse en las paredes y en el fondo del bioreactor.



Figura 5. Preparación de muestra para recuento celular.

3.2.1.3 Recuento con cámara de Neubauer:

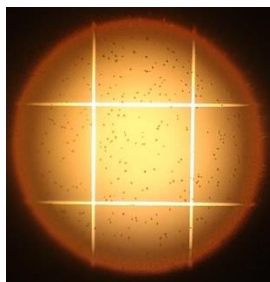
Según la técnica de recuento celular con caja de Neubauer se coloca el cubreobjetos sobre la cámara de Neubauer, luego se introduce entre la cámara y el cubreobjetos 10 μ l de la muestra de microalgas utilizando la micropipeta automática (Ver Figura 6a), controlando que no exista aire en el interior y que el cubreobjetos no se deslice sobre la cámara, evitando pérdida o exceso de muestra. Luego, se coloca la cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio (Ver Figura 6b), y se enfoca la muestra usando el lente magnificador 40x hasta lograr una imagen nítida de las células (Ver Figura 6c). Se cuentan las células presentes en los cuatro extremos de una de las cámaras de Neubauer, se toma como pauta para el recuento, que las células que están tocando el límite superior o el límite izquierdo deben ser contabilizadas (Bastidas, 2011) (Ver Figura 6d). Es importante hacer el recuento de las células que tengan una morfología redondeada evitando aquellas células que tengan sus paredes rotas o posean una forma extraña (Ver Figura 6e).



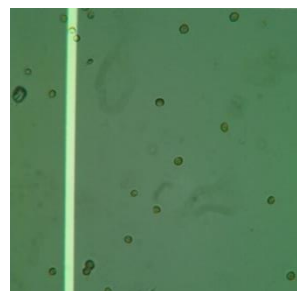
(a) Cámara Neubauer con muestra



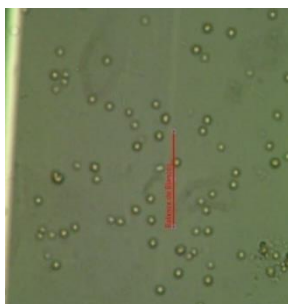
(b) Cámara de Neubauer en la bandeja del microscopio



(c) Enfoque del lente magnificador 40x



(d) Células en el límite izquierdo



(e) Células con morfología redondeada para recuento.

Figura 6. Recuento celular con Cámara de Neubauer.

Para determinar la concentración de células del cultivo de microalgas, se realiza el cálculo con el volumen de la muestra colocada entre el cubreobjetos y la cuadrícula de 1 mm², correspondiente a 10µl, es decir 0.1 mm³. Entonces, se aplica la Ecuación 1 cuyo resultado se obtiene en células/mililitro.

$$(\text{Número de células}) * \frac{1000}{0.1} * 10 = \left[\frac{\text{celulas}}{\text{ml}} \right]$$

Ecuación 1

3.2.1.3.1 Análisis de tasas de crecimiento.

Según (Piña et al., 2007) se obtiene la tasa de crecimiento a partir del recuento celular, utilizando la Ecuación 2.

$$\mu = \frac{\ln\left(\frac{C_{t+1}}{C_t}\right)}{\ln 2}$$

Ecuación 2

Donde:

μ = tasa de crecimiento

C_{t+1} = concentración celular en el tiempo $t + 1$

C_t = concentración celular en el tiempo t

3.2.2 Análisis de crecimiento mediante Turbiedad

3.2.2.1 Materiales

Para determinar la concentración de células del cultivo de microalgas mediante turbiedad se utilizan los materiales descritos a continuación.

- Turbidímetro HACH 2100AN Turbidimeter (Ver Figura 7a).
- Cubeta de muestra (Ver Figura 7b).



(a) Turbidímetro



(b) Cubeta de muestra

Figura 7. Materiales para realizar turbiedad.

3.2.2.2 Preparación de la muestra

Se toma la muestra del bioreactor, utilizando el conjunto muestreador; luego se agita la muestra para homogenizarla y evitar que las partículas queden sedimentadas, y se procede a colocarla en la cubeta de muestreo (tomamuestra).

3.2.2.3 Medición de turbiedad:

Se introduce la cubeta de muestreo en el turbidímetro, y se registra el valor de turbiedad en Unidades Nefelométricas de Turbiedad (NTU). Se realizan 3 ensayos, cuyos valores se promedian para verificar la tendencia de los datos.

3.2.3 Análisis de crecimiento mediante obtención de biomasa algal

3.2.3.1 Materiales

Para determinar la concentración de células del cultivo de microalgas mediante obtención de biomasa se utilizan los materiales descritos a continuación.

- Pipeta volumétrica de 10 ml, para tomar una muestra del cultivo (Ver Figura 8a).
- Filtro de papel marca Whatmanm microfibra de vidrio, diámetro 47mm. (Ver Figura 8b).
- Bomba de succión para la filtración (Ver Figura 8c).
- Filtro de porcelana (Ver Figura 8d).
- Horno (Ver Figura 8e).
- Balanza analítica SARTORIUS (Ver Figura 8f).



(a) Pipeta volumétrica



(b) Filtro de papel



(c) Bomba de succión



(d) Filtro de porcelana



(e) Horno



(f) Balanza analítica

Figura 8. Materiales para obtención de biomasa algal.

3.2.3.2 Preparación de la muestra

Se toma 10 ml de la muestra del cultivo con la pipeta volumétrica, previamente agitada para homogenizarla y evitar que las partículas queden sedimentadas. En la balanza de precisión se coloca el filtro de papel previamente desecado, para obtener su peso.

3.2.3.3 Filtración y secado al horno

Se coloca el filtro de papel sobre el filtro de porcelana y se acciona la bomba de succión durante dos minutos, tiempo en el cual se succiona el exceso de agua. Se retira el filtro de papel con la biomasa filtrada y se coloca en el horno durante 24 horas. Se registra nuevamente el peso del filtro con la biomasa seca.

Utilizando la Ecuación 3 se calcula la cantidad total de biomasa obtenida del ensayo.

$$Biomasa = W_{papel\ filtro+biomasa} - W_{papel\ filtro+biomasa\ seca}$$

Ecuación 3

3.3 Elaboración de perlas de alginato.

Para la elaboración de las perlas de alginato se sigue el procedimiento descrito en (Gonzalez & Bashan, 2000) con algunas modificaciones.

Diluir 2 gramos de alginato de sodio en 50 ml de agua destilada y mezclar hasta obtener una solución homogénea, evitando la presencia de grumos. Ajustar la mezcla a pH entre 7.8 - 8.0 utilizando ácido clorhídrico HCL 0,1M o hidróxido de sodio NaOH 0.1 M según corresponda. Luego, utilizando una jeringa se procede a tomar 20 ml de la solución de alginato de sodio para

dejarla gotear en una solución de cloruro de calcio 1% (p/v), con agitación constante por medio de un imán. Se pueden obtener 200 perlas de este peso de alginato una vez terminado el goteo de la solución. Finalmente, Se procede a filtrar y lavar las perlas utilizando un tamiz, para eliminar el cloruro de calcio y conservarlas hidratadas en un recipiente con agua destilada estéril (Ver Figura 9).

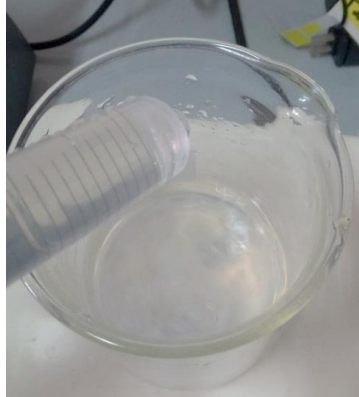


Figura 9. Obtención de perlas de alginato de sodio.

3.4 Coinmovilización de algas *Chlorella* en perlas de alginato de sodio

Para la coinmovilización de las microalgas se sigue un procedimiento bastante similar al de obtención de las perlas de alginato. Pero antes, se requiere realizar un conteo en la Cámara de Neubauer para conocer la concentración de los cultivos de *Chlorella* en células/ml, ya que dependiendo de la concentración celular se debe añadir el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 40×10^6 células/ml de solución de alginato. Posteriormente se procede a elaborar las perlas de alginato siguiendo el procedimiento descrito en la sección 3.3 (Ver Figura 10).



*Figura 10. Coinmovilización de algas *Chlorella*.*

Se dejan las microalgas encapsuladas en las perlas por 7 días; esto para que el alginato atraviese y permeabilice la pared de las células y luego al ponerlas en contacto con los metales pesados, las partículas sean absorbidas o ingresen al metabolismo de la célula.

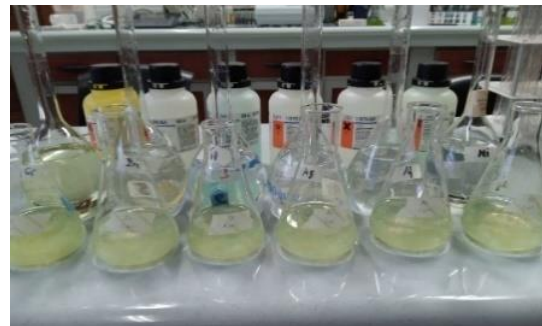
3.5 Remoción de metales pesados de soluciones sintéticas con algas coimmobilizadas en perlas de alginato de sodio

3.5.1 Preparación de soluciones sintéticas de metales pesados

Se preparan las soluciones sintéticas de cromo, zinc, aluminio, níquel y cobre utilizando matraces balón de 500 ml (Ver Figura 11a). Luego, se colocan 50 gr de perlas de alginato con *Chorella* en 200ml de solución a tres diferentes concentraciones: 1ppm, 3ppm y 5ppm. Se realizan 3 ensayos por bloque, es decir, se realizan 3 ensayos para cada concentración de cada metal (Ver Figura 11b). Adicionalmente se realizan los mismos ensayos solamente con las perlas de alginato (Ver Figura 11c).



(a) Preparación de las soluciones sintéticas de metales pesados.



(b) Matraces con perlas con *Chorella* en soluciones de metales pesados.



(c) Matraces con perlas sin *Chorella* en soluciones de metales pesados.

Figura 11. Preparación de soluciones sintéticas de metales pesados.

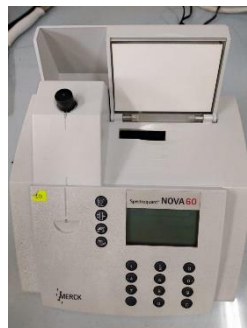
3.5.2 Remoción de metales pesados

Primero se determina la concentración inicial del metal en el tiempo cero, luego se regulan las condiciones aplicadas a cada muestra. Es decir, se abastece de luz y aereación constante (Ver Figura 12a). Estas condiciones se aplican durante un periodo de 80 minutos tomando muestras

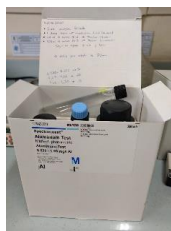
cada 10 minutos para determinar la concentración del metal. Para determinar la concentración del metal se utiliza un Fotómetro Spectroquant NOVA 60 (Ver Figura 12b), y utilizando los kits de ensayo de metales pesados (Ver Figura 12c), donde se muestra el kit para el Aluminio siendo similares para los demás metales; se preparan las muestras para el Níquel (Ver Figura 12d), Cromo (Ver Figura 12e), Zinc (Ver Figura 12f), Aluminio (Ver Figura 12g) y Cobre (Ver Figura 12h) a ser valoradas mediante espectrofotometría.



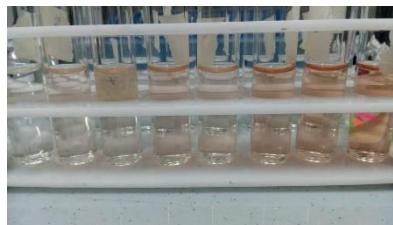
(a) Matrices con soluciones de metales pesados con luz y aereación.



(b) Espectrofotómetro NOVA 60.



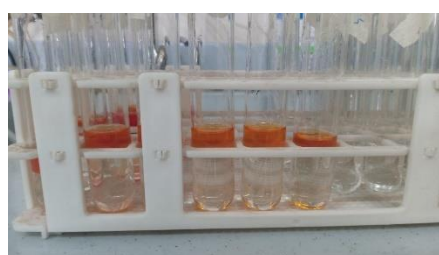
(c) Kit para preparar la muestra del Aluminio.



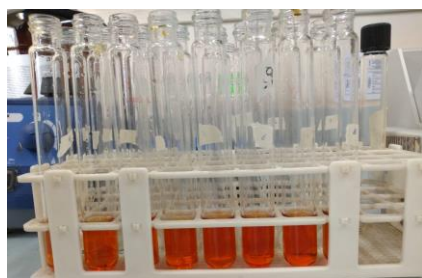
(d) Muestras de Níquel



(e) Muestras de Cromo



(f) Muestras de Zinc



(g) Muestras de Aluminio



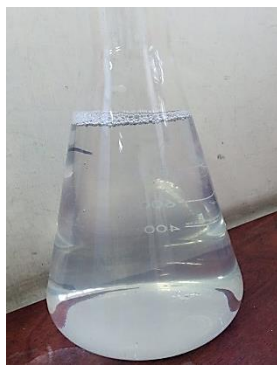
(h) Muestras de Cobre

Figura 12. Remoción de metales pesados en muestras de soluciones sintéticas.

Luego, de cada uno de los recipientes se toma 1 gramo de perlas con microalgas coinmovilizada y se coloca en un vaso de precipitación; se adiciona 9 ml de solución de bicarbonato al 4%; se deja reposar la muestra durante 4 horas, para luego realizar un recuento celular (Ardila Forero, 2012).

3.6 Remoción de metales pesados de aguas residuales industriales con algas coinmovilizada en perlas de alginato de sodio.

