

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES

TEMA:  
“ANÁLISIS DE REMOCIÓN DE CADMIO POR ACCIÓN DE LA MICROALGA  
*Chlorella* sp. INMOVILIZADA EN PERLAS DE ALGINATO”

AUTORES:  
BLANCA YOMAIRA PERENGUEZ ORTEGA  
CHRISTIAN ANDRÉS VALDEZ ÁLVAREZ

TUTOR/A:  
MARÍA FERNANDA GUEVARA

Quito, Mayo de 2017

## Cesión de derechos de autor

Nosotros Blanca Yomaira Perengüez Ortega y Christian Andrés Valdez Álvarez, con documento de identificación N<sup>o</sup> 1003012596 y N<sup>o</sup> 1720133741 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación titulado: Análisis de remoción de cadmio por acción de la microalga *Chlorella* sp, inmovilizada con perlas de alginato, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la Obra antes citada. En concordancia, suscribimos este documento en el momento que hagamos entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Nombre: Blanca Yomaira Perengüez Ortega  
Cédula: 1003012596  
Fecha: Mayo de 2017



Nombre: Christian Andrés Valdez Álvarez  
Cédula: 1720133741  
Fecha: Mayo de 2017

**Declaratoria de coautoría del docente tutor/a**

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación “Análisis de remoción de cadmio por acción de la microalga *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato” realizado por: Blanca Yomaira Perenguez Ortega y Christian Andrés Valdez Álvarez, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, mayo 2017



María Fernanda Guevara Granja

Cédula de identidad: 1002454948

## **Dedicatoria**

Dedicamos de manera especial a nuestros padres: José Perengüez y Martha Ortega; y Ángel Valdez y Laura Álvarez; por ser el pilar fundamental en nuestra vida, por su constante apoyo y dedicación.

## **Agradecimiento**

Gracias a Dios por habernos dado fuerza, sabiduría e inteligencia para alcanzar cada meta propuesta.

A nuestra familia por brindarnos su apoyo y ofrecernos el amor y la calidez de un hogar.

A María Fernanda Guevara, por brindarnos su tiempo y apoyarnos con todos sus conocimientos y experiencia para la realización de este proyecto.

A Edison Osorio, Erika Paredes, Marco Ibarra, Janss Beltrán, Christian Larenas, Wilson Tapia, Ever Morales, Daniel Acurio, Laura Huachi y Marco Cerna por su colaboración, disposición y asesoramiento de diferente manera en realización del trabajo.

A todos nuestros amigos, compañeros y demás profesores, de manera especial a Belén Almeida, Byron Fuertes, Joselyn Freire, Josselyn Garrido, Diego Mallitasig, Erick Rodríguez, y Mishell Arias, por brindarnos su apoyo y ayuda cuando más los necesitábamos.

Al Grupo de Investigación del Medio Ambiente, Metabolitos Secundarios y Biotecnología Animal “NUNKUY-WAKAN” (Alma de la Tierra) por recibirnos y ayudarnos con la investigación.

A la Universidad Politécnica Salesiana por recibirnos y darnos la formación profesional.

## Contenido

Resumen.....	
Abstract.....	
Introducción.....	1
CAPÍTULO I.....	5
1 Marco teórico.....	5
1.1 Metales pesados.....	5
1.1.1 Generalidades.....	5
1.1.2 Toxicidad de metales pesados.....	5
1.1.3 Cadmio.....	6
1.2 MICROALGAS.....	9
1.2.1 Uso de microalgas en el campo biotecnológico.....	10
1.3 <i>Chlorella</i> sp.....	12
1.3.1 Usos de <i>Chlorella</i> sp.....	13
1.4 Perlas de alginato.....	14
1.4.1 Usos alimenticios de los alginatos.....	15
1.4.2 Desintoxicación y depuración, propiedades de los alginatos.....	15
1.4.3 Aplicaciones Biotecnológicas.....	15
1.4.4 Uso de perlas de alginato en la remoción de metales.....	16
CAPÍTULO II.....	19
2 Marco metodológico.....	19

2.1	Bioaumentación de células de la microalga <i>Chlorella</i> sp. ....	19
2.2	Conteo de <i>Chlorella</i> sp. en cámara de Neubauer .....	20
2.3	Elaboración de perlas de alginato.....	22
2.4	Inmovilización de <i>Chlorella</i> sp. en perlas de alginato .....	23
2.5	Remoción de cadmio con perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. ....	23
2.6	Remoción de cadmio con perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. ....	24
2.7	Cuantificación de la concentración de cadmio en remanente líquido .....	25
2.8	Viabilidad de la microalga por cambio de color .....	26
2.9	Digestión por vía seca de las perlas de alginato.....	26
CAPÍTULO III.....		27
3	Resultados y Discusión.....	27
3.1	Bioaumentación de células de la microalga <i>Chlorella</i> sp. ....	27
3.2	Elaboración de perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. ....	28
3.3	Inmovilización de <i>Chlorella</i> sp. en perlas de alginato .....	28
3.4	Viabilidad de <i>Chlorella</i> sp. ....	28
3.5	Remoción de cadmio con perlas de alginato .....	29
3.5.1	Interacciones de <i>Chlorella</i> sp., concentración de cadmio y tiempo de exposición de la solución acuosa de metal a las perlas de alginato.....	29
3.5.2	Concentración de cadmio en las soluciones acuosas durante el proceso de remoción del metal.....	30
3.6	Digestión ácida de las perlas de alginato y relación del balance de masas .	37
Conclusiones .....		39

Referencias bibliográficas .....	42
Anexos .....	48

## Índice de tablas

Tabla 1. Análisis de la varianza .....	29
Tabla 2. Cuadro de análisis de la varianza, valores de $p < 0.001$ .....	30
Tabla 3. Análisis de las interacciones de <i>Chlorella</i> sp. ....	31
Tabla 4. Resultados del porcentaje de remanente de cadmio en soluciones acuosas en concentración 20, 100 y 200 ppm durante 80 min. ....	32
Tabla 5. Test Duncan para la presencia o ausencia de <i>Chlorella</i> sp. ....	35
Tabla 6. Test de Duncan para las concentraciones de Cd .....	36
Tabla 7. Test de Duncan para los tiempos de exposición .....	36
Tabla 8. Test de Duncan para presencia, ausencia y concentración .....	37

## Índice de figuras

Figura 1. Primera Etapa de Bioaumentación.....	20
Figura 2. Selección de reactores de mayor intensidad verde propia de <i>Chlorella</i> sp.	21
Figura 3. Conteo celular en cámara de Neubauer .....	21
Figura 4. Perlas de alginato en solución de cloruro de calcio .....	22
Figura 5. Remoción en biorreactores utilizando perlas sin <i>Chlorella</i> sp. ....	24
Figura 6. Remoción en biorreactores utilizando perlas con <i>Chlorella</i> sp. ....	25

## Índice de anexos

Anexo 1. Morfología células de <i>Chlorella</i> sp. ....	48
Anexo 2. Pruebas de viabilidad fase inicial .....	49
Anexo 3. Pruebas de viabilidad fase final .....	50
Anexo 4. Lectura y curva de regresión estándares de Cadmio. $R = 0,99$ .....	51
Anexo 5. Variación de la concentración de 20 ppm de Cd .....	52
Anexo 6. Variación de la concentración de 100 ppm de Cd .....	53
Anexo 7. Variación de la concentración de 200 ppm de Cd .....	54
Anexo 8. Balance de masas .....	55
Anexo 9. Valores de las mediciones de cadmio en solución sin <i>Chlorella</i> sp. ....	56
Anexo 10. Valores de las mediciones de cadmio en solución con <i>Chlorella</i> sp. ....	57

## Resumen

El cadmio (Cd) es un metal que puede interferir negativamente en diferentes rutas metabólicas de los seres vivos, es así que este trabajo tuvo como objetivo la evaluación de la capacidad de remoción de cadmio en soluciones acuosas por acción de *Chlorella* sp. a una concentración de  $25 \times 10^6$  células/mL inmovilizada en perlas de alginato y perlas de alginato sin *Chlorella* sp., como testigo. Todos los tratamientos se establecieron por triplicado con aireación constante en durante 80 min, en soluciones acuosas con cuatro concentraciones de cadmio a: 0 ppm, 20 ppm, 100 ppm y 200 ppm, tomando muestras del remanente líquido cada 10 min, para finalmente ser leídas en el equipo de absorción atómica con flama de aire-acetileno con lámpara de cadmio.

El presente estudio determinó que *Chlorella* sp. inmovilizada removió 59,67% de metal cadmio a una concentración inicial de 20 ppm dejando en la solución un remanente de 40,33%; siendo el mejor resultado de remoción en un tiempo de 80 min en comparación con los tratamientos a 100 ppm, y 200 ppm de cadmio con presencia y ausencia de la microalga.

Palabras claves: *Chlorella* sp., remoción, cadmio, inmovilización, alginato.

## Abstract

Cadmium (Cd) is a metal that can interfere negatively in different metabolic routes of living beings, this project is objective was the evaluation al cadmium removal ability in aqueous solutions by means of *Chlorella* sp. in a concentration of  $25 \times 10^6$  cells / mL immobilized on alginate pearls, and alginate beads without *Chlorella* sp. as witness. All treatments were established by triplicate, under constant aeration for 80 minutes, in aqueous solutions with four concentrations of cadmium at: 0 ppm, 20 ppm, 100 ppm and 200 ppm, taking samples of the liquid remnant every 10 minutes, to finally be read in the atomic absorption equipment with air-acetylene flame with cadmium lamp.

The present study determined that *Chlorella* sp. immobilized removed 59,67% of cadmium metal at an initial concentration of 20 ppm leaving a 40,33% residue in the solution; Being the best removal result in a time of 80 min compared to the treatments at 100 ppm and 200 ppm of cadmium with presence and absence of the microalga.

Key words: *Chlorella* sp., Removal, cadmium, immobilization, alginate.

## **Introducción**

La contaminación por el uso de metales en concentraciones tóxicas como consecuencia de los residuos generados por las industrias, como la minería, la fundición de metales, la producción de combustible y energía a partir del petróleo, industria de fertilizantes y pesticidas y sus aplicaciones, industria del curtido de cuero, producción de energía atómica, entre otras, producen residuos que generan peligrosidad al contener metales que terminan transfiriéndose al medio ambiente bioacumulándose o biomagnificándose; debido a un incorrecto tratamiento o disposición final al no poder ser degradados en forma química o biológicamente de manera natural (Larenas y Ballesteros, 2012; Plaza, 2012).

En la últimas décadas el uso masivo de químicos y otros agentes contaminantes, se ha convertido en una de las mayores problemáticas puesto que, aun en mínimas concentraciones presentan un alto nivel de peligrosidad, ya que ha causado una considerable toxicidad hacia la naturaleza por la presencia de residuos metálicos en sus desechos alcanzando concentraciones mayores de las que se encuentran de formas normal en el ambiente esto directamente relacionado con el mecanismo de acción de cada metal y su lugar de acumulación, que han alterado a los ecosistemas de forma silenciosa que no se puede ver a simple vista, causando un grave daño a la salud humana así como en animales, plantas, cultivos y a la vez provocando alta contaminación; afectando tanto a la alcalinidad como a la degradación del suelo y en aguas procedentes de ríos, lagos, y demás reservorios naturales (Moreno, García, León, y Arévalo, 2012).

La necesidad de desarrollar tecnologías alternativas para la remediación de aguas contaminadas con metales pesados debe considerarse como prioridad en el Ecuador

como lo están haciendo los países industrializados que han tomado medidas severas para combatir la contaminación, puesto que el aumento de industrias como minas y fábricas que generan descargas contaminantes en fuentes de aguas llegando a las aguas subterráneas permaneciendo por cientos de años, no reciben tratamiento adecuado antes de ser vertidas (Jiménez, 2012; Odum, 2016).

