



Estudio de adaptación de la microalga *Chlorella vulgaris* para la remoción del zinc

Maestría en Ingeniería de la Energía y del Ambiente

Lilian Mishel Almeida Saá

Leiria, diciembre de 2020



Estudio de adaptación de la microalga *Chlorella vulgaris* para la remoción del zinc

Maestría en Ingeniería de la Energía y del Ambiente

Lilian Mishel Almeida Saá

Disertación bajo la orientación del Profesor Doctor Nelson Oliveira y del Profesor Doctor Kirill Ispolnov

Leiria, diciembre de 2020

Originalidad y Derechos de Autor

La presente disertación es original, elaborada únicamente para este fin, han sido debidamente citados todos los autores cuyos estudios y publicaciones contribuyeron para la elaboración.

Reproducciones parciales de este documento serán autorizadas en la condición de que sea mencionada la Autora y haciendo referencia al ciclo de estudios en el ámbito del cual la misma fue realizada, a saber, Curso de Maestría en ingeniería de la energía y ambiente en el año lectivo 2019/2020, de la Escuela Superior de Tecnología y Gestión del Politécnico de Leiria, Portugal, y, bien así, a la fecha de las pruebas públicas que fueron destinados la evaluación de estos trabajos.

Dedicatoria

A mi familia

Agradecimientos

A mi familia por darme la vida, por su amor y apoyo incondicional.

Agradecer y brindar mi admiración a mi orientador al Doctor Nelson Oliveira y al Doctor Kirill Ispolnov por la guía y apoyo, ya que sin su ayuda, conocimiento y preocupación no hubiese sido posible la concretización de este trabajo.

A la técnica Dra. Maria Carlos Rodrigues quien compartió sus conocimientos con voluntad y desinterés, los cuales fueron de mucha ayuda en la realización práctica de la disertación.

Expresar mi inmenso reconocimiento al prestigioso Politécnico de Leiria por abrirme las puertas y formarme como profesional, a mis profesores por sus valiosos conocimientos y experiencias.

Resumen

Las aguas residuales generadas por procesos industriales ocasionan problemas de contaminación en los ecosistemas, debido a la presencia de metales pesados en ellas. Con el propósito de tener alternativas para disminuir o eliminar metales como el zinc se realizó en el presente proyecto un análisis de la adaptabilidad a elevadas concentraciones de zinc y la capacidad de remoción de este metal utilizando la microalga *Chlorella vulgaris*. La determinación del proceso de adaptación se realizó sometiendo a la microalga *Chlorella vulgaris* a 3 ensayos a concentraciones de zinc cada vez en aumento. El primer ensayo se llevó a cabo en cuatro reactores con medio BBM (Bold's Basal Medium), 5% de microalgas, y concentraciones diferentes de zinc: 0, 2, 4, y 8 ppm para cada reactor y en condiciones adecuadas para su crecimiento. En el ensayo 2 se utilizaron 6 reactores con las mismas condiciones del ensayo 1 pero a concentraciones diferentes de zinc: 0, 8, 16, 26, 38 y 50 ppm y usando como biomasa las células provenientes del reactor 2 del primer ensayo. El tercer ensayo fue realizado a partir de células pre adaptadas del ensayo dos del reactor con 50 ppm a las mismas condiciones. El crecimiento celular en el ensayo 1 tuvo mayor biomasa en reactores donde se adicionó 2 ppm de zinc, que es la cantidad óptima para su normal desarrollo alcanzando una concentración de $8,16 \times 10^7$ células.ml⁻¹, en el ensayo 2 tuvo mayor crecimiento el reactor 1 con 0 ppm con $1,20 \times 10^8$ células.ml⁻¹, mientras que el reactor con mayor concentración de zinc tuvo un crecimiento menor hasta $9,92 \times 10^7$ células.ml⁻¹. Para el ensayo 3 se obtuvo una mayor biomasa en el reactor con 50 ppm de zinc alcanzando una concentración de hasta $1,30 \times 10^8$ células.ml⁻¹, mientras que en el reactor con 100 ppm el crecimiento fue menor hasta $1,75 \times 10^7$ células.ml⁻¹.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que *C. vulgaris* exhibió una capacidad de adaptación a diferentes concentraciones de zinc, cuyos valores pueden estar presentes en cuerpos de agua superficiales. En el ensayo 4 se determinó la capacidad de remoción de la microalga, utilizando 5 reactores con concentraciones de zinc de 0, 2, 5, 10, 20 ppm respectivamente, en donde se obtuvo una remoción menor para el reactor 2 de 25% y una remoción mayor para el reactor 5 de 53,72%. La remoción de Zn por *Chlorella vulgaris* estuvo en relación directa con la concentración del metal. La cantidad de Zn removida en ambos casos fueron significativamente diferentes. La remoción a concentraciones elevadas a 20 ppm fue en el día 3 de 8,23%, en el día 10 de 28,11% en el día 15 de 53,72%, esto

evidencia que hay una correlación positiva entre la concentración de células y la remoción del zinc.

Este trabajo muestra que *Chlorella vulgaris* puede remover el Zn, por lo que esta microalga posee el potencial para ser utilizada en técnicas de biorremediación para la remoción de metales en efluentes provenientes de aguas residuales.

Palabras-clave: Biorremediación, *Chlorella vulgaris*, zinc, adaptación, remoción.

Abstract

Wastewater generated by industrial processes causes pollution problems in ecosystems, due to the presence of heavy metals in it. In order to have alternatives to reduce or eliminate metals such as zinc, an analysis of the adaptability to high concentrations of zinc and the removal capacity of this metal was carried out in this project using the microalgae *Chlorella vulgaris*. The determination of the adaptation process was carried out by subjecting the *Chlorella vulgaris* microalgae to 3 tests at increasingly increasing zinc concentrations. The first test was carried out in four reactors with BBM medium (Bold's Basal Medium), 5% microalgae, and different concentrations of zinc: 0, 2, 4, and 8 ppm for each reactor and under suitable conditions for its growth. In test 2, 6 reactors were used with the same conditions of test 1 but at different concentrations of zinc: 0, 8, 16, 26, 38 and 50 ppm respectively and using the cells from reactor 2 of the first test as biomass. The third test was carried out from pre-adapted cells from test two of the reactor with 50 ppm under the same conditions. Cell growth in test 1 had higher biomass in reactors where 2 ppm of zinc was added, which is the optimal amount for normal development, reaching a concentration of 8.16×10^7 cells.mL⁻¹, in test 2 it had higher Reactor 1 grew at 0 ppm with 1.20×10^8 cells.mL⁻¹, while the reactor with the highest concentration of zinc had a lower growth to 9.92×10^7 cells.mL⁻¹. For test 3, a higher biomass was obtained in the reactor with 50 ppm of zinc, reaching a concentration of up to 1.30×10^8 cells.mL⁻¹, while in the reactor with 100 ppm the growth was lower up to 1.75×10^7 cells.mL⁻¹.

The results obtained in the present work show that *C. vulgaris* exhibited a capacity to adapt to different concentrations of zinc, whose values may be present in surface water bodies. In test 4 the removal capacity of the microalgae was determined, using 5 reactors with zinc concentrations of 0, 2, 5, 10, 20 ppm respectively, where a lower removal for reactor 2 of 25% and a greater removal for reactor 5 of 53.72%. The removal of Zn by *Chlorella vulgaris* was directly related to the metal concentration. The amount of Zn removed in both cases was significantly different. Removal at concentrations elevated to 20 ppm was 8.23% on day 3, 28.11% on day 10 and 53.72% on day 15, this shows that there is a positive correlation between the concentration of cells and zinc removal.

This work shows that *Chlorella vulgaris* can remove Zn, so this microalgae has the potential to be used in bioremediation techniques for the removal of metals in effluents from wastewater.

Keywords: Bioremediation, *Chlorella vulgaris*, zinc, adaptation, removal.

Índice

Originalidad y Derechos de Autor	1
Dedicatoria.....	2
Agradecimientos	3
Resumen	4
Abstract	6
Lista de Figuras	11
Lista de Tablas.....	12
Lista de siglas y acrónimos	13
1. Introducción.....	14
2. Marco Teórico.....	18
2.1. Metales Pesados	18
2.1.1. Características	18
2.1.2. Contaminación por Metales Pesados.....	18
2.1.3. Zinc (Zn)	19
2.2. Estrategias para la remoción de metales pesados.....	20
2.2.1. Biorremediación	21
2.3. Microalgas.....	21
2.3.1. Generalidades	21
2.3.2. Cinética de crecimiento	22
2.3.3. Tipos de cultivo	23
2.3.4. Usos	23
2.3.5. Parámetros para el cultivo de microalgas.....	24
2.3.6. <i>Chlorella</i>	27
2.3.7. Caracterización de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	28
2.3.8. Morfología.....	29
2.3.9. Adaptación y tolerancia de microalgas en presencia de metales pesados.....	31
2.3.10. Remoción de metales pesados con microalgas.....	31
3. Metodología.....	34
3.1. Descripción, componentes y material a utilizar.....	35
3.1.1. Organismo de estudio.....	35
3.1.2. Preparación de medio de cultivo	35
3.1.3. Desinfección de la biomasa.....	35
3.1.4. Diseño experimental.....	36

3.2.	Determinación de la concentración celular en la cultura	37
3.2.1.	Densidad óptica (DO).....	38
3.2.2.	Recuento celular en la Cámara de Neubauer.....	38
3.2.3.	Correlación entre DO y conteo en la cámara de Neubauer	40
3.3.	Cinética de crecimiento y adaptabilidad	40
3.3.1.	Condiciones del cultivo	40
3.3.2.	Primer experimento preliminar E1	41
3.3.3.	Segundo experimento - E2	41
3.3.4.	Tercer experimento - adaptación ensayo E3.....	42
3.3.5.	Determinación de curvas de crecimiento.....	42
3.3.6.	Determinación de la velocidad específica de crecimiento.....	42
3.4.	Ensayos de remoción del zinc, ensayo E4	43
3.4.1.	Determinación de curvas de crecimiento.....	43
3.4.2.	Calibración – Recta patrón	43
3.4.3.	Protocolo de medición.....	44
3.4.4.	Cálculos para la remoción del zinc.....	44
3.5.	Análisis Estadístico	44
4.	Resultados y discusión.....	46
4.1.	Concentración celular inicial.....	46
4.1.1.	Correlación con la densidad óptica.....	46
4.2.	Experimento preliminar ensayo E1	47
4.2.1.	Cinética de crecimiento	47
4.2.2.	Velocidad específica de crecimiento	49
4.2.3.	Evolución del pH en el crecimiento de la biomasa	49
4.2.4.	Efecto de luz y oscuridad en el crecimiento celular	50
4.3.	Segundo experimento E2 (adaptación)	51
4.3.1.	Cinética de crecimiento	52
4.3.2.	Evolución del pH.....	54
4.4.	Tercer experimento E3 (adaptación)	56
4.4.1.	Cinética de crecimiento	56
4.4.2.	Evolución del pH.....	58
4.5.	Remoción de zinc E4.....	60
4.5.1.	Cinética de crecimiento	60
4.5.2.	Evolución del pH.....	61
4.5.3.	Remoción del zinc	63
4.6.	Factores que influenciaron el crecimiento del cultivo y remoción del Zn.....	65

5. Conclusiones	67
Referencias Bibliográficas	69
Anexos	75

Lista de Figuras

Figura 1 Curva de crecimiento típica por fases para una población de microalgas. (O. González, 2014).....	22
Figura 2 Células de <i>Chlorella vulgaris</i>	29
Figura 3 Morfología de <i>Chlorella</i> . Adaptado de Tantté, 2018	30
Figura 4 Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (OH ⁻ , SH ⁻ , COO ⁻ , PO ₄ ²⁻ , NO ₂ , NH ₂) (Téllez, 2018)	33
Figura 5 Flujograma de los ensayos para remoción y adaptación de zinc.....	34
Figura 6 Diseño de material implementado en los diferentes ensayos de crecimiento celular, adaptación y remoción.	37
Figura 7 Barrido de densidad óptica entre 400 a 800 nm para una muestra de microalga.....	38
Figura 8 Cámara de Neubauer – Conteo celular.....	39
Figura 9 Metodología de recuento celular con elevada concentración.....	40
Figura 10 Correlación entre la concentración celular y la densidad óptica (687 nm).....	47
Figura 11 Evolución de la biomasa de microalgas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 1). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering (1990).	48
Figura 12 Influencia de la luz en de la densidad de la biomasa en las diferentes concentraciones de zinc.	51
Figura 13 Evolución de la biomasa de microalgas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 2). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering, (1990).	53
Figura 14 Variación del pH ensayo E2.....	55
Figura 15 Comparación de la variación de pH de los reactores del ensayo E2	55
Figura 16 Evolución de la biomasa de microalgas pre-adaptadas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 3). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering, (1990).	56
Figura 17 Comparación de células de <i>Chlorella vulgaris</i> sin adaptación (E2-R6) y con adaptación (E3-R1) a 50 ppm de zinc.	57
Figura 18 Variación del pH ensayo E3.....	59
Figura 19 Comparación de la variación de pH de los reactores del ensayo E3	60
Figura 20 Evolución de la biomasa de microalgas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 4). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering, (1990).	61
Figura 21 Variación del pH ensayo E4.....	62
Figura 22 Variación del pH.....	63

Lista de Tablas

Tabla 1 - Volumen adicionado a cada reactor del ensayo E1	28
Tabla 2 - Volumen adicionado a cada reactor del ensayo E2	28
Tabla 3 - Volumen adicionado a cada reactor del ensayo E3	29
Tabla 4 - Valores de DO y concentración de células.mL ⁻¹ por cada dilución.....	33
Tabla 5 - Fases de crecimiento del ensayo E1, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento .	6
Tabla 6 - Valores de los parámetros del modelo empírico de Zwietering (1990) E1	36
Tabla 7 - Fases de crecimiento del ensayo E2, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento	40
Tabla 8 - Valores de los parámetros del modelo empírico de Zwietering (1990) E2	40
Tabla 9 - Fases de crecimiento del ensayo E3, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento	45
Tabla 10 - Valores de los parámetros del modelo empírico de Zwietering (1990) E3	45
Tabla 11 - Fases de crecimiento del ensayo E4, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento	48
Tabla 12 - Valores de los parámetros del modelo empírico de Zwietering (1990) E4	48
Tabla 13 - % de Remoción de Zn por la microalga a diferente concentración y en distinto periodo de tiempo. imiento.....	51
Tabla 14 - Remoción del Zinc por célula	52

Lista de siglas y acrónimos

AA	Absorción Atómica
abs	Absorbancia
BBM	Bold's Basal Medium
DO	Densidad óptica

1. Introducción

La contaminación en el medio ambiente por presencia de metales pesados es un problema que debe ser abordado con mayor preocupación por autoridades e investigadores, ya que está ocasionando impactos negativos en los ecosistemas. La actividad industrial está generando descargas residuales a los cuerpos hídricos influyendo en su calidad, debido al deficiente o ausente tratamiento de sus aguas residuales. La composición de las aguas residuales es un reflejo de los estilos de vida y las tecnologías para la producción de la sociedad (García, Arbib, & Perales, 2015). La presencia de metales puede causar perturbaciones en parámetros físico-químicos, alteración de pH, entre otros (Pérez, 2016). Además de caracterizarse por ser persistentes de manera indefinida generando afectaciones en la vida marina y a la salud humana (Dewi & Nuravivah, 2018).

La utilización de metales en los procesos industriales ha permitido que grandes concentraciones de metales pesados potencialmente tóxicos sean vertidos en los ambientes acuáticos. Las fuentes de emisión de estos elementos son industrias de azúcar, aceite, cerveza, textil, celulosa, acabados metálicos, cobre y sus ligaciones, hierro y acero, galvanizado, curtiembre, industria alimenticia, entre otras, clasificadas como focos puntuales de contaminación (Bou *et al.*, 2018).

Las técnicas de tratamiento de las aguas residuales son realizadas con el fin de evitar o disminuir la contaminación física, química y biológica en los cuerpos de agua. La clasificación de las técnicas de tratamiento de las aguas residuales depende de ciertos factores y se han clasificado según el orden de actuación sobre el agua (Caviedes, Muñoz, Perdomo, Rodríguez, & Sandoval, 2015).

El pre-tratamiento está destinado a la preparación o acondicionamiento de las aguas residuales, el tratamiento primario tiene como objetivo la remoción por medios físicos o mecánicos de una parte sustancial del material sedimentable o flotante, la mayoría de las plantas de depuración implementan el tratamiento secundario de sus aguas, ya que luego del tratamiento primario permanecen niveles elevados de materia orgánica soluble o suspendida, junto a otros nutrientes (Rojas, 2013), el tratamiento terciario se ha aplicado a las operaciones y procesos utilizados para eliminar contaminantes no removidos por el tratamiento primario o secundario. Esta etapa tiene como fin la reducción de iones orgánicos, los cuales se pueden

eliminar por medios químicos, físicos o biológicos (Candela, 2016). El tratamiento cuaternario consiste en la utilizar la coagulación química y filtración por carbón activado para degradar compuestos inorgánicos tóxicos y orgánicos refractarios. Y el tratamiento quinario elimina sales inorgánicas, metales pesados y compuestos orgánicos residuales, mediante ósmosis inversa, electrodiálisis entre otras (Arellano, 2007).

Con la finalidad de proteger el medio acuático y mejorar la calidad de las aguas en función de sus principales usos el Ministerio del Ambiente de Portugal ha emitido el Decreto-Lei n° 236/98, de 1 de agosto donde establece normas, criterios y objetivos para realizar una buena gestión integrada de los recursos hídricos y de preservación del ambiente. Las cuales establecen los valores máximos de algunas de las variables como los metales pesados, cuyos valores permitidos para poder ser descargados son de 5 mg/L (DRE,1998).

Para salvaguardar y preservar los ecosistemas acuáticos el Ministerio del Ambiente del Ecuador ha establecido instrumentos de control relativo al recurso agua. Según el Texto Unificado de legislación secundaria: Acuerdo N° 97/A Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, los límites permisibles de descarga a un cuerpo de agua en presencia de Zinc es de 5 mg/L (R.O, 2015).

Debido a la falta o deficiente tratamiento de aguas residuales provenientes de operaciones industriales, se han buscado metodologías alternativas que puedan complementar los tratamientos tradicionales. En el caso de los metales pesados los tratamientos convencionales han resultado costosos y en concentraciones no muy altas (10 a 50 ppm) han resultado poco eficientes, es por ello, que se han buscado implementar sistemas biológicos que eliminen los metales pesados de cuerpos de agua a menores costos (Arellano, 2007).

Las microalgas son microorganismos que pueden encontrarse en agua dulce o mar e incluso en suelos empozados, y juegan un papel importante en la cadena alimenticia en las aguas como productores (Gomez, 2007). Presentan un gran potencial como agente de biorremediación, ya que han desarrollado diversas estrategias para degradar o acumular metales pesados haciendo de esta manera que el efecto tóxico disminuya o desaparezca por completo (Dewi & Nuravivah, 2018).

Debido a que las microalgas presentan carga superficial negativa poseen una alta afinidad por los iones de metales pesados del medio, el resultado es la formación de complejos

quelados que pueden quedar en el exterior de la pared celular o en compartimentos específicos en el interior de la célula (Hernández & Labbé, 2014).

Las microalgas presentan una buena capacidad de adaptación y tolerancia siendo consideradas como bioacumuladores eficientes de metales, ofreciendo una alternativa de complementariedad para los tratamientos convencionales (Cañizares, 2000).

Para que las microalgas puedan alcanzar su potencial máximo de desarrollo es necesario tener en cuenta ciertos parámetros como nutrientes, temperatura, luz, potencial de hidrógeno, CO₂, cuyos factores son determinantes para la productividad y crecimiento, en consecuencia buenas condiciones para remoción de metales (Mejía, 2006).

En el presente estudio se utilizó la microalga *Chlorella vulgaris*, ya que presenta crecimiento rápido, alto poder fotosintético, fácil adaptabilidad y bajo costo, resultando una buena alternativa para la obtención de biomasa, nutrientes, e captación de iones metálicos (Pedro Rodríguez *et al.*, 2016).

Hipótesis

Con la utilización de las microalgas, se puede remover grandes concentraciones del metal zinc, similares a las encontradas en los efluentes provenientes de aguas residuales industriales.

Al ser expuestas las microalgas a diferentes concentraciones del Zinc estas pueden adaptarse, teniendo un óptimo crecimiento.

Objetivo General

El objetivo de la presente investigación es evaluar la capacidad de remoción y adaptación que puede presentar la microalga *Chlorella vulgaris* en presencia de diferentes concentraciones de zinc.