Para realizar este análisis se sigue un procedimiento similar al de la sección 3.5. Con el espécimen inicial (Ver Figura 13a) se prepara la muestra (Ver Figura 13b), con la diferencia que aquí ya se tiene directamente la muestra residual industrial con los metales pesados y no es necesario preparar una solución adicional.



(a) Muestra de aguas residuales industriales



(b) Aplicación de luz y aereación en las muestras de aguas residuales industriales.

Figura 13. Remoción de metales pesados en muestra de agua residual industrial con luz y aereación.

CAPÍTULO 4

En este capítulo se presentan los resultados obtenidos en los diferentes experimentos. Se ensayaron 4 cultivos a partir de los cuales se determina la cinética de crecimiento y la remoción de los metales a diferentes concentraciones.

4 RESULTADOS

4.1 Cinética de crecimiento

4.1.1 Condiciones para el crecimiento de las microalgas

Las condiciones controladas a las que son expuestas las microalgas, permiten conseguir un adecuado desarrollo del cultivo. El cultivo de microalgas en un fotobioreactor permite controlar factores como luz, pH, temperatura, aereación, agitación y el suministro de nutrientes. Así, en estos cultivos se aplicaron las siguientes condiciones.



La fuente de alimento fue la descrita en la sección 3.1.2. Las condiciones de luz aplicadas se basaron en fotoperiodos de luz y oscuridad de 12 horas. La aplicación de iluminación se realizó como se indica en la Figura 3a. El pH fue controlado de forma que no se convierta en un factor limitante del cultivo. Se registraron valores de pH, dos veces al día. Esto se lo realizó de forma automática a través de electrodos como se indica en la Figura 2c. Los valores registrados oscilan entre 7.03 - 8.11. Los valores menores corresponden al inicio del cultivo y va ascendiendo paulatinamente. Corroborando el análisis que se presenta en (Cabrera & Pulla, 2014), ya que las microalgas extraen el anhídrido carbónico parcialmente combinado en los bicarbonatos suministrados al cultivo y paulatinamente producen un incremento del pH. La temperatura durante el cultivo corresponde a la temperatura ambiente del laboratorio, con algunas variaciones debido a la influencia de otros equipos electrónicos existentes en el mismo lugar y el enfriamiento debido al recirculador. La temperatura se mantuvo en un rango de 19.1 a 31.2°C durante todos los ensayos. La aereación que se aplica al cultivo corresponde a un periodo de 12 horas de encendido y 12 horas de apagado, coincidiendo con los periodos de encendido y apagado de luz.

4.1.2 Recuento de células en cámara de Neubauer

Para cada uno de los 4 cultivos se ha realizado un conteo de la cantidad de células presentes para un periodo de 8 días. Conforme a la teoría revisada en la sección del marco teórico se cumple que la máxima tasa de crecimiento se presenta entre el cuarto y sexto día. Cabe recalcar que aplicó las mismas condiciones ambientales (periodos de luz y obscuridad, rangos de temperatura, periodos de aereación y agitación continua) para cada uno de los cultivos.

En la Figura 14 se presenta el recuento de células en cámara de Neubauer para los 4 ensayos. Existe una tendencia de descenso en los primeros días, esto debido a que las microalgas se encuentran en fase de adaptación a las condiciones del medio de cultivo y muchas perecen. En esta fase la densidad celular promedio se encuentra en $2.23E7$ células por ml. Entre el cuarto y sexto día las células alcanzan su máximo crecimiento. Así, se obtiene un valor de densidad celular máxima promedio de $4,93E07$ células/ml analizando los 4 cultivos. En esta fase es donde se toma un inóculo para iniciar un nuevo cultivo. A partir de este último, las células entran en la fase de latencia, donde las microalgas empiezan a sucumbir, reflejando un número menor en el recuento celular. Aquí presentan una densidad celular promedio de $2.82E7$ células por ml.

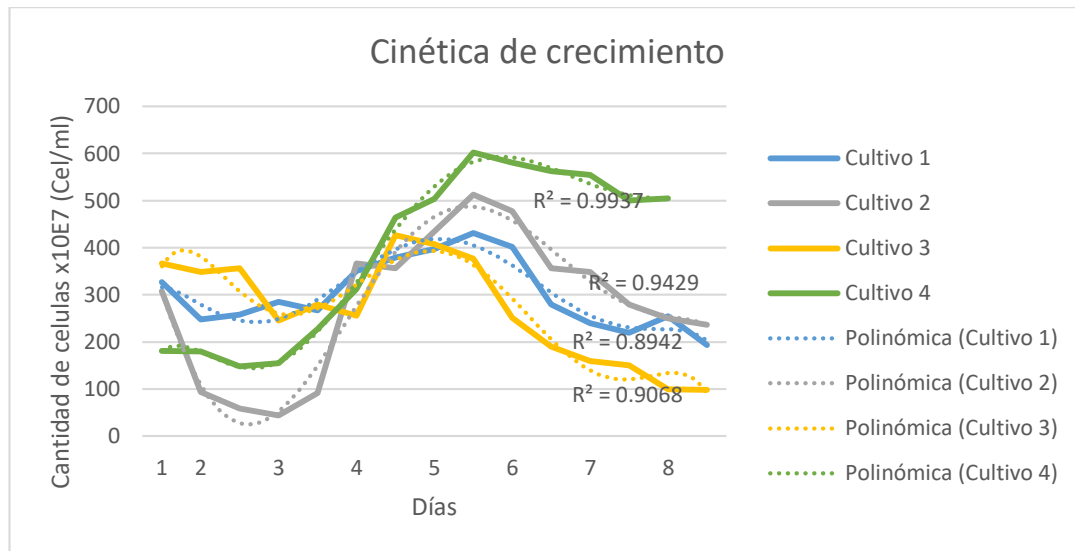


Figura 14. Cinética de crecimiento.

4.1.2.1 Determinación de la tasa de crecimiento

En la **Tabla 4** se muestra el recuento celular de los cultivos y la tasa de crecimiento de las células. Para los 4 cultivos se observa que la tasa de crecimiento es negativa en los primeros días, luego se hace positiva y nuevamente se torna negativa. El comportamiento se ha plasmado también de forma gráfica en la Figura 14, así se puede observar que las fases de crecimiento de cultivo son concordantes con lo revisado en la sección de marco teórico.

Tabla 4. Recuento celular y tasa de crecimiento de los cultivos.

DÍA	CULTIVO 1		CULTIVO 2		CULTIVO 3		CULTIVO 4	
	RECUENTO CEL/ML	TASA DE CRECIMIENTO	RECUENTO CEL/ML	TASA DE CRECIMIENTO	RECUENTO CEL/ML	TASA DE CRECIMIENTO	RECUENTO CEL/ML	TASA DE CRECIMIENTO
1	32700000	-0,399	3,08E+07	-1,712	3,67E+07	-0,077	1,81E+07	-0,008
	24800000	0,057	9,40E+06	-0,672	3,48E+07	0,033	1,80E+07	-0,282
2	25800000	0,144	5,90E+06	-0,423	3,56E+07	-0,539	1,48E+07	0,067
	28500000	-0,094	4,40E+06	1,064	2,45E+07	0,193	1,55E+07	0,550
3	26700000	0,395	9,20E+06	1,996	2,80E+07	-0,129	2,27E+07	0,459
	35100000	0,111	3,67E+07	-0,044	2,56E+07	0,738	3,12E+07	0,573
4	37900000	0,067	3,56E+07	0,289	4,27E+07	-0,069	4,64E+07	0,119
	39700000	0,119	4,35E+07	0,238	4,07E+07	-0,110	5,04E+07	0,256
5	43100000	0,000	5,13E+07	-0,102	3,77E+07	-0,587	6,02E+07	-0,054
	43100000	-0,627	4,78E+07	-0,425	2,51E+07	-0,402	5,80E+07	-0,045



6	27900000	-0,217	3,56E+07	-0,029	1,90E+07	-0,248	5,62E+07	-0,021
	24000000	-0,126	3,49E+07	-0,318	1,60E+07	-0,084	5,54E+07	-0,148
7	22000000	0,213	2,80E+07	-0,163	1,51E+07	-0,595	5,00E+07	0,014
	25500000	-0,402	2,50E+07	-0,083	1,00E+07	-0,014	5,05E+07	-0,064

4.1.3 Ensayo de turbiedad

A través de este ensayo se determina la turbiedad para cada cultivo. La turbiedad es una metodología complementaria al recuento celular que permite definir la concentración de células en una muestra. En la Figura 15 se observa que, paralelamente a la Figura 14, la turbiedad es menor en los días iniciales de cultivo y toma un valor alto entre el cuarto y el sexto día. En los últimos días del cultivo, la turbiedad nuevamente tiene tendencia a disminuir debido que el cultivo está llegando a su etapa final.

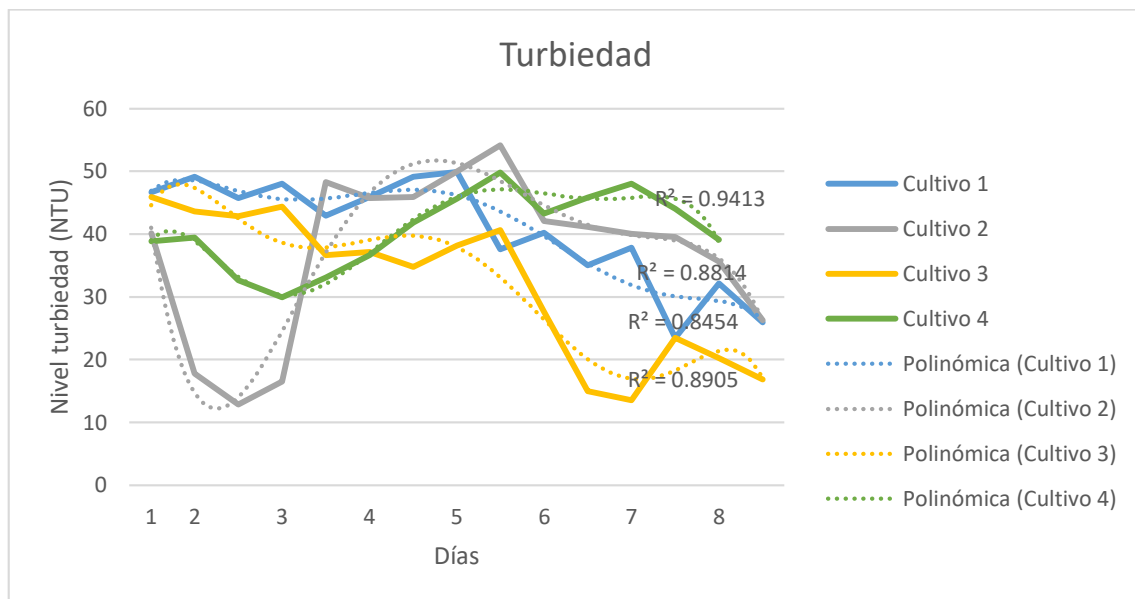


Figura 15. Turbiedad.

4.1.4 Determinación de sólidos totales

En la Figura 16 se presenta los resultados de sólidos totales en cada uno de los ensayos. Los sólidos totales en una muestra representan la cantidad de materia orgánica presente, suponiendo que el cultivo es puro. De esta manera, es posible tener otra apreciación de la cantidad de microalgas presentes en cada cultivo. Siendo así, una medida complementaria que permite comprobar que la tendencia de crecimiento se cumple, al igual que en la Figura 14 y Figura 15.

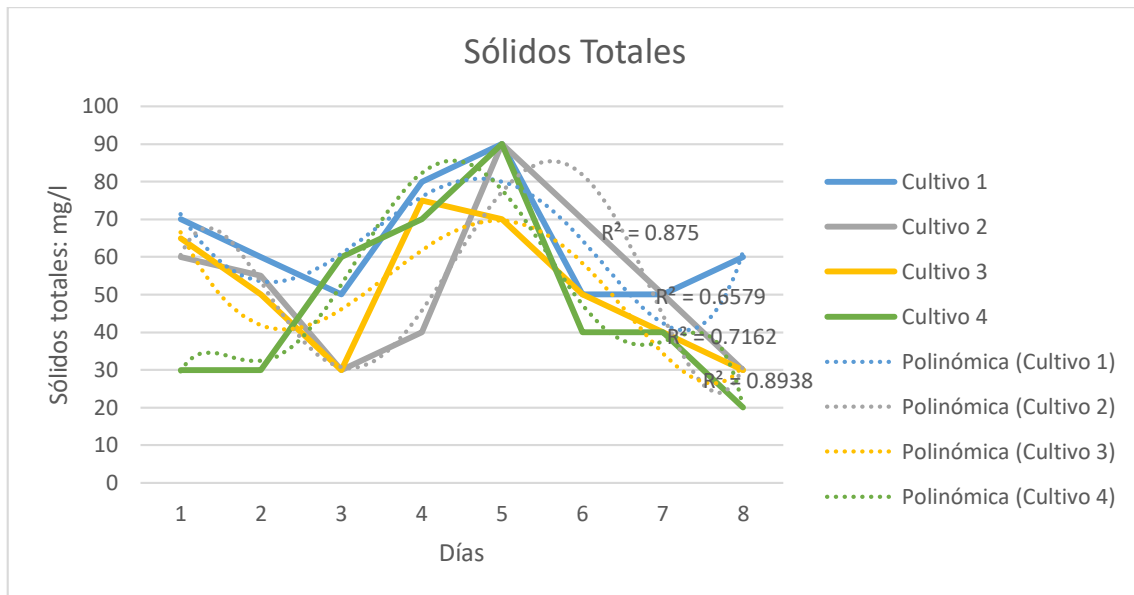


Figura 16. Sólidos totales.