Actualmente se conoce de manera amplia sobre los efectos adversos de estos elementos tanto en la salud humana (toxicología, aumentando su concentración a medida que se consume directamente por alimentos o agua contaminada o estar expuestos indirectamente como en el caso de vivir cerca de un lugar que genere este tipo de residuos metálicos) como en los animales y plantas (ecotoxicología) (Plaza, 2012). Por lo que es necesario el desarrollo de tecnologías baratas como remoción de metales en aguas contaminadas, suelos húmedos y atmósferas controladas que puedan solucionar estos problemas generados, aprovechando su potencial para conservar la biodiversidad en nuestro planeta (Martínez y García, 2011).

Este proyecto estudió a la microalga *Chlorella* sp., conocida por ser usada como una alternativa para la bioremediación de diferentes iones metálicos entre ellos el cadmio y por ser tolerante a diferentes metales pesados, Valle, (2007); evaluando la capacidad de remoción de cadmio en diferentes concentraciones de 0 ppm, 20 ppm, 100 ppm y 200 ppm; disueltos en solución acuosa, utilizando *Chlorella* sp., inmovilizada en perlas de alginato de calcio, estableciéndose además un proceso de bioaumentación de la microalga en biorreactores expuestos a condiciones ambientales de luz y oxigenación mecánica continua; a temperatura ambiente; para después, la solución de *Chlorella* sp. ser inmovilizada en esferas de alginato y finalmente analizar la cinética de remoción del metal en un total de 80 min realizándose el proceso por triplicado, utilizando como control el mismo proceso antes mencionado utilizando perlas de

alginate sin la presencia de la microalga, haciendo uso de un análisis de varianza con  $p < 0,001$ ; un test de Duncan en el caso de presencia o ausencia de *Chlorella* sp.; en los valores medios del porcentaje de metal en el remanente de cadmio y en los tiempos de exposición, análisis de interacciones de presencia-ausencia de *Chlorella* sp.; concentración de cadmio y tiempo de remoción y una relación del balance de masas para determinar si existió o no pérdida de metal al final del proceso. Así estableciéndose si *Chlorella* sp., potencia o no su capacidad de remoción cuando se encuentra inmovilizada en las esferas de alginato frente a diferentes; concentraciones de iones metálicos, haciéndose énfasis en el estudio del metal cadmio.

El cadmio es un elemento empleado en un gran número de procesos industriales, se lo puede hallar en efluentes provenientes de diversas fuentes transportándose con facilidad a través del aire y del agua, siendo un metal peligroso para la salud por ser persistente ya que se bio acumula en el cuerpo humano causando graves enfermedades que a mediano plazo pueden llegar a ser letales. Las industrias de curtiembre de cuero y metal-mecánica (producción de baterías recargables de níquel-cadmio, revestimientos químicos resistentes y fabricación de fusibles), son altamente tóxicas, al desechar como vertimientos un promedio de 200 ppm de cadmio en aguas de desecho produciendo cambios elevados en las propiedades de turbidez, viscosidad, en la demanda química de oxígeno y el aumento de la eutrofización (Pérez y Azcona, 2012).

El uso de células de *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato, que en el área ambiental ha sido poco explotado, ha establecido un potencial en la biodegradación de contaminantes y la remoción de metales debido que la inmovilización en una matriz confiere incremento en la estabilidad de las células evitando su reproducción acelerada y generando tolerancia ante ciertos compuestos tóxicos además de conservar su

actividad fisiológica pudiéndose inmovilizar grandes densidades celulares. Este proceso presenta ventajas como: brindar protección a los microorganismos inmovilizados contra el estrés ambiental, ofrecer una barrera físico contra microorganismos depredadores, bajo costo, alto porcentaje de remoción en poco tiempo, métodos amigables para el medio ambiente que depende de la concentración inicial de metal y la posibilidad de tratar al mismo tiempo al agua contaminada y producir biomasa algal en el caso de que alguna célula se vea afectada por la exposición a elevadas concentraciones de metales, provocando una facilidad en la operación y una fácil recuperación de las células del medio previniendo el lavado de la biomasa (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012).

## Capítulo I

### 1 Marco teórico

#### 1.1 Metales pesados

##### 1.1.1 Generalidades

Los metales pesados son componentes presentes en la naturaleza principalmente en la corteza de tierra y no pueden ser degradados o ser destruidos sin la presencia de una elevada fuerza física o una acción química. El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una alta densidad, sea tóxico o venenoso en concentraciones relativamente bajas; como ejemplos de metales pesados incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd), el arsénico (As), el cromo (Cr), el talio (Tl), y el plomo (Pb) que son considerados de alta peligrosidad por sus efectos tóxicos, aunque están presentes en el ecosistema en condiciones naturales (Argotta G, Argotta H, H, y Larramendi J, 2012).

##### 1.1.2 Toxicidad de metales pesados

Los metales pesados son altamente tóxicos porque tienden a bioacumularse; la bioacumulación es un aumento en la concentración de un producto químico en cualquier organismo biológico a un cierto plazo, comparada con la concentración de este mismo producto químico en el ambiente (Lenntech, 2016).

La contaminación de las aguas naturales por acción de los metales pesados llega a ser inevitable debido a la industrialización y urbanización. Los metales de mayor importancia toxicológica y eco toxicológica en ambientes acuáticos son: mercurio

(Hg), arsénico (As), cromo (Cr), plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni) y zinc (Zn); ya que para la mayoría de los organismos, la exposición por encima de una concentración umbral a estos metales, puede ser extremadamente tóxica produciendo alteraciones metabólicas que pueden llevar incluso a la muerte del organismo (Argotta G et al., 2012).

### 1.1.3 Cadmio

El cadmio es un elemento químico metálico de gran importancia tóxica asociado a la actividad antrópica, con símbolo Cd, de número atómico 48, situado en el grupo 12 de la tabla periódica en el grupo d transición II B; con peso atómico de 112,40 g/mol y densidad relativa de 8,65 a 20 °C, es un metal altamente dúctil de color blanco-plateado ligeramente azulado maleable parecido al estaño de estructura cristalina hexagonal, brillante y blanda que puede cortarse fácilmente con un cuchillo, es estable al aire pierde el brillo al cabo de un lapso de tiempo (Beltrán-Pineda, M. E., y Gómez-Rodríguez, A. M., 2016).

Su punto de fusión es de 321,07 °C, presenta ocho isótopos estables en la naturaleza además de haberse establecido once radioisótopos inestables artificiales. Este ion metálico divalente, se usa en aleaciones para la fabricación de extintores, alarmas de incendios y fusibles, en soldadura, etc., se lo puede obtener por fuentes naturales formando la corteza terrestre y también con fuentes antrópicas como la galvanotecnia en la fabricación de esmaltes (Lenntech, 2016).

### 1.1.3.1 Toxicidad de Cadmio

El Cadmio procede sus particularidades toxicológicas de su parecido químico con el zinc, un elemento metálico que trabaja como un micro alimento esencial para las plantas, los animales y los seres humanos. El cadmio es bioduradero y al ser absorbido una vez por un organismo, sigue siendo morador por largos períodos que abarcan muchos años (décadas en los seres humanos) aunque puede ser segregado ocasionalmente (Álvarez, 2015).

En seres humanos, la exposición a largo plazo está relacionado con la disfunción renal o en otros casos la alta exposición puede ocasionar enfermedades como la obstrucción del pulmón que podría conducir al cáncer, aunque los datos referentes con relación a esta patología son dificultosos de interpretar, debido a los diferentes factores que originan el cáncer. El cadmio puede también producir consecuencias negativas en el tejido óseo (patologías como: osteomalacia, osteoporosis) en seres humanos y también en animales (Argotta G et al., 2012).

Las actividades industriales especialmente las químicas y las de curtiembre de cuero, han contribuido al aumento de contenido de la concentración de diversos metales bajo su forma iónica que son descargados a ríos, lagunas, lagos y mares, debido a los grandes volúmenes de efluentes contaminantes con este metal tóxico, cuando se lo remueve de sus depósitos naturales; el cadmio se distribuye a diferentes compartimentos ambientales como aire, tierra, y agua, siendo éste el más importante. En la industria se lo ha utilizado para la elaboración de algunos plaguicidas, pesticidas y fertilizantes dando como resultado la bioacumulación en diferentes organismos desde microorganismos hasta seres humanos; en estos últimos, cuando el cadmio logra entrar en el organismo suele fijarse en los tejidos de órganos como hígado y riñón

produciendo efectos toxicológicos, que pueden inclusive formar parte de neonatos en mujeres gestantes (Morí et al., 2013).

La cantidad de metal necesaria para causar efectos tóxicos a un organismo depende de la vía de entrada, forma de exposición, tiempo y propiedades físico-químicas. Para alcanzar el umbral de toxicidad se relaciona con una ingesta líquida de 10-50  $\mu\text{g}$ , mientras que en inhalación se ha establecido valores menores a 0,01  $\text{mg}/\text{m}^3$ , esto en rangos que confieren a exposición directa, es decir personas que viven cerca a industrias en donde se produzca la liberación de cadmio (Lenntech, 2016).

#### 1.1.3.2 Usos del Cadmio

El Cadmio es producido como un subproducto inevitable de la refinación del zinc (o de vez en cuando de plomo), puesto que estos metales se encuentran naturalmente dentro del mineral crudo. Sin embargo, una vez que cadmio es recogido, es relativamente fácil de reciclar (Lenntech, 2016).

El uso más significativo que se ha relacionado al cadmio está en la composición de baterías de níquel/cadmio, como fuentes de energía recargables o secundarias que proporcionan alta salida de ciclos de carga (oscilan entre los 1000 a 1500 ciclos de carga), vida de útil larga, poco mantenimiento y alta tolerancia a la tensión física y eléctrica. Las capas del cadmio brindan excelente resistencia al deterioro de materiales por consecuencia de ataque electroquímico a su entorno, particularmente en ambientes prestos a fuertes tensiones tales como ambientes marinos y aeroespaciales donde se requiere condiciones especiales o alta seguridad (Bonnet, 2014)

Otras aplicaciones del cadmio son: producción de pigmentos, estabilizadores para materiales termoplásticos (PVC), productos con propiedades metálicas, aleaciones y

los compuestos electrónicos. El cadmio está también presente como impureza en algunos productos, que abarcan los fertilizantes del fosfato, purificadores, detergentes y los productos de petróleo refinados (Odum, 2012).

## **1.2 Microalgas**

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía lumínica en energía química con una eficacia cuatro veces superior a la de las plantas. Su trascendencia rechina en su papel como productores primarios de la cadena trófica, que las constituyen en las primeras productoras de materia orgánica siendo organismos de gran importancia en los ecosistemas. Por su tamaño pequeño y diverso (5–50  $\mu\text{m}$  en promedio) son de fácil manipulación y aprovechamiento, por ejemplo, multitudes de organismos se alimentan en forma directa del fitoplancton compuesto parcialmente por estos microorganismos fotosintéticos, es así que, la microalga ofrece nutrientes que en conjunto con otros microorganismos acuáticos proporcionan una excelente fuente de alimentación para el organismo que los consume (Abalde, 2013). Las condiciones ideales de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes, pH, entre otras; para el cultivo de microalgas, cambian considerablemente de una especie a otra, estos parámetros fisicoquímicos, han sido determinados con anterioridad en laboratorios y nos permiten comprender las condiciones adecuadas para el crecimiento de las diferentes especies en cultivo (Abalde, 2013).

En la actualidad en el campo comercial, los cultivos en grandes volúmenes de microalgas de forma externa y los foto biorreactores son de elevada importancia para la producción de compuestos químicos con alta pureza, como: biocombustibles,

biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos; así mismo, y de manera positiva para el tratamiento de aguas residuales, obtención y producción de compuestos terapéuticos, y como alimento para consumo en seres humanos y animal que en las últimas décadas ha alcanzado una excelente acogida por su alto valor nutritivos (Hernández y Labbé, 2014).