Objetivos Específicos

- Cultivar y obtener biomasa de la microalga *Chlorella vulgaris*.
- Caracterizar el crecimiento de las microalgas y su tolerancia, al ser mantenidas a diferentes concentraciones del metal estudiado.
- Determinar si la microalga puede adaptarse a concentraciones elevadas de Zn.
- Evaluar el porcentaje de remoción del metal pesado de las microalgas.

2. Marco Teórico

2.1. Metales Pesados

2.1.1. Características

Los problemas a nivel mundial a los cuales se enfrenta la humanidad actualmente es el creciente deterioro ambiental, causando pérdida en la calidad del medio ambiente que está aumentando a gran velocidad, debido a las actividades antropogénicas. Las operaciones industriales generan descargas masivas, que puede abatir la capacidad de autolimpieza de los ecosistemas receptores y como resultado la acumulación de metales pesados a niveles problemáticos y hasta perjudiciales (Cañizares, 2000).

Los metales pesados componen un grupo de cerca de 40 elementos de la Tabla periódica, (Valdés, 2009) los que presentan una densidad entre 4-7 g/cm³ y pertenecen al grupo de contaminantes que tienden a bioacumularse y biomagnificarse, es decir que perduran en el ambiente debido a su resistencia a la degradación química o biológica (Arenas & Lozada, 2016)

Algunos iones metálicos como Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Mo⁴⁺, son importantes en el desempeño fisiológico para el desarrollo de las funciones vitales de los organismos. Siendo divididas en tres categorías, el grupo de metales de categoría 1) son esenciales y básicamente no tóxicos entre los cuales tenemos Na⁺, K⁺, Mg²⁺ y Ca²⁺, una segunda categoría que también son esenciales, pero perjudiciales a concentraciones elevadas como Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Mo⁴⁺ y una tercera categoría la cual envuelve el grupo de metales que no son esenciales y son tóxicos Cr⁶⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Pb²⁺, estos elementos del grupo tres no cumplen funciones biológicas en las células y presentan un mayor poder contaminante al ecosistema en general (Valdés, 2009).

2.1.2. Contaminación por Metales Pesados

El término contaminación se refiere al aumento descontrolado de agentes tóxicos, que en concentraciones elevadas pueden tener un efecto perjudicial sobre las propiedades físicas, químicas o biológicas ya sea en el aire, tierra o agua, que afecta directamente a la vida humana o de las especies necesarias para la conservación del ambiente. La contaminación

puede ser de origen natural, sin embargo, en la mayoría de los casos tiene relación con la actividad humana, especialmente en las industrias que cada vez están aumentando. Algunos compuestos tóxicos pueden ser biodegradados pelos organismos vivos mientras que otros no persistiendo en el medio ambiente (Perenguez & Valdez, 2017).

Hay algunos metales pesados que son esenciales para la salud humana, pero una cantidad excesiva de estos metales puede tener efectos nocivos. Los metales pesados son liberados al medio ambiente de dos maneras, por procesos naturales y por actividades antropogénicas (Valdés, 2009).

Los metales pesados resultantes de la actividad industrial son los principales causantes de la contaminación. Las aguas residuales domésticas y agrícolas que no tuvieron un tratamiento adecuado también son generadoras de residuos perjudiciales para el medio ambiente (Chowdhury, Mazumder, Al-Attas, & Husain, 2016).

Los sedimentos son un reservorio final de varios contaminantes en el ecosistema marino, la presencia de varios elementos químicos nocivos, ejercen profundas consecuencias sobre la toxicidad para las especies en el medio ambiente, causando mayor preocupación. Varios estudios han reportado contaminación por metales pesados en aguas de los ambientes costeros mundiales (Aslam et al., 2020; López, 2017; González, 2006).

Con relación a los microorganismos los daños que pueden generar los metales son en la alteración o desnaturalización de proteínas causando en algunas ocasiones efectos letales en los mismos. En el caso de las plantas causan alteraciones en la permeabilidad de la membrana celular y contribuyen a la inhibición de la fotosíntesis, disminución en el consumo de agua y nutrientes, ocasionando posible muerte celular (Valdés, 2009).

2.1.3. Zinc (Zn)

El Zinc es un elemento esencial en la activación de enzimas en los organismos vivos, pero presenta efectos tóxicos a niveles elevados, en los humanos puede producir anemia, problemas en la piel, úlceras en el sistema digestivo, alteraciones en el sistema respiratorio y su acumulación puede presentar acción cancerígena y otras enfermedades degenerativas e inducir mutaciones genéticas, afectando así su descendencia. En los animales como en algunas especies de peces puede provocar efectos adversos en su morfología (Perenguez & Valdez, 2017).

El Zinc es de uso extensivo en la industria, como el galvanizado, la fabricación de acero, aleaciones, pigmentos, plásticos, procesos de refinación entre otros (Plaza, 2012). En el anexo 1 podemos encontrar las principales actividades industriales que generan Zinc (Caviedes *et al.*, 2015).

Las aplicaciones en las tecnologías establecidas han causado contaminación en los cuerpos de agua y la incorporación en los sedimentos, el cual puede aumentar su biodisponibilidad y así incidir en los efectos cancerígenos que puede ocasionar en los humanos. Esto hace que este metal esté clasificado como prioritario para el tratamiento de biorremediación como también su agotamiento en las reservas. (Valdés, 2009).

2.2.Estrategias para la remoción de metales pesados

Los avances tecnológicos para combatir la contaminación por metales pesados en aguas residuales consisten en el uso estrategias y en el mejoramiento de estos procesos para el tratamiento de residuos particulares (Cañizares, 2000).

Existen metodologías convencionales que son utilizadas con el fin de tratar aguas residuales que presentan metales pesados estas son: intercambio iónico, precipitación, filtración, oxidación, reducción, tecnologías de membrana, recuperación por evaporación y tratamiento electroquímico. Mismo así que estos métodos tengan resultados aceptables tiene un elevado costo y pueden resultar ineficientes cuando los metales pesados presentan una concentración muy baja, y en ciertas ocasiones conllevan a una contaminación secundaria (Cañizares, 2000). Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación. Las tecnologías convencionales para el tratamiento de efluentes no son económicamente viables para las industrias de pequeña escala en desarrollo (Kumar *et al.*, 2016).

El uso de sistemas biológicos en los últimos años como tratamientos complementarios a los tradicionales, ha ocupado un papel importante en tratamientos de aguas residuales, gracias a su capacidad para capturar metales pesados. Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, por esto las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una buena alternativa además de ayudar a las técnicas convencionales para la eliminación/recuperación de metales, teniendo potencial para hacerlo más eficiente y a menor costo (Cañizares, 2000).

La utilización de los microorganismos ofrece una opción rentable y beneficiosa, especialmente para tratar volúmenes de soluciones acuosas mayores con bajas concentraciones de estos elementos (Valdés, 2009). Las microalgas, al igual que otros organismos eucariotas fotosintéticos y algunos hongos han desarrollado la producción de péptidos capaces de inmovilizar estos metales (Torres *et al.*, 2017).

2.2.1. Biorremediación

Existen diferentes definiciones sobre el término biorremediación, dependiendo de la sustancia contaminante, del ecosistema a remediar y del agente que va a ser de remediador. Todas tiene en común el uso de sistemas biológicos, procesos metabólicos y características estructurales que permiten la eliminación de contaminantes químicos. La biorremediación es un proceso de catálisis biológica de manera controlada, la que tiene como objetivo remediar o eliminar la contaminación ambiental. Se utiliza para disminuir los elementos tóxicos que se encuentran presentes en aguas superficiales, aguas residuales, urbanas e industriales, lodos de refinerías de petróleo y suelos. Existen algunas técnicas para realizar la biorremediación como por ejemplo tratamiento *in-situ*, *landfarming*, compostaje y biorreactores. Los principales procesos y los más importantes de biorremediación dependen del agente biológico como son fitorremediación, biorremediación animal y biorremediación por microorganismos (Mejía, 2006).

2.3. Microalgas

2.3.1. Generalidades

Las microalgas son organismos microscópicos fotosintéticos que pueden crecer en ambientes de agua salada o dulce, en casi todas las condiciones medioambientales. (Mayorga & Manso, 2017). Se ha estimado que aproximadamente existen 50 000 especies de microalgas, de las cuales solo 30 000 han sido estudiadas y analizadas (Nuñez, 2017).

Su ciclo de crecimiento es rápido, ya que son microorganismos autótrofos y por la fotosíntesis, transforman la energía solar en energía química, su reproducción es asexual división de una sola célula o fragmentación de una colonia. La productividad de las microalgas se encuentra determinada por parámetros como, la luz, los nutrientes, la temperatura, el pH y la salinidad (López, 2017).

2.3.2. Cinética de crecimiento

El crecimiento de una población que se encuentra limitada por recursos está relacionado con su tasa de reproducción, los microorganismos generalmente se dividen una vez han doblado su tamaño celular. Por lo tanto, la limitación en el crecimiento se puede estudiar midiendo el incremento en el número de individuos (Lampert & Sommer, 2007).

Las fases de crecimiento de las microalgas describen la forma en la cual cambian la concentración celular, la biomasa y la composición bioquímica de las microalgas. El crecimiento poblacional de las microalgas se puede dividir básicamente en seis fases: 1) de adaptación, 2) de aceleramiento, 3) de crecimiento exponencial, 4) de desaceleración o crecimiento lento, 5) de crecimiento estacionario y 6) de muerte figura 1.

En la fase de adaptación o de latencia es la fase en la que la cultura se adapta a condiciones diferentes de lo habitual. En la fase de aceleramiento se incrementa la síntesis de componentes celulares estructurales, que lleva a la división celular, aumentando su tasa de crecimiento. En la fase exponencial, la multiplicación celular es la máxima y, ante la ausencia de factores limitantes, la tasa de crecimiento se mantiene constante. En la fase de desaceleración se puede evidenciar que algunos factores están limitando el crecimiento y en consecuencia el número de divisiones celulares disminuye, por lo que la tasa de crecimiento decrece. Durante la fase estacionaria, las condiciones del cultivo son limitantes, las tasas de crecimiento y de mortalidad se equilibran permaneciendo relativamente constantes. En la última fase, la fase de muerte, la limitación de nutrientes, sumada al incremento de desechos metabólicos y a la proliferación de bacterias, ocasiona la muerte o lisis celular, por lo que la mortalidad es superior al crecimiento, la concentración celular disminuye, se registra una disminución de la biomasa y la tasa de crecimiento es negativa (Vega & Voltolina, 2007).

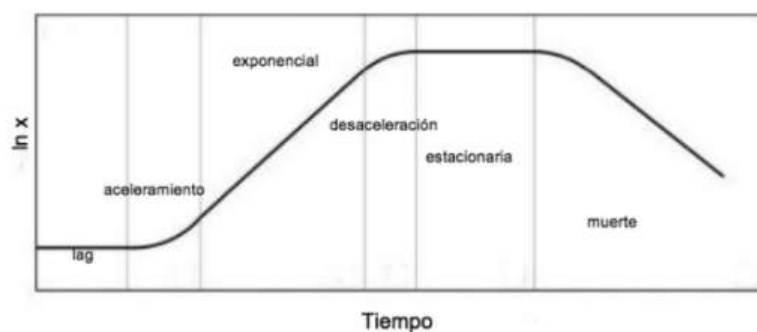


Figura 1 Curva de crecimiento típica por fases para una población de microalgas. (O. González, 2014)

2.3.3. Tipos de cultivo

Las microalgas pueden ser producidas por diversos métodos como el cultivo batch, semicontinuo y continuo. El tipo batch consiste en una única inoculación de las células en un contenedor con medio de cultivo por un periodo de crecimiento y finalmente cosechado. El semicontinuo se refiere al uso de cultivos en tanques por cosechas periódicas parciales, seguido inmediatamente llenado al volumen original de enriquecimiento. Por otra parte, el cultivo continuo consiste en suministrar medio enriquecido constantemente en una cámara de crecimiento y el exceso de cultivo se extrae de forma simultánea permitiendo que el factor de dilución iguale a la velocidad de crecimiento, permitiendo el mantenimiento de culturas muy cerca de la máxima velocidad de crecimiento (Mayorga & Manso, 2017).

2.3.4. Usos

Actualmente existe un creciente interés en la producción de microalgas debido a los productos que pueden ser obtenidos a partir de estas, como proteínas, lípidos, carbohidratos, carotenoides y cosméticos, son fuentes comerciales de químicos de alto valor como beta – caroteno, astaxantina y extractos de algas. Las microalgas tienen un valor nutricional, son consumidas como complemento alimenticio (*Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis*), sus productos también son utilizados para diferentes propósitos como productos farmacéuticos, colorantes, aditivos alimenticios y suplementos nutricionales y alimentos para animales. Las especies de microalgas destinadas para el consumo humano, ha tenido una gran producción, es así que en el 2003 se registró una producción de *Chlorella* con gran valor nutricional y alto contenido proteico, además de contener un gran valor medicinal como la protección contra la insuficiencia renal, fueron comercializadas en pastillas y polvo como suplementos alimenticios generalmente en mercados de alimentos saludables (Mayorga & Manso, 2017).

Otro uso es como alimento para la acuicultura, ya que posee grandes cantidades de carbohidratos, proteínas útiles, lípidos y antioxidantes, convirtiéndolo en un alimento esencial en la cría de todas las etapas de especies marinas. En los países agrícolas, la biomasa de algas es utilizada para la inoculación del suelo con el fin de aumentar la productividad de los cultivos (Nuñez, 2017).

En las últimas dos décadas, el interés en estos organismos microscópicos aumentó, la implementación de los microorganismos a nuevas aplicaciones cada vez en desarrollo, destinados a la producción de biocombustibles debido al agotamiento de las reservas de

combustibles fósiles y la gran preocupación por el calentamiento global. Estos escenarios dramáticos están obligando al mundo a investigar nuevas estrategias globales para mitigar las emisiones de CO₂, proponiendo recursos alternativos renovables e investigaciones de biocombustibles de tercera generación. Las microalgas en la actualidad son consideradas un recurso energético sostenible promisor, debido a la capacidad que tiene para acumular grandes cantidades de lípidos que son utilizados para la producción de biodiesel, el cual se comporta de manera semejante al combustible de petróleo (Safi, Zebib, Merah, Pontalier, & Vaca-Garcia, 2014).

Una aplicación importante de las microalgas es en el tratamiento de aguas residuales, ya que en el año de 1940 los primeros estudios fueron relatados sobre la posibilidad de utilizar a las microalgas como organismos purificadores de las aguas residuales, debido al aprovechamiento de los nutrientes inorgánicos contenidos en esas aguas, para favorecer el crecimiento de las microalgas, operando como medio de cultivo. Posteriormente fue desencadenando el desarrollo de la producción en masa de microalgas en sistemas cerrados y abiertos con diferentes finalidades (M. González, 2006).

2.3.5. Parámetros para el cultivo de microalgas

Las microalgas tienen factores comunes influyentes en su crecimiento, sin embargo, cada especie y subespecie de microalgas presentan características propias respecto a las condiciones óptimas para su crecimiento, así como también su productividad máxima alcanzada en un cultivo. La productividad de las microalgas está determinada por parámetros como el tipo de intensidad de luz, densidad celular del cultivo, el pH del medio, salinidad, disponibilidad y concentración de nutrientes, temperatura y la contaminación o depredación que se puede presentar por otros organismos. En fase exponencial algunas especies pueden duplicar su biomasa en tiempos muy cortos como en 3,5 horas (Brennan & Owende, 2010).

a) Estado de la biomasa

Es importante tener en cuenta que usar las células en estado metabólico determinado, estará en dependencia de la información genética que tenga la especie para manifestar un tipo u otro mecanismo de captura (Tantte, 2018).

b) Luz

La disponibilidad de luz es el principal factor limitante de los cultivos de microalgas fotoautótrofas. Los nutrientes inorgánicos y el CO₂ pueden ser incorporados al medio de cultivo en exceso, de manera que nunca sean limitantes al crecimiento. Por lo contrario, la luz es un parámetro de gran importancia y tiene que ser proveído al cultivo de forma continua, ya que la energía radiante no puede ser acumulada (Tantte, 2018).

Los organismos fotosintéticos solo utilizan la fracción de luz que es fotosintéticamente activa, es decir entre 350 e 700 nm, lo que supone un 40 % de la energía solar. La mayor parte de los ecosistemas naturales vegetales presentan una eficiencia de conversión de energía lumínica en energía química de alrededor de 1 %, sin embargo, en el caso de las microalgas se han demostrado eficiencia de conversión entre 1-4% en sistemas abiertos y aún mayores en fotobiorreactores cerrados (Stephens et al., 2010).

c) Nutrientes

Los nutrientes inorgánicos se los puede dividir en macronutrientes, requeridos en grandes cantidades y micronutrientes, requeridos en concentraciones muy bajas. Los macronutrientes (incluye compuestos de nitrógeno, fósforo, y azufre) son componentes fundamentales de macromoléculas y juegan un papel fundamental en la estructura celular. Los micronutrientes tienen un papel metabólico específico en la fisiología de las microalgas (Gonzalez, 2010).

Según Tantte (2018) las microalgas se pueden clasificar por la utilización de los nutrientes en autotróficas, heterotróficas y mixotróficas. Las microalgas autotróficas pueden utilizar como fuente de carbón el CO₂ presente en la atmósfera o en gases de escape, así como también los iones bicarbonato mediante la enzima anhidrasa carbónica.

El nitrógeno es un macronutriente esencial para el crecimiento de las microalgas. Estas pueden capturar nitrógeno del medio generalmente en forma de urea, nitrato, nitrito, amonio, nitrógeno gaseoso y óxidos de nitrógeno. El fósforo es capturado del medio en forma de ortofosfato, cuya concentración en equilibrio con las formas de protón dependen del pH del medio. Factores como un pH excesivamente mayor o menor, o la ausencia de iones como potasio, sodio o manganeso, ralentizan la captura de fosfatos por parte de las microalgas (Tantte, 2018).

La ley del mínimo desarrollada por Liebig establece que el crecimiento es limitado por aquel nutriente cuya concentración esté cerca al mínimo nivel requerido. Es decir, cuando la concentración del nutriente limitante se incrementa, aumenta el crecimiento hasta que otro nutriente llega a ser limitante. El modelo de Droop asume que la tasa de crecimiento microalgal es una función de las reservas intracelulares del nutriente limitante: cuando está disponible, la abundancia del nutriente determina su tasa de asimilación y su almacenamiento intracelular. Si hay reproducción continua, la cantidad de recurso contenido en cada organismo disminuye. Esta reducción conlleva a una disminución en la tasa de crecimiento hasta que alcanza su valor mínimo, momento en el cual no puede haber más crecimiento (fase estacionaria) (Gonzalez, 2010).

d) pH

Cada especie de microalgas tiene un rango de pH en el cual su crecimiento es óptimo, dependiendo de que especie química este más habituada a asimilar. El pH en la mayoría de los cultivos de microalgas se encuentra entre 7 y 9, con un óptimo entre 8,2-8,7. Por encima o debajo de este valor, puede presentar un descenso en su productividad afectando al crecimiento algal y a la capacidad de remoción de contaminantes en sistemas de tratamientos de aguas (Hernández & Labbé, 2014).

El proceso fotosintético de fijación de CO₂ provoca un aumento gradual del pH en el medio, debido a la acumulación de OH⁻, lo que puede promover la eliminación de nitrógeno en forma de amoníaco a la atmosfera, y la eliminación del fósforo por precipitación de ortofosfatos. El control de pH se consigue mediante la aireación o inyección controlada de CO₂, aunque también mediante la adición de ácidos o bases (Cartagena & Malo, 2017).

Con el aumento de pH de la solución del metal los sitios activos sobre la pared celular se desprotonan y aumenta la carga negativa con un consecuente incremento de la ligación de los metales a los grupos funcionales de las biomasas microbianas, producto de una intensificación de las fuerzas electrostáticas involucradas en el proceso de adsorción (Bou et al., 2018). El descenso de pH puede ser letal para el crecimiento microalgal, pero a un aumento de pH este crecimiento si puede darse (Cartagena & Malo, 2017).