4.2 Obtención de perlas de alginato de sodio

Dentro de las características físicas y morfológicas de las perlas de alginato formadas, que se toma en cuenta para su selección están: que tengan una forma redondeada, sean de color blanco-transparente y tengan un tamaño aproximado de 4mm de diámetro. A partir del procedimiento descrito en la sección 3.3, se obtuvo un aproximado de 50 gramos de perlas con las características antes mencionadas a partir de la solución de 2 gramos de alginato de sodio en 50 mililitros de agua destilada (Ver Figura 17).



Figura 17. Perlas de alginato de sodio sin Chlorella.

4.3 Coinmovilización de Chlorella en perlas de alginato

A partir del procedimiento descrito en la sección 3.4 se obtuvo un aproximado de 50 gramos de perlas coinmovilizada con alginato de sodio, con las características mencionadas en la sección

4.2. Se partió de una solución de 2 gramos de alginato de sodio en 50 mililitros de agua destilada con una concentración de 40×10^6 células/ml de microalgas *Chlorella*. (Ver Figura 18).



Figura 18. Perlas de alginato de sodio con *Chlorella*.

4.4 Remoción de metales pesados

Se evalúa la capacidad de las microalgas *Chlorella* de remover metales pesados en concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm. Estos metales se encuentran disueltos en solución acuosa, y las microalgas *Chlorella* se hallan coinmovilizada en perlas de alginato de sodio. Al igual que en la etapa de cultivo, las microalgas encapsuladas fueron expuestas a condiciones ambientales de luz y aereación buscando una mayor efectividad en la remoción de los metales (Ver Figura 12a).

Se realizaron 2 muestreos, el primero donde se pone en contacto las soluciones de metales pesados con las perlas de alginato de sodio; y el segundo ensayo donde se pone en contacto las soluciones de los metales pesados con las microalgas *Chlorella* coinmovilizada en perlas de alginato de sodio. De esta forma se busca determinar si la encapsulación de la microalga en el alginato de sodio aumenta la capacidad de remoción de los metales pesados. Se realizaron los ensayos por triplicado para cada metal con cada una de las concentraciones. Para cada muestreo y para concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm se obtuvo 24 muestras para cada metal, así para los 5 metales ensayados se obtuvo un total de 120 muestras. Los especímenes corresponden a las muestras tomadas cada 10 minutos, durante 80 minutos. Para determinar el porcentaje de remoción de cada metal, se hace un análisis de la disminución del metal en la solución acuosa por acción de las microalgas encapsuladas en las perlas de alginato y solamente por acción de las perlas de alginato.

4.4.1 Ensayos con soluciones sintéticas de metales pesados en concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm.

- **Níquel**

En la Tabla 5, Tabla 6 y Tabla 7 se presentan los resultados de los 3 ensayos realizados para el Níquel para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas para las



concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm respectivamente. Para el caso de 1ppm se puede observar que el porcentaje de remoción solo con perlas de alginato, es mayor que utilizando las microalgas. Para 3ppm y 5ppm, la situación se invierte, el porcentaje de remoción es mayor durante todo el ensayo cuando se utiliza las perlas con microalgas

Tabla 5. Remoción de Níquel en solución sintética a 1ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO					PERLAS CON ALGAS				
	1PPM									
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
A	B	C	PROMEDIO	A		B	C	PROMEDIO		
10	0,38	0,25	0,52	0,38	62%	0,45	0,5	0,52	0,49	51%
20	0,30	0,22	0,33	0,28	72%	0,36	0,47	0,39	0,41	59%
30	0,24	0,20	0,25	0,23	77%	0,35	0,39	0,36	0,37	63%
40	0,23	0,20	0,23	0,22	78%	0,3	0,33	0,29	0,31	69%
50	0,19	0,20	0,22	0,20	80%	0,29	0,31	0,29	0,30	70%
60	0,18	0,19	0,20	0,19	81%	0,29	0,3	0,27	0,29	71%
70	0,15	0,20	0,20	0,18	82%	0,28	0,27	0,26	0,27	73%
80	0,09	0,18	0,19	0,15	85%	0,25	0,23	0,21	0,23	77%

Tabla 6. Remoción de Níquel en solución sintética a 3ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO					PERLAS CON ALGAS				
	3PPM									
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
A	B	C	PROMEDIO	A		B	C	PROMEDIO		
10	1,34	1,28	1,41	1,34	55%	0,79	0,82	0,80	0,80	73%
20	1,05	1,09	1,15	1,10	63%	0,62	0,79	0,69	0,70	77%
30	0,92	1,01	0,98	0,97	68%	0,55	0,60	0,59	0,58	81%
40	0,86	0,93	0,81	0,87	71%	0,51	0,52	0,50	0,51	83%
50	0,64	0,76	0,75	0,72	76%	0,51	0,49	0,49	0,50	83%
60	0,58	0,65	0,59	0,61	80%	0,50	0,48	0,47	0,48	84%
70	0,49	0,59	0,49	0,52	83%	0,45	0,41	0,44	0,43	86%
80	0,41	0,53	0,47	0,47	84%	0,38	0,35	0,39	0,37	88%

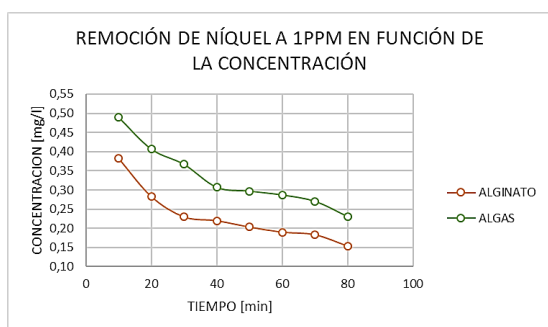
Tabla 7. Remoción de Níquel en solución sintética a 5ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO					PERLAS CON ALGAS				
	5PPM									
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
A	B	C	PROMEDIO	A		B	C	PROMEDIO		
10	4,00	3,90	3,20	3,70	26%	2,36	2,45	2,32	2,38	52%

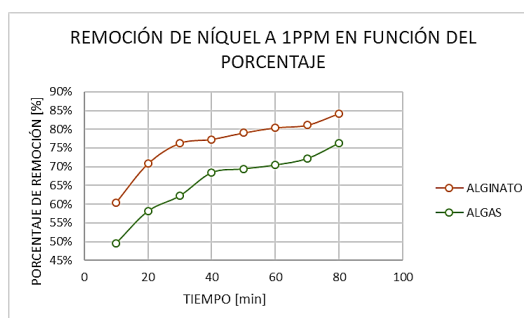


20	2,80	2,75	2,92	2,82	44%	1,92	2,01	1,95	1,96	61%
30	1,78	1,68	1,74	1,73	65%	1,47	1,52	1,35	1,45	71%
40	1,31	1,41	1,39	1,37	73%	1,09	1,02	1,15	1,09	78%
50	1,40	1,32	1,29	1,34	73%	0,98	0,99	1,03	1,00	80%
60	1,21	1,32	1,19	1,24	75%	0,84	0,87	0,91	0,87	83%
70	1,09	0,99	0,97	1,02	80%	0,75	0,78	0,82	0,78	84%
80	0,98	0,97	0,94	0,96	81%	0,72	0,65	0,79	0,72	86%

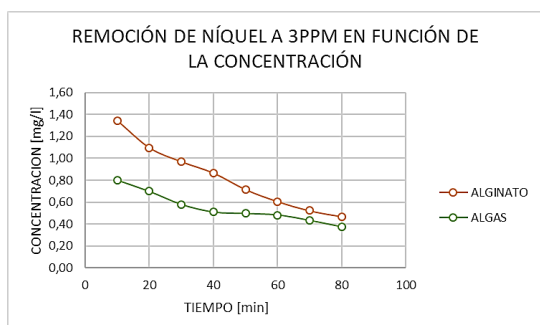
En la Figura 19 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Níquel a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm respectivamente.



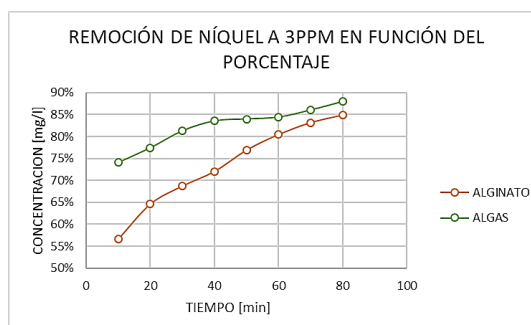
(a) Remoción de Ni a 1ppm en función de la concentración.



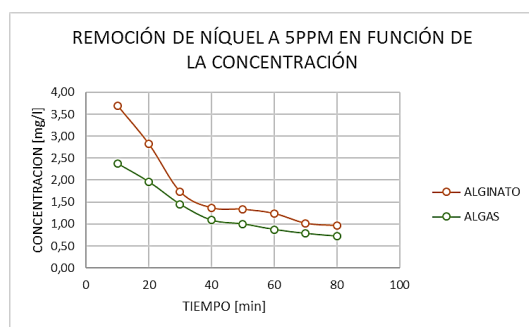
(b) Remoción de Ni a 1ppm en función del porcentaje



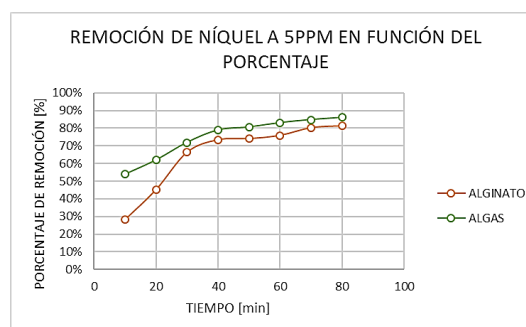
(c) Remoción de Ni a 3ppm en función de la concentración.



(d) Remoción de Ni a 3ppm en función del porcentaje



(e) Remoción de Ni a 5ppm en función de la concentración.



(f) Remoción de Ni a 5ppm en función del porcentaje

Figura 19. Remoción en el tiempo para el Níquel en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.

Se observa que para la concentración de 1ppm existe mayor remoción en el tratamiento con perlas de alginato que en el tratamiento con perlas con microalgas. Para las concentraciones de 3ppm y 5ppm respectivamente la situación se invierte, teniendo como resultado una mayor remoción en los ensayos con perlas con microalgas. En estos casos el porcentaje de remoción alcanza el 88% y el 86% para los ensayos con microalgas, y el 84% y 81% para ensayos con alginato respectivamente. En (Ruiz Tovar & Morales Fonseca, 2008) se presenta un porcentaje de remoción para el Níquel de 59% a partir de una concentración de 300ppm, utilizando hongos blancos cultivados en condiciones no estériles. En el trabajo realizado en (Sánchez et al., 2008) la concentración del metal disminuye conforme avanza el tiempo de contacto del metal con las microalgas, ya que la biomasa se va saturando del metal con lo que velocidad de bioadsorción disminuye y se alcanza un equilibrio a los 40 minutos para el Níquel. En este mismo trabajo, se presenta un porcentaje de remoción del 65% para una concentración inicial de 100ppm a 120 minutos de ensayo utilizando biomasa del alga *Chlorella*. Por lo que con los resultados del presente trabajo se demuestra que se produce un mayor porcentaje de remoción cuando se ensaya con concentraciones bajas de metales. En (Ruiz Tovar & Morales Fonseca, 2008) para efectos de remoción de este metal es mejor el uso de células vivas con un metabolismo activo; la mayor velocidad de remoción se presenta en los primeros 10 minutos de contacto para los ensayos con microalgas lo que coincide con los resultados de este trabajo. Mientras que para los ensayos con perlas de alginato la afinidad iónica aumenta paulatinamente.

En términos generales a medida que pasa el tiempo aumenta el porcentaje acumulado de remoción, pero este va disminuyendo porque las membranas tanto de las células como del alginato se van saturando.

Por lo tanto, a mayor concentración mayor remoción con algas, posiblemente la cinética de la reacción biológica es mejor, a mayor concentración.



- **Cromo**

En las tablas: Tabla 8, Tabla 9, y Tabla 10, se presentan los resultados de los 3 ensayos realizados para el Cromo para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm respectivamente. Para el caso de 1ppm se puede observar que la remoción con perlas solo de alginato es mayor que cuando se utilizan las perlas con microalgas. Con el paso del tiempo el porcentaje de remoción utilizando microalgas aumenta, de tal manera que al cabo de los 80 minutos el método con perlas con microalgas presenta mayor porcentaje de remoción. Para el caso de 3ppm el porcentaje de remoción es mayor durante todo el ensayo cuando se utiliza las perlas con microalgas. Para el caso de 5ppm, se tiene una tendencia similar al caso de 3ppm. Es decir, a mayor concentración actúan las algas en el proceso de remoción.