Las microalgas presentan una propiedad ficorremediadora que se basa en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso. Estos compuestos que ocasionan contaminación son captados por la biomasa algal que a su vez la biotransforma y pueden ser recuperados mediante diversas técnicas durante su cosecha (Hernández y Labbé, 2014).

#### 1.2.1 Uso de microalgas en el campo biotecnológico

En el campo biotecnológico, las microalgas son importantes fuentes de biomoléculas de gran interés económico y constituyen una fuente directa de alimento, medicamentos y biocombustible, entre otras aplicaciones como la bioconversión de la energía lumínica, aumentando la utilización de los elementos nutritivos (nitrógeno (N), potasio (K) y fósforo(P)), aporte de oxígeno al ambiente y una producción de biomasa que puede ser aprovechable en diversas áreas de la industria alimenticia, farmacéutica y química. Santos, Gonzáles, y Sastre, (2014), las microalgas han adquirido gran importancia en los últimos años ya que presentan la solución a diversos problemas en aspectos de alimentación, producción de biomasa y metabolitos de alto valor agregado de origen natural.

Las investigaciones sobre el cultivo de microalgas acarrearán gran importancia dada a su amplia aplicación biotecnológica y comercial que apuestan al desarrollo económico

y social de diferentes sectores de la industria que desencadenan en una mejora en la calidad de vida.

#### 1.2.1.1 Tratamiento de aguas

El uso de las microalgas, como sistema biológico alternativo para el tratamiento de las aguas residuales domésticas ha sido objeto de numerosas investigaciones debido a su capacidad en la remoción de cantidades significativas de nitratos, fosfatos y materia orgánica presentes en estas aguas. Además, la biomasa producida en durante el tratamiento de aguas residuales, representa una fuente potencial de alimento, químicos y pigmentos, entre otros productos de elevado interés (Roa & Cañizares, 2012).

Investigaciones demuestran que existe una amplia gama de especies de microalgas que absorben diferentes metales pesados soportando y adaptándose fisiológicamente al estrés de diferentes concentraciones por este tipo de contaminación, un ejemplo claro es el uso que se ha dado a *Chlorella* sp. obteniéndose valores en remoción que llegan a alcanzar el 100% de acción; utilizada en casos como: Mn 96,5-98%, para Fe 77,4-85%, para Zn 77,5-95%, para Cr 52,3-64%, y para Cd 77,3-81% en función de las concentraciones iniciales del metal en los tratamientos (Abalde, 2013).

#### 1.2.1.2 Producción de biodiesel

Los beneficios de las microalgas rompen los esquemas, tan amplios que incluyen la producción de biodiesel suscitándose el interés de los productores y consumidores; este interés ha aumentado gracias al mercado de producción y procesamiento de algas, que va en auge, conociéndose que ciertas industrias están optando por opciones

amigables con el ambiente dando como resultado una producción mundial de biodiesel a través de diversos materiales orgánicos, uno de ellos las microalgas haciéndose uso de su capacidad de rápido crecimiento, aprovechando su material orgánico y el fácil manejo para obtener etanol, en donde la industria química por motivo de producción de biodiesel; ha tenido una amplia investigación y acogida en los últimos años.

La rápida velocidad de reproducción permite la duplicación de producción de biodiesel; es decir entre 15 y 300 veces más aceite que los cultivos tradicionales en función de la superficie, requiriéndose una superficie menor comparados con los cultivos agrícolas con una baja demanda de energía y agua para su producción, superando el proceso de fotosíntesis en relación a los vegetales utilizados para obtener biodiesel y sobre todo primando el gran potencial energético que brinda este biocombustible asociado a contrarrestar los problemas de contaminación que ocasionan los combustibles derivados del petróleo (García 2015).

La capacidad mundial, la producción y consumo de biodiesel crecieron en promedio un 32%/año durante 2000-2005, y la industria parece que va para las tasas de crecimiento aún más rápido en tiempos actuales (Santos et al., 2014).

### **1.3** *Chlorella* sp.

*Chlorella* sp. es un alga verde unicelular de agua dulce de forma elipsoidal esférica; descubierta en 1890 por el microbiólogo holandés M.W. Beijernick, su origen se remonta a más de 600 millones de años lo que la convierte en una de las formas de vida más primitivas del planeta. Ésta microalga presenta reproducción asexual con crecimiento en forma de células simples con un diámetro entre 2-10  $\mu\text{m}$ ; 100 y 1.000 veces menor a 1 mm, en su estructura no posee flagelo (Biblioteca Ceibal, 2012).

El color verde lo obtiene de los cloroplastos, que son las estructuras encargadas de realizar la fotosíntesis, requiriéndose relevantes cantidades de CO<sub>2</sub>, agua, luz solar mientras que en pequeñas cantidades ciertos minerales. Posee clorofila de tipo A y B. Pertenece a la división Chlorophyta y a la clase de las Chlorophyceae (Infante et al., 2012).

### 1.3.1 Usos de *Chlorella* sp.

El género *Chlorella* posee amplios campos de uso como en la industria agroquímica, metal-mecánica y especialmente en la curtiembre de cuero, ha sido aplicada al tratamiento biológico de aguas residuales, probando su efectividad en la remoción de nitrógeno, fósforo, demanda química de oxígeno y metales. Su uso en aplicaciones de biorremediación ha sido ampliamente utilizado, en forma suspendida o inmovilizada (esferas de alginato), como cepa pura o en asociación con otros microorganismos no fotosintético (Infante et al., 2012).

*Chlorella* sp. es una microalga con alto potencial biotecnológico por su capacidad de sintetizar ácidos grasos de interés industrial, rápido crecimiento y capacidad de adaptación a diferentes fuentes de nutrientes tanto en regímenes autotróficos como mixotróficos e inclusive heterotrófico, constituye una fuente extraordinaria de proteína vegetal: aproximadamente el 60 % de su composición es proteica y contiene 19 aminoácidos, incluidos los 9 esenciales, además, también tiene un alto contenido en vitaminas A, C y del grupo B, betacaroteno, ácido pantoténico, fólico y lipoico, niacina, colina, inositol, biotina y vitaminas E y K, entre los minerales que la componen encontramos fósforo, potasio, hierro, cobre, zinc, calcio, magnesio,

manganeso y yodo como lo establece Moreno et al., (2012), pudiéndosela aprovechar como fuente de alimentación y acción medicinal.

La microalga *Chlorella* sp. es el organismo vegetal con mayor concentración de clorofila, siendo, la clorofila el único sistema natural existente que a través de la alimentación puede transmitir al ser humano la energía procedente del sol. Una vez en el organismo la clorofila activa las enzimas imprescindibles para una adecuada asimilación de los nutrientes y para su combustión proceso que permite convertirlos en energía. Las células de clorofila y las de los glóbulos rojos presentan una estructura muy similar (únicamente se diferencian por el átomo central, en hemoglobina es Fe y en la clorofila es Mg), similitud que la convierte en un excelente tónico para la sangre en caso de anemias (Valencia, 2014).

#### **1.4 Perlas de alginato**

Los alginatos son polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares de las algas pardas conocidas también como algas marrones entre las que se encuentran *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japónica* y algunas especies de los géneros *Lessonia*, *Ecklonia*, *Durvillaea* y *Ascophyllum*. Los alginatos son macromoléculas formadas por la unión de monómeros en este caso dos tipos de monosacáridos, los dos con un grupo ácido, el ácido glucurónico y el ácido manurónico, de tipo orgánicos. Son derivados del ácido algínico. La síntesis de los alginatos se da a partir de la fructosa, pasando por el ácido manurónico y glucurónico, subsecuentemente (González, 2015), (Calvo, 2012).

#### 1.4.1 Usos alimenticios de los alginatos

Durante los últimos años se ha observado un interés sobre las propiedades del alginato en la industria alimentaria. Éste presenta diversas ventajas como el efecto prebiótico de los alginatos de bajo peso molecular, los beneficios de su ingesta como fibra para la reducción de los niveles de azúcar y colesterol en la sangre, así como la capacidad para prolongar la vida útil de los productos (Martínez y García, 2011).

#### 1.4.2 Desintoxicación y depuración, propiedades de los alginatos

Si alguna propiedad se le reconoce a los alginatos es especialmente es la depuración de ambientes y desintoxicación de organismos de metales pesados como el cadmio, el uranio, el mercurio o el plomo, pesticidas, herbicidas, radiaciones, toxinas etc. Este extraordinario efecto se atribuye a los componentes que se encuentran en sus estructuras que logran absorber y almacenar el elemento tóxico para después biotransformarlo o almacenarlo (Olarte y Valencia, 2016).

#### 1.4.3 Aplicaciones Biotecnológicas

En el campo biotecnológico, el uso de los alginatos en presencia de calcio u otros iones forma una solución espesa que normalmente presenta el aspecto de gel lo que permite facilitar la separación del producto y a su vez permite la recuperación del agente biológico como lo establece Martínez y García, (2011), con lo cual ha brindado usos en el laboratorio con técnicas especiales como la inmovilización de los alginatos en forma de esferas o perlas.

Las matrices de alginato se usan como soportes de bajo costo obteniéndose un incremento en la producción de metabolitos. La inmovilización de microorganismos en matrices limita la concentración de biomasa lo que permite mantener controlado el espacio que va a ocupar el microorganismo (perlas de alginato), permitiendo el paso de la luz, nutrimentos y en el caso de regeneraciones ambientales la captación de metales que se encuentren dispersos en el medio, el alginato de calcio y alginato de sodio se han mostrado como un material de gran adaptación y matriz para diferentes tipos de microorganismos por un determinado tiempo, puesto que una vez el microorganismo empieza a reproducirse en determinadas cantidades, la matriz puede llegar a estabilizarse y dar su destrucción total dispersando a las células que se encontraban dentro (González, 2015).

La técnica de atrapamiento e inmovilización es aplicable a diversos microorganismos y en esta se utiliza gelatina, agar, gel de poliacrilamida, alginato de calcio, carragenina, quitosano, alcohol poli vinílico o-gel como materiales para la formación de la matriz, facilitando así su manipulación (Roa et al., 2012), es así que el uso de microalgas en perlas de alginato ayudan a la captación de distintas sustancias, pero existe una limitante para su aplicación que es la concentración total del contaminante de exposición ya que los microorganismos pueden inhibir su proceso normal de biotransformación, crecimiento celular, densidad y captación de sustancias tóxicas para los seres vivos, afectando también a la estructura de la esfera con la correspondiente deformidad de la misma (Tapia, Cabrejos, Rojas, y Reyes. 2013).

#### 1.4.4 Uso de perlas de alginato en la remoción de metales

En la actualidad existen diversos procesos fisicoquímicos que son utilizados en laboratorios *in situ* y *ex situ* para el tratamiento de metales altamente tóxicos y

persistentes en las cadenas tróficas, entre los que se encuentran cadmio, cromo, mercurio, plomo, entre otros; provenientes principalmente de la industria minera y química que libera residuos con concentraciones importantes de estos metales que pueden llegar a contaminar el agua de ríos, arroyos, mares, etc., es así que la implementación de otro tipo de tecnologías como la implementación de perlas de alginato, han establecido capacidades especiales de biotransformación de estas sustancias tóxicas (Beltrán y Gómez, 2016).

La fusión del uso de esferas de alginato conjuntamente con la utilización de microorganismos que posean capacidades metabólicas especiales, han permitido contrarrestar la toxicidad de los metales pesados que gracias al manejo de la biotecnología han permitido obtener porcentajes de remoción elevados de hasta 99.9%, esto dependiendo de la concentración inicial del metal (Beltrán y Gómez, 2016).