Una vez que se realiza el proceso de biorremediación, se tiene la opción de recuperar la biomasa viva e introducirla en un nuevo ciclo de biorremediación, se puede utilizar químicos suaves para bajar el pH y retirar los metales, sin destruir las células (Mejía, 2006).

e) Aireación

La aireación es importante para evitar la sedimentación de microorganismos, asegurando que todas las células de la población se encuentren expuestas a la luz y nutrientes, así como también la importancia del intercambio de gases entre el aire y el medio de cultivo (Tipan, 2015). La agitación facilita la eficiencia en el transporte, impidiendo la sedimentación de las algas y su adherencia a las paredes del reactor, homogeniza el pH y garantiza la distribución de los gases y de la luz (Tantte, 2018). El movimiento del agua para algunas especies de algas perifíticas es de gran importancia, ya que puede mejorar significativamente la asimilación de nutrientes. El mecanismo para este fenómeno se basa en que el movimiento del agua disminuye la capa laminar alrededor del alga, aumentando de esta forma la difusión de nutrientes (Gonzalez, 2010).

El nivel de oxígeno disuelto es un parámetro que debe ser controlado en un cultivo de microalgas, ya que altas concentraciones de oxígeno disuelto pueden inhibir la fijación de carbono por parte de la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa comúnmente llamada RuBisCo. Esta inhibición se ve favorecida por un déficit de CO₂ y por la alta radiación y temperatura (Tantte, 2018).

f) Temperatura

En el crecimiento de las microalgas, la temperatura es un factor por considerar, ya que influye en los coeficientes de velocidad de las reacciones biosintéticas. La relación entre temperatura y velocidad de crecimiento aumenta exponencialmente hasta alcanzar una temperatura óptima. Las microalgas tienen la capacidad de desarrollarse en un rango amplio de temperaturas, un ejemplo es la especie de *Chlorella* que puede crecer en un rango de temperatura de 5 a 42 °C, y fuera de estos valores se pueden inhibir o incluso morir (Bou et al., 2018).

2.3.6. *Chlorella*

El nombre *Chlorella* proviene de la palabra griega *chloros*, que significa verde, y el subfijo latino *ella* que se refiere a su tamaño microscópico. Es una microalga unicelular que crece en agua dulce y está presente en la Tierra desde el periodo anterior al Cámbrico hace 2 500 millones de años y desde entonces su integridad genética se mantiene constante. Al principio de 1900, el contenido de proteínas de *Chlorella* (fue de aproximadamente 55 % de peso seco)

llamó la atención de los científicos alemanes como una fuente de alimento no convencional. La Carnegie Institution de Washington en la década de 1950 asumió la investigación y consiguió cultivar esta microalga a gran escala para disminución del CO₂ (Safi et al., 2014).

El género *Chlorella* pertenece a las microalgas bastante frecuentes, estos microorganismos tienen la capacidad de crecer en diferentes tipos de trofía y pueden tolerar ambientes hostiles en términos de temperatura, deficiencia de nutrientes, pH y salinidad. Estas microalgas tienen varios usos lo que ha despertado gran interés por parte de las industrias (Torres et al., 2017).

2.3.7. Caracterización de la microalga *Chlorella vulgaris*

La *C. vulgaris* es una microalga unicelular con mancha ocular y vacuolas contráctiles, figura 2. Es una alga de la clase Chlorophyceae, unicelular y no móvil. Posee un único cloroplasto semejante a una forma de taza, con o sin pirenoide y un único núcleo de tamaño pequeño. Su forma de reproducción es asexual, en la que cada célula haploide se divide mitóticamente dos o tres veces para dar origen a cuatro u ocho células no móviles. La organización celular en estas microalgas es en colonias, forman un agregado celular (Silva, 2006).

Fue descubierta por los japoneses usándolas como complemento alimenticio, debido a su alta concentración de vitaminas, ácido nítrico, fólico, clorofila a y b, sales minerales entre otros. Los primeros estudios investigativos fueron realizados en la segunda Guerra Mundial por los alemanes y norteamericanos con el fin de utilizar la especie como un complemento alimenticio para ser consumidos en el campo de batalla (Silva, 2006).

Debido a la capacidad que tienen las microalgas para realizar la fotosíntesis y posicionándose como productoras primarias en las cadenas tróficas, se han convertido en organismos ideales para acumular metales. Algunas plantas y otros organismos como las algas que son fototróficas tienen fuerte afinidad con los metales polivalentes, por proceso de biosorción. Esta afinidad es debido básicamente a dos hechos, la primera es a la necesidad de esa presencia en locales activos de enzimas esenciales que son complejas en las vías metabólicas, y un segundo hecho referente a los procesos de biosorción (interacción físico-química en todas las células/nivel membrana) y bioacumulación (actividad intracelular) (Silva, 2006).

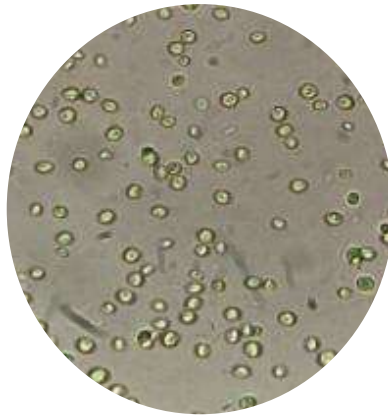


Figura 2 Células de *Chlorella vulgaris*

2.3.8. Morfología

El género *Chlorella* agrupa a las algas verdes unicelulares, eucariotas que viven en medios marinos, agua dulce e incluso en suelos encharcados. Figura 3 Tienen forma esférica, ovoide o elipsoide, la reproducción es asexual, sus mediciones son de 2-10 μm de diámetro, y tienen varios elementos estructurales semejantes a las plantas (Safi *et al.*, 2014).

Cuando sus células alcanzan su tamaño máximo, el núcleo se divide en cuatro u ocho partes y en el interior de la célula madre se forma de cuatro a ocho células más pequeñas idénticas a la célula madre que son liberadas por eclosión, transformándose entonces en células maduras al crecer (Rodríguez, 2014).

- **Pared celular**

Sirve de protección contra los invasores y el medio ambiente, su rigidez preserva la integridad de la célula, tiene una variación lo que depende de la fase de crecimiento, en su formación temprana, permanece frágil, formando una capa unilaminar de 2 μm de espesor. La pared celular de la célula hija aumenta gradualmente en grosor hasta llegar a 17-21 μm después de la maduración, donde una capa de microfibrilla se forma representando una capa de quitosano compuesta de glucosamina, la que es responsable de su rigidez. En la fase madura, el espesor de la pared celular y la composición no son constantes porque pueden cambiar según el crecimiento y las condiciones ambientales (Safi *et al.*, 2014).

- **Citoplasma**

Comprende la sustancia gelificada confinada dentro de la barrera de la membrana celular y está compuesta de agua, proteínas solubles y minerales. *C. vulgaris* tiene en su interior

orgánulos como mitocondria, un pequeño núcleo, vacuolas, aparato de Golgi y cloroplastos (Safi *et al.*, 2014).

- **Mitocondria**

Cada mitocondria contiene cierta cantidad de material genético, el aparato respiratorio y una membrana de capa doble, el exterior de la membrana rodea todo el orgánulo y está compuesto de proteínas y fosfolípidos en igual cantidad. Sin embargo, en el interior de la membrana está compuesta de tres veces más proteínas que fosfolípidos, el cual rodea el espacio interno llamado matriz, el que contiene la mayoría de proteínas (Rodríguez, 2014).

- **Cloroplastos**

Esta microalga solo tiene un cloroplasto con una membrana de doble envoltura compuesta de fosfolípidos, el exterior de la membrana es permeable para metabolitos e iones, pero el interior de la membrana tiene una función más específica en el transporte de proteínas. Los gránulos de almidón, compuestos de amilasa y amilo-pectina, pueden formarse en el interior del cloroplasto, especialmente en condiciones de crecimiento desfavorable (Safi *et al.*, 2014, Tante, 2018).

Contiene pigmentos verdes fotosintéticos como la clorofila -a e -b en su cloroplasto. La fotosíntesis hace que la multiplicación celular sea rápida, requiriendo solo dióxido de carbono, agua, luz solar y pequeñas cantidades de minerales (Rodríguez, 2014).

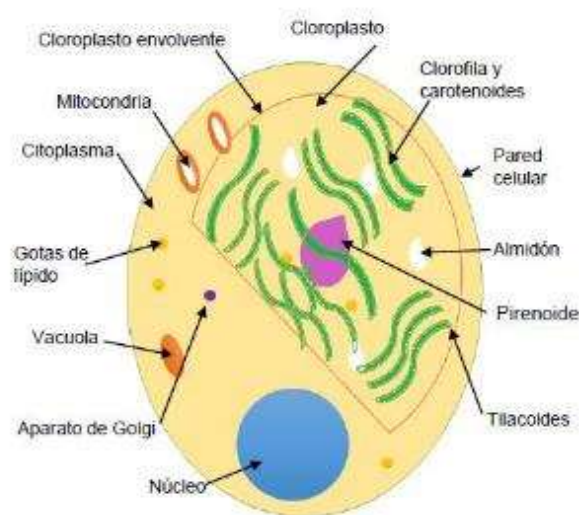


Figura 3 Morfología de *Chlorella*. Adaptado de Tante, 2018

2.3.9. Adaptación y tolerancia de microalgas en presencia de metales pesados

La adaptación es la capacidad que presentan las microalgas para sobrevivir y reproducirse en hábitats contaminados con metales, pueden ser adaptaciones genéticas o morfológicas, haciendo más tolerantes algunos géneros de microalgas a un metal específico (M. González, 2006).

La propiedad de persistencia y acumulación de los metales genera que algunas especies fotosintéticas sean sensibles, mientras que en otras se induzcan respuestas de bioacumulación, adaptación y resistencia. En general, los niveles elevados de metales inducen al estrés de las células, las que realizan mecanismos para mantener las concentraciones de iones metálicos libres en niveles que no superen las necesidades celulares. Se incluyen: (1) unión en la pared celular, (2) cambios en la permeabilidad de iones, (3) exclusión activa (ej. sistemas de eflujo), (4) biotransformación, (5) quelación extra e intracelular, y (6) compartimentación del metal. A partir de estos antecedentes, se ha propuesto que la capacidad de los metales de acumularse en las células microalgales por exposiciones continuas del contaminante metálico, daría lugar a mecanismos de resistencia a través de procesos adaptativos fisiológicos estimulados por cambios en la expresión genética y estructural (Téllez, 2018).

2.3.10. Remoción de metales pesados con microalgas

La biorremediación de sistemas contaminados con metales pesados por microorganismos favorece la movilización o inmovilización de estos contaminantes. Los procesos resultan ser poco costosos y simples en su aplicación, en comparación de los métodos químicos y físicos. (Valdés, 2009).

En las descargas de efluentes provenientes de las operaciones industriales y domésticas, se encuentran principalmente altas concentraciones de materia orgánica y residuos inorgánicos, los que podemos mencionar los metales pesados que son altamente tóxicos, causantes de alteraciones en seres vivos. La biorremediación de estos metales es posible mediante la aplicación de cultivo de microalgas, siendo de gran importancia debido a su mecanismo de adaptación y tolerancia, siendo los responsables de realizar procesos de adsorción, absorción y desorción. Los géneros de microalgas que demuestran una mayor capacidad de remoción para los metales (Cd, Zn, Cu, Ag, Hg, Ni y Cr) son *Chlorella* y *Scenedesmus* (M. González, 2006).

Las microalgas presentan un papel fundamental como agentes biorremediadores en los procesos de depuración mejorando la calidad de los vertidos de las aguas, produciendo gran cantidad de oxígeno y consumiendo para ello CO₂ y nutrientes, alcanzando aproximadamente una concentración de hasta 20 mg. L⁻¹ de oxígeno en el cultivo (Amaral, 2016).

El objetivo fundamental de la aplicación de microalgas para el tratamiento de aguas residuales es la utilización y la biotransformación de los nutrientes a biomasa. Además, de la remoción de amonio, nitritos, nitratos y fosfatos, entre otros, ocurre el aumento de pH lo que favorece a la precipitación de los fosfatos, la oxigenación del agua, la recuperación de O₂, reducción de organismos patógenos, son los más comunes (Ramos & Pizarro, 2018).

En la remoción de metales pesados las microalgas son consideradas las más promisoras, por su fácil obtención, su adaptación en medios de cultivos variados y su bajo costo. Estos microorganismos acumulan metales esenciales intracelularmente como requerimientos nutricionales por transporte activo y pueden secuestrar iones metálicos que les resultan tóxicos por diferentes mecanismos como la quelación intracelular por proteínas y la adsorción a grupos activos de la superficie celular, en respuesta a un proceso de detoxificación (Valdés, 2009). La pared celular está compuesta principalmente por polisacáridos, proteínas y lípidos, los que portan grupos funcionales tales como carboxilos, hidroxilo, amino, sulfuros y fosfatos que le confieren una carga negativa a la superficie celular y sitios de alta afinidad a los cationes metálicos (Bou *et al.*, 2018).

La microalga *C. vulgaris* ha demostrado que es capaz de absorber y acumular grandes cantidades de iones metálicos, generalmente ocurre en dos etapas:

(1) **Adsorción** generalmente llamada biosorción, ha emergido como alternativa a los métodos convencionales al emplear sistemas biológicos para remover y recuperar sustancias contaminantes del ambiente, lo que incluye dentro del concepto de biorremediación (Bou *et al.*, 2018). Es un proceso independiente del metabolismo, y es más rápido y reversible. Sus mecanismos se basan con frecuencia en interacciones fisicoquímicas entre iones metálicos y grupos funcionales (OH⁻, SH⁻, COO⁻, PO₄²⁻, NO₂, NH₂) presentes en la superficie celular, Figura 4 (Téllez, 2018). Un factor importante es la composición de la pared celular de la microalga debido a que posee una mezcla compleja de azúcares, glucosamina, proteínas y ácido urónico (Silva, 2006). El proceso tiene la capacidad para captar metales, sean estos de forma soluble e insoluble, a través de mecanismos fisicoquímicos tales como, el intercambio

iónico, la formación de complejos, la micro precipitación, entre otros. En estos mecanismos, la pared celular constituye el principal lugar de captura o enlace de los iones (Kadukova, 2016).

(2) **Bioacumulación** es un proceso complejo típico de las células vivas que depende de una variedad de mecanismos físicos, químicos y biológicos. mucho más lento, irreversible, que implica el transporte activo de cationes metálicos a través de la membrana celular en el citoplasma, con la posterior unión a biomoléculas intracelulares. En una definición estrecha, es un proceso de acumulación intracelular de metales que depende del metabolismo celular. Si bien la adsorción es un proceso rápido independiente de la presencia de nutrientes específicos, la bioacumulación es lenta y depende de los nutrientes y puede ser inhibida por inhibidores metabólicos como la baja temperatura y la falta de fuentes de energía (luz). Para distinguir entre los dos procesos, la bioacumulación a menudo se usa para describir el proceso que involucra a células vivas (independientemente del mecanismo), y biomasa muerta mayormente tiene la capacidad de biosorción debido a la incapacidad de las células muertas de desintoxicar el metal por transporte activo hacia el interior de la célula. (Kadukova, 2016).

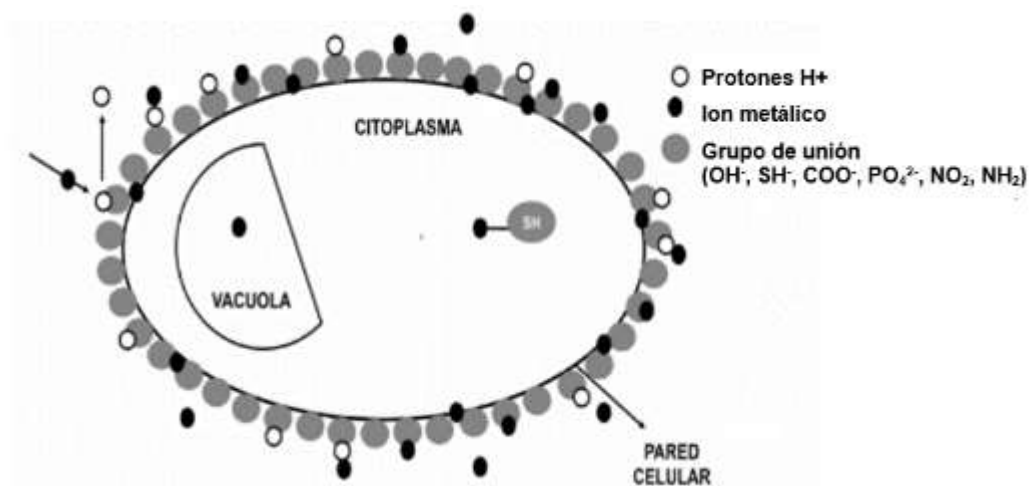


Figura 4 Mecanismo y diferentes grupos funcionales que participan en la biosorción de iones metálicos en microalgas (OH⁻, SH⁻, COO⁻, PO₄²⁻, NO₂, NH₂) (Téllez, 2018)

3. Metodología

De acuerdo con los objetivos del presente trabajo, la especie a utilizar es la microalga *Chlorella vulgaris*. La cepa, los materiales y los equipos fueron suministrados por los laboratorios de análisis instrumental y de biociencias del Politécnico de Leiria, siendo también adecuados algunos materiales durante la experimentación.

En la elaboración de este estudio se va a implementar microalgas a 4 ensayos con concentraciones diferentes de zinc para evaluar el crecimiento poblacional y la adaptación en los ensayos E1, E2 y E3 subsecuentemente en condiciones adecuadas para su buen desarrollo, y el ensayo E4 para determinar la capacidad de remoción de la microalga. La figura 5 muestra el flujograma de los ensayos para remoción y adaptación de zinc.

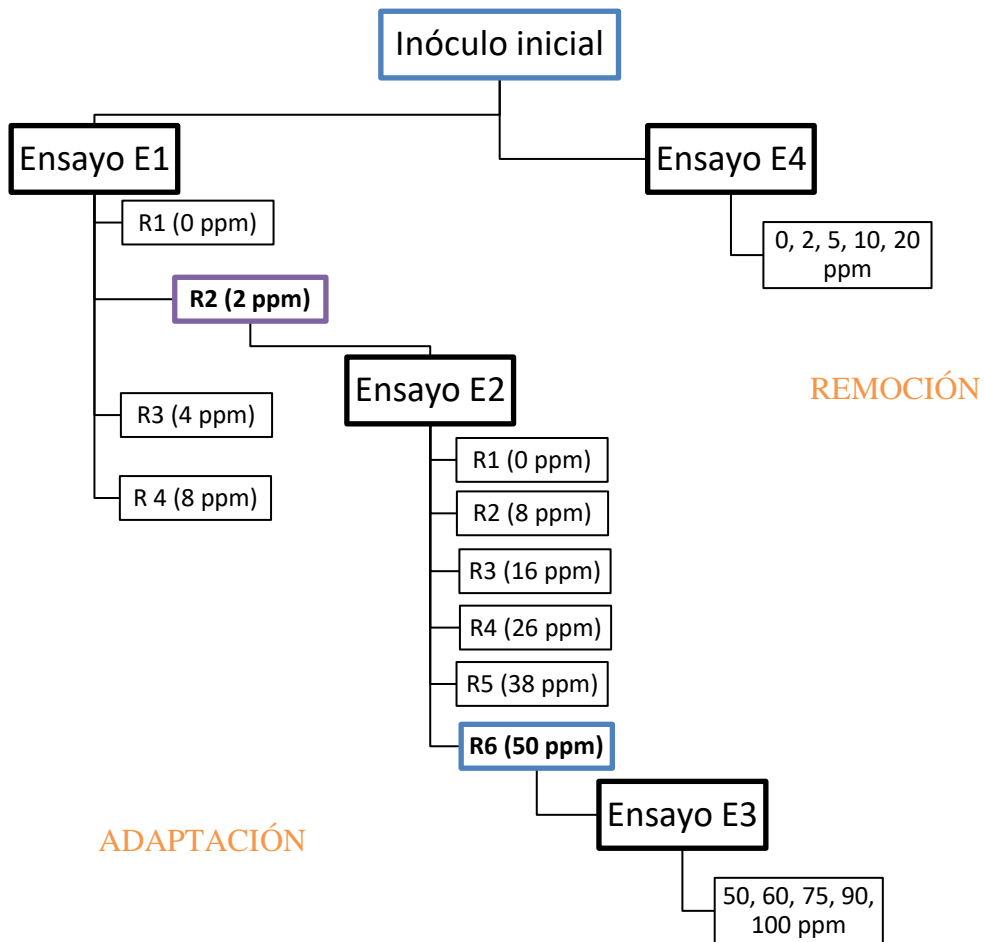


Figura 5 Flujograma de los ensayos para remoción y adaptación de zinc

3.1. Descripción, componentes y material a utilizar

3.1.1. Organismo de estudio

Como organismo de estudio, se empleó la microalga *Chlorella vulgaris* por tratarse de una especie de alta producción biomasal, su eficiencia y uso en tratamientos de efluentes (Hernández & Labbé, 2014).