Tabla 8. Remoción de Cromo en solución sintética a 1ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN		
	1PPM											
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm						
A	B	C	PROMEDIO	A	B	C	PROMEDIO					
10	0,69	0,88	0,57	0,71	29%	0,83	0,91	0,87	0,87	13%		
20	0,45	0,78	0,52	0,58	42%	0,76	0,82	0,79	0,79	21%		
30	0,41	0,73	0,44	0,53	47%	0,53	0,61	0,63	0,59	41%		
40	0,39	0,62	0,37	0,46	54%	0,43	0,5	0,49	0,47	53%		
50	0,37	0,54	0,33	0,41	59%	0,4	0,42	0,42	0,41	59%		
60	0,34	0,48	0,33	0,38	62%	0,35	0,29	0,31	0,32	68%		
70	0,33	0,46	0,32	0,37	63%	0,32	0,3	0,29	0,30	70%		
80	0,26	0,34	0,29	0,30	71%	0,29	0,28	0,26	0,28	72%		

Tabla 9. Remoción de Cromo en solución sintética a 3ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN		
	3PPM											
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm						
A	B	C	PROMEDIO	A	B	C	PROMEDIO					
10	1,17	1,10	1,22	1,16	61%	0,98	1,00	0,99	0,99	67%		
20	1,11	1,02	1,19	1,11	63%	0,97	0,99	0,97	0,98	67%		
30	1,02	0,99	1,16	1,06	65%	0,90	0,97	0,94	0,94	69%		
40	1,01	0,97	1,05	1,01	66%	0,89	0,95	0,89	0,91	70%		
50	0,99	0,95	0,98	0,97	68%	0,86	0,92	0,85	0,88	71%		

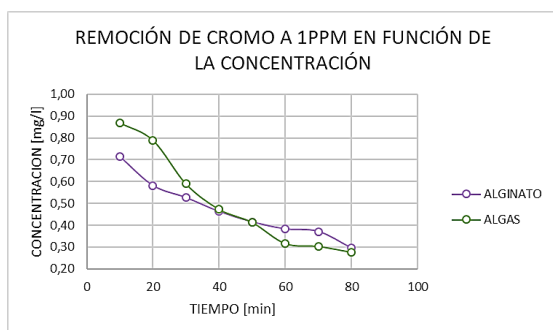


60	0,98	0,92	0,95	0,95	68%	0,85	0,89	0,84	0,86	71%
70	0,96	0,84	0,93	0,91	70%	0,81	0,86	0,82	0,83	72%
80	0,90	0,79	0,89	0,86	71%	0,80	0,83	0,81	0,81	73%

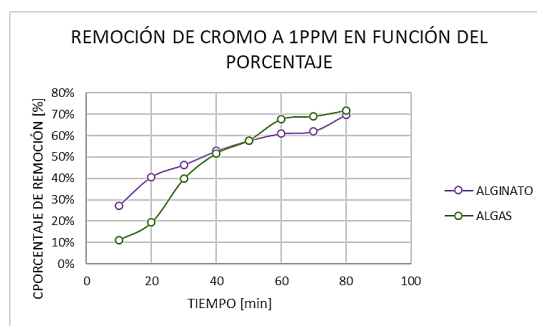
Tabla 10. Remoción de Cromo en solución sintética a 5ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				POCENTAJE DE REMOCIÓN		
	5PPM											
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				POCENTAJE DE REMOCIÓN	
A	B	C	PROMEDIO	A	B		C	PROMEDIO				
10	2,90	2,60	3,10	2,87	43%	2,60	2,40	2,80	2,60	48%		
20	2,80	2,50	2,80	2,70	46%	2,50	2,30	2,60	2,47	51%		
30	2,50	2,30	2,50	2,43	51%	2,30	2,00	2,30	2,20	56%		
40	1,80	2,00	2,10	1,97	61%	1,90	1,80	1,75	1,82	64%		
50	1,70	1,90	1,80	1,80	64%	1,50	1,70	1,50	1,57	69%		
60	1,60	1,70	1,60	1,63	67%	1,40	1,50	1,50	1,47	71%		
70	1,50	1,60	1,50	1,53	69%	1,40	1,40	1,40	1,40	72%		
80	1,40	1,50	1,50	1,47	71%	1,20	1,30	1,30	1,27	75%		

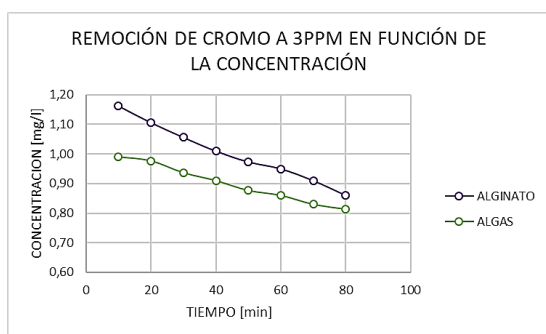
En la Figura 20 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Cromo a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm respectivamente.



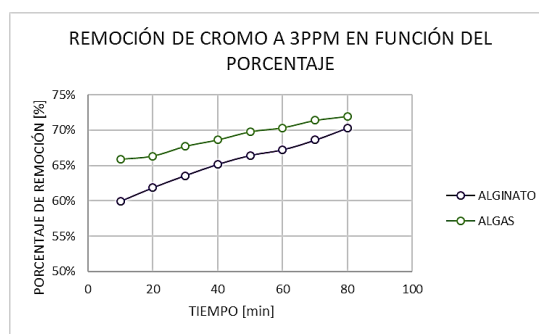
(a) Remoción de Cr a 1ppm en función de la concentración.



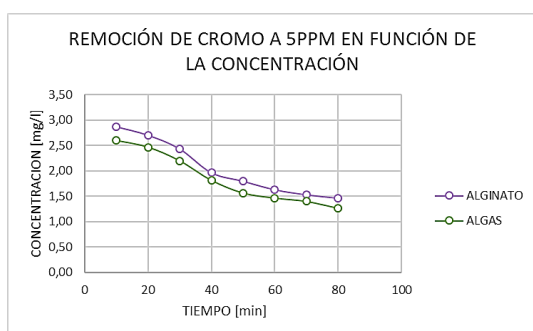
(b) Remoción de Cr a 1ppm en función del porcentaje



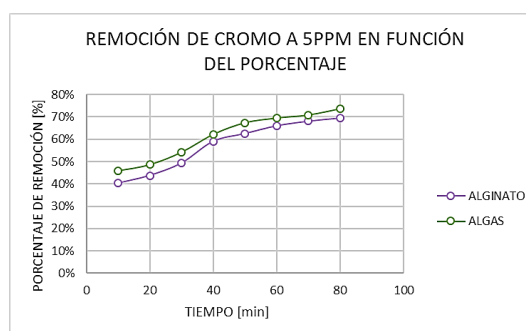
(c) Remoción de Cr a 3ppm en función de la concentración.



(d) Remoción de Cr a 3ppm en función del porcentaje



(e) Remoción de Cr a 5ppm en función de la concentración.



(f) Remoción de Cr a 5ppm en función del porcentaje

Figura 20. Remoción en el tiempo para el Cromo en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.

Luego del análisis de los datos, se consiguió un porcentaje de remoción utilizando microalgas del 72%, 73% y 75% partiendo de una concentración de 1ppm, 3ppm y 5ppm respectivamente, siendo porcentajes mayores en el tratamiento con perlas de alginato sin *Chlorella*. En trabajos como (Arias Vinueza, 2017) se presenta una remoción de Cromo de más de 61% partiendo de una concentración de 10 ppm, resultando más eficiente que el tratamiento control o de perlas solo de alginato. En (Ardila Forero, 2012) se estudia la remoción de Cromo en un ensayo de 200 minutos donde la concentración final de Cromo es de 4.4 ppm partiendo de una concentración inicial de 10ppm. Según el análisis estadístico realizado por (Arias Vinueza, 2017) la concentración de Cromo a los 80 minutos es de 4.93ppm, correspondiente a un porcentaje de remoción del 49.3%, disminuyendo cada vez su velocidad de remoción. Esta tendencia muestra que existe mayor eficiencia de remoción con microalga cuando se ensaya con concentraciones menores a 10ppm y para concentraciones mayores a este valor el porcentaje de remoción no es significativo. En donde el tratamiento con *Chlorella* encapsulada en perlas de alginato presenta un mayor grado de remoción de cromo que el tratamiento solo con perlas de alginato. La mayor velocidad de remoción se presenta en los primeros 10 minutos de contacto para los ensayos con microalgas y



para perlas de alginato en concentraciones de 3ppm y 5ppm. Mientras que para los ensayos de 1ppm con microalgas *Chlorella* y con perlas de alginato la remoción es pequeña al inicio de los ensayos.

- **Zinc**

En las tablas: Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13, se presentan los resultados de los 3 ensayos realizados para el Zinc para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas; para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm respectivamente. Los ensayos con este metal muestran que el porcentaje de remoción es mayor utilizando perlas con microalgas tanto para el caso de 1ppm, 3ppm y 5ppm.

Tabla 11. Remoción de Zinc en solución sintética a 1ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	1PPM					1PPM				
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm				
A	B	C	PROMEDIO	A	B	C	PROMEDIO			
10	0,89	0,66	0,67	0,74	26%	0,83	0,77	0,8	0,80	20%
20	0,86	0,56	0,44	0,62	38%	0,82	0,72	0,76	0,77	23%
30	0,74	0,54	0,41	0,56	44%	0,78	0,7	0,71	0,73	27%
40	0,56	0,52	0,36	0,48	52%	0,76	0,67	0,68	0,70	30%
50	0,35	0,49	0,34	0,39	61%	0,73	0,61	0,64	0,66	34%
60	0,34	0,39	0,33	0,35	65%	0,71	0,59	0,6	0,63	37%
70	0,33	0,29	0,32	0,31	69%	0,69	0,56	0,58	0,61	39%
80	0,30	0,28	0,30	0,29	71%	0,65	0,52	0,56	0,58	42%

Tabla 12. Remoción de Zinc en solución sintética a 3ppm.

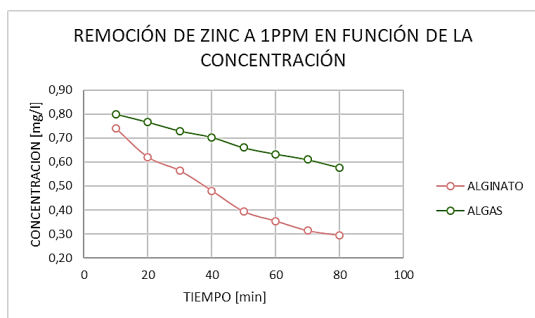
TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	3PPM					3PPM				
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm				
A	B	C	PROMEDIO	A	B	C	PROMEDIO			
10	1,86	1,98	1,84	1,89	37%	1,73	1,85	1,72	1,77	41%
20	1,12	1,18	1,12	1,14	62%	0,88	1,02	0,95	0,95	68%
30	0,90	1,02	0,98	0,97	68%	0,85	0,93	0,86	0,88	71%
40	0,80	0,92	0,87	0,86	71%	0,79	0,90	0,75	0,81	73%
50	0,79	0,90	0,85	0,85	72%	0,78	0,82	0,71	0,77	74%
60	0,74	0,85	0,80	0,80	73%	0,68	0,78	0,69	0,72	76%
70	0,71	0,79	0,74	0,75	75%	0,60	0,79	0,65	0,68	77%
80	0,69	0,71	0,68	0,69	77%	0,55	0,65	0,61	0,60	80%



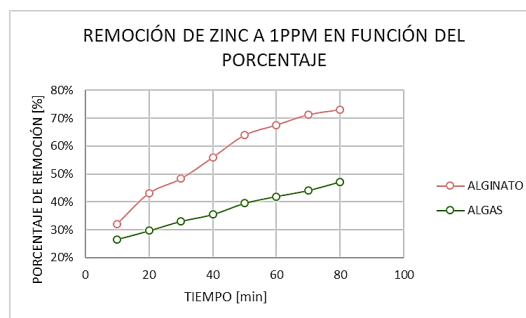
Tabla 13. Remoción de Zinc en solución sintética a 5ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	5PPM									
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm				
A	B	C	PROMEDIO	A	B	C	PROMEDIO			
10	3,00	3,10	3,30	3,13	37%	2,90	2,80	3,10	2,93	41%
20	2,90	2,90	3,20	3,00	40%	2,60	2,60	2,80	2,67	47%
30	2,80	2,70	3,00	2,83	43%	2,40	2,50	2,70	2,53	49%
40	2,60	2,60	2,90	2,70	46%	2,30	2,40	2,50	2,40	52%
50	2,50	2,60	2,70	2,60	48%	2,20	2,20	2,30	2,23	55%
60	2,40	2,50	2,50	2,47	51%	2,10	2,10	2,20	2,13	57%
70	2,30	2,40	2,40	2,37	53%	2,10	2,10	2,10	2,10	58%
80	2,20	2,30	2,20	2,23	55%	2,00	1,90	2,10	2,00	60%

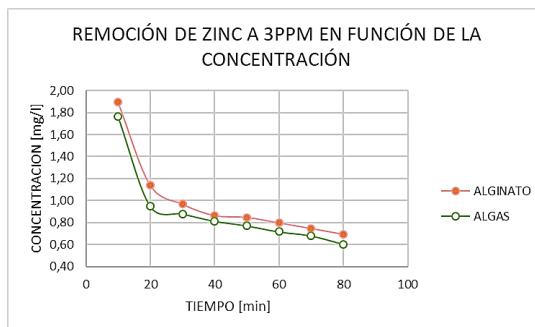
En la Figura 21 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Zinc a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm respectivamente.



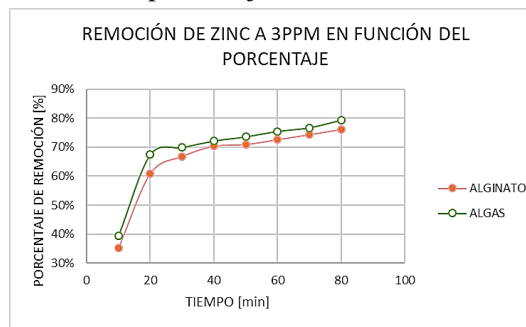
(a) Remoción de Zn a 1ppm en función de la concentración.



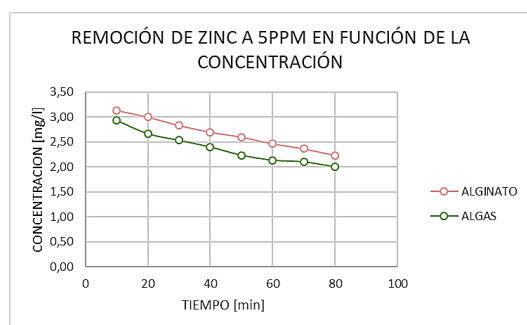
(b) Remoción de Zn a 1ppm en función del porcentaje



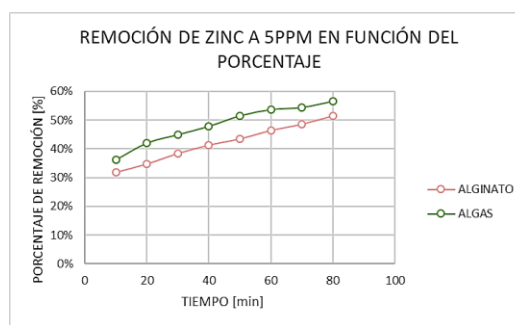
(c) Remoción de Zn a 3ppm en función de la concentración.