Las ventajas de uso de esferas de alginato de calcio en la remoción de iones metálicos tóxicos son amplias, no solo se utilizan materiales biosorbentes no costosos, sino que estos materiales pueden ser reutilizables, además actúan sobre grandes áreas específicas de contaminación que pueden atrapar uno o más metales que pudieran estar presentes, sin descartar el tiempo de remoción que alcanza tiempos mínimos (60 min) gracias a la difusión interparticular y si se ayuda con temperaturas especiales (35-37°C) el proceso puede mejorar predominando la interacción física, la eficiencia y la rapidez del mismo como lo establece Álvarez, (2015) en su trabajo de remoción de cobre utilizando perlas de alginato.

En tratamientos de aguas provenientes de efluentes industriales es factible la implementación de estas tecnologías, utilizando esferas de alginato que pudieran estar combinadas con microorganismos como microalgas remediadoras, facilitarían

tratamientos de grandes volúmenes de lodos que pueden ser aplicables a la recuperación de suelos que pudieran disminuir la contaminación ambiental y a la salud humana, recordando que la metodología es económicamente viable (Beltrán & Gómez, 2016).

La preocupación por disminuir las emisiones y los vertidos de contaminantes producidas por industrias químicas, textiles, mineras ha ido en crecimiento en las últimas décadas, de ahí la importancia de trabajar con métodos económicos, efectivos, rápidos que a la vez no afecten al proceso de biorremediación del medio ambiente. Es por ello, que la utilización de la propiedad de biosorción que presentan los materiales que forman las esferas de alginato, capaces de remover metales hasta en concentraciones extremadamente bajas que retienen a los iones mediante interacción electrostática con los grupos iónicos del alginato, brindan una excelente adsorción de los metales que puede ser potencializado con la inmovilización de microalgas en perlas de alginato (Tapia et al., 2013).

## Capítulo II

### 2 Marco metodológico

#### 2.1 Bioaugmentación de células de la microalga *Chlorella* sp.

Este proceso consistió en colocar inóculos de *Chlorella* sp. en biorreactores de 500 mL de capacidad partiendo de un volumen de 470 mL de solución., a los cuales se colocó 3 mL de fertilizante foliar Nitrofoska-completo por L de solución, cada 7 días (Figura 1). Este fertilizante contiene: N=10%; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>=4%; K<sub>2</sub>O =7 %; MgO=0,2%; S=0,8%; Mn=17 ppm; Fe=140 ppm; Cu=5 ppm; Zn=22 ppm; Mo=3 ppm.

Se sometieron estos cultivos a aireación constante con una presión de aire de 0.012 Mega Pascales (MPa) con bombas de aireación para pecera marca JAD modelo SE-314 con fotoperiodo 12:12h, intensidad lumínica promedio de 250 luxes y temperatura ambiente por cinco semanas llegando a un volumen de 40 L (Figura 2). Una vez alcanzada la coloración verde oscura de *Chlorella* sp., la una concentración definida de  $40 \times 10^6$  células /mL establecida por conteo en cámara de Neubauer se procedió a la bioaugmentación, para esto se colocó el 50% del volumen de la solución de microalga y se completa con el 50% de agua autoclavada para completar el volumen del nuevo biorreactor, es decir 50% de solución de la microalga y 50% de agua autoclavada. Proceso llevado acabo semanalmente para llegar a un volumen de 40 L de solución con la microalga. Finalmente se añadió Nitrofoska al medio de cultivo en una concentración de 3 mL por litro de solución para masificar la cepa y obtener un cultivo madre para las primeras pruebas de inmovilización de la microalga, realizando un control microscópico continuo para observar la morfología celular de *Chlorella* sp.; y descartar la presencia de contaminación (Anexo 1). La biomasa fue utilizada después de diez semanas de cultivo.

## Bioaumentación de *Chlorella* sp.



Figura 1. Primera Etapa de Bioaumentación.

Fuente: Los autores, 2016

### 2.2 Conteo de *Chlorella* sp. en cámara de Neubauer

Para el conteo se escogieron los biorreactores con tonalidad verde oscura, botellones A, B, C de la Figura 2.

Se realizaron diluciones de los cultivos escogidos con agua ultra pura obtenida de la purificadora marca Millipore modelo Direct-Q, para proceder al conteo en cámara de Neubauer con microscópico óptico marca Micros Austria modelo MC100LED, el factor de dilución establecido para todos los conteos fue de  $10^5$  (Figura 3)

Reactores de *Chlorella* sp.



A B C D

Figura 2. Selección de reactores de mayor intensidad verde propia de *Chlorella* sp.

Fuente: Los autores, 2016

Imagen microscópica de células de *Chlorella* sp. en cámara de Neubauer.

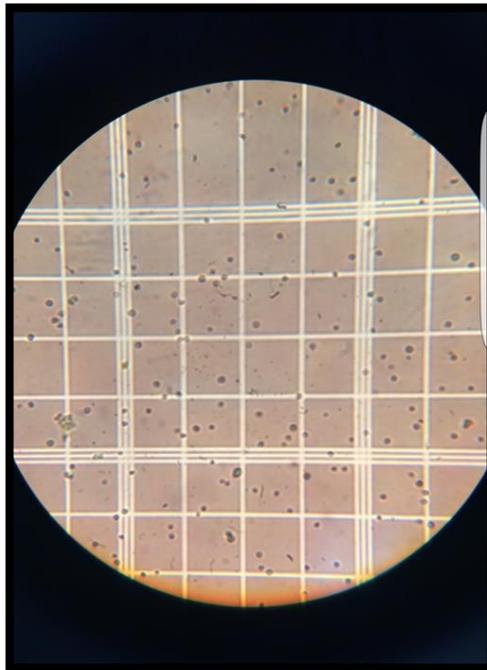


Figura 3. Conteo celular en cámara de Neubauer

Fuente: Los autores, 2016

### 2.3 Elaboración de perlas de alginato

Se disolvieron 2 gramos de alginato de sodio grado alimenticio marca Lobachime en 200 mL de agua ultra pura para obtener una mezcla homogénea, ajustando el pH entre 7,8 – 8,0 con hidróxido de sodio 0,1 molar o ácido clorhídrico 0,1 molar; según sea necesario, logrando una mezcla homogénea. Se llenaron varias jeringuillas de 25 mL con la pasta de alginato de sodio y se procedió eliminar la aguja metálica, para verter lentamente una gota a la vez en una solución de cloruro de calcio 1% p/v con agitación constante; una vez obtenido las perlas se tamizaron con la ayuda de una gasa y se las lavó con agua destilada (Figura 4).

Elaboración de perlas de alginato sin *Chlorella* sp.



Figura 4. Perlas de alginato en solución de cloruro de calcio

Fuente: Los autores, 2016

## **2.4 Inmovilización de *Chlorella* sp. en perlas de alginato**

Para la inmovilización de *Chlorella* sp. en perlas de alginato se realiza un conteo en cámara de Neubauer para conocer la concentración de los cultivos y realizar las diluciones necesarias para alcanzar una concentración de  $30 \times 10^6$  de células por mL, se disolvieron 2 g alginato de sodio en cultivo de microalga posteriormente se procedió con la elaboración de perlas de alginato.

## **2.5 Remoción de cadmio con perlas de alginato sin *Chlorella* sp.**

Se montaron doce biorreactores en balones de vidrio de 500 mL de capacidad en cuyo interior se colocaron 50 g de perlas de alginato sin *Chlorella* sp. y 200 mL de solución de cadmio a 0 ppm, 20 ppm, 100 ppm y 200 ppm respectivamente (Figura 5). Se trabajó por triplicado con cada concentración de cadmio. Los balones con 0 ppm de cadmio correspondieron a controles que contenían agua ultra pura sin metal presente. Los biorreactores fueron sometidos a aireación constante a presión de 0,012MPa (Mega pascales) ubicados al azar durante 80 min. Las muestras se tomaron a intervalos de 10 min generando 8 tiempos de muestreo por triplicado. Para las lecturas de muestras se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con lámpara de cadmio, realizándose las mediciones por triplicado.

### Técnica de remoción de cadmio sin *Chlorella* sp.



Figura 5. Remoción en biorreactores utilizando perlas sin *Chlorella* sp.

Fuente: Los autores, 2016

### 2.6 Remoción de cadmio con perlas de alginato con *Chlorella* sp.

Se montaron doce biorreactores en balones de vidrio de 500 mL de capacidad en cuyo interior se colocaron 50 g de perlas de alginato con  $25 \times 10^6$  células de *Chlorella* sp. por mL de alginato y 200 mL de solución de cadmio a 0 ppm, 20 ppm, 100 ppm y 200 ppm respectivamente. Se trabajó por triplicado con cada concentración de cadmio. Los balones con 0 ppm de cadmio correspondieron a controles que contenían agua ultra pura sin metal presente. Los biorreactores fueron sometidos a aireación constante a presión de 0,012 MPa ubicados al azar (Figura 6). Se realizaron ensayos durante 80 min, tomándose muestras de 10 mL aproximadamente en tubos de ensayo con intervalos de tiempo de 10 min generando 8 tiempo de muestreo por triplicado, para establecer si la adición de *Chlorella* sp. en las perlas de alginato, aumenta o disminuye la actividad de remoción de alginato sobre las diferentes concentraciones del metal. Para las lecturas de muestras se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con

lámpara de cadmio, realizándose las mediciones por triplicado. Con el programa estadístico Infostat y software R se aplicó un diseño aleatorio con tres repeticiones.

Técnica de remoción de cadmio con *Chlorella* sp.



Figura 6. Remoción en biorreactores utilizando perlas con *Chlorella* sp.

Fuente: Los autores, 2016

## 2.7 Cuantificación de la concentración de cadmio en remanente líquido

La cuantificación de la concentración de cadmio en el remanente líquido, se realizó para analizar la cinética de remoción del metal con un espectrofotómetro de absorción atómica de aspiración directa marca VARIAN modelo 55 2000386474–(8004) 2000386474 usando flama de aire-acetileno con lámpara de cadmio. El proceso se efectuó con la preparación de soluciones en un estándar con concentraciones de 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm y 200 ppm de cadmio, calibrando el equipo con el uso de las mismas para obtener una curva con coeficiente de regresión lineal de  $r^2=0,9999$  o superior para luego proceder a las lecturas de las muestras obtenidas del proceso de remoción (Anexo 4 y 5).

## **2.8 Viabilidad de la microalga por cambio de color**

Se realizaron ensayos con biomasa libre (sin inmovilizar en perlas de alginato), para esto se prepararon soluciones de 0 ppm, 20 ppm, 100 ppm y 200 ppm de cadmio con  $30 \times 10^6$  células/mL, en botellas de vidrio que contenían 100 mL de la solución del metal. Los ensayos se realizaron por triplicado, monitoreando el cambio de coloración de la solución después de 1 hora, 24 horas y 7 días de iniciado el tratamiento.

## **2.9 Digestión por vía seca de las perlas de alginato**

Se procedió con una variación del método de Miranda Martínez (2001). El proceso inicia con la determinación de los pesos secos de los crisoles (tara) sometidos a  $750^\circ\text{C}$  en la mufla marca Thermo modelo F48010, de acuerdo al método establecido por Miranda Martínez (2001). Las perlas procedentes de los ensayos de remoción de Cd se deshidrataron en la estufa marca ESCO modelo OFA 54-8 a  $100^\circ\text{C}$  durante 24 horas se establecieron como variables el tiempo de remoción y la concentración del metal. Las perlas deshidratadas fueron calcinadas con una desviación permisible de 0,5 mg en un crisol de porcelana previamente tarado, durante dos horas y media a  $750^\circ\text{C}$ . Se enfría el crisol en una desecadora y se pesa, repitiéndose el proceso hasta que dos medias de masa sucesivas no difieran en más de 0,5 mg por g (masa constante).