El inóculo inicial de la microalga *Chlorella vulgaris* fue obtenido del Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela Superior de Tecnología y Gestión, del Politécnico de Leiria.

La cultura inicial utilizada en esta investigación fue cultivada en un medio de cultura BBM de solución (Bold's Basal Medium) en un frasco de vidrio de 1 L, en constante aeración, agitación y en presencia de luz artificial con fotoperiodos 12 h luz / 12 h oscuridad.

3.1.2. Preparación de medio de cultivo

El medio BBM presentaba una composición inicial de NaNO_3 25,0 g L⁻¹, MgSO_4 7,5 g L⁻¹, NaCl 2,5 g L⁻¹, K_2HPO_4 7,5 g L⁻¹, KH_2PO_4 17,5 g L⁻¹, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g L⁻¹, H_3BO_3 11,42 g L⁻¹, KOH 31 g L⁻¹, Na_2EDTA 50 g L⁻¹, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 concentrado 0,1% (v/v), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 8,82 g L⁻¹, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,44 g L⁻¹, MoO_3 0,71 g L⁻¹, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,57 g L⁻¹, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,40 g L⁻¹ (Hamed & Klöck, 2014), y para la realización de este estudio se substituyó este medio, por el BBM sin Zn, retirando simplemente este componente (Zn) del medio normal. El medio se sometió a un proceso de autoclavado a 121 °C durante 20 minutos autoclave automático (Raypa AES 75).

3.1.3. Desinfección de la biomasa

Para garantizar un buen desarrollo de las microalgas es importante controlar dentro de lo posible el crecimiento de otros organismos, principalmente bacterias y hongos que podrían intervenir alterar su crecimiento.

La cultura inicial fue parcialmente descontaminada por centrifugación, (Heraeus Biofuge Stratos de Thermo Scientific) se removió lo más posible del medio viejo para ser substituido por el medio BBM sin zinc, la eliminación de bacterias no fue realizada en su totalidad, pero el medio BBM no es favorable a su crecimiento, las microalgas crecen en este medio de manera más rápida.

Este proceso consistió en la adición de 30 mL de la cultura inicial en 6 tubos Falcon de 50 mL de capacidad centrifugando por un periodo de 10 minutos a una velocidad de rotación de 5000 rpm, donde se da una separación de los componentes (líquido-sólido) en función de la densidad.

Al finalizar este proceso, fue retirado el componente líquido (sobrenadante) quedando el sedimento de masa celular en el interior de los tubos Falcon, se rellenaron nuevamente hasta los 30 mL con agua destilada para volver a realizar el proceso de centrifugación. Esta operación fue realizada dos veces con agua destilada y una última vez con medio BBM sin zinc para que la muestra esté lo menos contaminada posible. Una vez culminada la centrifugación, el sobrenadante fue retirado de los 6 tubos Falcon quedando en el interior el sedimento de masa celular de microalgas, seguidamente se adicionó medio BBM sin zinc y se agitó para homogenizar la muestra en un agitador de tubos de ensayo (Reax de Heidolph). Posteriormente fueron colocadas en un frasco de vidrio de 1 L y aforado con medio BBM sin zinc, sobre un agitador magnético, incorporándole un sistema de aireación, siendo esta biomasa la cultura madre.

3.1.4. Diseño experimental

Para la determinar el crecimiento celular y la adaptabilidad se realizaron 3 ensayos E1, E2, y E3, y para la remoción fue relaborado un ensayo E4. En el ensayo 1 se crearon 4 reactores adaptando garrafones de plástico de 5 L, y desarrollando un sistema de aireación interno para la homogenización y oxigenación del medio.

Para los cultivos de los ensayos E2 y E3 fueron desarrollados 6 y 5 reactores respectivamente, realizados con jeringas de 100 mL con difusores de piedra en su interior, siendo tapadas con torundas de algodón y gasa, evitando en lo posible contaminación externa, se diseñaron estructuras de madera como soporte de los reactores.

En el ensayo E4 de cultivo de biomasa se utilizó 10 balones de vidrio en dos soportes de madera, el soporte A y B, el soporte A con 5 balones hizo de control y en el soporte B se realizaron los ensayos con biomasa.

Para todos los ensayos se utilizaron mangueras y tubos plásticos unidas a un compresor (Air 550 R Plus de Sera) para la inyección de aire con una tasa de aireación de $9,2 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ con el fin de evitar la sedimentación de la biomasa en las paredes de los reactores y asegurar la

distribución de los nutrientes presentes en el medio BBM. La figura 6 muestra el diseño experimental de los reactores utilizados.

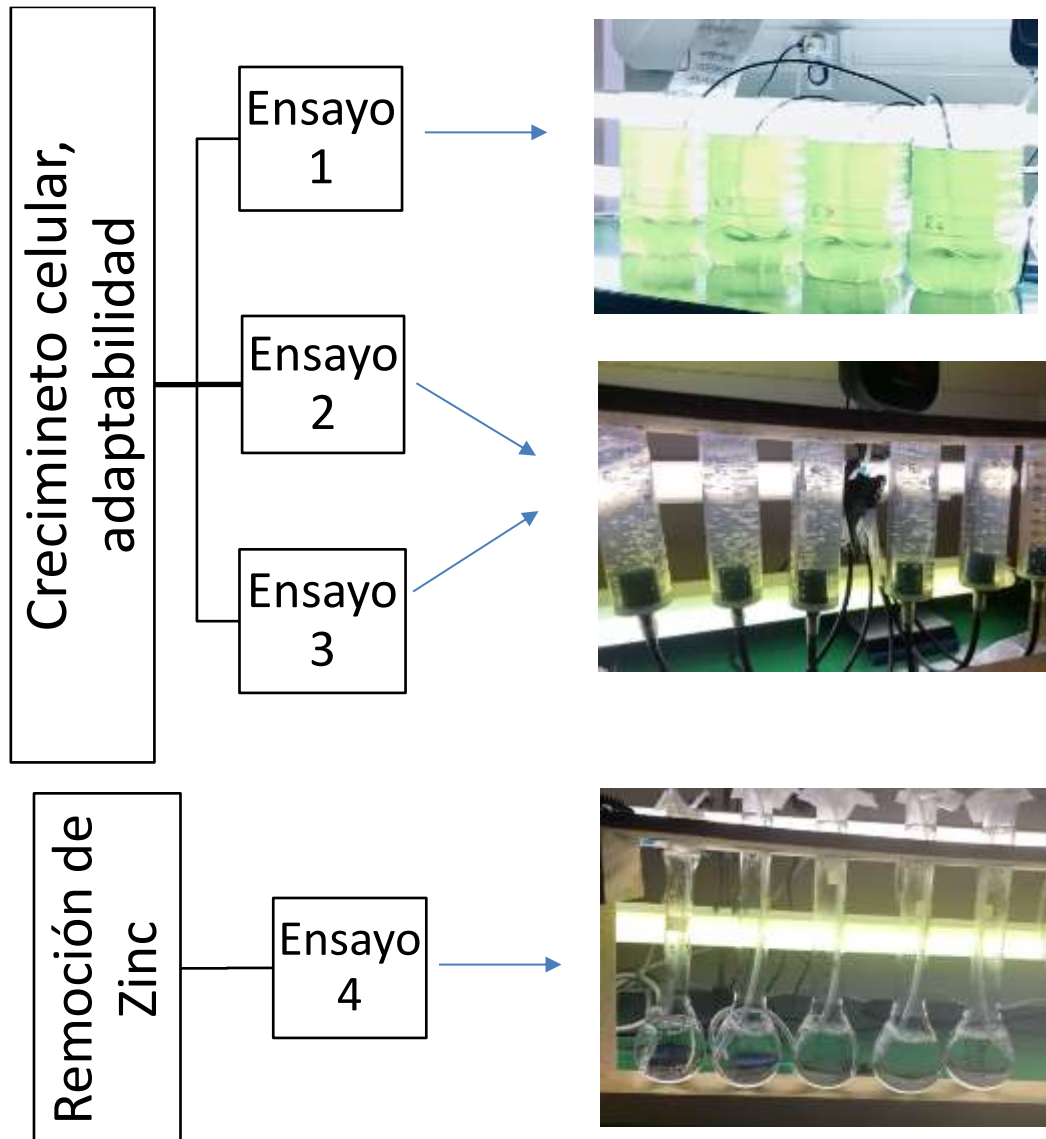


Figura 6 Diseño de material implementado en los diferentes ensayos de crecimiento celular, adaptación y remoción.

3.2. Determinación de la concentración celular en la cultura

El crecimiento de un cultivo de microalgas se lo puede expresar como el incremento de biomasa en concentración de células por unidad de tiempo ($\text{cél.mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), este incremento puede ser determinado por diferentes métodos, entre los más utilizados en laboratorios y los

utilizados en esta investigación son el recuento celular a través de un microscopio y la determinación de los cambios de densidad óptica del cultivo por espectrofotometría (Vega & Voltolina, 2007)

3.2.1. Densidad óptica (DO)

La concentración celular puede ser estimada indirectamente usando la densidad óptica del cultivo, que es una técnica menos precisa del recuento directo, pero permite una evaluación rápida de la concentración microalgal.

Para estimar la concentración celular se determinó inicialmente la longitud de onda en un espectrofotómetro ultravioleta-visible (Cary 50 de Varian) realizando barrido entre los 400 y los 800 nm dos veces la muestra microalgal, en los que se detectó el pico de absorbancia que corresponde a los 687 nm, la figura 7 podemos observar esta determinación.

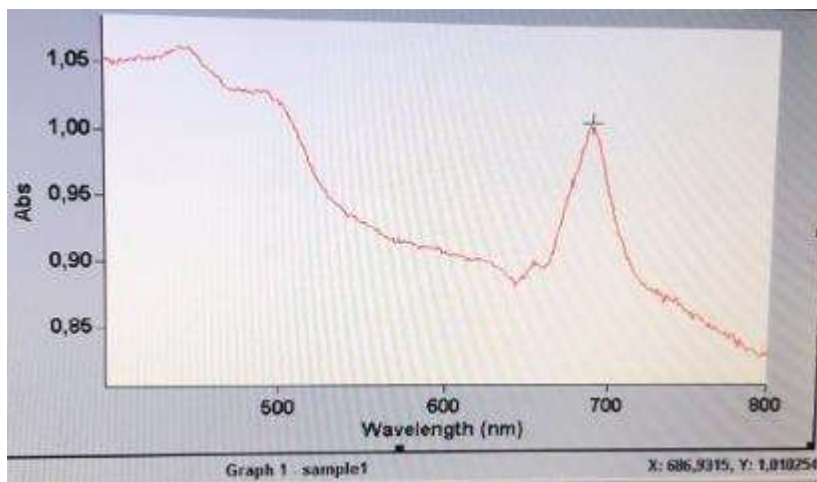


Figura 7 Barrido de densidad óptica entre 400 a 800 nm para una muestra de microalga.

Se realizaron diluciones del cultivo concentrado de biomasa (cultura madre) en fase exponencial, las diluciones evaluadas tuvieron una concentración de 0,8%, 2%, 8%, 16% y 28%, las cuales fueron colocadas en balones volumétricos de 25 mL y aforadas con agua destilada. Estas diluciones fueron medidas por densidad óptica.

3.2.2. Recuento celular en la Cámara de Neubauer

Las mismas diluciones de la cultura donde se midió la densidad óptica fueron usadas para el conteo de células en la cámara de Neubauer. La cámara de recuento que se utilizó fue el hematocitómetro de 0,1 mm de profundidad con reglilla de Neubauer, la cual consta de 9

cuadrados con lados de 1 mm, cada uno de los cuales corresponde a un volumen de 0,1 μ L (Vega & Voltolina, 2007). Los cuatro extremos están subdivididos en 16 cuadros pequeños. El cuadro central contiene 25 cuadros, a su vez divididos en 16 cuadros más pequeños. Debido al tamaño de las células del presente estudio fue utilizado el cuadro central para realizar el conteo, Figura 8.

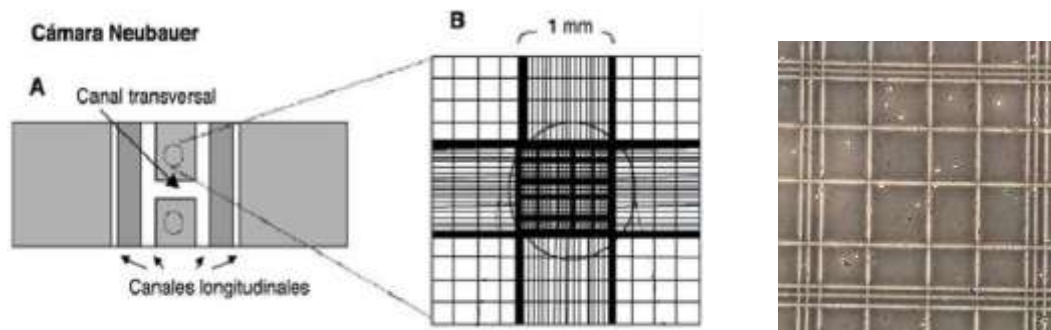


Figura 8 Cámara de Neubauer – Conteo celular.

Para proceder al contaje celular primeramente se agitó la muestra para tener una distribución homogénea de las células y se succionó con una pipeta Pasteur, se llenó la cámara con el cubreobjetos ya puesto, colocando la punta de la pipeta en el borde del cubreobjetos, en el extremo de la cámara de Neubauer, dejando que la muestra penetre entre la cámara y el cubreobjetos desde el lateral, por capilaridad, teniendo en atención que el volumen depositado sea el suficiente tener una distribución adecuada.

Fue utilizado el microscopio compuesto con contraste de fase (Olympus CX41), primero se enfocó la cámara con el objetivo de 10x y posteriormente con el de 40x por tratarse de células pequeñas, facilitando así su identificación.

Se registraron las células contadas en el cuadro del centro (1 mm x 1 mm x 0,1 mm), para las células que tocan las líneas de separación de cuadros son contadas solamente las que tocan dos de los cuatro lados. Se contaron las células de los cuadros más pequeños realizándolo en orden de conteo en forma de zigzag cuando la concentración celular fue alta como el descrito en la figura 9.

3.3.2. Primer experimento preliminar E1

Para el ensayo 1 se utilizaron 4 reactores a los cuales se les adicionaron medio de cultivo BBM modificado con concentraciones variables de zinc: 0, 2, 4 y 8 ppm respectivamente, autoclavado a 121 °C durante 20 minutos y biomasa de *C. vulgaris* proveniente de la cultura madre a la concentración constante de inóculo de 5 mL previamente centrifugada (5000 rpm durante 10 min), resultando volumen total de 3,5 L. La tabla 1 muestra las concentraciones y cantidad de componentes utilizados para cada reactor.

Tabla 1 Volumen adicionado a cada reactor del ensayo E1

Reactores	[Zn] (ppm)	Inóculo inicial de microalgas (mL)	ZnSO ₄ 800 ppm (mL)	BBM Sin Zn (mL)	Total (mL)
R1	0	150	0,00	3350,00	3500
R2	2	150	8,75	3341,25	3500
R3	4	150	17,5	3332,50	3500
R4	8	150	35,00	3315,00	3500

3.3.3. Segundo experimento - E2

El ensayo 2 abarca el cultivo y adaptación de las microalgas a mayores concentraciones de zinc a partir a los ensayos preliminares E1, específicamente de la biomasa celular del reactor R2 a una concentración de 2 ppm de zinc.

Para el nuevo ensayo de adaptación se tomó un total de 60 mL de la biomasa del reactor R2 (2 ppm) en 2 tubos falcon y se sometió a centrifugación por dos ocasiones, (retirando el sobrenadante y volviendo a rellenar con agua y medio) evitando de esta manera posible contaminación por microorganismos.

Las cepas fueron cultivadas a nivel de laboratorio, en 6 nuevos biorreactores de 100 mL de capacidad, con las mismas condiciones experimentales descritas en los ensayos iniciales y a concentraciones cada vez mayores. La tabla 2 indica la composición de este ensayo.

Tabla 2 Volumen adicionado a cada reactor del ensayo del ensayo E2

Reactores	[Zn] (ppm)	C. Madre (mL)	ZnSO ₄ 800 ppm (mL)	BBM Sin Zn (mL)	Total (mL)
R1	0	4,28	0,00	95,72	100
R2	8	4,28	1,00	94,72	100
R3	16	4,28	2,00	93,72	100
R4	26	4,28	3,25	92,47	100
R5	38	4,28	4,75	90,97	100
R6	50	4,28	6,25	89,47	100

3.3.4. Tercer experimento - adaptación ensayo E3

En el ensayo E3 se realizaron cultivos con las mismas condiciones experimentales descritas en el ensayo E2. Las diferencias para este experimento fueron: mayor concentración de zinc adicionada a los reactores indicadas en la tabla 3. La biomasa utilizada fue del reactor R6 pre-adaptado a 50 ppm de zinc.

Tabla 3 Volumen adicionado a cada reactor del ensayo E3

Reactores	[Zn] (ppm)	C. Madre (mL)	ZnSO ₄ 770 ppm (mL)	BBM Sin Zn (mL)	Total (mL)
1	2	5	0,260	94,740	100
2	50	5	6,494	88,506	100
3	60	5	7,792	87,208	100
4	75	5	9,740	85,260	100
5	90	5	11,688	83,312	100
6	100	5	12,987	82,013	100

3.3.5. Determinación de curvas de crecimiento

Se realizaron mediciones cada 6 horas inicialmente, pasando a 24, 48 y 72 horas, y fue determinado indirectamente el aumento de biomasa celular presente en los ensayos mediante la evaluación de la OD a una longitud de onda de 687 nm, las muestras fueron diluidas en las proporciones adecuadas, para garantizar que los valores medidos estuvieran dentro del rango de detección del espectrofotómetro. El pH fue un parámetro medido a lo largo de los 3 ensayos, en el ensayo E1 se midió el primer día y el último, en el ensayo E2 y E3 se realizó semanalmente, para determinar su variación con relación a la concentración celular.

3.3.6. Determinación de la velocidad específica de crecimiento

Para su determinación es preciso calcular el logaritmo natural del número de células por mililitro con respecto al tiempo de la fase exponencial donde se encuentra una recta, cuya pendiente de esta línea recta es la velocidad específica de crecimiento. Con base a los valores de DO y concentración celular se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ) utilizando la ecuación propuesta por Guillard (1975):

$$\mu = \frac{dx}{dt} \frac{1}{x} \quad (2)$$

En donde:

x= concentración de la biomasa (cél. mL⁻¹)

t= tiempo en días

dx= variación de la concentración de células

dt= variación del tiempo

3.4. Ensayos de remoción del zinc, ensayo E4

3.4.1. Determinación de curvas de crecimiento

En primer soporte fueron colocados 5 balones de vidrio con medio BBM sin Zn y con concentraciones de 0, 2, 5, 10 y 20 ppm de zinc respectivamente, haciéndolo de control, y un segundo soporte de 5 balones con las mismas concentraciones de zinc y medio, pero adicionándole microalgas, con los mismos parámetros utilizados en los ensayos anteriores.

Se realizaron muestreos diarios de la biomasa para medir la DO a una longitud de onda de 687 nm por espectrofotometría, y se monitoreó además el pH semanalmente con un medidor de pH/ORP/ISE (HANNA HI 3221) durante los 15 días del ensayo.

3.4.2. Calibración – Recta patrón

La concentración de zinc se midió utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Sprectr AA 55B de Varian del laboratorio de Análisis Instrumental. Estas mediciones fueron realizadas en tres ocasiones durante el ensayo en el día 3, 10 y 15 para determinar la variación de la absorción en función al tiempo y por ende a la densidad celular.

El proceso inicial se efectuó con la preparación de soluciones patrón con concentraciones de 0,2, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 y 2,5 ppm de Zn, calibrando el equipo con el uso de estas para obtener una curva con coeficiente de regresión R² superior a 0,99 y posteriormente proceder a las lecturas de las muestras determinando su absorbancia.

3.4.3. Protocolo de medición

El procedimiento consistió en retirar de cada reactor de ambos soportes control/test una muestra de 10 mL a tubos Falcon bajando el pH a 4-4,5 y centrifugando por 10 minutos a 5000 rpm en la centrifugadora (Heraeus Biofuge de Thermo Scientific), a continuación, se colectó 5 mL del sobrenadante de cada reactor, siendo acidificado con solución de ácido clorhídrico al 10%, las muestras fueron diluidas a cantidades adecuadas para poder medir la absorbancia de zinc en el espectrofotómetro de absorción atómica.