(d) Remoción de Zn a 3ppm en función del porcentaje



(e) Remoción de Zn a 5ppm en función de la concentración.



(f) Remoción de Zn a 5ppm en función del porcentaje

Figura 21. Remoción en el tiempo para el Zinc en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.

En el trabajo realizado en (Sánchez et al., 2008) se determina que la concentración del metal disminuye conforme avanza el tiempo de contacto del metal con las microalgas, ya que la biomasa se va saturando del metal con lo que velocidad de bioadsorción disminuye y se alcanza un equilibrio a los 80 minutos para el Zinc. En este mismo trabajo, se presenta un porcentaje de remoción del 45% para una concentración inicial de 100ppm a 120 minutos de ensayo utilizando biomasa del alga *Chlorella*. En (Almeida Saá, 2020) se determinó un porcentaje de remoción del 25% y 21,28% para una concentración de 2ppm y 5ppm respectivamente a los 15 días; en este trabajo se cultiva la microalga en la solución acuosa de zinc, por lo que el bajo porcentaje de remoción se debería a que este elemento está siendo utilizado como nutriente, pero en promedio la microalga alcanzó una disminución de la concentración hasta un 50%. En (Valle, 2007) se encontró que la cianobacteria *Synechococcus* sp. remueve un gran porcentaje de zinc, siendo este de 78% a 96% para concentraciones iniciales de 50ppm y 75ppm respectivamente. En (Chan et al., 2014) las microalgas pudieron eliminar entre 0,7% y 94,1% del Zn en el ensayo sin tratar; en el ensayo de autoclave, las extracciones fueron mayores de 93,1% a 96,3% para Zn, dependiendo de la cepa. En el trabajo de (Chong et al., 2000) la concentración inicial más alta de Cr, Cu, Pb y Zn en el efluente crudo fue 12,7, 4,8, 3,2 y 7,4 mg/l respectivamente; tras el tratamiento con microalgas, se redujo a 6,9, 1,05, 1,53 y 4,41 mg/l, respectivamente, lo que corrobora que estas microalgas tienen capacidad bioremediadora. Así, se puede corroborar con este trabajo que existe remoción de Zinc en mayor porcentaje para concentraciones bajas (2ppm a 5ppm).

- **Aluminio**

En las tablas: Tabla 14, Tabla 15, Tabla 16 se presentan los resultados de los 3 ensayos realizados para el Aluminio para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas; para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm respectivamente. Los ensayos con este metal muestran que el porcentaje de remoción es mayor utilizando perlas con microalgas tanto para el caso de 1ppm, 3ppm y 5ppm.



Tabla 14. Remoción de Aluminio en solución sintética a 1ppm.

		PERLAS SOLO ALGINATO				PERLAS CON ALGAS				
		1PPM								
TIEMPO min	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	A	B	C	PROMEDIO		A	B	C	PROMEDIO	
10	0,69	0,47	0,49	0,55	45%	0,21	0,22	0,22	0,217	78%
20	0,59	0,40	0,42	0,47	53%	0,19	0,2	0,19	0,193	81%
30	0,38	0,30	0,37	0,35	65%	0,15	0,17	0,16	0,160	84%
40	0,31	0,29	0,30	0,30	70%	0,13	0,14	0,14	0,137	86%
50	0,28	0,21	0,25	0,25	75%	0,13	0,13	0,12	0,127	87%
60	0,23	0,18	0,20	0,20	80%	0,12	0,11	0,11	0,113	89%
70	0,19	0,17	0,17	0,18	82%	0,1	0,1	0,11	0,103	90%
80	0,16	0,13	0,16	0,15	85%	0,09	0,1	0,09	0,093	91%

Tabla 15. Remoción de Aluminio en solución sintética a 3ppm.

		PERLAS SOLO ALGINATO				PERLAS CON ALGAS				
		3PPM								
TIEMPO min	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	A	B	C	PROMEDIO		A	B	C	PROMEDIO	
10	1,30	1,22	1,35	1,29	57%	0,34	0,30	0,32	0,32	89%
20	0,75	0,60	0,72	0,69	77%	0,28	0,27	0,30	0,28	91%
30	0,42	0,41	0,46	0,43	86%	0,26	0,25	0,28	0,26	91%
40	0,39	0,40	0,39	0,39	87%	0,24	0,23	0,26	0,24	92%
50	0,30	0,32	0,31	0,31	90%	0,24	0,23	0,24	0,24	92%
60	0,21	0,26	0,28	0,25	92%	0,23	0,22	0,23	0,23	92%
70	0,19	0,25	0,26	0,23	92%	0,21	0,20	0,21	0,21	93%
80	0,18	0,22	0,21	0,19	94%	0,20	0,19	0,20	0,20	93%

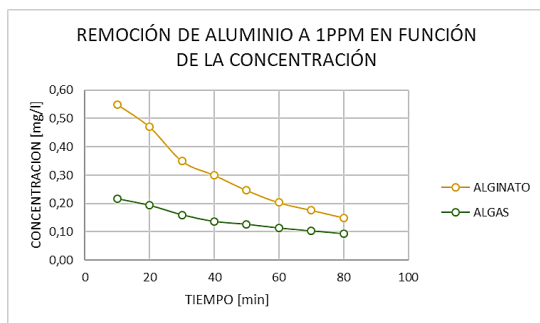
Tabla 16. Remoción de Aluminio en solución sintética a 5ppm.

		PERLAS SOLO ALGINATO				PERLAS CON ALGAS				
		5PPM								
TIEMPO min	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ppm				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	A	B	C	PROMEDIO		A	B	C	PROMEDIO	
10	2,30	2,50	2,40	2,40	52%	2,20	1,90	1,80	1,967	61%
20	1,70	1,90	2,10	1,90	62%	1,60	1,60	1,50	1,567	69%
30	1,40	1,70	1,90	1,67	67%	1,00	1,20	1,20	1,133	77%

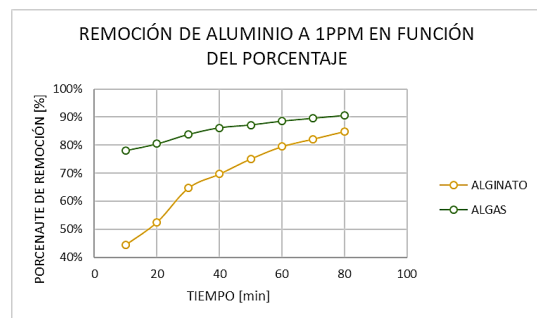


40	1,13	1,35	1,20	1,23	75%	0,50	0,60	0,70	0,600	88%
50	1,11	1,09	1,12	1,11	78%	0,30	0,40	0,40	0,367	93%
60	1,05	1,09	1,03	1,06	79%	0,20	0,20	0,30	0,233	95%
70	0,92	0,96	0,95	0,94	81%	0,10	0,10	0,20	0,133	97%
80	0,69	0,71	0,75	0,72	86%	0,10	0,10	0,20	0,133	97%

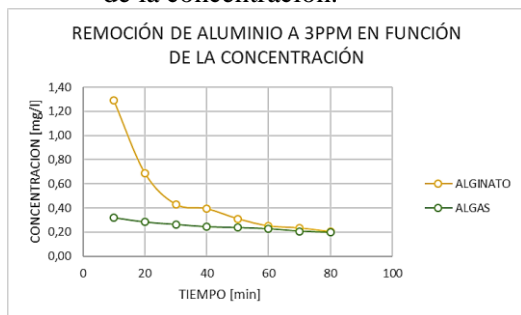
En la Figura 22 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Aluminio a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm respectivamente.



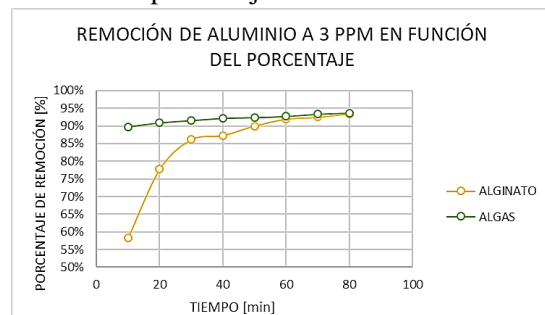
(a) Remoción de Al a 1ppm en función de la concentración.



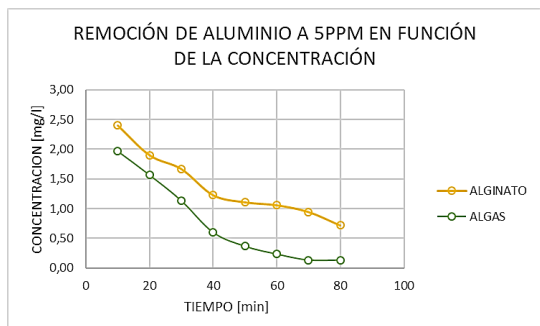
(b) Remoción de Al a 1ppm en función del porcentaje



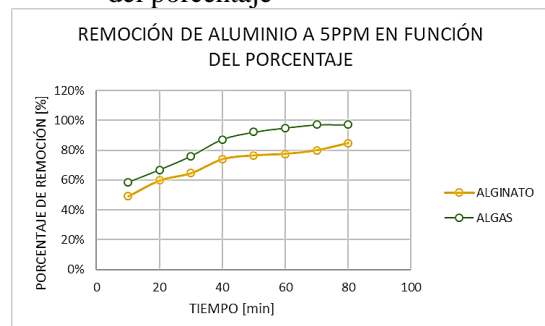
(c) Remoción de Al a 3ppm en función de la concentración.



(d) Remoción de Al a 3ppm en función del porcentaje



(e) Remoción de Al a 5ppm en función de la concentración.



(f) Remoción de Al a 5ppm en función del porcentaje

Figura 22. Remoción en el tiempo para el Aluminio en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y

5ppm.



En el trabajo de (Zimnik & Sneddon, 1988) la remoción por *Chlorella* fue eficaz con una remoción de aluminio máxima de 68% a pH 5; la remoción óptima se produjo después de 20 minutos de exposición de las algas a la solución de aluminio. En el presente trabajo se demuestra que, para concentraciones bajas, menores a 5ppm, se tiene altos porcentajes de remoción, mayores al 90%, coincidiendo con la bibliografía acerca de la capacidad de biorremediación que poseen las microalgas *Chlorella*.

- **Cobre**

En las tablas: Tabla 17, Tabla 18 y Tabla 19, se presentan los resultados de los 3 ensayos realizados para el Cobre para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas; para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5 ppm respectivamente. Los ensayos con este metal muestran que el porcentaje de remoción es mayor utilizando perlas con microalgas tanto para el caso de 1ppm, 3ppm y 5ppm

Tabla 17. Remoción de Cobre en solución sintética a 1ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN		
	1PPM											
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm						
	A	B	C	PROMEDIO		A	B	C	PROMEDIO			
10	0,78	0,54	0,61	0,64	36%	0,17	0,19	0,2	0,19	81%		
20	0,77	0,50	0,59	0,62	38%	0,16	0,17	0,18	0,17	83%		
30	0,68	0,45	0,51	0,55	45%	0,14	0,15	0,16	0,15	85%		
40	0,58	0,39	0,44	0,47	53%	0,14	0,14	0,15	0,14	86%		
50	0,43	0,31	0,34	0,36	64%	0,13	0,13	0,14	0,13	87%		
60	0,38	0,26	0,29	0,31	69%	0,13	0,12	0,13	0,13	87%		
70	0,23	0,21	0,21	0,22	78%	0,13	0,11	0,13	0,12	88%		
80	0,17	0,19	0,18	0,18	82%	0,12	0,1	0,12	0,11	89%		

Tabla 18. Remoción de Cobre en solución sintética a 3ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN		
	3PPM											
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm						
	A	B	C	PROMEDIO		A	B	C	PROMEDIO			
10	1,31	0,88	1,42	1,20	60%	0,57	0,55	0,61	0,58	81%		
20	0,88	0,82	1,06	0,92	69%	0,51	0,50	0,55	0,52	83%		
30	0,84	0,71	0,92	0,82	73%	0,41	0,40	0,42	0,41	86%		

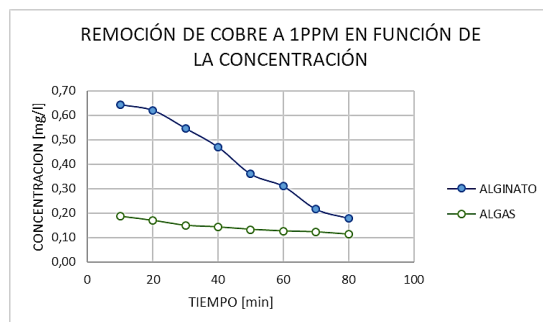


40	0,75	0,58	0,81	0,71	76%	0,22	0,30	0,27	0,26	91%
50	0,72	0,38	0,79	0,63	79%	0,18	0,20	0,19	0,19	94%
60	0,37	0,33	0,65	0,45	85%	0,17	0,18	0,15	0,17	94%
70	0,32	0,29	0,49	0,37	88%	0,15	0,17	0,14	0,15	95%
80	0,29	0,25	0,32	0,29	90%	0,14	0,15	0,12	0,14	95%