Adicionalmente, las cenizas obtenidas fueron tratadas con 20 mL de ácido clorhídrico 0,05 normal a ebullición a  $100^\circ\text{C}$ , se filtró la solución obtenida y se aforó a 100 mL con agua ultra pura, para luego determinar la absorbancia de estas diluciones por el método de absorción atómica previamente descrito en el apartado (2.7).

## Capítulo III

### 3 Resultados y Discusión

#### 3.1 Bioaugmentación de células de la microalga *Chlorella* sp.

Finalizado el proceso de bioaugmentación se obtuvo un total de 40 L de cultivo con *Chlorella* sp. distribuidos en 8 reactores de 5 L de capacidad obteniendo resultados similares a Infante et al., (2011) quienes cultivaron esta microalga en lotes durante intervalos de 8 a 9 días logrando una rápida bioaugmentación del cultivo.

El uso de Nitrofoska (fertilizante foliar) en una concentración de 3mL/L se mantuvo constante a lo largo de todo el proceso por cada reactor generando un importante crecimiento de la microalga llegando a valores de  $40 \times 10^6$  células/ mL en cada reactor favorecido por las condiciones de luz utilizadas para los cultivos y por los nutrientes añadidos al medio; determinándose con el color verde oscuro indicativo de una elevada concentración celular. El uso controlado de los fotoperíodos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad y temperatura ambiente, brindaron las condiciones necesarias para el crecimiento de *Chlorella* sp. (Ruiz, 2011).

En deficiencia de Nitrofoska se observó ligeras tonalidades de un color verde claro en los reactores, se establece la adición de Nitrofoska como indispensable para el crecimiento celular. Gomez, Rodriguez, y Subero, (2011) obtienen resultados similares utilizando fertilizante foliar para una adecuada nutrición de las algas.

La biomasa sirvió de inóculo para los experimentos que se dieron en la remoción de cadmio por acción de la microalga. El proceso de bioaugmentación y mantenimiento de los cultivos para realizar los ensayos de remoción de cadmio tomaron un total de cuatro meses.

### **3.2 Elaboración de perlas de alginato sin *Chlorella* sp.**

Se obtuvo un total de 1800 g de perlas de alginato utilizadas en el tratamiento testigo (sin *Chlorella* sp.), de un color crema pálido tanto para las pruebas piloto y para su uso en el ensayo final

### **3.3 Inmovilización de *Chlorella* sp. en perlas de alginato**

Al igual que en el tratamiento testigo se obtuvo un total de 1800 g de perlas de alginato con la microalga inmovilizada de color verde, las cuales fueron utilizadas tanto en las pruebas piloto como en la evaluación del ensayo final.

### **3.4 Viabilidad de *Chlorella* sp.**

En el ensayo de viabilidad de *Chlorella* sp., se observó un cambio de color en de las soluciones de células de la microalga libre (sin inmovilizar en perlas de alginato) expuestas a diferentes concentraciones de cadmio sin Nitrofoska. Se determinó que a la concentración de 20 ppm de cadmio a una hora de iniciado el ensayo *Chlorella* sp demuestra resistencia sin mostrar cambios notorios de tonalidad por el contrario la micro alga no presentó resistencia a las concentraciones 100 y 200 ppm de cadmio determinándose que las células no permanecieron viables debido al cambio de color desde un verde oscuro hasta un marrón grisáceo notándose el cambio de color a los 60 min de exposición. Mostrando cambios más notorios en la tonalidad marrón a las 24 horas y 7 días de iniciado el ensayo con resultados similares a Cuizano y Navarro, (2008) quienes demostraron la tolerancia de las microalgas a metales pesados a concentraciones menores a 100 ppm (Anexos 2 y 3).

### 3.5 Remoción de cadmio con perlas de alginato

Para todos los tratamientos (perlas con ausencia y presencia de *Chlorella* sp., concentraciones de metal y tiempos de exposición de la solución acuosa de metal a las perlas de alginato) se obtuvieron los siguientes resultados; con los valores de  $r = 0,9999$ , además de un coeficiente de variación de 2,12 lo que demuestra homogeneidad de datos (Tabla 1) explicando una alta correlación lineal de los datos lo que hace posible usar un análisis de varianza, se aplicó un diseño aleatorio con tres repeticiones.

Tabla 1.

Análisis de la varianza

Análisis de la varianza				
Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
RESIDUO	144	0,99	0,99	2,12

Nota. Fuente: Los autores, 2016

#### 3.5.1 Análisis de varianza para las interacciones de *Chlorella* sp., concentración de cadmio y tiempo de exposición de la solución acuosa de metal a las perlas de alginato

El análisis de varianza (Tabla 2) muestra diferencias significativas con  $p < 0,001$  para los valores medios para tratamientos con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. según concentración, tiempo de exposición de la solución de metal a las perlas de alginato y todas sus interacciones, haciendo posible generar los cuadros estadísticos para las variables en los modelos siguientes:

Tabla 2.

Cuadro de análisis de la varianza, valores de  $p < 0,001$

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	20792,70	47	442,40	208,19	<0,0001	
CHLORELLA	2048,19	1	2048,19	963,86	<0,0001	
CONCENT	8661,85	2	4330,93	2038,08	<0,0001	
TIEMPO	6494,77	7	927,82	436,62	<0,0001	
CHLORELLA*CONCENT	1606,71	2	803,35	378,05	<0,0001	
CHLORELLA*TIEMPO	128,21	7	18,32	8,62	<0,0001	
CONCENT*TIEMPO	1714,01	14	122,43	57,61	<0,0001	
CHLORELLA*CONCENT*TIEMPO	138,98	14	9,93	4,67	<0,0001	
Error	204,00	96	2,12			
Total	20996,70	143				

Nota. Fuente: Los autores, 2016

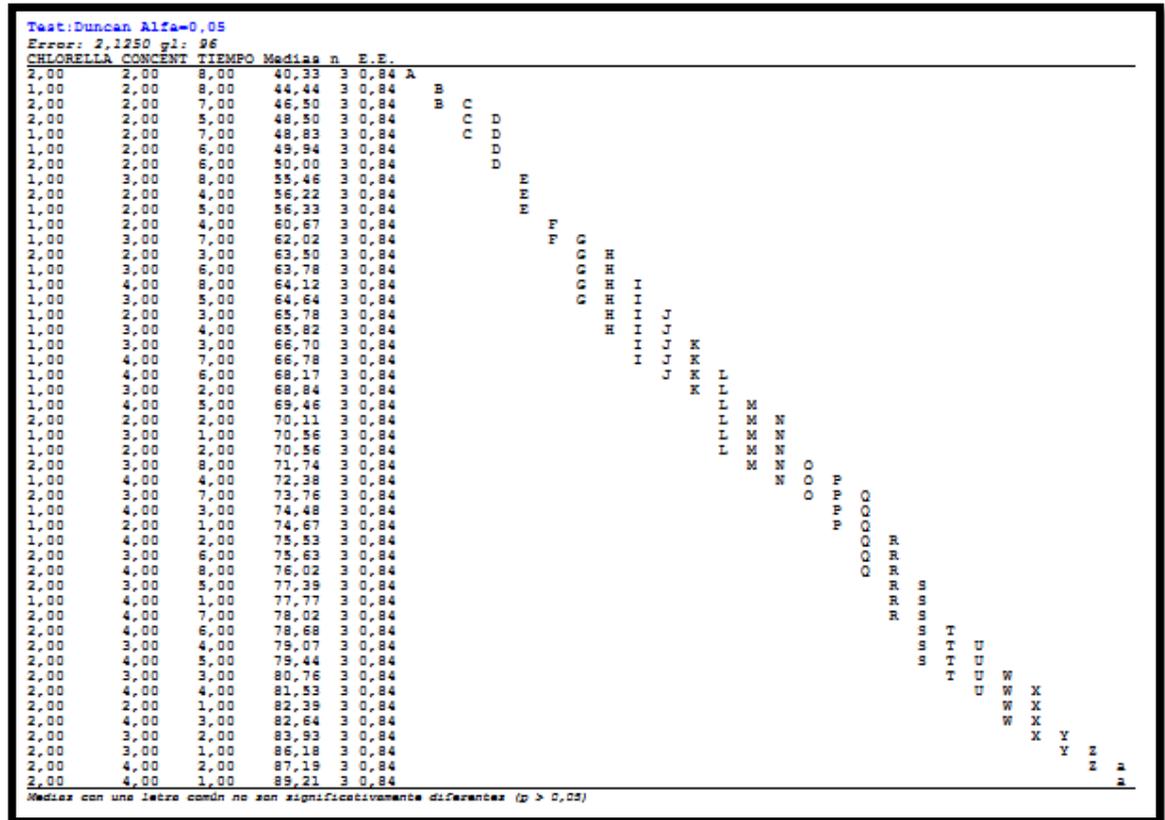
### 3.5.2 Resultados de remoción de cadmio en las soluciones acuosas durante el proceso.

Finalizada la prueba estadística para todas las variables en relación a ausencia y presencia de *Chlorella* sp. en las perlas de alginato, tiempo de exposición de la solución acuosa y concentración de Cd se comprueba que el mejor tratamiento para remoción de Cd asignado con la letra “A” es el correspondiente a perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada en la concentración de 20 ppm de Cd a los 80 min, presentándose el menor porcentaje de remanente en la solución con una media de 40,33% (Tabla 3); tal como lo demuestra Valle, (2007), las microalgas trabajan mejor a menores concentraciones de metal, en este estudio se utilizaron microalgas libres para la remoción de iones cadmio en aguas residuales urbanas, resultados similares presentaron Fonseca y Ruiz, (2008), quienes trabajaron con hongos inmovilizados probando que en menores cantidades de metal logra mayor porcentaje de remoción pues a menores concentraciones de cadmio es eficiente la interacción del ion con la pared del microorganismo; y presentando la menor remoción en el tratamiento asignado con la letra “a” correspondiente a presencia de *Chlorella* sp. a 200 ppm de

Cd en 0 min, dejando un residuo de 89,21% de metal en la solución (Tabla 4, Anexos 9 y 10).

Tabla 3.

Análisis de las interacciones de *Chlorella* sp.



Nota: Análisis de las interacciones de la presencia o ausencia de *Chlorella* sp. según diferentes concentraciones en diferentes tiempos de exposición de la solución acuosa de metal a las perlas de alginato. Fuente: Los autores, 2016

Tabla 4.

Resultados del porcentaje de remanente de cadmio en soluciones acuosas en concentración 20, 100 y 200 ppm durante 80 min.

	20 ppm		100 ppm		200 ppm	
	Remante de Cd en la solución acuosa (% de Cd en la solución acuosa)	Remante de Cd en la solución acuosa (% de Cd en la solución acuosa)	Remante de Cd en la solución acuosa (% de Cd en la solución acuosa)	Remante de Cd en la solución acuosa (% de Cd en la solución acuosa)	Remante de Cd en la solución acuosa (% de Cd en la solución acuosa)	Remante de Cd en la solución acuosa (% de Cd en la solución acuosa)
t0	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
t1	82,39	74,67	86,18	70,56	89,21	77,77
t2	70,11	70,56	83,93	68,84	87,19	75,53
t3	63,50	65,78	80,76	66,70	82,64	74,48
t4	56,22	60,67	79,07	65,82	81,53	72,38
t5	48,50	56,33	77,39	64,64	79,44	69,46
t6	50,00	49,94	75,63	63,78	78,68	68,17
t7	46,50	48,83	73,76	62,02	78,02	66,78
t8	40,33	44,44	71,74	55,46	76,02	64,12

Nota: Abreviaturas: t0= 0 min, t1= 10 min, t2= 20 min, t3= 30 min, t4= 40 min, t5= 50 min, t6= 60 min, t7= 70

min, t8= 80 min. Fuente: Los autores, 2016

### 3.5.2.1 Comparación de los tratamientos con el uso de perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. a concentración de 20 ppm de cadmio

Para el caso la concentración de cadmio para 20 ppm versus el tiempo de exposición de la solución acuosa a las perlas de alginato con *Chlorella* sp., se estableció una disminución del metal en la solución a lo largo de los 80 min tanto en el tratamiento testigo como en el tratamiento con *Chlorella* sp. observando que la mayor velocidad de remoción se da a los primeros 10 min como se muestra en el Anexo 5; por el contrario se da una diferencia significativa según R para el t8 con *Chlorella* sp. inmovilizada, presentando una mejor remoción en relación al tratamiento testigo sin presencia del alga. A tiempos inferiores a los 80 min, y como se demostro en las pruebas de viabilidad, *Cholrella* sp. es capaz de resistir 20 ppm de Cd, por lo menos

durante una hora, por otro lado, los resultados de Álvarez (2015), comprobaron que el alga puede resistir concentraciones inferiores a los 20 ppm, en su estudio de prefactibilidad de la remoción con microorganismos inmovilizados, potenciando el trabajo de remoción propio del alginato. Estos resultados nos muestran que *Chlorella* sp. pudo permanecer viable durante los 80 minutos de exposición lo que favoreció los procesos de remoción del metal, de manera que, la microalga potenciala la capacidad de remoción del alginato, por lo que se podría utilizar *Chlorella* sp. inmovilizada en esta matriz para procesos de biorremediación de cadmio a bajas concentraciones del metal.