3.4.4. Cálculos para la remoción del zinc

Con base a los datos de absorbancia, se calculó el porcentaje de remoción para cada reactor en sus diferentes días de muestra con la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{Ci-Cf}{Ci} * 100 \quad (1)$$

Donde:

% R=% de Remoción

Ci= Concentración de Zn control

Cf= Concentración de Zn test

Fue calculado también la remoción del zinc en base a la biomasa usando la siguiente fórmula.

$$\frac{R}{X} = \frac{Ci-Cf}{\Delta X} \quad (2)$$

ΔX = variación de la concentración de células en el mismo periodo (células·L⁻¹).

3.5. Análisis Estadístico

Se utilizó el modelo matemático de Modelo Zwietering, 1990, para ajustar los datos resultantes del estudio con los parámetros del modelo. Este modelo toma solo en consideración en la curva de crecimiento microbiano 3 fases: adaptación o lag, exponencial y estacionaria.

El modelo logístico fue inicialmente utilizado para describir el crecimiento microbiano por Gibson, Bratchell e Roberts (1987), siendo Zwietering *et al.* (1990) quien propuso la sustitución de los parámetros empíricos por los de significado biológicos μ_{max} , λ y A resultando la ecuación 5.

Los modelos matemáticos que poseen parámetros con significado biológico pueden ser considerados más interesantes en términos prácticos, y pueden ser evaluados de manera más conveniente (Longhi, 2012).

$$Y(t) = \frac{A}{1 + \exp\left(\frac{\mu_{max}}{A} [\lambda - t] + 1\right)} \quad (3)$$

Donde:

Y (t) = logaritmo del conteo microbiano N en el tiempo t

A = Amplitud de la curva

μ_{max} = velocidad específica máxima de crecimiento

λ = duración de la fase lag

Para llevar a cabo el análisis del ajuste de los parámetros A, μ_{max} y λ fue usado el programa de complemento de Microsoft Excel, solver.

4. Resultados y discusión

En esta sección se analizarán los resultados obtenidos de los ensayos realizados con la metodología y condiciones mencionado en el capítulo anterior, interpretando el crecimiento microalgal, la adaptación que sufrió la microalga *Chlorella vulgaris* a diferentes concentraciones de zinc, la capacidad de remoción que presenta esta alga frente a diversas cantidades de zinc y el modelo ajustado en las curvas de crecimiento de este proceso experimental.

4.1. Concentración celular inicial

4.1.1. Correlación con la densidad óptica

Para la estimativa de los valores de la biomasa en los diferentes experimentos se determinó la concentración celular presente en las diluciones evaluadas por conteo, utilizando la cámara de Neubauer y leyendo la densidad óptica de las mismas. La tabla 4 muestra valores obtenidos de concentración celular y densidad óptica de las diferentes diluciones realizadas.

La concentración celular puede ser estimada indirectamente usando la densidad óptica del cultivo, que es una técnica menos precisa del recuento directo, pero permite una evaluación rápida de la concentración microalgal.

Se demostró que existe linealidad entre la densidad óptica y el conteo celular de cada concentración, donde el coeficiente de determinación expresa el grado de relación entre la concentración de células y la absorbancia. El coeficiente de regresión R^2 fue 0,9942, superior a 0,99, lo que sugiere una predicción fiable para los datos experimentales, Figura 10.

Tabla 4 Valores de DO y concentración de células.mL⁻¹ por cada dilución.

V _{dil.} (mL)	Incerteza V _{dil.} (mL)	V _{bal.} (mL)	Incerteza V _{bal.} (mL)	N. cél. contadas	Incerteza de cél. contadas	N. cél.mL ⁻¹	Incerteza cél.mL ⁻¹	% Incerteza
0,2	0,000303	25,00	0,04	50,00	7,874	6,25E+07	9,84E+06	15,75
0,5	0,00045	25,00	0,04	126,0	15,30	6,30E+07	7,65E+06	12,14
1,0	0,00105	25,00	0,04	277,7	16,27	6,94E+07	4,07E+06	5,86
2,0	0,012	25,00	0,04	536,2	13,64	6,70E+07	1,75E+06	2,62
4,0	0,015	25,00	0,04	738,5	18,06	4,62E+07	1,14E+06	2,48
7,0	0,05	25,00	0,04	1714	18,38	6,12E+07	7,95E+05	1,30

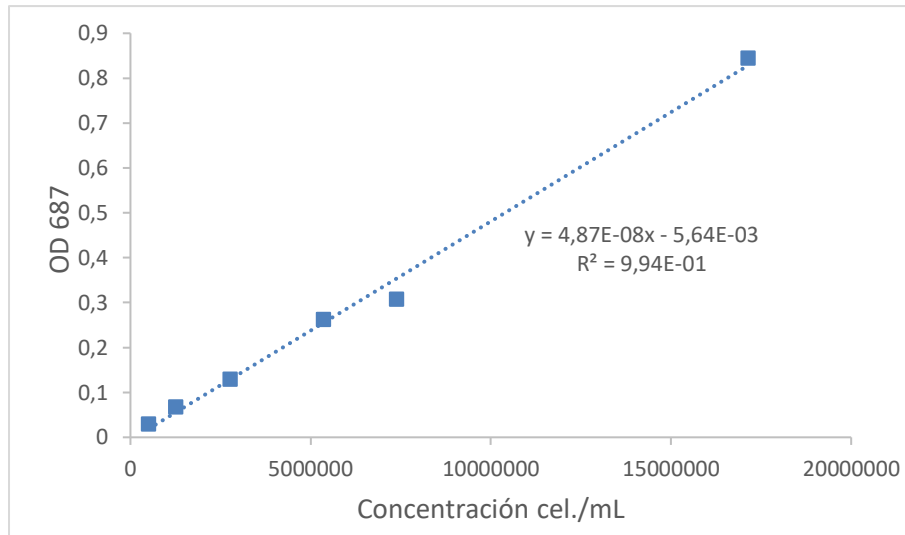


Figura 10 Correlación entre la concentración celular y la densidad óptica (687 nm)

La relación entre la concentración celular y la DO, está dada por la siguiente ecuación:

$$OD = 4,87 \times 10^{-8} X - 0,0056 \quad (4)$$

X = Concentración de cél. mL⁻¹

4.2. Experimento preliminar ensayo E1

4.2.1. Cinética de crecimiento

El ensayo inicial de exposición de *Chlorella vulgaris* al zinc que tuvo una duración de 36 días, mostró diferencias en el incremento de la biomasa celular medida por densidad óptica una longitud de onda de 687 nm, a distintas concentraciones de zinc.

La figura 11 muestra los resultados experimentales del estudio cinético del crecimiento de la microalga *C. vulgaris*. Con los datos de evolución temporal de la concentración de biomasa de *Chlorella vulgaris* se modeló la cinética de crecimiento ajustando del modelo logístico modificado por Zwietering.

Las curvas de crecimiento evaluadas por número de células que tuvo cada reactor en este periodo de tiempo presentaron: en el primer reactor R1 con ausencia de zinc (0 ppm) un crecimiento de $6,70 \times 10^7$ cél. mL⁻¹ con una velocidad de crecimiento de 0,046 d⁻¹ menor al segundo reactor R2 (2 ppm) de Zn de $8,16 \times 10^7$ cél. mL⁻¹, con una velocidad de crecimiento

de $0,049 \text{ d}^{-1}$, esto es debido a que las microalgas para su normal desarrollo necesitan la presencia de 2 ppm de zinc, pero en ausencia o cantidades más elevadas genera una alteración en su normal crecimiento, es así que en el reactor 3 y 4 el crecimiento fue aún menor.

Por otra parte, analizando las fases de crecimiento podemos notar que la fase de inducción o latencia para todos los reactores fue casi inexistente, e incrementó rápidamente la biomasa. Se observó una fase exponencial de crecimiento durante los 36 días del ensayo para los reactores R1 y R2, mientras que para los reactores R3 y R4 fue aproximadamente hasta el día 27 y 25 respectivamente. A partir de estos días los valores de concentración obtenidos en días consecutivos fueron cada vez más similares, con lo que se puede decir que se encuentra en una etapa de desaceleración de su crecimiento para posteriormente entrar en una fase estacionaria, y en el caso del R4 cerca del día 27 se observó un decrecimiento. Para los reactores R3 y R4 fue primero que para los reactores R1 y R2, esto pudo ser consecuencia de las concentraciones elevadas de zinc presentes en los reactores.

Adicionalmente, la posibilidad de tener la presencia de bacterias en el medio durante el periodo de ensayo debido al diseño del reactor puede realizar procesos de degradación de materia orgánica y recirculación de nutrientes, lo cual consigue explicar la prolongación de la fase exponencial de crecimiento por parte de la microalga.

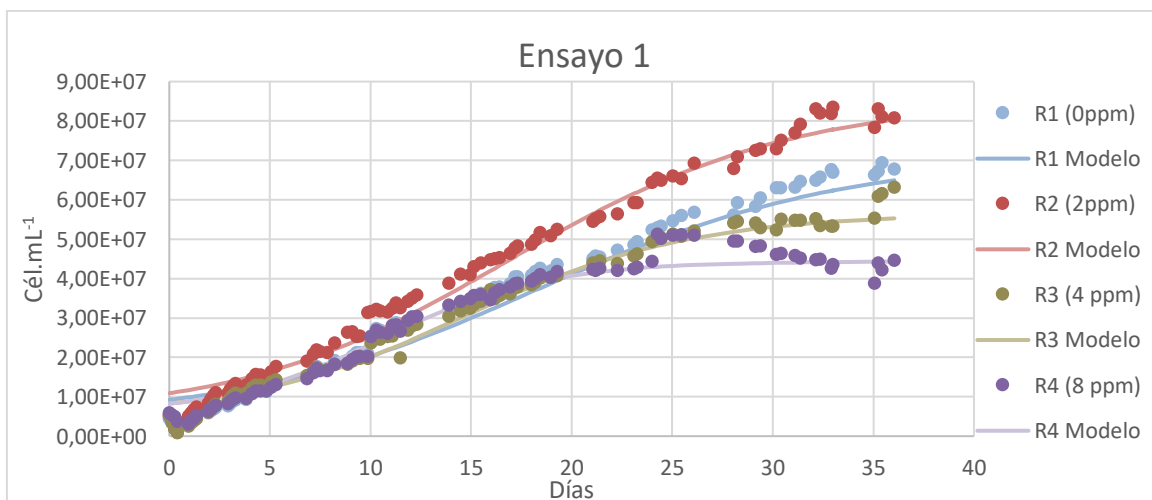


Figura 11 Evolución de la biomasa de microalgas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 1). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering (1990).

La densidad celular más alta fue registrada en el reactor R2 (2 ppm) de $8,16 \times 10^7$ cél. mL⁻¹. En tabla 5 se puede observar el crecimiento máximo alcanzado y la duración de cada fase de este ensayo. Así como también podemos encontrar los valores de los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990) en la tabla 6.

4.2.2. Velocidad específica de crecimiento

La velocidad específica de crecimiento fue determinada utilizando los valores de la fase exponencial de la curva de crecimiento, estableciendo cuál es la parte de la curva que es aproximadamente lineal y posteriormente determinando la pendiente.

En el ensayo E1 los valores de μ son semejantes en los R1 y R2 con 0,0046 y 0,0049 h⁻¹. En los reactores R3 y R4 que presentan mayor concentración de zinc la velocidad específica de crecimiento disminuyó, pudiendo determinar estos valores en la tabla 5.

Tabla 5 Fases de crecimiento del ensayo E1, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento.

Reactores	Zn (ppm)	Fase de adaptación (lag)(días)	Fase exponencial (días)	Fase estacionaria (días)	Muerte celular (días)	Concentración máxima (cel.mL-1)	Velocidad específica de crecimiento, μ (h ⁻¹)
R1	0	0-2	3-28	-	-	6,70E+07	0,0046
R2	2	0-1	2-28	-	-	8,16E+07	0,0049
R3	4	0-1	2-23	-	-	6,03E+07	0,0046
R4	8	0-1	2-18	-	-	4,29E+07	0,0058

Tabla 6 Valores de los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990) E1.

Reactores	Zn ppm	Duración fase de adaptación (lag), λ (h)	Amplitud de la curva, A	Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{max} (h ⁻¹)
R1	0	40,60	2,81	0,0040
R2	2	28,00	2,81	0,0039
R3	4	66,02	2,37	0,0047
R4	8	95,84	2,06	0,0059

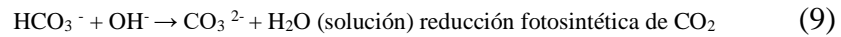
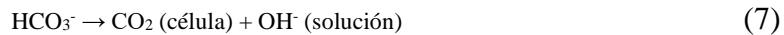
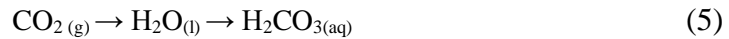
4.2.3. Evolución del pH en el crecimiento de la biomasa

El pH inicial en los 4 reactores fue de $6,4 \pm 0,2$ y al finalizar el ensayo se obtuvo que el pH sufrió un ascenso en todos los reactores, alcanzando un valor entre 9,5-10, presentando los valores más elevados en R3 y R4 con mayor concentración de zinc.

El trabajo de García et al., (2015) muestra el mismo comportamiento del pH que se observa en el presente experimento, en el cual la actividad fotosintética de las microalgas en un medio de cultivo lleva al incremento de pH de manera progresiva debido al efecto de especies carbonatadas en el agua. Durante el periodo de luz las microalgas asimilan el CO₂ por el proceso de fotosíntesis.

El CO₂, al disolverse en agua, forma moléculas de ácido carbónico (H₂CO₃). Este ácido se disocia en diferentes especies (H₂CO₃, HCO₃⁻ o CO₃²⁻) dependiendo del pH.

En el proceso de fotosíntesis realizadas por las microalgas se da la alcalinización del medio como consecuente aumento de pH. Éste aumento se presenta debido a la absorción del CO_{2(aq)} durante la fotosíntesis cuando de la conversión de HCO₃⁻ externo en CO₂ y OH⁻. El CO₂ activo es utilizado por la célula a través de la bomba de CO₂. Las ecuaciones 7 y 11 describen la conversión de CO₂ en HCO₃⁻ en el agua, como fijador de CO₂ fotosintético:



La solubilización del CO₂ atmosférico para producir H₂CO_{3(aq)} (7) es seguida por la conversión en HCO₃⁻ y H⁺ (8). El HCO₃⁻ es convertida en CO₂ y OH⁻ durante la absorción activa por las aguas (9) y el CO₂, es reducido por el proceso de fotosíntesis a (CHO)_n en el interior de la célula (10). El ion OH⁻ producido por la bomba de CO₂ resulta en aumento del pH del agua. Así las algas verdes utilizan la energía fotosintética el CO₂ de la bomba y alcalinizan el medio (Cândido, 2018).

4.2.4. Efecto de luz y oscuridad en el crecimiento celular

En las primeras dos semanas las mediciones fueron tomadas 4 veces al día en intervalos aproximadamente de 6 horas, dos mediciones expuestas a oscuridad o cercanas y dos mediciones en horas de luz, con el objetivo de determinar el comportamiento del crecimiento celular ante estas condiciones.

Con esta evaluación se pudo conocer que, en las mediciones realizadas de biomasa de los cultivos aumentó en los periodos de luz, pero hubo un crecimiento lento o incluso la tasa de crecimiento disminuyó en los periodos de obscuridad, la figura 12 muestra claras oscilaciones de aumento y disminución en los periodos de luz/obscuridad.

La disminución de la densidad óptica registrada en las mediciones sugiere que las células presentan esta variación debido a que el metabolismo de las algas durante este periodo provocó oscilaciones en el contenido celular de osmolitos como el glicerol, lo que indujo más la oscilación en el volumen celular durante este periodo. (Xu, Ibrahim, & Harvey, 2016)

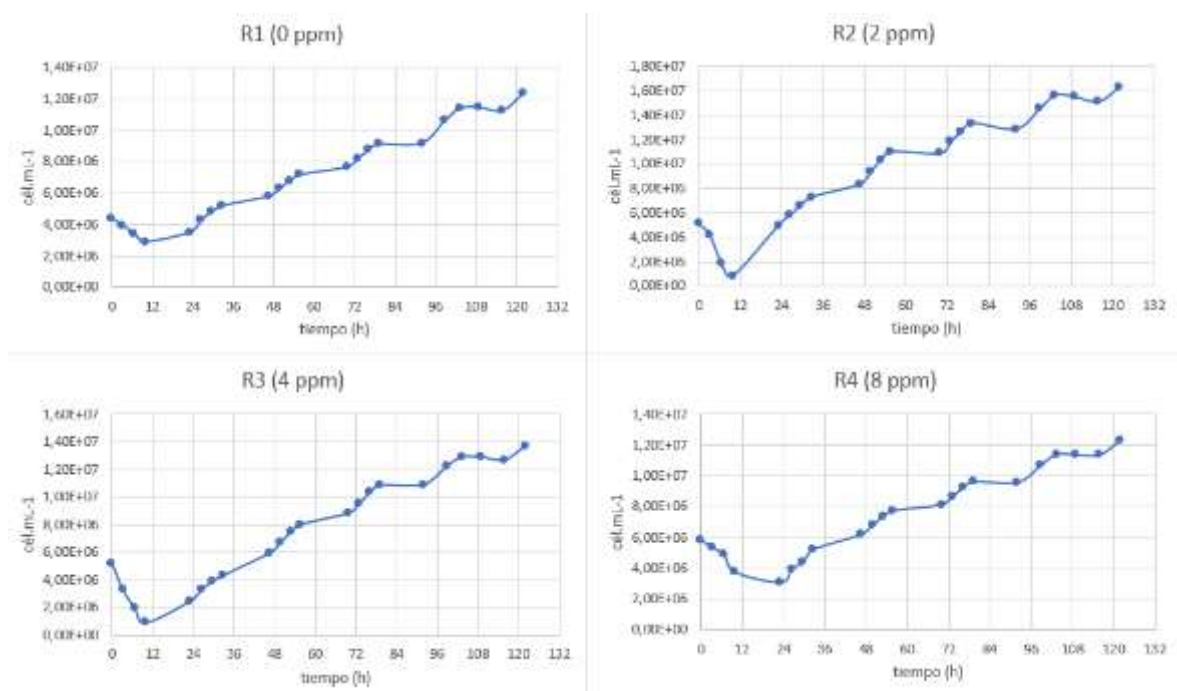


Figura 12 Influencia de la luz en de la densidad de la biomasa en las diferentes concentraciones de zinc.

4.3. Segundo experimento E2 (adaptación)

Después de la realización del ensayo 1 se decidió aumentar las concentraciones de zinc en el ensayo 2, con el fin de observar efectos más pronunciados en su crecimiento. Se inoculó en los 6 reactores la biomasa del reactor 2 (R2, 2 ppm) del ensayo inicial E1, a diferentes concentraciones de zinc por un periodo de 63 días.

4.3.1. Cinética de crecimiento

En la figura 13 podemos observar las curvas de crecimiento de los diferentes reactores, teniendo un mayor crecimiento en el reactor 1 (0 ppm) con una concentración celular máxima alcanzada de $1,20 \times 10^8$ cél. mL⁻¹, para los reactores R2, R3, R4 y R5 la fase de adaptación fue entre 4 y 6 días, lo que difiere del reactor R6 en el que su fase de latencia tuvo un tiempo más pronunciado, cabe mencionar que en este periodo de tiempo R6 tuvo lugar a una adaptación de las células pudiendo aumentar su concentración celular inclusive mayor a la de R5 y obteniendo una capacidad de sobrevivir más tiempo que R4 y R5. Las fases de crecimiento en los reactores se pueden determinar en la tabla 7. El reactor R4 (26 ppm) fue el que tuvo un mejor crecimiento obteniendo una concentración máxima de $1,18 \times 10^8$ cél.mL⁻¹ después del R1 con $1,20 \times 10^8$ cél.mL⁻¹ y una velocidad específica de crecimiento de $0,010$ h⁻¹ y $0,011$ h⁻¹ respectivamente, pasando al reactores R2 con una concentración máxima de $1,09 \times 10^8$ cél.mL⁻¹ y R3 con $9,68 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, presentando velocidad específica de crecimiento de $0,012$ h⁻¹ y $0,010$ h⁻¹.