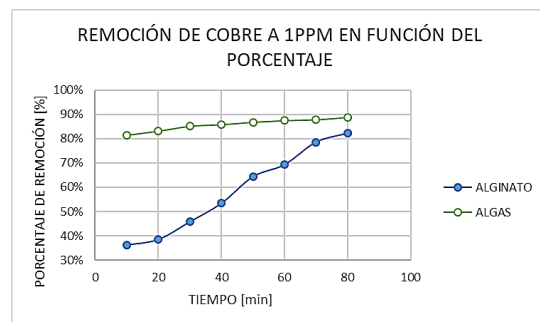
Tabla 19. Remoción de Cobre en solución sintética a 5ppm.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO				PORCENTAJE DE REMOCIÓN	PERLAS CON ALGAS				PORCENTAJE DE REMOCIÓN
	5PPM									
	CONCENTRACIÓN FINAL ppm					CONCENTRACIÓN FINAL ppm				
	A	B	C	PROMEDIO		A	B	C	PROMEDIO	
10	1,03	1,06	0,99	1,03	79%	0,66	0,85	0,68	0,73	85%
20	0,81	0,86	0,97	0,88	82%	0,49	0,65	0,49	0,54	89%
30	0,68	0,72	0,86	0,75	85%	0,46	0,44	0,45	0,45	91%
40	0,64	0,69	0,79	0,71	86%	0,42	0,36	0,39	0,39	92%
50	0,63	0,62	0,69	0,65	87%	0,39	0,35	0,34	0,36	93%
60	0,61	0,59	0,66	0,62	88%	0,37	0,34	0,34	0,35	93%
70	0,51	0,55	0,59	0,55	89%	0,32	0,28	0,26	0,29	94%
80	0,51	0,49	0,51	0,50	90%	0,26	0,25	0,22	0,24	95%

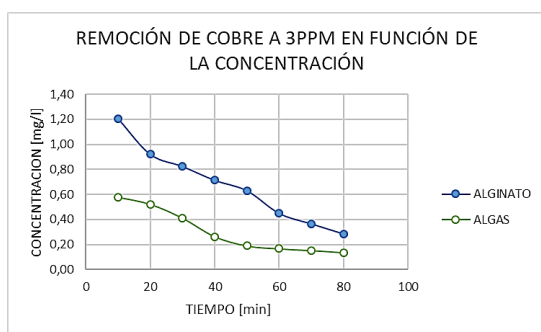
En la Figura 23 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Cobre a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm respectivamente.



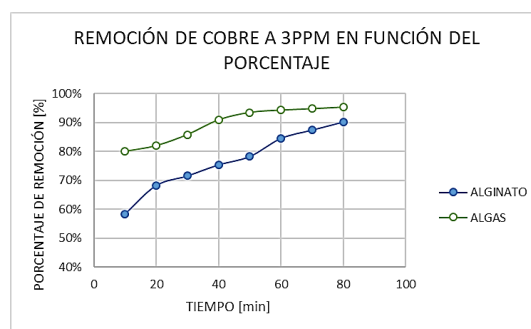
(a) Remoción de Cu a 1ppm en función de la concentración.



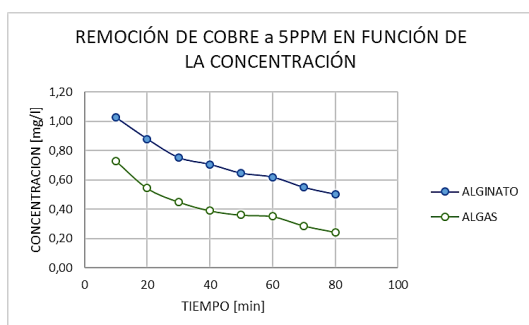
(b) Remoción de Cu a 1ppm en función del porcentaje



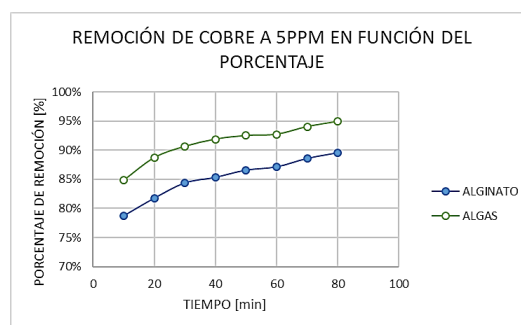
(c) Remoción de Cu a 3ppm en función de la concentración.



(d) Remoción de Cu a 3ppm en función del porcentaje



(e) Remoción de Cu a 5ppm en función de la concentración.



(f) Remoción de Cu a 5ppm en función del porcentaje

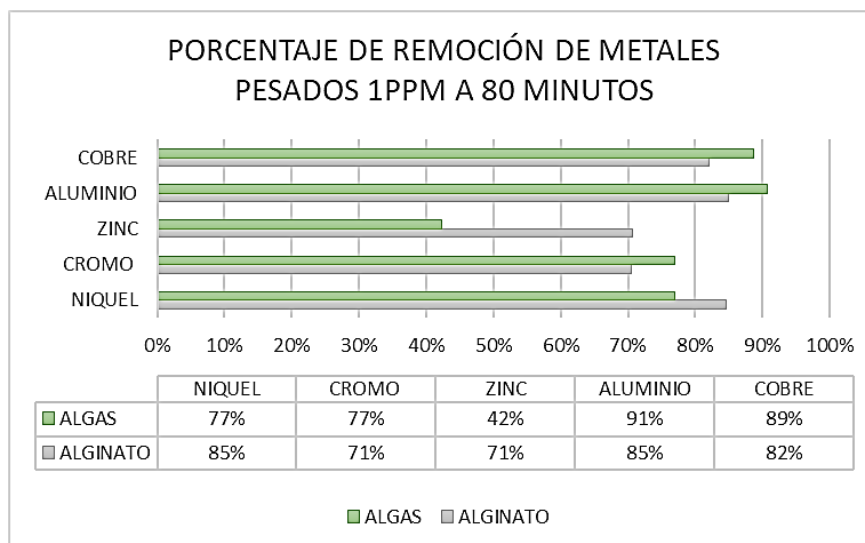
Figura 23. Remoción en el tiempo para el Aluminio en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm.

En (Oliveira Medina, 2003) se demuestra que las perlas húmedas de alginato de calcio, caracterizadas porque después de obtenidas y lavadas se las pasa por aire caliente para eliminar el agua exterior, se saturan a las 3 horas y solamente se logra un porcentaje de remoción del 18.03%. Mientras que, utilizando perlas secas de alginato de calcio, las cuales después del lavado son sometidas a un proceso de secado utilizando un foco de 200W como fuente de calor, se saturan a las 24 horas logrando un porcentaje de remoción promedio de Cobre del 46% a partir de una concentración de 300mg/l. En (Ajayan et al., 2018) después de 12 días de cultivo, las algas eliminaron de 78,1 a 90,4% de cobre; en un estudio similar realizado por (Lombardi et al., 2002) se encontró que *Chlorella* tiene buenas propiedades acumulativas de cromo, cobre, plomo y zinc. En (Chan et al., 2014) las microalgas pudieron eliminar entre 69,9% y 81,7% del Cu en el ensayo sin tratar. En el presente trabajo se determinó un porcentaje alto de remoción de alrededor del 90% para las concentraciones ensayadas.

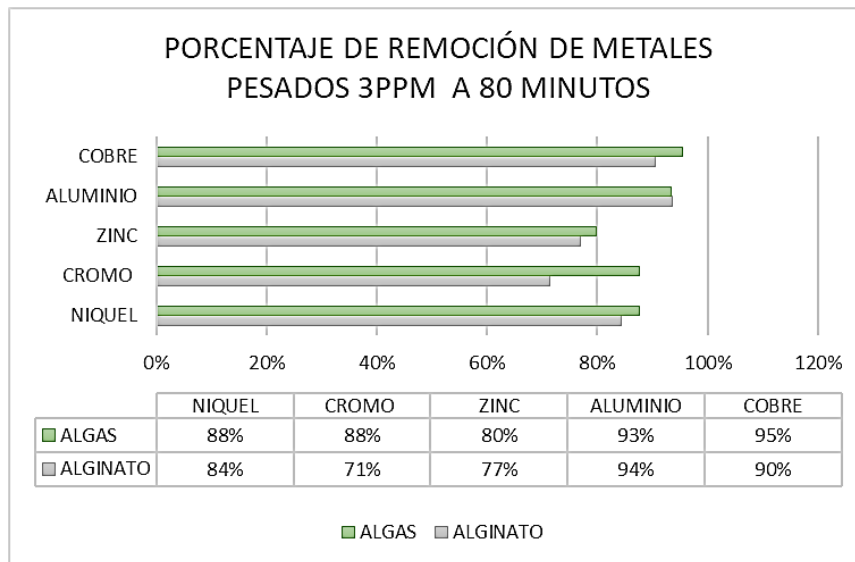
4.4.1.1 Resumen de ensayos de los metales pesados en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.

Los resultados para la remoción de metales pesados se resumen en la Figura 24, donde se muestra el porcentaje de remoción al finalizar los 80 minutos de ensayo para cada metal con su respectiva concentración. Para la concentración de 1ppm (Ver Figura 24a), se observa que para la remoción de Zinc y Níquel tiene mayor influencia el alginato, mientras que para el Cobre, Aluminio y Cromo las microalgas encapsuladas son las que realizan una mayor remoción del metal. Para la concentración de 3ppm (Ver Figura 24b), para todos los metales, se observa que las microalgas remueven mayor cantidad del metal presente en la solución. Para la concentración de 5ppm (Ver Figura 24c) se observa que efectivamente el tratamiento con perlas sin Chlorella. remueve menos metal que el tratamiento de las perlas con Chlorella.

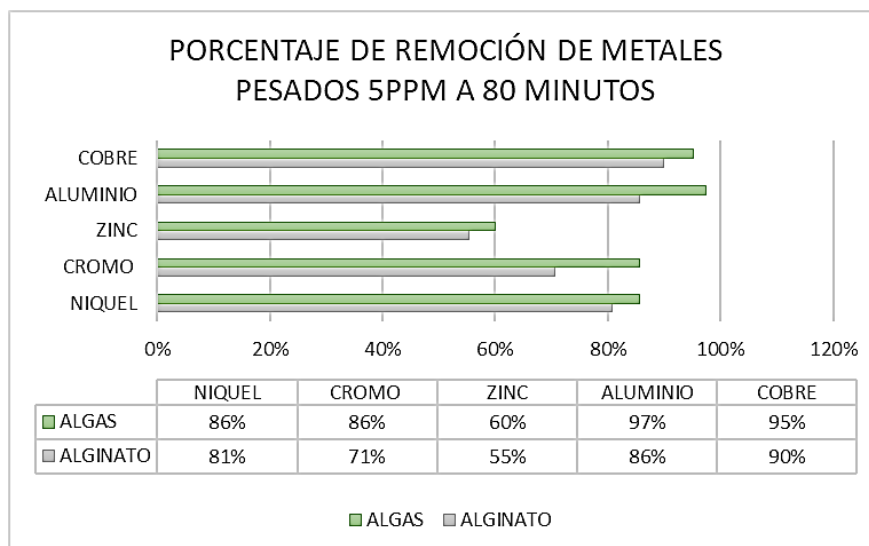
Además, en el tratamiento con microalgas, los resultados muestran que el Aluminio fue el metal más tolerado y removido por las microalgas Chlorella, con remoción de más del 90% para las concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm. En cambio, el Zinc fue el elemento con menor porcentaje de remoción con las concentraciones de ensayo. Se puede observar que el alginato ejerce mayor influencia en el Zinc en la concentración más baja, coincidiendo con el Níquel; es así que se obtiene una mayor remoción debido a la influencia del alginato en estos dos metales. Según la bibliografía la densidad celular influye en el porcentaje de remoción; en el presente trabajo se ensayó con 4e6 células/ml, obteniendo porcentajes de remoción más altos que en (Arias Vinueza, 2017) donde ensayó con una densidad celular de 2.5E6 células/ml.



(a) Resumen del porcentaje de remoción para los metales pesados a 1ppm a 80 minutos.



(b) Resumen del porcentaje de remoción para los metales pesados a 3ppm a 80 minutos.



(c) Resumen del porcentaje de remoción para los metales pesados a 5ppm a 80 minutos.

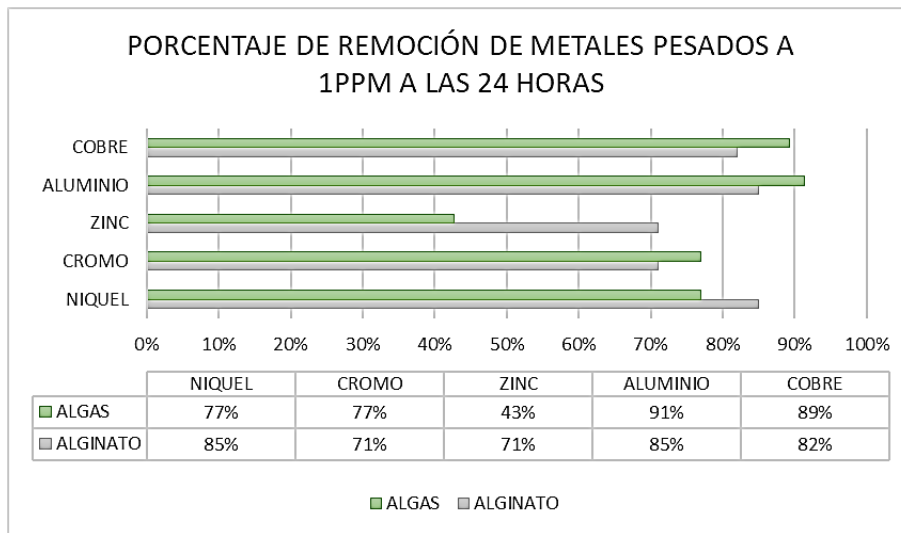
Figura 24. Resumen de ensayos de los metales pesados en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.