### **3.5.2.2 Comparación de los tratamientos con el uso de perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. a concentración de 100 ppm de cadmio**

Para el caso de la concentración de 100 ppm de cadmio, a medida que avanzaron los 80 min del proceso de experimentación, mostrando una mayor velocidad de remoción a los primeros 10 min. Se observa una diferencia significativa del tratamiento testigo en relación al tratamiento con el uso de *Chlorella* sp., determinando que el proceso muestra una ventaja de remoción sin la microalga, con resultados similares Álvarez, (2015), remoción de metales con perlas de alginato de calcio (Anexo 6); este polímero tiene mayor capacidad de remoción a mayor concentración de cadmio, sin embargo debido a que *Chlorella* sp. disminuye su capacidad de remoción a medida que aumentan las concentraciones del metal debido a la muerte celular; disminuyendo la capacidad de cadmio, de manera que las biomoléculas del alginato trabajan mejor removiendo cadmio cuando están solas que cuando se encuentran unidas a las células de la microalga, debido a que la presencia de la biomasa de *Chlorella* sp., disminuye la superficie específica de contacto del alginato con el metal. Esto demuestra que la matriz de alginato podría ser utilizada efectivamente en procesos de remoción de Cd a

elevadas concentraciones. Martín, (2008), erigió que algunos metales pesados tienen mayor afinidad por material biosorbente, esto puede regirse a propiedades como: carga eléctrica, potencial iónico; además de la superficie de contacto de ciertos materiales biológicos como el alginato o de las membranas biológicas de ciertas algas que influyen en la adsorción de los iones metálicos de acuerdo a la superficie irregular y heterogénea de las membranas que constituyen los biosorbentes; de acuerdo a la interacción de los metales pesados y la matriz del material biológico; dificultando la biosorción de los iones metálicos; cuando la superficie de los biosorbentes se encuentra comprimida y/o obstaculizada por la presencia de otros metales pesados o grupos metálicos.

### **3.5.2.3 Comparación de los tratamientos con el uso de perlas de alginato con**

#### ***Chlorella* sp. y sin microalga a concentración de 200 ppm de cadmio**

Para la concentración de 200 ppm de cadmio, se observa que la mayor velocidad de remoción se da a los primeros 10 min (Anexo 7). Se corroboró que mientras aumentó la concentración de metal, existió una diferencia significativa en el tratamiento sin *Chlorella* sp., en relación al tratamiento con *Chlorella* sp. determinando que el proceso de remoción es mejor sin la presencia de la microalga, esto dado a *Chlorella* sp. disminuye su capacidad de remoción a medida que aumentan las concentraciones del metal en las soluciones debido a la presencia de biomasa no viable y a la reducción de la superficie específica de contacto (Martín, 2008).

### 3.5.2.4 Análisis comparativo de los valores medios para los tratamientos con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. en relación a diferentes concentraciones de cadmio, tiempo de exposición y sus diferentes interacciones.

Existe una diferencia en el tratamiento con perlas de alginato sin *Chlorella* sp. (Tabla 5) quedando 64,91 % del metal cadmio en la solución; comparado al tratamiento con perlas de alginato con *Chlorella* sp. en el que quedó 72,45 % del metal cadmio en la solución, esto se debe a la capacidad de resistencia de la microalga a diferentes concentraciones de metal.

Tabla 5.

Test Duncan para la presencia o ausencia de *Chlorella* sp.

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 2,1250 gl: 96				
CHLORELLA Medias n E.E.				
1,00	64,91	72	0,17	A .
2,00	72,45	72	0,17	B .
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)				

Nota: Test Duncan para la presencia o ausencia de *Chlorella* sp. en perlas de alginato durante el proceso de remoción de metal en relación al remanente de cadmio en soluciones acuosas. Fuente: Los autores, 2016

Según las pruebas estadísticas en relación a la concentración con un nivel de significancia, existe una diferencia en el tratamiento de 20 ppm de Cd (Letra “A”), dejando en la solución solo un 58,05 % de cadmio; siendo el tratamiento de 200 ppm de Cd, el menos efectivo asignado (Letra “C”), dejando 76,34 % del metal en la

solución y a la concentración de 100 ppm de cadmio, un nivel intermedio de remoción (Letra “B”) dejando en la solución un 71,64 % del metal (Tabla 6).

Tabla 6.

Test de Duncan para las concentraciones de Cd

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 2,1250 gl: 96				
CONCENT	Medias	n	E.E.	
2,00	58,05	48	0,21	A
3,00	71,64	48	0,21	B
4,00	76,34	48	0,21	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

Nota: Test Duncan para los valores medios del porcentaje de metal en el remanente de cadmio en soluciones acuosas en relación a la concentración inicial de cadmio. Fuente: Los autores, 2016

Según las pruebas estadísticas en el t8 -80 min- (Letra “A”) dejó en la solución una concentración de 58,69 % de cadmio, sin embargo, existe mayor velocidad de remoción en el tiempo 1 -10 min- probando la hipótesis de Fonseca y Ruiz (2008), quienes indican que mientras a mayor superficie de contacto entre las perlas de alginato y el metal, aumenta el porcentaje remoción (Tabla 7).

Tabla 7.

Test de Duncan para los tiempos de exposición

Test:Duncan Alfa=0,05				
Error: 2,1250 gl: 96				
TIEMPO	Medias	n	E.E.	
8,00	58,69	18	0,34	A
7,00	62,65	18	0,34	B
6,00	64,37	18	0,34	C
5,00	65,96	18	0,34	D
4,00	69,28	18	0,34	E
3,00	72,31	18	0,34	F
2,00	76,03	18	0,34	G
1,00	80,13	18	0,34	H

Nota: Test Duncan para el tiempo de explosión de las perlas de alginato a las soluciones acuosas del metal cadmio. Fuente: Los autores, 2016

Según las pruebas estadísticas para todas las medias en relación a la primera interacción con presencia o ausencia de *Chlorella* sp. en diferentes concentraciones existe una superioridad del tratamiento 2 correspondiente a perlas de alginato con *Chlorella* sp. en la menor concentración 20 ppm asignado con la letra “A” dejando en la solución solo 51,19 % de cadmio; siendo el tratamiento 2, perlas de alginato con *Chlorella* sp., a la concentración más elevada (200 ppm) el menos efectivo asignado con la letra “F” dejando 81,59 % del metal en la solución (Tabla 8).

Tabla 8.

Test de Duncan para presencia, ausencia y concentración

Test:Duncan Alfa=0,05					
Error: 2,1250 gl: 96					
CHLORELLA	CONCENT	Medias	n	E.E.	
2,00	2,00	57,19	24	0,30	A
1,00	2,00	58,90	24	0,30	B
1,00	3,00	64,73	24	0,30	C
1,00	4,00	71,08	24	0,30	D
2,00	3,00	78,56	24	0,30	E
2,00	4,00	81,59	24	0,30	F

Nota: Test Duncan para la presencia o ausencia de *Chlorella* sp. en perlas de alginato durante el proceso de remoción en relación a los valores medios del porcentaje del metal en las soluciones acuosas con diferente concentración inicial de cadmio. Fuente: Los autores, 2016

### 3.6 Digestión ácida de las perlas de alginato y relación del balance de masas

El procedimiento de digestión permitió determinar la cantidad de metal que fue removido por las perlas. Se logró una aproximación real de remoción, junto con un adecuado balance de masas, confirmando que la cantidad de metal presente en las perlas posterior al proceso de digestión sumado al total de metal presente en las soluciones acuosas fueron valores cercanos al total de metal utilizado al inicio de los ensayos como establece Logroño (2012), que debe haber un equilibrio de la materia

en donde la misma cantidad del reactivo que entra debe ser igual a la suma de las transformaciones de los productos obtenidos.

La relación del balance de masas dio como resultado que, la concentración de metal que no se encontraba en la solución acuosa, se encontraba contenida en las perlas de alginato tanto para el tratamiento con *Chlorella* sp. como para el tratamiento sin microalga, y se determinó que existió una ligera pérdida de Cd (Anexo 8), durante el proceso de digestión posiblemente debido a pérdidas durante la ebullición, demostrando que el proceso de remoción se estableció por condiciones biológicas del alginato y la microalga.

## Capítulo IV

### Conclusiones

- A bajas concentraciones de metal (20 ppm) la microalga potencia su capacidad de remoción logrando un porcentaje de remoción de 59,67% con *Chlorella* sp., siendo significativamente mayor que la remoción presentada sin *Chlorella* sp (55,56%).
- El proceso de viabilidad demostró que *Chlorella* sp. puede resistir durante periodos de por lo menos 60 min la presencia de cadmio a 20 ppm, de forma que, en el proceso de remoción de metal a esta concentración, la biomasa de la microalga permanecería viable.
- *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato se podría utilizar para procesos de biorremediación de cadmio a bajas concentraciones del metal, debido a que la presencia de biomasa viable de la microalga potenciala la capacidad de remoción del alginato.
- En los ensayos de remoción con concentraciones iniciales de 100 y 200 ppm de cadmio, se observó que existió una diferencia significativa en relación al tratamiento con *Chlorella* sp., y sin microalga. Las perlas de alginato sin microalga remueve mayor cantidad de metal que cuando se combina alginato con *Chlorella* sp. Es así que a 100 ppm y 200 ppm de cadmio se obtuvieron valores de 44,54% y 35,88% de remoción respectivamente cuando el alginato está sin microalga sp., mientras que al inmovilizar *Chlorella* sp. los porcentajes disminuyen relativamente a 28,26% y 23,92% respectivamente.
- El análisis de viabilidad mostró que al exponer directamente *Chlorella* sp. a concentraciones de 100 ppm y 200 ppm de cadmio existe una diferencia de

coloración durante la exposición. Se observó el cambio de verde oscuro a tonalidad parda que representa el deterioro celular de la microalga inmediatamente al exponer al metal a la microalga, aumentando a las 24 horas y a los 7 días se intensificó su coloración parda, de manera que las células no son viables a estas concentraciones de metal.

- La presencia de la biomasa de *Chlorella* sp., no viable por acción de las elevadas concentraciones del cadmio (100 y 200 ppm) en los ensayos de remoción, disminuye la superficie específica de contacto del alginato con el metal, de manera que la matriz de alginato sin microalga podría ser utilizada efectivamente en procesos de remoción de Cd a elevadas concentraciones.
- El análisis de la remoción de cadmio con perlas de alginato en presencia y ausencia de *Chlorella* sp., permitió definir un balance de masas adecuado entre la cantidad de metal presente en las perlas luego de la digestión y el remanente de metal en la solución acuosa, en el cual existen pocas pérdidas de metal probablemente debido proceso de ebullición.
- Se estableció que el mejor período de remoción fue a los primeros 10 min, en donde tanto el tratamiento utilizando perlas alginato con *Chlorella* sp. como el tratamiento sin microalga presentaron la mayor velocidad de remoción en relación a los demás tiempos de tratamiento.