El crecimiento elevado que presenta el reactor R4 se justifica posiblemente por la mayor aireación del compresor en este reactor, a pesar de que fue regulado en lo posible a condiciones similares la salida de aire por las válvulas, pudo existir mayor cantidad de este flujo al reactor R4 ocasionando mejor condición para su desarrollo. Los reactores R5 y R6 fueron los que obtuvieron un menor crecimiento de todos los reactores debido a su mayor concentración de zinc a 38 y 50 ppm respectivamente. El reactor R5 alcanzó su concentración máxima de crecimiento de $8,60 \times 10^7$ cél.mL⁻¹ menor que la del reactor R6 hasta $9,92 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, además de R5 llegar primero a la fase de muerte. En la tabla 8 podemos encontrar los valores de los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990).

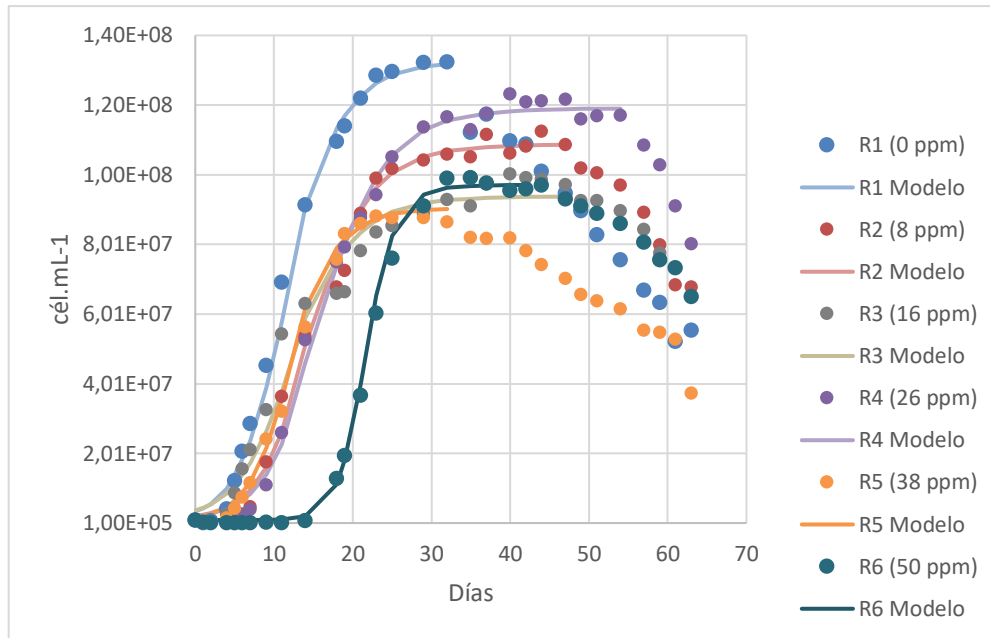


Figura 13 Evolución de la biomasa de microalgas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 2). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering, (1990).

Tabla 7 Fases de crecimiento del ensayo E2, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento.

Reactores	Zn (ppm)	Fase de adaptación (lag)(días)	Fase exponencial (días)	Fase estacionaria (días)	Muerte celular (días)	Concentración máxima (cel.mL-1)	Velocidad específica de crecimiento, μ (h^{-1})
R1	0	0-3	4-21	22-32	33-68	1,20E+08	0,011
R2	8	0-6	7-23	24-47	48-68	1,09E+08	0,012
R3	16	0-4	5-21	22-47	48-68	9,68E+07	0,010
R4	26	0-6	7-25	26-47	48-68	1,18E+08	0,010
R5	38	0-4	5-19	20-32	33-68	8,60E+07	0,012
R6	50	0-14	15-29	30-44	45-68	9,92E+07	0,015

Tabla 8 Valores de los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990) E2.

Reactores	Zn ppm	Duración fase de adaptación (lag), λ	Amplitud de la curva, A	Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{max} (h^{-1})
R1	0	8,01	4,97	0,013
R2	8	49,74	4,75	0,010
R3	16	2,00	4,41	0,010
R4	26	67,76	4,86	0,010
R5	38	68,04	4,56	0,013
R6	50	364,07	4,61	0,018

4.3.2. Evolución del pH

En el transcurso de los 68 días del crecimiento algal, mediante verificación de pH se pudo determinar que hubo una variación de este en todos los reactores pudiendo ser observada en la figura 14.

Inicialmente se presentaron valores entre de $6,5 \pm 0,2$ en todos los reactores y posteriormente se registró un aumento, para los reactores con baja concentración de zinc, el pH fue aumento progresivamente con un máximo alcanzado de 10,8 cerca del día 14, y a partir de esa semana comenzó a tener un decrecimiento llegando a un valor entre 8,5 – 9 durante su crecimiento exponencial, se puede observar que este decrecimiento se presenta cuando la biomasa comienza su estado estacionario. Para los reactores con mayor concentración de zinc, donde la densidad celular es menor se registró valores de pH entre 8,5-9,0. Por su parte, el reactor 4 alcanzó también un buen crecimiento algal teniendo un aumento mayor a 10, a partir de esta semana tuvo una disminución al igual que el reactor R1. Se puede observar que esta disminución comienza cuando entra en fase estacionaria. El reactor R2, R3 y R4 tuvieron un comportamiento semejante en la variación de pH alcanzando un valor mayor a 9 cerca del día 14 y teniendo una disminución leve en el transcurso del ensayo. El reactor R6 comenzó a aumentar después de la fase de adaptación cuando las microalgas comenzaron a aumentar la concentración celular el pH también aumentó.

En la figura 15 podemos encontrar la variación del pH en los 6 reactores donde se puede determinar el mayor aumento de pH fue en R1 donde tuvo mejores condiciones para su crecimiento celular, mientras que el reactor R6 presentó un incremento solo después de la fase de latencia, cuando la concentración celular comenzó a aumentar.

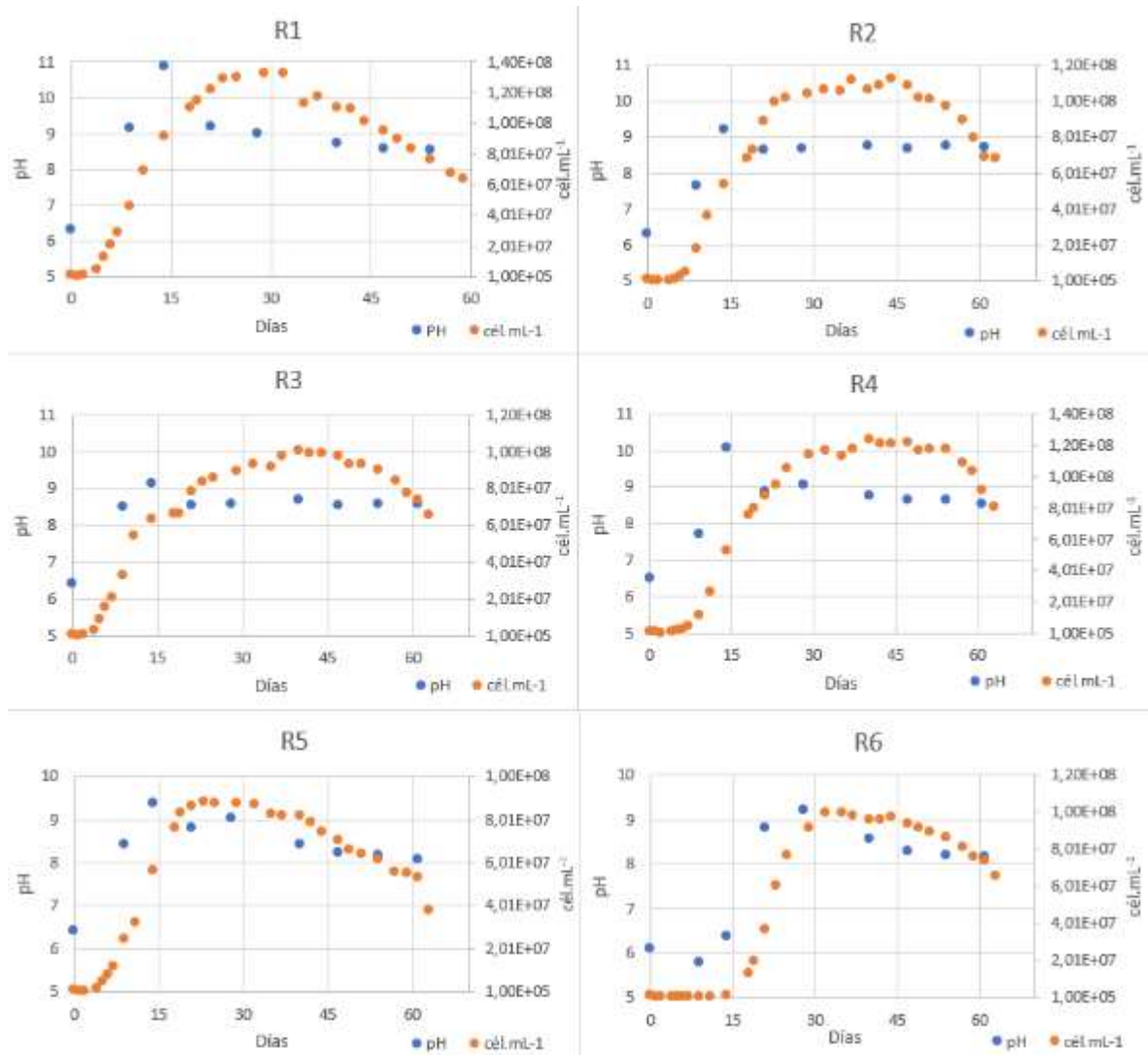


Figura 14 Variación del pH ensayo E2.

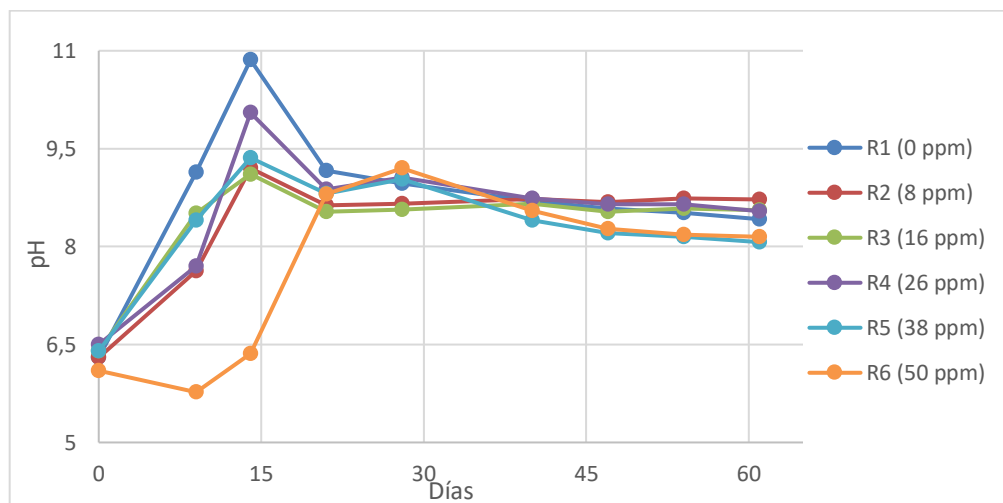


Figura 15 Comparación de la variación de pH de los reactores del ensayo E2

4.4. Tercer experimento E3 (adaptación)

En este ensayo fue utilizado la biomasa del R6 (50 ppm) del ensayo E2 para todos los reactores teniendo una duración de 38 días.

4.4.1. Cinética de crecimiento

La figura 16 muestra la curva de crecimiento con el ajuste del modelo de los 5 reactores, donde podemos determinar que en el reactor R1 (50 ppm) y R2 (60 ppm) el crecimiento celular fue similar tanto en el número máximo de células alcanzadas como en el paso de las fases de crecimiento. A medida que la concentración aumento R3 (75 ppm) disminuye su crecimiento celular. Para el reactor R4 (90 ppm) se puede observar además de su disminución del crecimiento, el periodo de latencia es más pronunciado comparado con los reactores que presentan menor concentración de zinc, y aun mayor es la fase de latencia con un periodo de 18 días para el reactor R5 con 100 ppm de Zn, teniendo como un máximo de crecimiento celular de $1,75 \times 10^7$ cél.mL⁻¹.

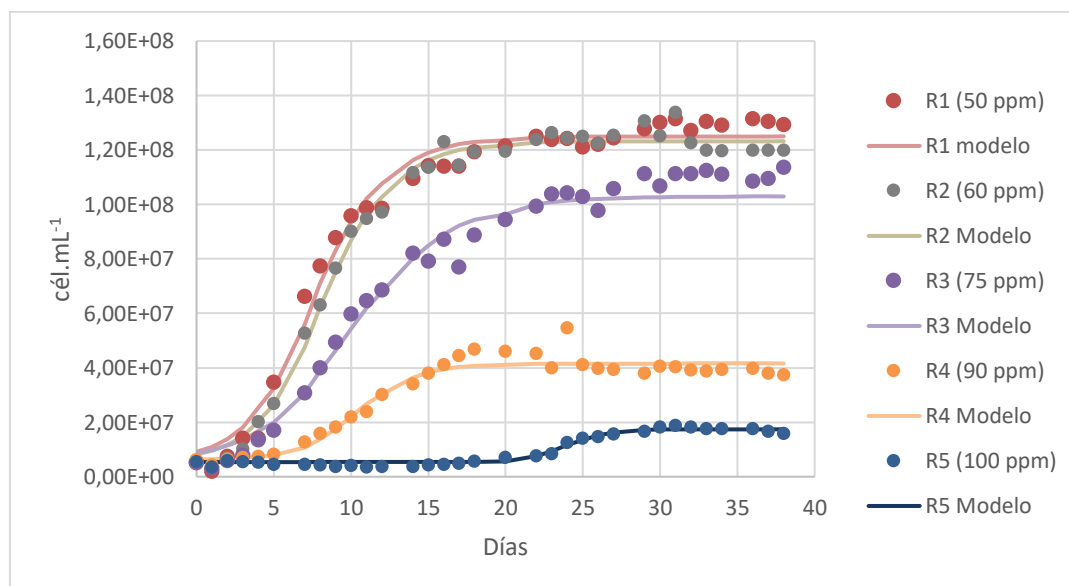


Figura 16 Evolución de la biomasa de microalgas pre-adaptadas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 3). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Zwietering, (1990).

Comparando las curvas de crecimiento del reactor R6 del ensayo E2 a 50 ppm con el reactor R1 del ensayo E3 a 50 ppm (pre adaptado) podemos determinar que el reactor R6 del ensayo E2 tuvo una fase de inducción de largo periodo y aproximadamente al día 15 alcanzó un crecimiento exponencial hasta llegar a una concentración máxima de crecimiento de $9,92 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, mientras que el reactor R1 del ensayo E3 presentó una fase de adaptación aproximadamente al día 4 siendo esta más rápida debido a una adaptación que sufrió la biomasa en el ensayo E2 a esta concentración de zinc, por lo que tuvo un mejor crecimiento y una mayor concentración celular de $1,30 \times 10^8$ cél.mL⁻¹. Se puede evidenciar el proceso de adaptabilidad que tuvo la microalga *Chlorella vulgaris* a concentraciones elevadas de zinc. En la figura 17 se muestra el mayor aumento en la densidad celular al ser estas células pre-adaptadas a la misma concentración, con una fase de latencia corta.

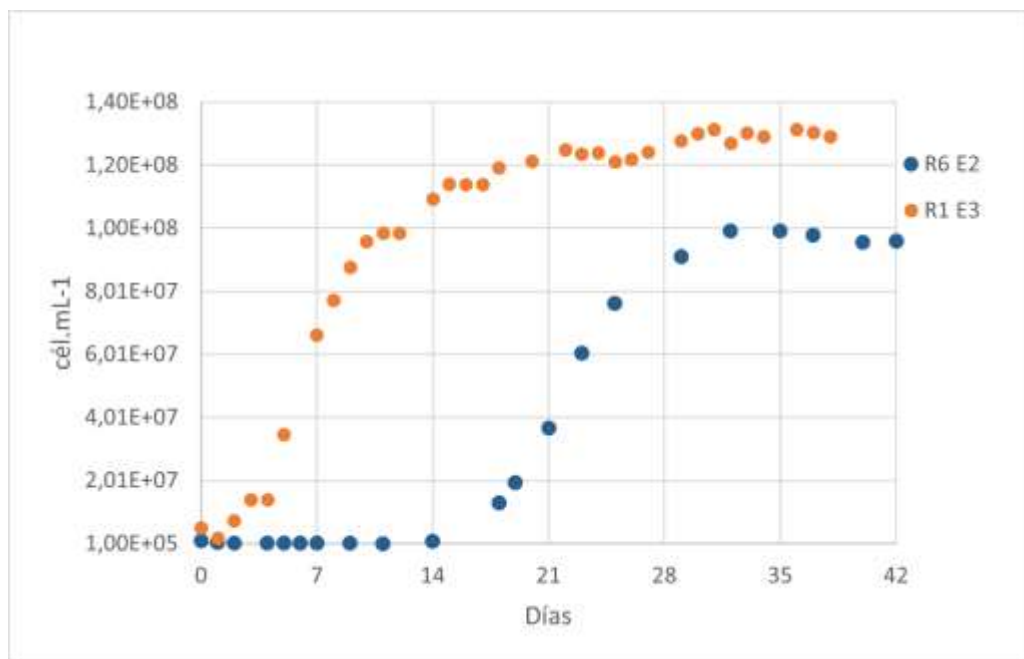


Figura 17 Comparación de células de *Chlorella vulgaris* sin adaptación (E2-R6) y con adaptación (E3-R1) a 50 ppm de zinc.

Las diferentes fases en la curva de crecimiento en este ensayo se muestran en la tabla 9, en la que podemos determinar que los reactores presentaron una adaptación en un periodo de aproximadamente 5 días, mientras que para el reactor R6 con mayor concentración de zinc a 100 ppm su proceso de adaptabilidad fue más extenso, durante un periodo de 18 días. Este reactor no tuvo un buen crecimiento celular siendo su máximo de $1,75 \times 10^7$ cél.mL⁻¹, presentando una velocidad específica de crecimiento de $0,0046 \text{ h}^{-1}$ a diferencia del reactor R1 y R2 con un valor de $0,058$ y $0,0053 \text{ h}^{-1}$ respectivamente. Se presentaron valores mayores

de μ en los reactores con mayor concentración celular y por ende con menor cantidad de zinc en el medio. En la tabla 10 podemos encontrar los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990)

Tabla 9 Fases de crecimiento del ensayo E3, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento.

Reactores	Zn (ppm)	Fase de adaptación (lag)(días)	Fase exponencial (días)	Fase estacionaria (días)	Muerte celular (días)	Concentración máxima (cel.mL-1)	Velocidad específica de crecimiento, μ (h ⁻¹)
R1	50	0-4	5-11	12-38	-	1,30E+08	0,0058
R2	60	0-3	4-14	15-38	-	1,27E+08	0,0053
R3	75	0-3	4-16	17-38	-	1,10E+08	0,0049
R4	90	0-5	6-16	17-38	-	4,21E+07	0,0049
R5	100	0-18	19-26	27-38	-	1,75E+07	0,0046

Tabla 10 Valores de los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990) E3.

Reactores	Zn ppm	Duración fase de adaptación (lag), λ (h)	Amplitud de la curva, A	Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{max} (h ⁻¹)
R1	0	3,04	3,98	0,013
R2	8	30,70	3,20	0,013
R3	16	49,13	3,16	0,013
R4	26	45,27	3,00	0,009
R5	38	155,57	1,90	0,010
R6	50	513,87	1,18	0,009

4.4.2. Evolución del pH

En el transcurso de los 38 días del crecimiento algal, mediante verificación de pH se pudo determinar que hubo una variación de este en todos los reactores pudiendo ser observada en la figura 18.

Inicialmente se presentaron valores aproximados entre 5 y 6 en todos los reactores y posteriormente se registró un incremento, el reactor R1y R2 tuvieron un comportamiento similar, aumentando en el día 7 alcanzando un valor aproximado de 8,5 y posteriormente tuvo una disminución lenta, este incremento se da en la fase exponencial. Los reactores R3 y R4 presentan un máximo crecimiento en el día 14, sufriendo una disminución lenta a partir de esa semana. Por su parte, el reactor 5 presentó un incremento lento, teniendo como máximo alcanzando valores que no superan los 8 cerca del día 28.

En la figura 19 podemos encontrar la variación del pH en los 5 reactores donde se puede determinar el mayor aumento de pH fue en R1 con mejores condiciones para su crecimiento celular, mientras que el reactor R5 presentó un incremento hasta 8 y posteriormente tuvo un descenso.