4.4.1.2 Ensayos a las 24 horas de los metales pesados en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.

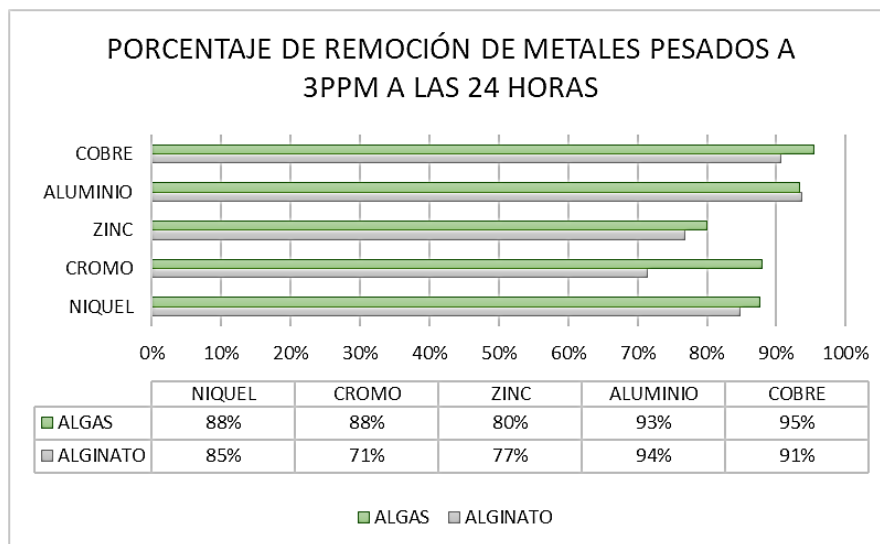
Además de los ensayos de 80 minutos, se realizó un análisis de remoción trascurridas las 24 horas. En la Figura 25 se observa que el porcentaje de remoción adicional a partir de los 80 minutos para las concentraciones de 1ppm y 5ppm aumentan en 1%; mientras que con una concentración de 3 ppm no existe una remoción adicional. Esto se debe a que la actividad enzimática de las células se ve colmatada por lo que la capacidad de las microalgas para incorporar a su metabolismo las



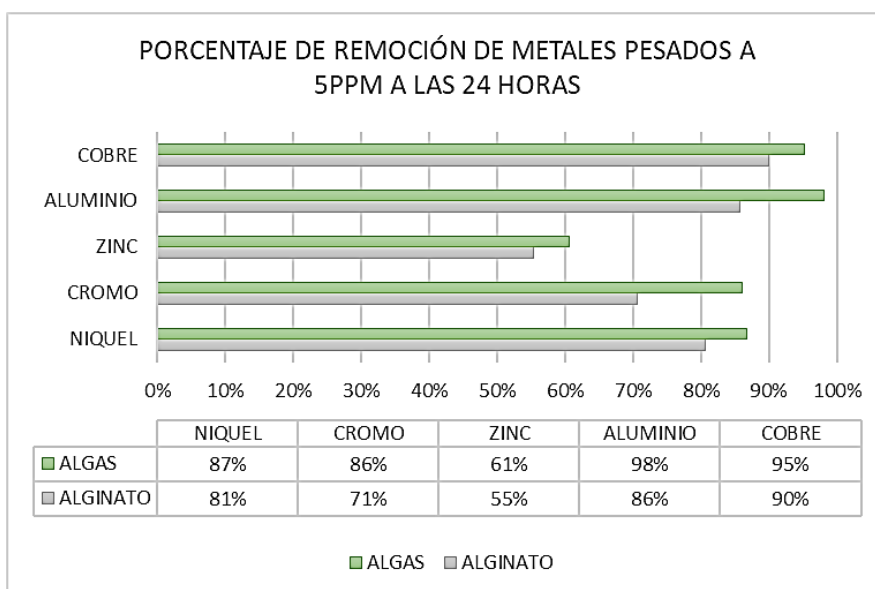
partículas de metales pesados estabiliza su tendencia. Esto coincide con el trabajo realizado en (Chong et al., 2000) donde la tasa de eliminación de cobre por las células de algas libres fue muy rápida, ya que las algas absorbieron la mayor parte del cobre en los primeros minutos y no hubo diferencia en la reducción del metal entre 1 y 4 horas de tratamiento.



(a) Porcentaje de remoción para los metales pesados a 1ppm a las 24 horas.



(b) Porcentaje de remoción para los metales pesados a 3ppm a las 24 horas.



(c) Porcentaje de remoción para los metales pesados a 5ppm a las 24 horas.

Figura 25. Ensayos de los metales pesados transcurridas 24 horas en soluciones sintéticas a concentraciones de 1ppm, 3 ppm y 5ppm.

4.4.2 Ensayos con aguas residuales industriales.

Se consiguieron muestras residuales industriales de dos empresas galvanizadoras, la primera muestra presentó concentraciones iniciales muy bajas de metales pesados como se indica en la Tabla 20, por lo que se descartó la muestra. El segundo espécimen corresponde a la muestra ensayada, en la que se realizó la medición inicial de los metales de interés y se obtuvieron los valores presentados en la Tabla 21.

Tabla 20. Concentración inicial del agua residual industrial de la fábrica galvanizadora 1.

CONCENTRACIONES INICIALES FÁBRICA GALVANIZADORA 1	
METAL	CONCENTRACIÓN mg/l
Cromo	0,186
Níquel	0,53
Aluminio	0,02
Cobre	0,06
Zinc	0,23

Tabla 21. Concentración inicial del agua residual industrial de la fábrica galvanizadora 2.

CONCENTRACIONES INICIALES DE LA FÁBRICA GALVANIZADORA 2	
METAL	CONCENTRACIÓN mg/l
Cromo	0,063
Níquel	1,34
Aluminio	0,033
Cobre	0,09
Zinc	5,6

Se evalúa la capacidad de remoción de metales pesados en las concentraciones descritas en la Tabla 21 para el Níquel y Zinc ya que sus concentraciones son las únicas de interés. Estos metales se encuentran disueltos en solución acuosa, y las microalgas *Chlorella* se hallan coinmovilizada en perlas de alginato de sodio. Al igual que en la etapa de cultivo, las muestras de agua residual



industrial con las microalgas encapsuladas fueron expuestas a condiciones ambientales de luz y aereación buscando una mayor efectividad en la remoción de los metales (Ver Figura 13).

Se realizaron 2 muestreos, el primero donde se pone en contacto las muestras de agua residual industrial con las perlas de alginato de sodio; y el segundo ensayo donde se pone en contacto las muestras de aguas residuales industriales con las microalgas *Chlorella*. coinmovilizada en perlas de alginato de sodio para determinar si la encapsulación de la microalga en el alginato de sodio aumenta la capacidad de remoción de los metales pesados. Los especímenes corresponden a las muestras tomadas cada 10 minutos, durante 80 minutos. Para determinar el porcentaje de remoción de cada metal, se hace un análisis de la disminución del metal en la solución acuosa por acción de las microalgas encapsuladas en las perlas de alginato y solamente por acción de las perlas de alginato.

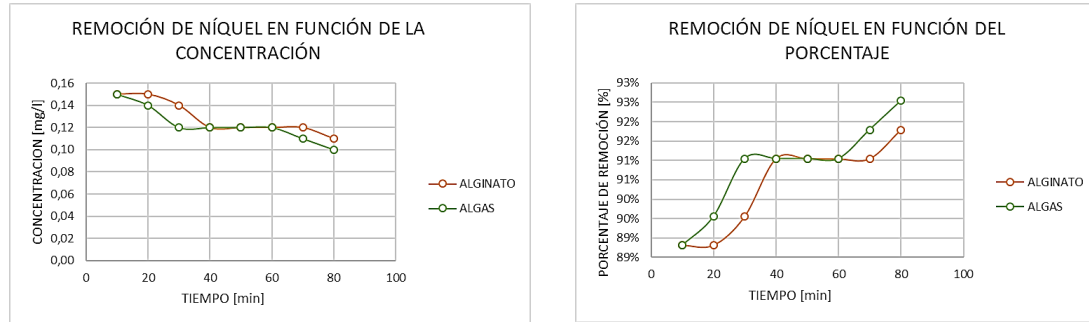
- **Níquel**

En la Tabla 22 se presentan los resultados de los ensayos realizados para el Níquel para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas para la muestra de agua residual industrial. Se observa, al comparar el porcentaje de remoción solo con perlas de alginato, que en los primeros 10 minutos del ensayo es igual que utilizando las microalgas. Para los 20 minutos siguientes el porcentaje de remoción se vuelve mayor sin mucha diferencia, luego se equilibran los porcentajes coincidiendo los dos tratamientos. Y en los últimos 20 minutos de ensayo el porcentaje de remoción nuevamente se torna mayor cuando se utiliza microalgas en el tratamiento.

Tabla 22. Remoción de Níquel en agua residual industrial.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO		PERLAS CON ALGAS	
	CONCENTRACIÓN FINAL mg/l	PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL mg/l	PORCENTAJE DE REMOCIÓN
10	0,15	89%	0,15	89%
20	0,15	89%	0,14	90%
30	0,14	90%	0,12	91%
40	0,12	91%	0,12	91%
50	0,12	91%	0,12	91%
60	0,12	91%	0,12	91%
70	0,12	91%	0,11	92%
80	0,11	92%	0,10	93%

En la Figura 26 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Níquel a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de Ni.



(a) Remoción de Ni en agua residual industrial en función de la concentración. (b) Remoción de Ni en agua residual industrial en función del porcentaje

Figura 26. Remoción en el tiempo para el Níquel de la muestra de agua residual industrial.

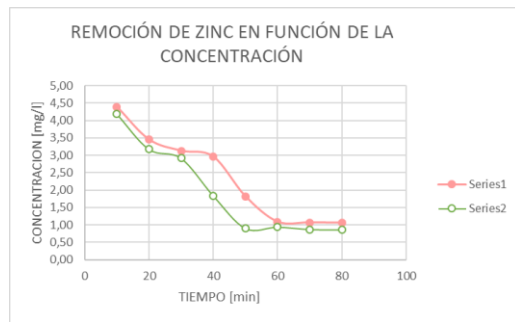
• **Zinc**

En la Tabla 23 se presentan los resultados de los ensayos realizados para el Zinc para los casos de perlas solo con alginato y para las perlas que encapsulan algas para la muestra de agua residual industrial. Se observa, al comparar el porcentaje de remoción solo con perlas de alginato, que a lo largo de todo el ensayo es menor que cuando se utiliza microalgas en el tratamiento.

Tabla 23. Remoción de Zinc en agua residual industrial.

TIEMPO min	PERLAS SOLO ALGINATO		PERLAS CON ALGAS	
	CONCENTRACIÓN FINAL mg/l	PORCENTAJE DE REMOCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL mg/l	PORCENTAJE DE REMOCIÓN
10	4,39	22%	4,20	25%
20	3,45	38%	3,18	43%
30	3,13	44%	2,92	48%
40	2,96	47%	1,84	67%
50	1,82	68%	0,90	84%
60	1,09	81%	0,94	83%
70	1,07	81%	0,87	84%
80	1,06	81%	0,86	85%

En la Figura 27 se presenta en la columna izquierda las concentraciones del Zinc a lo largo del tiempo; mientras que en la columna derecha se muestra el porcentaje de remoción obtenido para los diferentes intervalos de tiempo para las concentraciones de Zinc.



(c) Remoción de Zn en agua residual industrial en función de la concentración.



(d) Remoción de Zn en agua residual industrial en función del porcentaje

Figura 27. Remoción en el tiempo para el Zinc de la muestra de agua residual industrial.



CAPÍTULO 5

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este capítulo se realiza las conclusiones del trabajo experimental realizado y una visión de trabajos futuros relacionados a este proyecto.

5.1 Conclusiones

Después del análisis correspondiente de los datos, se concluye lo siguiente:

- En este trabajo mediante el control de las condiciones de luz, pH, nutrientes, temperatura y velocidad de agitación, se logró obtener cultivos estables de la especie de microalga *Chlorella*. Los periodos del ciclo de vida de estas microalgas obedecen a los establecidos en la teoría. La fase de adaptación es muy definida, con un deceso elevado; seguido de la fase de crecimiento lineal de multiplicación de las células, y finalmente la fase de muerte donde el deceso de las algas es menos pronunciado; es decir, en el cultivo sobresalen 3 de las etapas correspondientes a la curva de crecimiento de los microorganismos.
- La experimentación se ha realizado en condiciones de temperatura ambientales, por lo que el sistema no requiere el suministro externo de energía para incrementar la temperatura y favorecer el proceso de remoción.
- De los resultados obtenidos en el tratamiento con microalgas *Chlorella*, partiendo de concentraciones iniciales de 1ppm, 3ppm y 5ppm en soluciones sintéticas se obtienen porcentajes de remoción a los 80 minutos de ensayo de 77%, 88% y 86% para el Níquel; 77%, 88% y 86% para el Cromo; 42%, 80% y 60% para el Zinc; 91%, 93% y 97% para el Aluminio; y por último 89%, 95% y 95% para el Cobre, respectivamente. El Aluminio es el metal para el cual las microalgas tienen mayor tolerancia presentando mayor remoción en todas las concentraciones ensayadas, mientras que el Zinc es el elemento de menor remoción en todas las concentraciones. Además, el método es menos eficiente a bajas concentraciones; así, para todos los metales el porcentaje de remoción es menor a la concentración de 1ppm. Esto también se pudo observar en la remoción de metales pasados en efluentes industriales, al no presentar una concentración elevada de metales el porcentaje de remoción con microalgas es mayor pero no muy significativa en comparación con solo perlas de alginato, con un porcentaje de remoción adicional del 1% y del 4% para el Níquel y Zinc, respectivamente.
- Los ensayos realizados demuestran que, a 80 minutos de contacto, se consiguen remociones similares a las obtenidas a las 24 horas; lo que significa unidades de



tratamiento más pequeñas, puesto que el período de retención necesario, es significativamente menor.