## **Recomendaciones**

- Monitorear continuamente las condiciones de luz, temperatura, agitación y adición de nutrientes (Nitrofoska) monitoreando continuamente la coloración verde oscura propia de *Chlorella* sp. para un saludable crecimiento de la microalga, así como, un continuo conteo de células para verificar la multiplicación, descartar muerte celular y controlar posible contaminación con otro tipo de microorganismos, para obtener una *Chlorella* de calidad.

## Referencias bibliográficas

- Abalde. (2013). Microsoft Word - Introducción y Antecedentes. Generalidades de las microalgas. doc. - Capitulo1.pdf. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://tesis.uson.mx/digital/tesis/docs/20804/Capitulo1.pdf>
- Álvarez Valencia César Alfredo. (2015). «ESTUDIO DE PRE -FACTIBILIDAD TÉCNICA DE REMOCIÓN Y ELUCIÓN DE COBRE CON ESFERAS DE ALGINATO». Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://opac.pucv.cl/pucv\\_txt/txt-0000/UCD0010\\_01.pdf](http://opac.pucv.cl/pucv_txt/txt-0000/UCD0010_01.pdf)
- Argotta G, Argotta H, H, M., y Larramendi J. (2012). Histología y química umbral de metales pesados en hígado, branquias y cerebro de *Gambusia punctata* (Poeciliidae) del río Filé de Santiago de Cuba. Recuperado 7 de diciembre de 2016, a partir de <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050512B/011ATM08.pdf>
- Beltrán-Pineda, M. E., y Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Biblioteca Ceibal. (2012). 002-*Chlorella-vulgaris*.pdf. Recuperado 14 de diciembre de 2016, a partir de [http://contenidos.ceibal.edu.uy/fichas\\_educativas/\\_pdf/ciencias-naturales/reino-protista/002-Chlorella-vulgaris.pdf](http://contenidos.ceibal.edu.uy/fichas_educativas/_pdf/ciencias-naturales/reino-protista/002-Chlorella-vulgaris.pdf)
- Bonnet. (2014). Resistencia a la corrosión de metales pesados. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.bonnet.es/resitcorrosion.pdf>
- Cuizano, N., y Navarro, A. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. Recuperado el 15

de marzo de 2017, a partir de [file:///C:/Users/dell/Downloads/Dialnet-BiosorcionDeMetalesPesadosPorAlgasMarinas-2662606%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/dell/Downloads/Dialnet-BiosorcionDeMetalesPesadosPorAlgasMarinas-2662606%20(1).pdf)

Fonseca, D., y Ruiz, J. (2008). DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE REMOCION DE CADMIO, PLOMO Y NIQUEL POR HONGOS DE LA PODREDUMBRE BLANCA INMOVILIZADOS. Recuperado el 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis148.pdf>

Gómez, O., Rodríguez, R., y Subero, S. (2011). Redalyc. CULTIVO POLIALGAL (Chaetoceros gracilis, *Chlorella* sp. Y Tetraselmis chuii) EN MEDIOS NUTRITIVOS NO CONVENCIONALES - 427739445013.pdf. Recuperado el 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/4277/427739445013.pdf>

González-Moya, M. (2015). Inmovilización de Coelastrum sp. en esferas de alginato y su uso como biosorbentes de cafeína. Recuperado a partir de <http://rodin.uca.es:80/xmlui/handle/10498/17615>

Hernández Alexis, y Labbé José. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.scielo.cl/pdf/revbiolmar/v49n2/art01.pdf>

Jiménez David. (2012). Cuantificación de metales pesados (Cadmio, cromo, níquel y plomo) en agua superficial, sedimentos y organismos... Jiménez, David.pdf. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1683/1/Cuantificaci%C3%B3nde%20metales%20pesados%20\(Cadmio,%20cromo,%20n%C3%ADquel%20y%20plomo\)%20en%20agua%20superficial,%20sedimentos%20y%20organismos...%20Jim%C3%A9nez,%20David.pdf](http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1683/1/Cuantificaci%C3%B3nde%20metales%20pesados%20(Cadmio,%20cromo,%20n%C3%ADquel%20y%20plomo)%20en%20agua%20superficial,%20sedimentos%20y%20organismos...%20Jim%C3%A9nez,%20David.pdf)

- Infante Cherlys, Angulo Edgardo, Zárata Ana, Flores July, Barrios Freddy, y Zapata Cindy. (2012). PROPAGACIÓN DE LA MICROALGA *Chlorella* sp. EN CULTIVO POR LOTE: CINÉTICA DEL CRECIMIENTO CELULAR. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://www.exeedu.com/publishing.cl/av\\_cienc\\_ing/2012/Vol3/Nro2/16-ACI1105-11-full.pdf](http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2012/Vol3/Nro2/16-ACI1105-11-full.pdf)
- Larenas Christian, y Ballesteros José Luis. (2012). Determinación de la eficacia de *Azolla caroliniana* como matriz de hiperacumulación de metales pesados cuantificados. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento\\_completo\\_...pdf?seque=17](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento_completo_...pdf?seque=17)
- Lenntech. (2016). Metales pesados. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.lenntech.es/metales-pesados.htm>
- Logroño, R. (2012). BALANCES DE MASA Y ENERGÍA. Recuperado el 15 de marzo de 2017, a partir de <http://blog.utp.edu.co/balances/files/2015/02/LIBRO-BME2015-1.pdf>
- Martín L, (2008). CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE BIOMASA RESIDUAL A LA ELIMINACIÓN DE METALES PESADOS. Universidad de granada - 17514629.pdf. Recuperado 10 de mayo de 2017, a partir de <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/1906/1/17514629.pdf>
- Martínez M, y García M. (16 de diciembre de 2011). Aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttextpid=S1665-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttextpid=S1665-)

27382012000100005

Miranda Martínez, Migdalia, & Armando Cuéllar. (2001). *Farmacognosia y productos naturales*. Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela.

Moreno F. H., Méndez García E., Quilcat León V., y Huaranga Arévalo F. (2012).

Contaminación por metales pesados en la cuenca del río Moche. Recuperado

15 de marzo de 2017, a partir de

[https://www.google.com.ec/url?sa=tyrct=jyq=yesrc=sysource=webycd=1yved=0ahUKEwjU9vjx-](https://www.google.com.ec/url?sa=tyrct=jyq=yesrc=sysource=webycd=1yved=0ahUKEwjU9vjx-NjSAhVEymMKHZFqBw4QFggaMAAyurl=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4027759.pdfyusg=AFQjCNGF-yGnLX1gqqryJjJnLE2hY9T5zgzsig2=2sRnrTaa7tawOpNbMJKL8Q)

[NjSAhVEymMKHZFqBw4QFggaMAAyurl=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4027759.pdfyusg=AFQjCNGF-](https://www.google.com.ec/url?sa=tyrct=jyq=yesrc=sysource=webycd=1yved=0ahUKEwjU9vjx-NjSAhVEymMKHZFqBw4QFggaMAAyurl=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4027759.pdfyusg=AFQjCNGF-yGnLX1gqqryJjJnLE2hY9T5zgzsig2=2sRnrTaa7tawOpNbMJKL8Q)

[yGnLX1gqqryJjJnLE2hY9T5zgzsig2=2sRnrTaa7tawOpNbMJKL8Q](https://www.google.com.ec/url?sa=tyrct=jyq=yesrc=sysource=webycd=1yved=0ahUKEwjU9vjx-NjSAhVEymMKHZFqBw4QFggaMAAyurl=https%3A%2F%2Fdialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F4027759.pdfyusg=AFQjCNGF-yGnLX1gqqryJjJnLE2hY9T5zgzsig2=2sRnrTaa7tawOpNbMJKL8Q)

Morí, M. M., H. Maldonado, E. Guzmán, Eyrás, C., Bernardelli, C., Viera, M., y

Donati, E. (2013). Estudio cinético e isotérmico de la biosorción de zinc (ii) y

cadmio (ii) para un sistema monometálico-bimetálico por undaria pinnatifida

sp. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 16(2), 39-46.

Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de

<http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/6592>

Odum, H. T. (2016). *Heavy Metals in the Environment: Using Wetlands for Their*

*Removal*. CRC Press. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de

[https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=vBzNBQAAQBAJyoi=fnd](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=vBzNBQAAQBAJyoi=fndypg=PP1ydq=Heavy+Metals+in+the+Environment:+Using+Wetlands+for+T)

[ypg=PP1ydq=Heavy+Metals+in+the+Environment:+Using+Wetlands+for+T](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=vBzNBQAAQBAJyoi=fndypg=PP1ydq=Heavy+Metals+in+the+Environment:+Using+Wetlands+for+T)

[heir+Removalyots=\\_TEIG1-](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=vBzNBQAAQBAJyoi=fndypg=PP1ydq=Heavy+Metals+in+the+Environment:+Using+Wetlands+for+T)

[HeQysig=Lw6FuDpjWIn7V78ZJKxuCzPEvcc#v=onepageyq=Heavy%20Me](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=vBzNBQAAQBAJyoi=fndypg=PP1ydq=Heavy+Metals+in+the+Environment:+Using+Wetlands+for+T)

[tals%20in%20the%20Environment%3A%20Using%20Wetlands%20for%20](https://books.google.com.ec/books?hl=esylr=yid=vBzNBQAAQBAJyoi=fndypg=PP1ydq=Heavy+Metals+in+the+Environment:+Using+Wetlands+for+T)

Their%20Removalyf=false

Olarte Gómez Edward Andrés, y Valencia. (2016). EVALUACIÓN DEL USO DE LA MICROALGA *Chlorella vulgaris* EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES (VINAZAS). Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/5882/3/91535665.pdf>

Pérez Perla, y Azcona María. (2012). Los efectos de cadmio en la salud. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.medigraphic.com/pdfs/quirurgicas/rmq-2012/rmq123i.pdf>

Plaza Josefina. (2012). Remoción de metales pesados empleando algas marinas - Documento\_completo\_\_.pdf. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento\\_completo\\_.pdf?sequence=17](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento_completo_.pdf?sequence=17)

Roa Parra Alba Lucía, y Cañizares Villanueva Rosa Olivia. (2012). Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <http://www.redalyc.org/pdf/903/90326398006.pdf>

Ruiz, A. (2011). Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada. Recuperado el 15 de marzo de 2017, a partir de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12831/Ruiz%20Martinez%20Ana%20-%20Tesina%20Fin%20Master%20-%202011.pdf?sequence=1>

Santos Ana María, Gonzáles Yolanda, y Sastre Carlos. (2014). Uso y aplicaciones potenciales de las microalgas. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de

[http://www.revista-anales.es/web/n\\_24/pdf/seccion\\_13.pdf](http://www.revista-anales.es/web/n_24/pdf/seccion_13.pdf)

Tapia N., Cabrejos, J., P, N. R., D, F. T., y M, I. R. (2013). PREPARACIÓN DE PERLAS DE ALGINATO DE CALCIO CON PROPIEDADES MAGNÉTICAS Y SU APLICACIÓN EN LA ADSORCIÓN DE Cu (II). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 12(2), 29-33. Recuperado

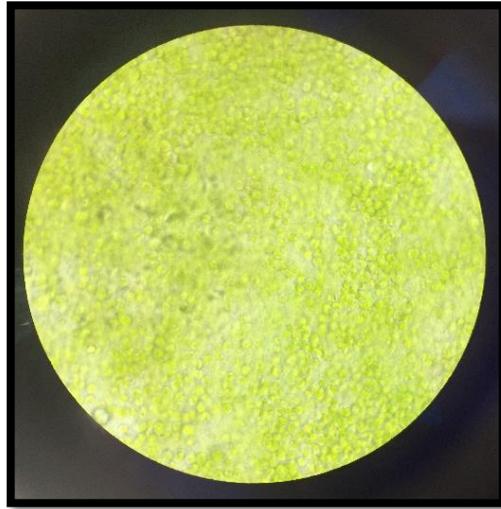
4 de enero de 2017, a partir de <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/quim/article/view/4317>

Valencia. (2014). PROPIEDADES\_DEL\_ALGACHLORELLA.pdf. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de [http://www.decretonatural.com/vidasana/propiedadesalimentos/PROPIEDADES\\_DEL\\_ALGACHLORELLA.pdf](http://www.decretonatural.com/vidasana/propiedadesalimentos/PROPIEDADES_DEL_ALGACHLORELLA.pdf)

Valle Gabriela. (2007). Utilización de microalgas inmovilizadas para la remoción de metales pesados en los efluentes de aguas residuales. Recuperado 15 de marzo de 2017, a partir de <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/747/1/177811.pdf>

## Anexos

### Anexo 1. Morfología células de *Chlorella* sp.



Fuente: Los autores, 2016

## Anexo 2. Pruebas de viabilidad fase inicial

Prueba de viabilidad de *Chlorella* sp. expuesta a diferentes concentraciones de Cd a tiempo cero, (A) 0 ppm, (B) 20 ppm, (C) 100 ppm, (D) 200 ppm.