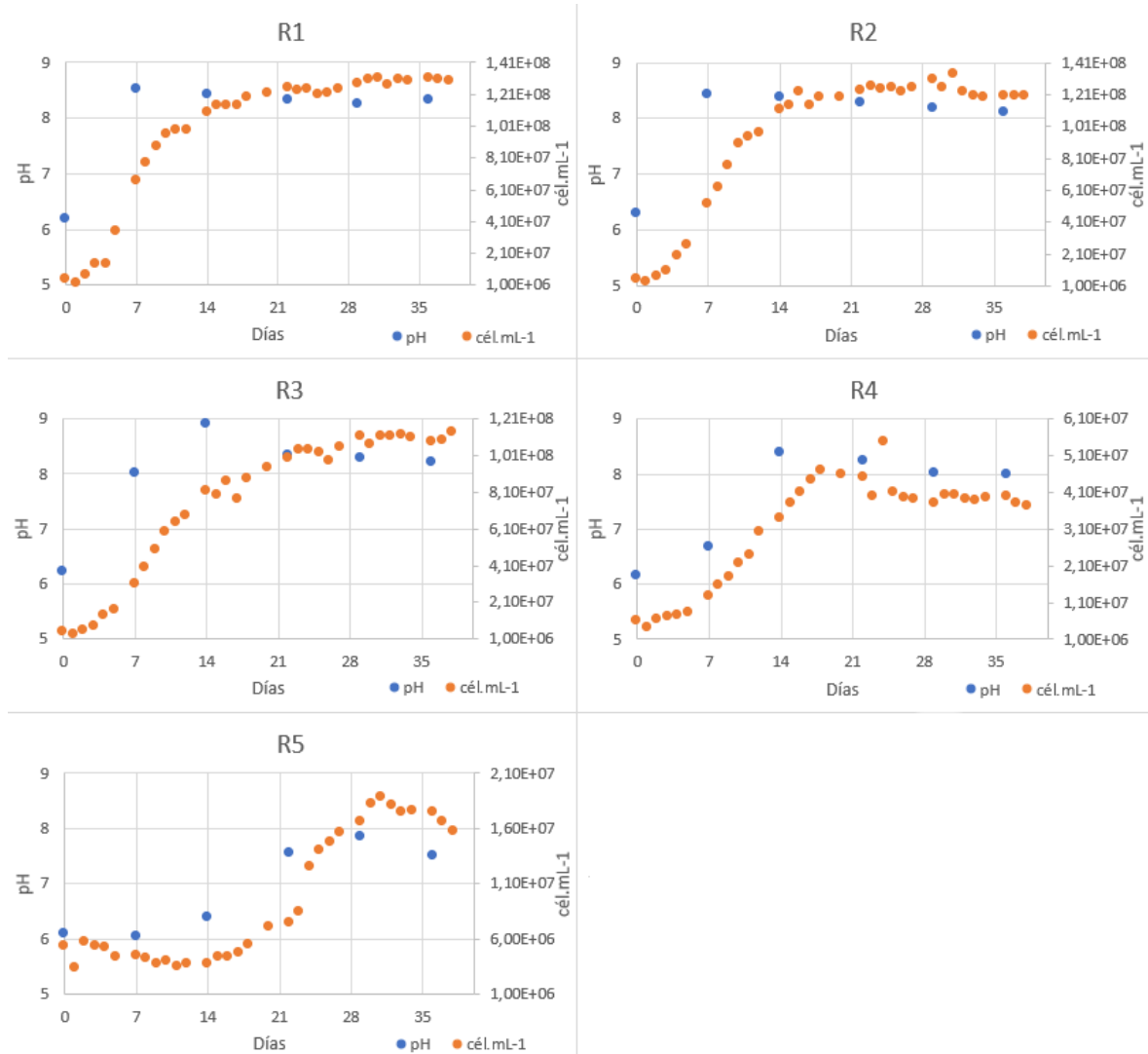


Figura 18 Variación del pH ensayo E3.

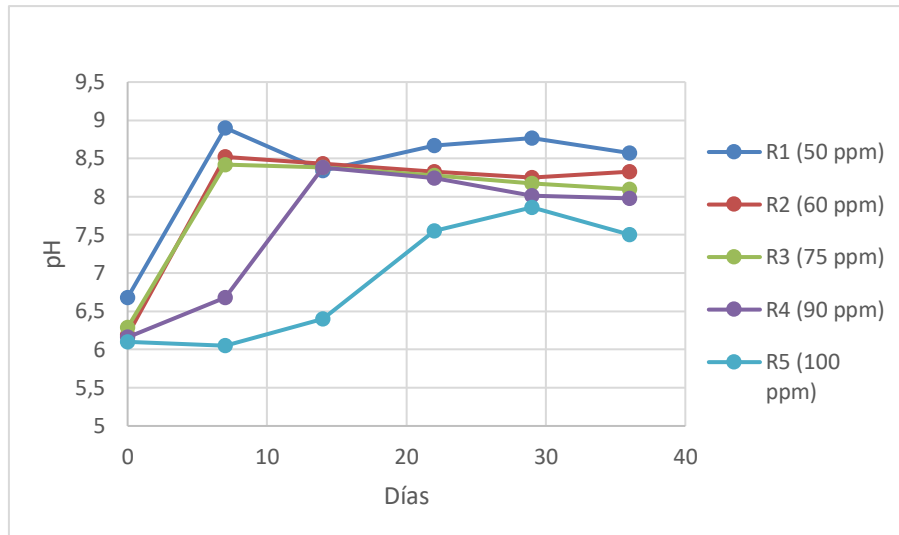


Figura 19 Comparación de la variación de pH de los reactores del ensayo E3

4.5. Remoción de zinc E4

4.5.1. Cinética de crecimiento

En este ensayo se determinó que el mayor crecimiento celular fue en el reactor 2 R2 ya que presenta una concentración de 2 ppm lo que se considera un valor adecuado para un normal desarrollo de las microalgas, obteniendo una máxima densidad de $9,90 \times 10^7 \text{ cel.mL}^{-1}$. La concentración celular máxima alcanzada la puede observar en la tabla 11, así como también podemos determinar que la velocidad específica de crecimiento para todos los reactores presente un valor similar. El periodo de adaptabilidad fue similar para todos los reactores entre 0-1 días para los de menor concentración R1 y R2 y entre 1-2 para los de mayor concentración R3 y R4 respectivamente. Todos los reactores durante este periodo de 15 días se encontraban en una fase de crecimiento exponencial. En la figura 20 podemos encontrar las curvas de crecimiento de este ensayo. En la tabla 12 podemos encontrar los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Zwietering (1990).

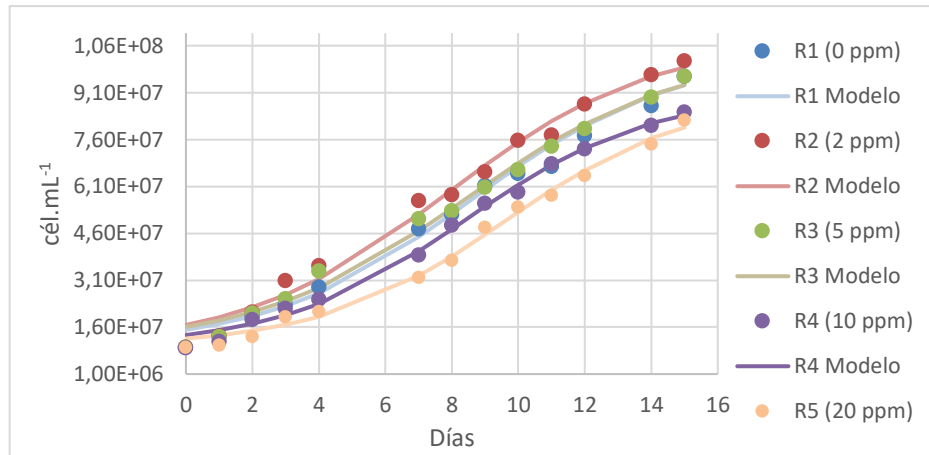


Figura 20 Evolución de la biomasa de microalgas a diferentes concentraciones de metal (Ensayo 4). Los símbolos redondos son datos experimentales y las líneas continuas representan los datos ajustados por el modelo empírico de Ziwietering, (1990).

Tabla 11 Fases de crecimiento del ensayo E4, concentración máxima y velocidad específica de crecimiento.

Reactores	Zn (ppm)	Fase de adaptación (lag)(días)	Fase exponencial (días)	Fase estacionaria (días)	Muerte celular (días)	Concentración máxima (cel.mL ⁻¹)	Velocidad específica de crecimiento, μ (h ⁻¹)
R1	0	0-1	2-15	-	-	9,16E+07	0,007
R2	2	0-1	2-15	-	-	9,90E+07	0,008
R3	5	0-1	2-15	-	-	9,31E+07	0,007
R4	10	0-1	2-15	-	-	8,28E+07	0,008
R5	20	0-3	4-15	-	-	7,85E+07	0,007

Tabla 12 Valores de los parámetros A , μ_{max} y λ de la aplicación del modelo empírico de Ziwietering (1990) E4.

Reactores	Zn ppm	Duración fase de adaptación (lag), λ (h)	Amplitud de la curva, A	Velocidad específica máxima de crecimiento, μ_{max} (h ⁻¹)
R1	0	36,630	2,387	0,007
R2	8	18,072	2,439	0,007
R3	16	26,992	2,396	0,006
R4	26	52,900	2,270	0,009
R5	38	82,300	2,254	0,006

4.5.2. Evolución del pH

La medición de pH fue realizada diariamente durante los 15 días de ensayo, en el que se pudo determinar el aumento progresivo en los 5 reactores con un valor máximo en el reactor R1 cerca de 9. Los reactores tuvieron un valor inicial de aproximadamente 6,2 y

posteriormente sufrieron un incremento. La figura 21 presenta el aumento del pH en función del tiempo, así como también el crecimiento microalgal.

En la figura 22 presenta la variación del pH de los reactores, para poder hacer una comparación de estos, donde podemos observar la similitud en el comportamiento de los reactores R1, R2 y R3, y R4, sin embargo, el reactor R5 tuvo un crecimiento lento debido a la concentración de zinc presente en el medio.

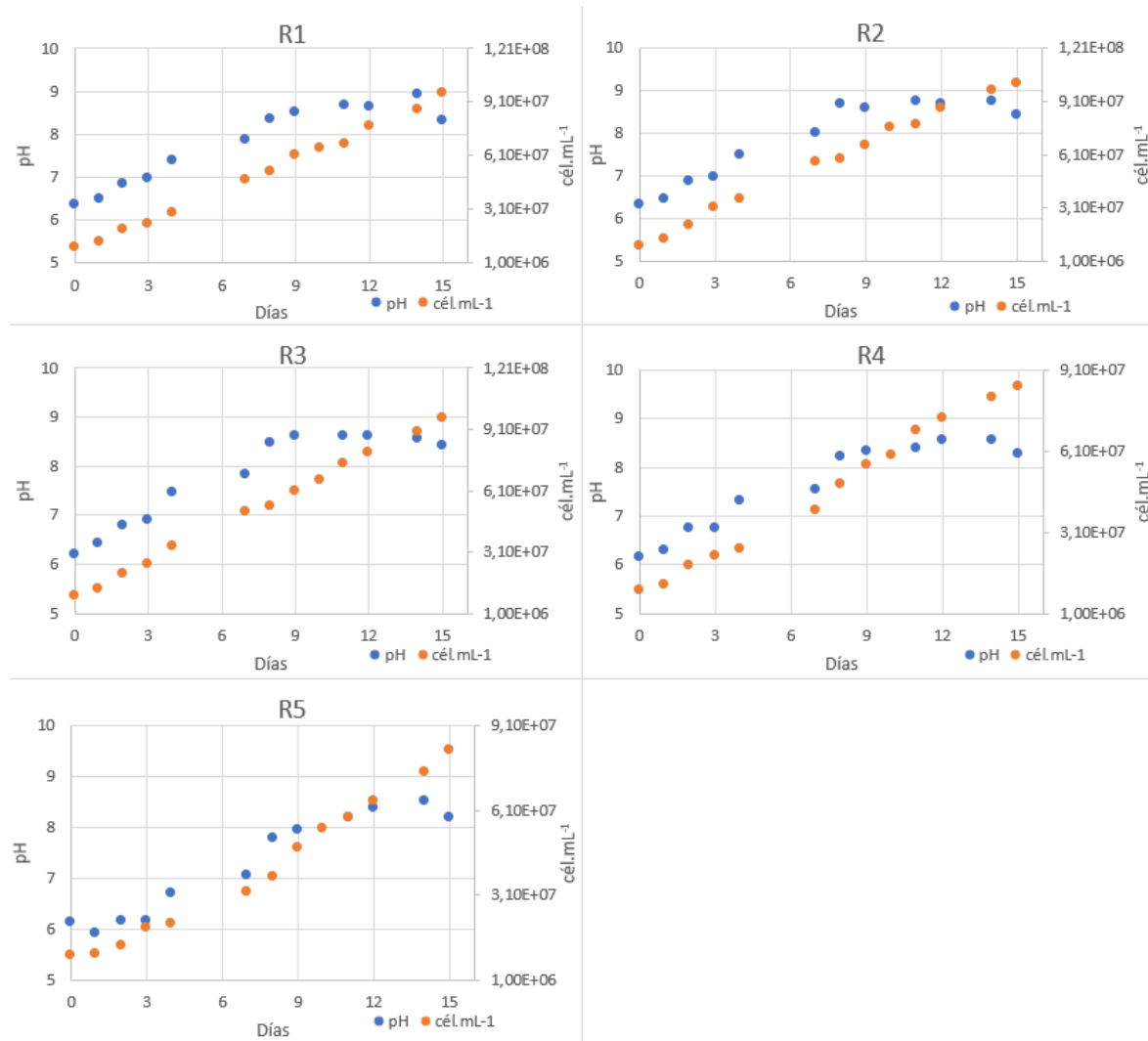


Figura 21 Variación del pH ensayo E4

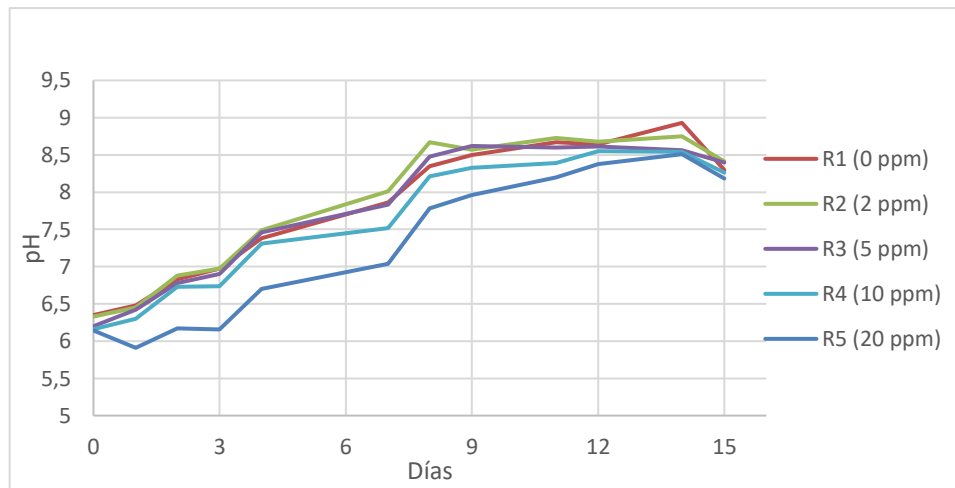


Figura 22 Variación del pH

4.5.3. Remoción del zinc

Tal vez uno de los aspectos más llamativos del uso de microalgas es la capacidad de remoción de diferentes contaminantes en cuerpos de agua, principalmente metales pesados (Pérez, 2016), en el presente trabajo se pudieron evidenciar reducciones en las diferentes concentraciones de zinc.

Las rectas de calibración obtenidas presentaron un buen coeficiente de correlación, este hecho torna los valores detectados de absorbancia y los calculados más fiables, cuyos resultados se encuentran presentados en los Anexo 2, 3 y 4.

Durante la fase experimental de la remoción del zinc se realizó un protocolo para los días de medición de la absorción, ya que se determinó un aumento de pH de (6,5-8,8). El pH es una variable determinante para calcular la cantidad de remoción del metal, ya que este aumento ocasiona precipitación química, siendo necesario ajustar los valores de pH de la muestra del medio de cultivo, para diluir este precipitado y obtener verdaderos datos de remoción de la microalga. En el punto 4.2.2 se explica la influencia del pH.

La capacidad de remoción de la microalga *Chlorella vulgaris*, se evaluó mediante el porcentaje de remoción de zinc que se encontraba en el reactor después de la acidificación de la muestra, en los cálculos realizados se consideró como valores de concentración inicial a los resultantes de la acidificación (soporte de control).

La remoción de Zn por *Chlorella vulgaris* estuvo en relación directa con la concentración del metal, removiendo 25% del reactor R2 y 53,72% del reactor R5; a baja y alta concentración 2 ppm y 20 ppm respectivamente. Las cantidades de Zn removidas en ambos casos fueron significativamente diferentes. En el caso de las bajas concentraciones, puede deberse a que este metal está siendo utilizado por la microalga como nutriente.

La remoción del zinc por la microalga a concentraciones elevadas a 20 ppm fue en el día 3 fue de 8,23%, en el día 10 de 28,11% en el día 15 de 53,72%, esto evidencia confirmando la contribución de la remoción por la biomasa. En la tabla 13 muestra el porcentaje de remoción que resulto en las diferentes concentraciones de zinc y al aumento de la densidad celular.

Finalmente, se considera una influencia del valor de pH inicial en la sorción del metal. A valores de pH bajos la remoción fue insignificante, por el contrario, la capacidad de sorción aumentó al aumentar el pH inicial, así como también el aumento en la concentración de biomasa disminuyó la concentración de metal en equilibrio y, a su vez, aumentó el porcentaje de eliminación de metal del medio.

Tabla 13 % de Remoción de Zn por la microalga a diferente concentración y en distinto periodo de tiempo.

Reactor	[Zn] (ppm)	Día 3			Día 10			Día 15		
		I Control	I Reactor	% Remoción	II Control	II Reactor	% Remoción	III Control	III Reactor	% Remoción
R1	0	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%
R2	2	2,2	2,1	4,55%	2,1	1,7	19,05%	2	1,5	25,00%
R3	5	5,2	4,9	5,77%	4,9	4,5	8,16%	4,7	3,7	21,28%
R4	10	10,2	9,2	9,80%	9,3	7,2	22,58%	8,2	6,5	20,73%
R5	20	19,2	15,7	18,23%	18,5	13,3	28,11%	18,8	8,7	53,72%

En la tabla 14 podemos encontrar valores de la remoción del zinc expresado en cantidad de zinc por célula a concentraciones (R/biomasa) diferentes realizados en el ensayo E4.

Tabla 14 Remoción del Zinc por célula

Reactores	tiempo (días)	ΔX cél/L	[Zn] _{ad} ppm	[Zn] _{control} ppm	[Zn] _{test} ppm	R/biomasa mg _{Zn} /10 ⁶ cél.
R1	3	2,32E+10	0	0	0	0
	10	6,52E+10		0	0	0
	15	9,62E+10		0	0	0
R2	3	3,09E+10	2	2,2	2,1	
	10	7,58E+10		2,1	1,7	6,68E-6
	15	1,01E+11		2	1,5	3,94E-6
R3	3	2,51E+10	5	5,2	4,9	
	10	6,63E+10		4,9	4,5	2,43E-6
	15	9,63E+10		4,7	3,7	2,00E-5
R4	3	2,20E+10	10	10,2	9,2	
	10	5,92E+10		9,3	7,2	2,96E-5
	15	8,48E+10		8,2	6,5	1,56E-2
R5	3	1,94E+10	20	19,2	15,7	
	10	5,45E+10		18,5	13,3	4,84E-5
	15	8,22E+10		18,8	8,7	1,77E-4

4.6. Factores que influenciaron el crecimiento del cultivo y remoción del Zn

Un factor influyente es la intensidad de luz, a pesar de que todos los ensayos fueron realizados con la misma intensidad de luz la disponibilidad de esta por parte de las microalgas depende de la trayectoria de luz que pudo variar en los reactores debido a la diferencia del material y el tipo de diámetro de estos.

Otro factor que influye en el crecimiento de un cultivo de microalgas es la temperatura, ya que no se mantuvo constante en los ensayos. El estudio fue realizado en diferentes estaciones del año donde existió una variación de la temperatura ambiente.