- La metodología empleada permitió la obtención de perlas de alginato de características satisfactorias para la remoción de metales en aguas residuales. Sobre estas perlas se encapsuló las microalgas de la especie *Chlorella* presentando propiedades físicas homogéneas: diámetro, coloración y forma. Al ensayar la remoción de Níquel, Cromo, Zinc, Aluminio y Cobre a partir de soluciones con diferentes concentraciones de metal, existe una diferencia en el porcentaje de disminución del contaminante entre perlas de alginato con y sin *Chlorella*. El alginato, debido a su gran afinidad con los iones metálicos, también participa en su remoción, pues se obtuvieron porcentajes de remoción significativos superiores al 70% a los 80 minutos de ensayo para concentraciones de 1ppm, 3ppm y 5ppm. No obstante, este método no es el más recomendable ambientalmente ya que la contaminación solamente se transferiría de un lugar a otro. La remoción con microalgas coinmovilizada en perlas de alginato de sodio es mayor que el tratamiento solo con perlas de alginato. La razón primordial por la que se coinmoviliza las microalgas *Chlorella* en alginato de sodio es el aumento de su capacidad de remoción de metales pesados, ya que actúan como un sistema conjunto. La encapsulación de las microalgas en la matriz de alginato de sodio garantiza el mantenimiento de sus características fisiológicas y morfológicas: color, forma, etc., pero fundamentalmente permeabiliza las paredes celulares de las algas, favoreciendo la adsorción y absorción de los metales.

5.2 Recomendaciones

- El presente trabajo confirma la viabilidad de la especie de microalga *Chlorella* coinmovilizada en perlas de alginato para la remoción de metales pesados presentes en los efluentes de las industrias. Por consiguiente, sería eficiente y amigable con el medio ambiente, aplicar este trabajo evaluado a nivel laboratorio a un ámbito de producción más amplio y actual.
- Ensayar con diferentes concentraciones de microalgas coinmovilizada en perlas de alginato, ya que coincidiendo con la bibliografía se sabe que cuanto mayor es la densidad celular, mayor es la reducción del metal pesado presente, sobre todo para el Zinc, que probablemente requiera condiciones específicas.
- Aplicar otras condiciones, luz, pH, temperatura, agitación, aereación y nutrientes, para el crecimiento de las algas con el fin de incrementar la tasa de crecimiento.



- Utilizar procedimientos automáticos para la elaboración de las perlas de alginato, en caso de que se desarrollen proyectos a gran escala, para de esta manera obtener mayor cantidad y calidad de perlas.

REFERENCIAS

- Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A., & Ibraheem, I. B. M. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(3), 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.04.005>
- Ajayan, K. V., Harilal, C. C., & Selvaraju, M. (2018). Phycoremediation resultant lipid production and antioxidant changes in green microalgae *Chlorella*. *International Journal of Phytoremediation*, 20(11), 1144–1151. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1413333>
- Almeida Saá, L. M. (2020). *Estudio de adaptación de la microalga Chlorella vulgaris para la remoción del zinc*. *Estudio de adaptación de la microalga Chlorella vulgaris para la remoción del zinc*.
- Ardila Forero, L. (2012). *Medición de la capacidad de chlorella vulgaris y scenedesmus acutus para la remoción de cromo de aguas de curtiembre*. 239. <http://www.bdigital.unal.edu.co/10276/>
- Arias Vinuesa, A. M. (2017). Análisis de remoción de cromo por la acción de la microalga *Chlorella*. coinmovilizada en perlas de alginato. [Universidad Politécnica Salesiana]. In *Tesis*. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Bautista, F. (1999). Introducción al estudio de la contaminación del suelo por metales pesados - Francisco Bautista Zúñiga - Google Libros. *Introducción Al Estudio de La Contaminación Del Suelo Por Metales Pesados, January 1999*, 1–66.
- Brunswick, N. (n.d.). *New Brunswick's BioFlo. Easy to Use and Versatile Too!*
- Cabrera, M., & Pulla, M. (2014). *Línea Base Para El Aprovechamiento De Microalgas De Sistemas De Tratamiento De Agua Residual*. 1–105.
- Cahuasqui Toscano, S. G. (2011). *Determinación de metales pesados (plomo, cadmio y níquel) en el cilantro (Coriandrum sativum L) en Aloag, cantón Mejía, provincia de Pichincha por espectrofotometría de absorción atómica de llama*. *Disertación*. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.



- Canales López, B. (1999). *Enzimas-algas: posibilidades de su uso para estimular la producción agrícola y mejorar los suelos*. 17, 270–276. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57317312>
- Cañizares-Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143.
- Cartagena Arévalo, J. C., & Malo Malo, B. O. (2017). Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la PTAR El Salitre a nivel laboratorio. In *Ekp* (Vol. 13, Issue 3). Fundación Universidad de América.
- Chan, A., Salsali, H., & McBean, E. (2014). Heavy metal removal (copper and zinc) in secondary effluent from wastewater treatment plants by microalgae. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2(2), 130–137. <https://doi.org/10.1021/sc400289z>
- Chong, A. M. Y., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2000). Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere*, 41(1–2), 251–257. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00418-X)
- de la Noüe, J., & Proulx, D. (1988). Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(2–3), 292–297. <https://doi.org/10.1007/BF00939324>
- Figueroa Ceballos, R., Bran González, M. del C., Morales Esquivel, O., & Álvarez Valenzuela, G. A. (2020). Potencial de los hongos anamorfos de Guatemala para la producción de α -amilasas utilizando como sustrato cascarilla de arroz. *Rev. Cient. (Guatem.)*.
- Garbisu, C., Gil, J. M., Bazin, M. J., Hall, D. O., & Serra, J. L. (1991). Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors. *Journal of Applied Phycology*, 3(3), 221–234. <https://doi.org/10.1007/BF00003580>
- God, O. J. (2020). *Aplicación de microalgas para la remoción de nutrientes en efluentes agrícolas: Revisión de literatura*. Escuela Agrícola Panamericana.
- González Céspedes, A. (2015). ¿Qué Son Las Microalgas? *Cajamar ADN Agro*, 011, 1–11.
- Gonzalez, L. E., & Bashan, Y. (2000). Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1527–1531. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1527-1531.2000>



- Guzmán Molina, J. E. (2015). *Extracción de amilasa del consorcio de alga Chlorella Antártica utilizando alginato de sodio como soporte de coinmovilización*. 166.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>
- Jjemba, P. (2004). *Environmental microbiology: principles and applications*.
- Kaplan, D. (2013). Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology: Second Edition*, 602–611. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch32>
- Kitaya, Y., Xiao, L., Masuda, A., Osawa, T., Tsuda, M., & Omasa, K. (2008). *Effects of temperature, photosynthetic photon flux density, photoperiod and O₂ and CO₂ concentrations on growth rates of the symbiotic dinoflagellate, Amphidinium sp.* (N. I. S. Symposium (ed.)).
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I. M., Marchant, R., & Koutinas, A. A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. *Food Microbiology*, 21(4), 377–397. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2003.10.005>
- Lombardi, A. T., Vieira, A. A. H., & Sartori, L. A. (2002). Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). *Journal of Phycology*, 38(2), 332–337. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00126.x>
- Lupo, B., González, C., & Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151.
- Mahapatra, D. M., Chanakya, H. N., & Ramachandra, T. V. (2013). Treatment efficacy of algae-based sewage treatment plants. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185(9), 7145–7164. <https://doi.org/10.1007/s10661-013-3090-x>
- Martínez-Trujillo, M. A., & García-Rivero, M. (2012). Revisión: Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11(1), 55–73.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10), 3949–3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Olarte Gómez, E. A., & Valencia Giraldo, M. J. (2016). *Evaluación del uso de la microalga Chlorella vulgaris en tratamiento de aguas residuales industriales (VINAZAS)*. Universidad



Nacional Abierta y a Distancia.

- Oliveira Medina, J. (2003). Estudio de la biosorción de cobre Cu (II) por perlas de Alginato de Calcio. *Tesis, Ii*.
- Perales-Vela, H. V., Peña-Castro, J. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*, 64(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Perenguez Ortega, B. Y., & Valdez Álvarez, C. A. (2017). Análisis de remoción de cadmio por acción de la microalga *Chlorella*. coinmovilizada en perlas de alginato [Universidad Politécnica Salesiana]. In *Tesis*. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Pérez Cebada, J. D. (2001). *Minería y medio ambiente en perspectiva histórica*. (Univeridad de Huelva (ed.)).
- Piña, P., Medina, M. A., Nieves, M., Leal, S., López-Elías, J. A., & Guerrero, M. A. (2007). Cultivo De Cuatro Especies De Microalgas Con Diferentes Fertilizantes Utilizados En Acuicultura. *Rev. Invest. Mar*, 28(3), 225–236. <http://www.cim.uh.cu/rim/pdf/2007/3/2007-225.pdf>
- Piotrowska-Niczyporuk, A., Bajguz, A., Zambrzycka, E., & Godlewska-żyłkiewicz, B. (2012). Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae). *Plant Physiology and Biochemistry*, 52, 52–65. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.11.009>
- Plaza, C. (2012). Remoción de metales pesados empleando algas marinas. *Universidad De La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.*, 166. http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento_completo_.pdf?sequence=17
- Ponting, C. (1992). *Historia verde del mundo* (E. Paidós (ed.)).
- Posso, S. (2019). *Explorando la biodiversidad de consorcios microbianos Amazónicos con capacidad biorremediadora de aguas residuales mediante secuenciación de última generación* [Universidad San Francisco de Quito. Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales]. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/8283/1/142691.pdf>
- Rawat, I., Ranjith Kumar, R., Mutanda, T., & Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels



- production. *Applied Energy*, 88(10), 3411–3424.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2010.11.025>
- Reddy, R., & Reddy, S. (2010). Effect of different Co-polymers on Sodium Alginate Microcapsules Containing Isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*, 2(4), 2198–2203.
http://www.sphinxnsai.com/Oct_dec_2010_vol2_no.4/PharmTech_vol2_no.4_1_pdf/PT=12%282198-2203%29.pdf
- Richmond, A. (1990). *Large scale microalgal culture and applications. En In: Progress in Phycological Research*. 7, 239–320.
- Richmond, A. (2004). Principles for attaining maximal microalgal productivity in photobioreactors: an overview. *Asian Pacific Phycology in the 21st Century: Prospects and Challenges*, i(Table 1), 33–37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0944-7_5
- Rodríguez-Heredia, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. Occupational poisoning due to heavy metals. *Medisan*, 21(12), 3372–3385.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30192017001200012
- Romero Morales, M. A., Ortiz Villota, M. T., & Meza Rodríguez, L. D. (2018). La biorremediación con microalgas (*Spirulina máxima*, *Spirulina platensis* y *Chlorella vulgaris*) como alternativa para tratar la eutrofización de la laguna de Ubaque, Colombia. *Revista De Investigación, Desarrollo E Innovación*, 9(1), 163–176.
<https://doi.org/10.19053/20278306.v9.n1.2018.8153>
- Romo-Piñera, A. K. (2002). Manual para el cultivo de microalgas. *Biología Marina*, 16, 65.
<http://biblio.uabcs.mx/tesis/TE1366.pdf>
- Ruiz Tovar, K. J., & Morales Fonseca, D. M. (2008). Determinacion de la capacidad de remocion de cadmio, plomo y niquel por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados diana milena morales fonseca katherine johanna ruiz tovar. *Pontificie Universidad Javeriana, Bogota, D.C. Colombia*, 1–139.
- Sánchez, E., Teresa, G. M., Almaguer, V., Sáenz, I., & Liñan, A. (2008). Estudio cinético e isothermas de adsorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa del alga *Chlorella*. coinmovilizada. *Ciencia UANL*, IX, 168–176.
<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/402/40211207.pdf>
- Simental Valle, D. E. (2015). *Coinmovilización de Lactobacillus acidophilus en mezclas de alginato, gelana y mucílago de nopal*.



- Srivastava, N. K., & Majumder, C. B. (2008). Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.101>
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *TecnoLógicas*, 18(34), 109. <https://doi.org/10.22430/22565337.209>
- Triviño Tonato, N. G. (2018). Evaluación de remoción de plomo por acción de perlas de alginato con *Chlorella*. coinmovilizada [Universidad Politécnica Salesiana]. In *Tesis*. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Valle, G. A. (2007). *Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas*. 1–83.
- Vela García, N., Guamán Burneo, M. C., & González Romero, N. P. (2019). Efficient bioremediation from metallurgical effluents through the use of microalgae isolated from the amazonic and highlands of Ecuador. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 35(4), 917–929. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.04.11>
- Vera Cabezas, L., Uguña, M., García Alvear, N., Flores, M., & Vázquez Freire, V. (2016). Eliminación de los metales pesados de las aguas residuales mineras utilizando el bagazo de caña como biosorbente. *Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada*, 73(573), 43–49.
- Verma, R., & Dwivedi, P. (2013). Heavy metal water pollution- A case study. *Recent Research in Science and Technology*, 5(5), 98–99. <http://recent-science.com/>
- Voltolina, D., Cordero, B., Nieves, M., & Soto, L. P. (1999). Growth of *Scenedesmus* sp. in artificial wastewater. *Bioresource Technology*, 68(3), 265–268. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(98\)00150-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(98)00150-3)
- Wilde, E. W., & Benemann, J. R. (1993). Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*, 11(4), 781–812. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(93\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0734-9750(93)90003-6)
- Yagnentkovsky, N. (2011). *"Aplicación de técnicas de biorremediación para el Ing. Nadia Yagnentkovsky tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados"*. Universidad Nacional de la Plata.
- Zimnik, P. R., & Sneddon, J. (1988). Binding and removal of aluminum ions in waters by an algal biomass. *Analytical Letters*, 21(8), 1383–1396. <https://doi.org/10.1080/00032718808059871>