La aireación es importante como proveedor de fuente de carbón (CO₂), para la distribución de nutriente y evitar la sedimentación, en los ensayos realizados se implementó este mecanismo de inyección de aire, tratando en lo posible de proveer la misma cantidad en todos los reactores, sin embargo, pudo tener una desigualdad entre estos debido a la poca precisión de flujo de aire por parte de los reguladores utilizados. De igual manera el tipo de sistema incorporado para la aireación en los reactores fue diferente principalmente en el

ensayo 1 donde por su volumen y tipo de sistema no pudo tener una buena recirculación de aire por ende una homogenización del medio; sin embargo, tuvo un buen crecimiento celular.

La precipitación química de algunos metales es dependiente del pH, ya que bajo condiciones de alcalinidad estos disminuyen su solubilidad y pueden reaccionar con hidróxidos para finalmente precipitar (Pérez, 2016).

Un incremento en el pH del medio repercute en la química de los metales traza de tres formas principalmente: a) la complejación de los metales ligándolos conforme el CO_3^{2-} o el OH^- aumenta, b) la afinidad efectiva de los quelantes por varios metales puede aumentar como resultado de la disminución de los iones hidrógeno por el ligando y, c) la solubilidad de los metales que forman hidróxidos o carbonatos puede cambiar (López, 2017).

En un intento por superar las dificultades para cuantificar la absorción de metales, se realizaron pruebas con soluciones tampón de ftalato de hidrógeno y potasio $\text{KHC}_8\text{O}_4\text{H}_4$ / NaOH , ajustando el pH a alrededor de 4,5. Los resultados mostraron una sorción de metal insignificante (Arellano, 2007).

5. Conclusiones

Los metales pesados presentes en los cuerpos hídricos por actividad industrial es un problema que causa impacto negativo en el medio ambiente y en la salud pública, el cual debe ser controlado en sus principales fuentes emisoras, implementando metodologías complementarias a las plantas de tratamiento de aguas residuales convencionales disminuyendo la concentración del metal.

La microalga *Chlorella vulgaris* posee la capacidad de reproducirse en medios contaminados por Zn, que depende de la concentración adicionada para que su crecimiento celular sea mayor o menor.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo evidencian que *Chlorella vulgaris* exhibió una capacidad de adaptación a diferentes concentraciones de zinc, cuyos valores pueden estar presentes en cuerpos de agua superficiales. Esta capacidad que presenta la microalga la convierte en una alternativa potencial para tratamientos de aguas residuales.

La microalga *Chlorella vulgaris* tuvo una buena adaptación en medios con concentraciones elevadas de zinc en la mayoría de los ensayos (hasta los 75 ppm), demostrando en el incremento de la densidad celular a través de la curva de crecimiento a esta concentración.

La microalga posee una alta velocidad de crecimiento lo que permitió conocer en poco tiempo la capacidad de adaptabilidad y remoción del metal, su manipulación es relativamente sencilla en laboratorio.

La remoción de zinc por la microalga estuvo relacionada directamente con la densidad celular y la cantidad de zinc en el medio, a mayor concentración del metal y densidad celular, mayor es la capacidad de remoción observada.

La eficiencia de remoción de metales por las microalgas depende de ciertas condiciones del medio como la intensidad luminosa, el pH, edad del cultivo, cantidad inicial implementada y los contaminantes que afectan la composición de la biomasa.

La microalga *C. vulgaris* tuvo una buena capacidad de remoción del metal en el medio, logrando una disminución de la concentración del metal hasta un 50%.

El pH fue un factor importante en el proceso de sorción debido a la competencia entre los protones y los cationes metálicos por los sitios activos de la biomasa. Como tendencia general, los niveles de sorción aumentaron con el pH.

El modelo matemático de Zwietering, (1990), proporcionó un ajuste en las variables de la curva de crecimiento de los ensayos.

La adaptación de la biomasa permite alcanzar concentraciones superiores a los valores límite de emisión de aguas residuales industriales, así como también la eficiencia en la eliminación del zinc permite alcanzar concentraciones finales por debajo de los límites correspondientes a 5,0 mg/l Zn, establecidos en el Decreto-Lei n° 236/98, de 1 de agosto (Arellano, 2007).

Referencias Bibliográficas

- Acuerdo N° 97/A Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua. Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Ecuador, 30 de julio del 2015.
- Amaral, M. (2016). *Memoria de tesis doctoral: Tratamiento de aguas residuales con microalgas en reactores abiertos*. 44–188. <https://www.educacion.gob.es/teseo/imprimirFicheroTesis.do?idFichero=r00YhW0Jls%3D>
- Arellano, G. (2007). *Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas*. Centro de investigación científica y de educación superior en ensenada.
- Arenas, R., & Lozada, V. (2016). Determinación de la concentración de cadmio y plomo en papa (*Solanum Tuberosum*) cosechada en las cuencas de los rios Mashcon y Chonta-Cajamarca. *Facultad de Farmacia y Bioquímica*, Universidad Nacional Mayor de SAN MARCOS.
- Aslam, S., Chan, M. W. H., Siddiqui, G., Boczkaj, G., Kazmi, S. J. H., & Kazmi, M. R. (2020). A comprehensive assessment of environmental pollution by means of heavy metal analysis for oysters' 110970. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.110970>
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Bou, L. P., Bernal, I. S., Duarte, C. L., Sardiñas, A. M., Arias, M. E. C., & Valdés, M. E. C. (2018). Biosorción microbiana de metales pesados: Características del proceso. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 6(1), 1–12. <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/216/302>
- Brennan, L., & Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), 557–577. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.10.009>

- Candela, R. (2016). *Las microalgas y el tratamiento de aguas residuales: conceptos y aplicaciones. Unarevisión bibliográfica.* 3345–3356.
- Cândido, G. C. (2018). *Remoção de íons manganês (Mn (II)) utilizando a microalga Chlorella vulgaris.* (Ii).
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143.
- Cartagena, J., & Malo, B. (2017). Evaluación del uso de la microalga *Chlorella vulgaris* en la remoción de materia orgánica de las aguas residuales de la PTAR salitre a nivel laboratorial.
- Caviedes, D., Muñoz, R., Perdomo, A., Rodríguez, D., & Sandoval, I. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Ingeniería y Región*, 13(1), 73. <https://doi.org/10.25054/22161325.710>
- Chowdhury, S., Mazumder, M. A. J., Al-Attas, O., & Husain, T. (2016). Heavy metals in drinking water: Occurrences, implications, and future needs in developing countries. *Science of the Total Environment*, 569–570, 476–488. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.166>
- Decreto.Lei n° 236/98. Diário da República Electrónico. Ministério do Ambiente, Portugal, 1 de agosto de 1998.
- Dewi, E. R. S., & Nuravivah, R. (2018). Potential of Microalgae *Chlorella vulgaris* As Bioremediation Agents of Heavy Metal Pb (Lead) On Culture Media, pp. 3–6. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183105010>
- García, C., Arbib, Z., & Perales, A. (2015). Cinéticas de crecimiento y consumo de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 6(1), 49–68.
- Gomez, L. (2007). Microalgas: Aspectos ecológicos y biotecnológicos. *Revista Cubana de Química*, Vol. XIX, Núm. 2., 3(19). <https://www.redalyc.org/pdf/4435/443543707001.pdf>
- Gonzalez, L. M. (2010). *Influencia de la deficiencia de Nitrógeno y Fósforo en las*

interacciones competitivas entre Chlorella vulgaris Y Scenedesmus acutus. 65.

González, M. (2006). Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *ContactoS*, 59, 64–70.

González, O. (2014). *Efecto de la intensidad de la luz y de la tasa de inyección de aire en el crecimiento y la productividad de la microalga Nannochloropsis sp., cultivada en un biorreactor plano*.

Hamed, S., & Klöck, G. (2014). Improvement of Medium Composition and Utilization of Mixotrophic Cultivation for Green and Blue Green Microalgae towards Biodiesel Production. *Advances in Microbiology*, 04(03), 167–174. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.43022>

Hernández, A., & Labbé, J. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572014000200001>

Kadukova, J. (2016). Surface sorption and nanoparticle production as a silver detoxification mechanism of the freshwater alga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technology*, 216, 406–413. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.05.104>

Kumar, B., Smita, K., Sánchez, E., Stael, C., & Cumbal, L. (2016). Andean Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) shell biomass as new biosorbents for Pb²⁺ and Cu²⁺ ions. *Ecological Engineering*, 93, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.05.034>

Longhi, A. (2012). *Modelos matemáticos para o crescimento microbiano em condições não-isotérmicas Florianópolis*.

López, R. (2017). *Potencial de cepas de microalgas aisladas de la costa de Yucatán, para la producción de biodiesel*.

Mayorga, C., & Manso, L. (2017). Crecimiento de la microalga *Dunaliella salina* en un cultivador Raceway en condiciones de laboratorio. *Revista De Iniciación Científica*, 3, 85–91. Retrieved from <http://revistas.utp.ac.pa/index.php/ric/article/view/1702>

Mejía, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77–99. <https://doi.org/10.21615/210>

- Núñez, M. del P. (2017). *Cultivo a pequeña escala de la especie Chlorella vulgaris para la obtención de aceite*. 2011(2865), 55.
- Perenguez, B., & Valdez, C. (2017). Análisis de remoción de cadmio por acción de microalgas en perlas de alginato. *Tesis*, 1–100. <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>
- Pérez, K. (2016). Uso de *Scenedesmus* para la remoción de metales pesados y nutrientes de aguas residuales para la industria textil. *Ingeniería Solidaria*, 12(20), 95–105. <https://doi.org/10.16925/in.v19i20.1418>
- Plaza, J. (2012). “Remoción de metales pesados empleando algas marinas.” *Universidad De La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.*, 158. Retrieved from http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento_completo_.pdf?sequence=17
- Ramos, R., & Pizarro, R. (2018). Crecimiento y capacidad de biorremediación de *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) cultivada en aguas residuales generadas en el cultivo del pez dorado *Seriola lalandi* (Perciformes: Carangidae). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 53(1), 75–86. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572018000100075>
- Rodríguez, Paola. (2014). *Respuestas biológicas de Scenedesmus ovalternus y Chlorella vulgaris inmovilizadas en alginato de calcio, ante diferentes concentraciones de nutrientes en condiciones de laboratorio*. 128.
- Rodríguez, Pedro, Sánchez, Y., Zumalacárregui, L., Pérez, O., Echeveste, P., & Lombardi, A. (2016). Obtención de biomasa de microalga *Chlorella vulgaris* en un banco de prueba de fotobiorreactores de columna de burbujeo. *Afinidad*, 73(574), 125–129.
- Rojas, R. (2013). Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales. *Universidad Politecnica de Cataluña*, 1(3), 39–51.
- Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35(October 2017), 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

- Silva, F. (2006). Biorremoción de nitrogênio, fósforo e metais pesados (fe , mn , cu , zn) do efluente hidropônico, através do uso de *Chlorella vulgaris*. *Universo*.
- Stephens, E., Ross, I. L., Mussgnug, J. H., Wagner, L. D., Borowitzka, M. A., Posten, C., Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in Plant Science*, 15(10), 554–564. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.06.003>
- Tantte, J. (2018). Evaluación de la capacidad depuradora de *Chlorella vulgaris* Beyerinck inmovilizada en alginato para el tratamiento de aguas residuales de la ciudad de Huaralima. *Universidad Católica Sedes Sapientiae*.
- Téllez, A. (2018). Mecanismos de resistencia a Metales tóxicos (CD) bajo variaciones abióticas en Microalgas. *TIP. Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 21(1), 40–52. <https://doi.org/10.1016/j.recqb.2017.08.005>
- Tipan, M. (2015). USO DE MICROALGAS ENDÉMICAS DEL ECUADOR (*Chlorella* sp. Biotipo 3) EN LA BIOACUMULACIÓN DE INSECTICIDAS A NIVEL DE LABORATORIO. *Determinación De Metales Pesados En Miel De Abeja Para Su Evaluación Como Indicador Ambiental En Zonas Contaminadas, En La Provincia De Pichincha-Ecuador*.
- Torres, D. D., Cáceres Sepúlveda, S., Roa, A. L., Suárez Gelvez, J. H., & Urbina Suárez, N. A. (2017). Utilización de microalgas de la división Chlorophyta en el tratamiento biológico de drenajes ácidos de minas de carbón. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(2), 95–104. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.70429>
- Valdés, M. (2009). *Biosorción de cinc y cadmio de soluciones acuosas por biomasas microbianas*.
- Vega, B., & Voltolina, D. (2007). Capítulo 2: Concentración, recuento celular y tasa de crecimiento. *Métodos y Herramientas Analíticas En La Evaluación de La Biomasa Microalgal*, (January), 10. Recopilado de: <https://www.researchgate.net/publication/253237563>
- Xu, Y., Ibrahim, I. M., & Harvey, P. J. (2016). The influence of photoperiod and light intensity on the growth and photosynthesis of *Dunaliella salina* (chlorophyta) CCAP 19/30. *Plant Physiology and Biochemistry*, 106, 305–315.

<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.021>

Anexos

Anexo 1. Principales actividades industriales generadoras de metales pesados (Zn) (Caviedes et al., 2015)

Tabla A1 Actividades industriales generadoras de metales pesados

Industria	Metales	Contaminación derivada
Minería de metales ferrosos	Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn	Drenaje ácido de mina, relaves, escombreras
Extracción de minerales	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Presencia en las menas como en los subproductos
Fundición	As, Cd, Pb, Tl	Procesado del mineral para obtención de metales
Metalúrgica	Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Zn	Procesado térmico de metales
Aleaciones y aceros	Pb, Mo, Ni, Cu, Cd, As, Te, U, Zn	Fabricación, eliminación y reciclaje de metales. Relaves y escoriales
Gestión de Residuos	Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg, Mn	Incineración de residuos o en lixiviados
Corrosión Metálica	Fe, Cr, Pb, Ni, Co, Zn	Inestabilidad de los metales expuestos al medio ambiente
Galvanoplastia	Cr, Ni, Zn, Cu	Los efluentes líquidos de procesos de recubrimiento
Pinturas y pigmentos	Pb, Cr, As, Ti, Ba, Zn	Residuos acuosos procedentes de la fabricación y el deterioro de la pintura vieja.
Baterías	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Fluido de la pila de residuos, la contaminación del suelo y las aguas subterráneas.
Electrónica	Pb, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Residuos metálicos acuosa y sólida desde el proceso de fabricación y reciclaje
Agricultura y Ganadería	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn, As, Mn, Cu	Contaminación de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas, la bioacumulación planta

Anexo 2. Recta de calibración del zinc, medición 1

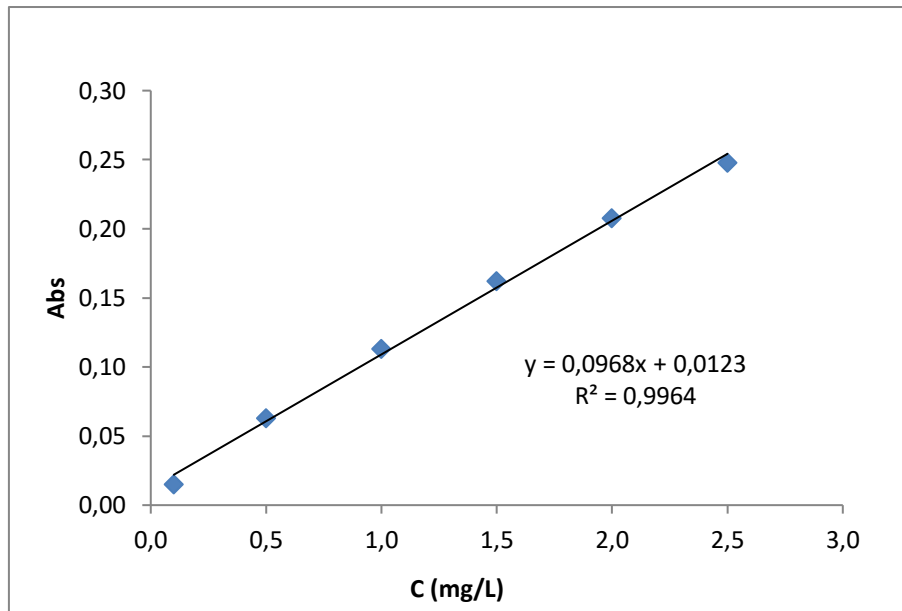


Figura A2 Recta de calibración del zinc medición 2

Anexo 3 Recta de calibración del zinc, medición 2

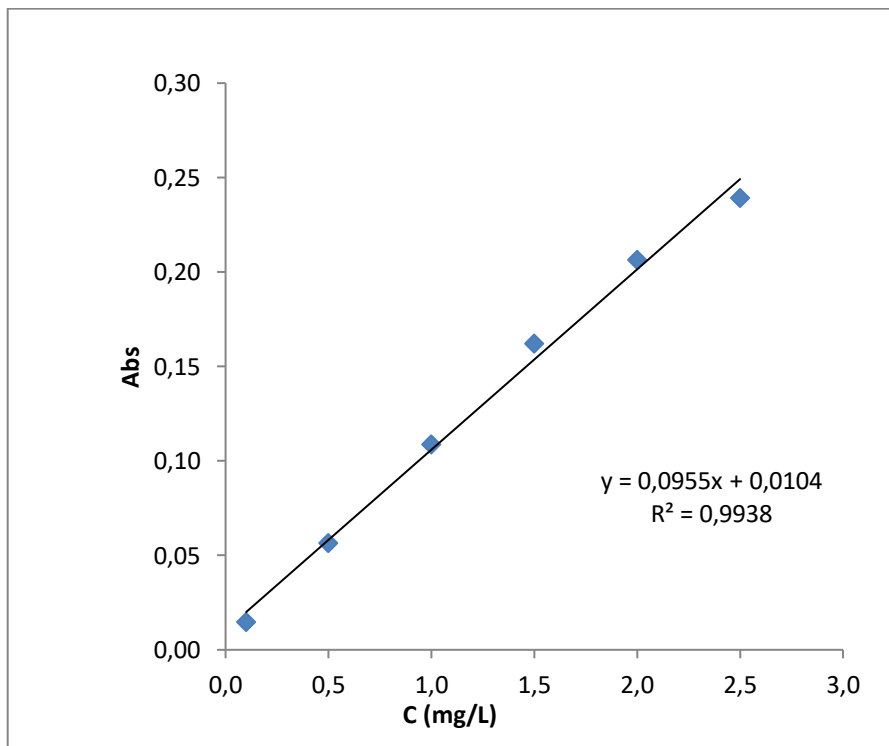


Figura A3 Recta de calibración del zinc medición 2

Anexo 4 Recta de calibración del zinc, medición 3

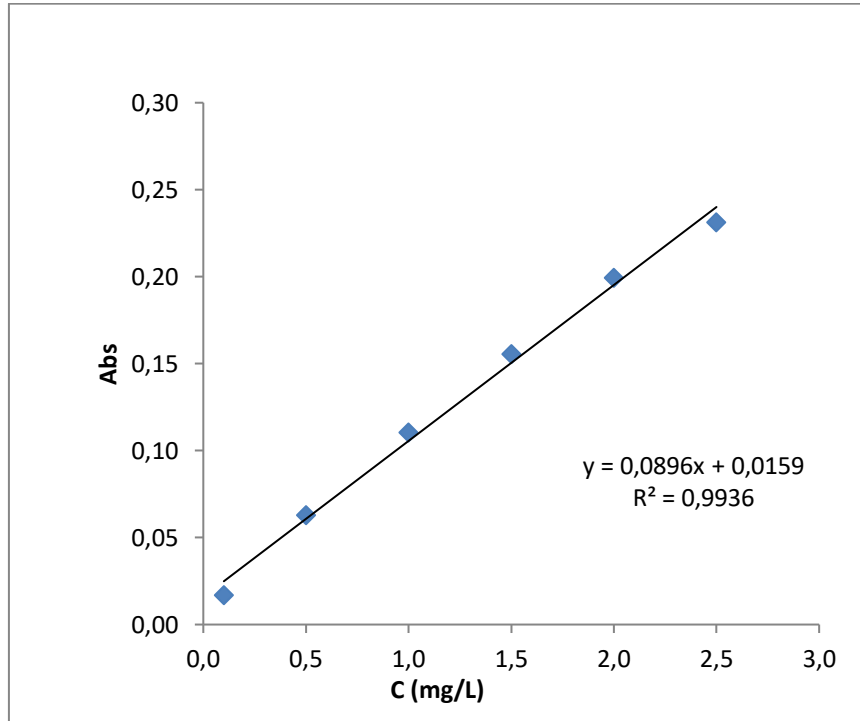


Figura A4 Recta de calibración del zinc medición 3