Fuente: Los autores, 2016

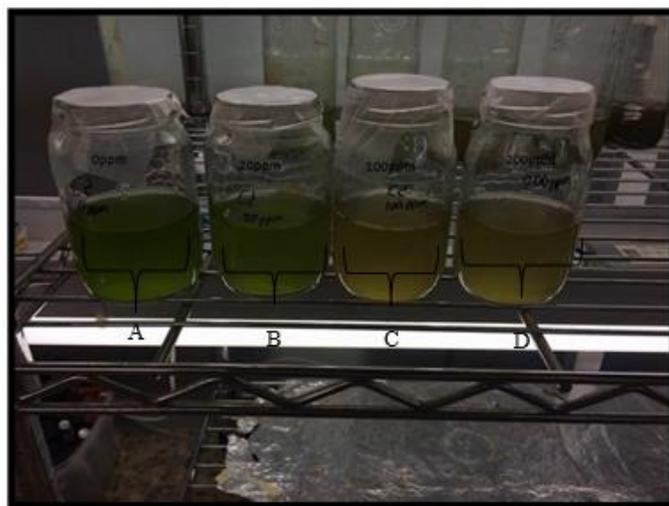
Prueba de viabilidad de *Chlorella* sp. expuesta a diferentes concentraciones de Cd a tiempo 60 min, (A) 0 ppm, (B) 20 ppm, (C) 100 ppm, (D) 200 ppm.



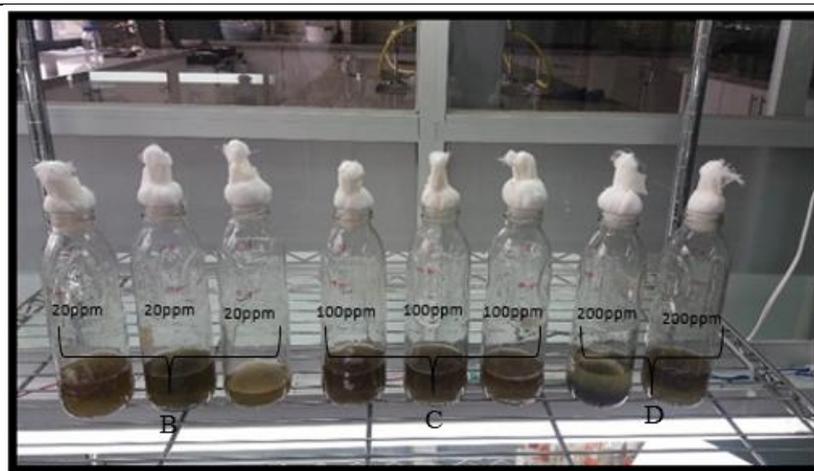
Fuente: Los autores, 2016

### Anexo 3. Pruebas de viabilidad fase final

Prueba de viabilidad de *Chlorella* sp. expuesta a diferentes concentraciones de Cd a tiempo 24 horas, (A) 0 ppm, (B) 20 ppm, (C) 100 ppm, (D) 200 ppm.



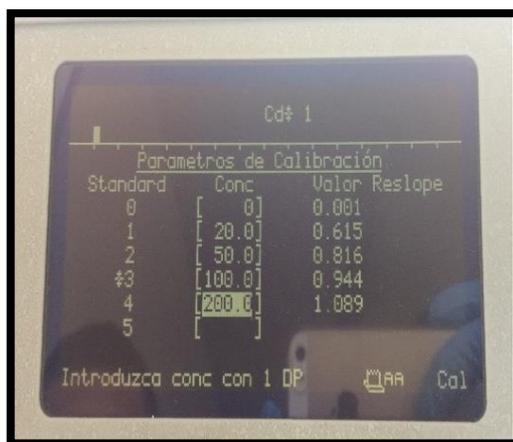
Fuente: Los autores, 2016



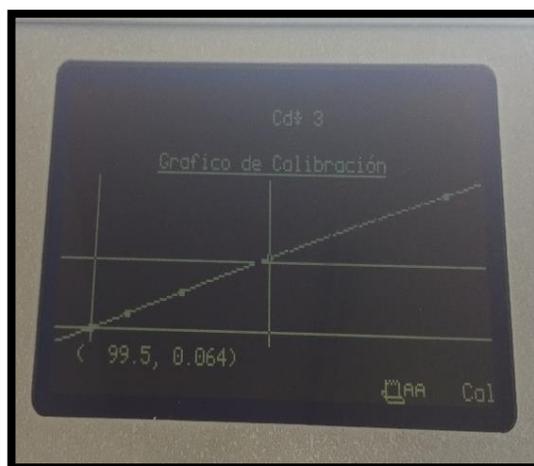
Prueba de viabilidad de *Chlorella* sp. sin Nitrofoska expuesta a diferentes concentraciones de Cd a tiempo 7 días, (B) 20 ppm, (C) 100 ppm, (D) 200 ppm.

Fuente: Los autores, 2016

Anexo 4. Lectura y curva de regresión estándares de Cadmio.  $R = 0,99$

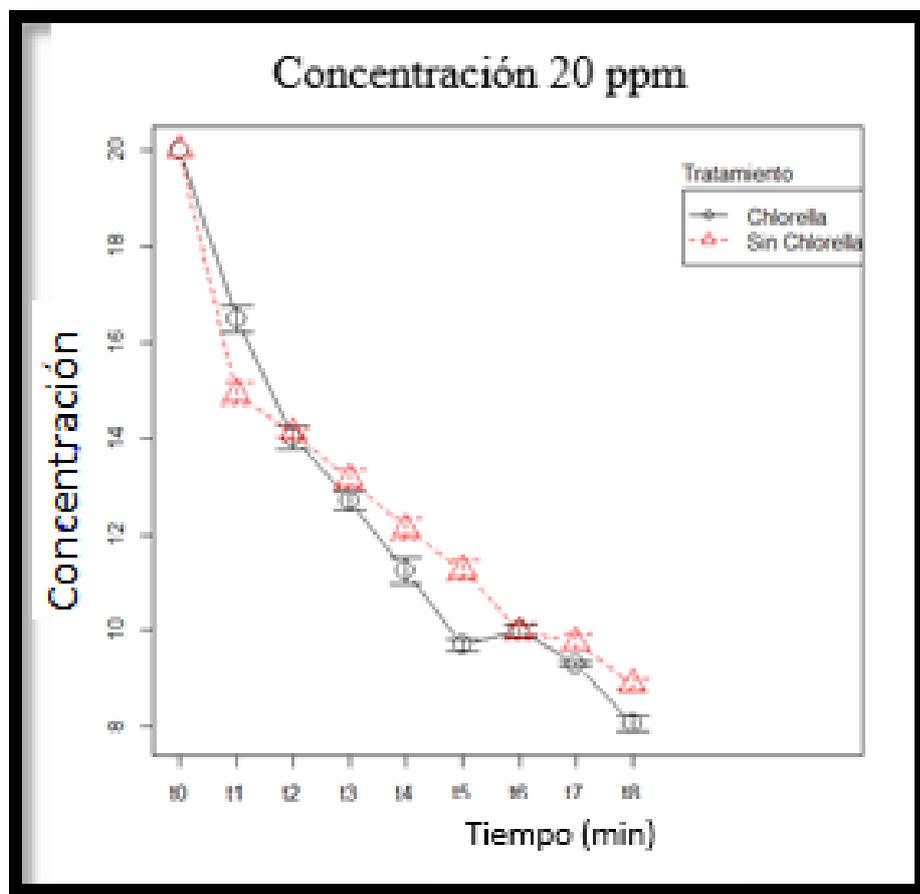


Fuente: Los autores, 2016



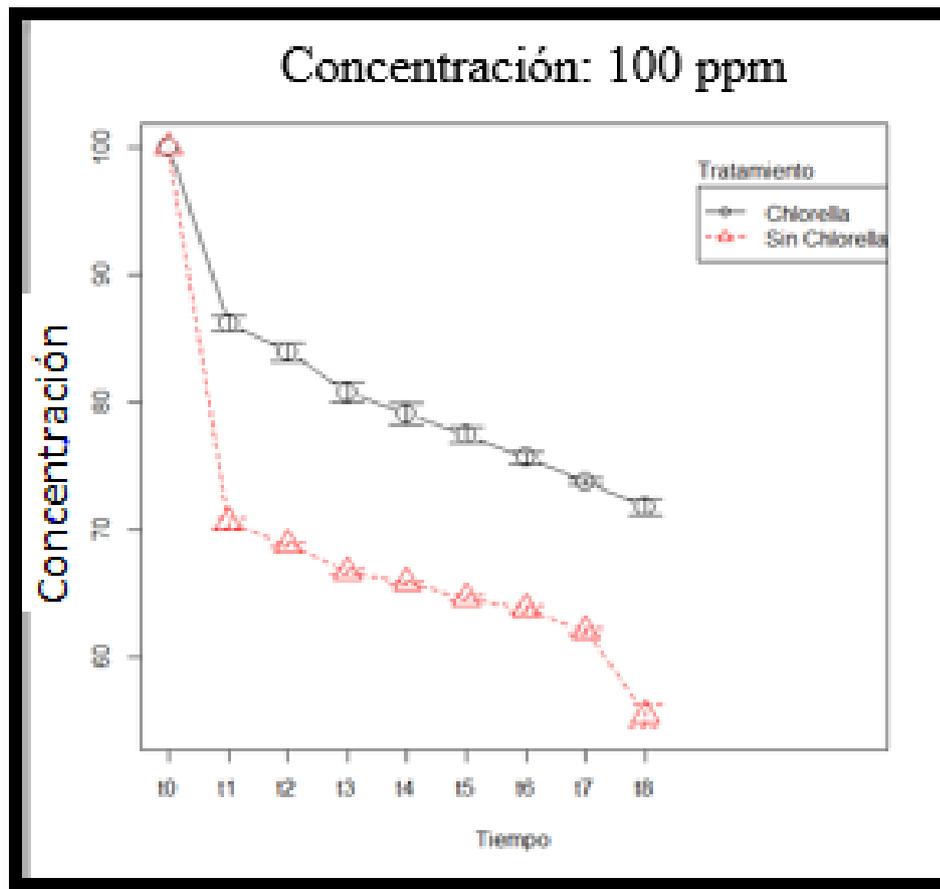
Fuente: Los autores, 2016

Anexo 5. Variación de la concentración de 20 ppm de Cd



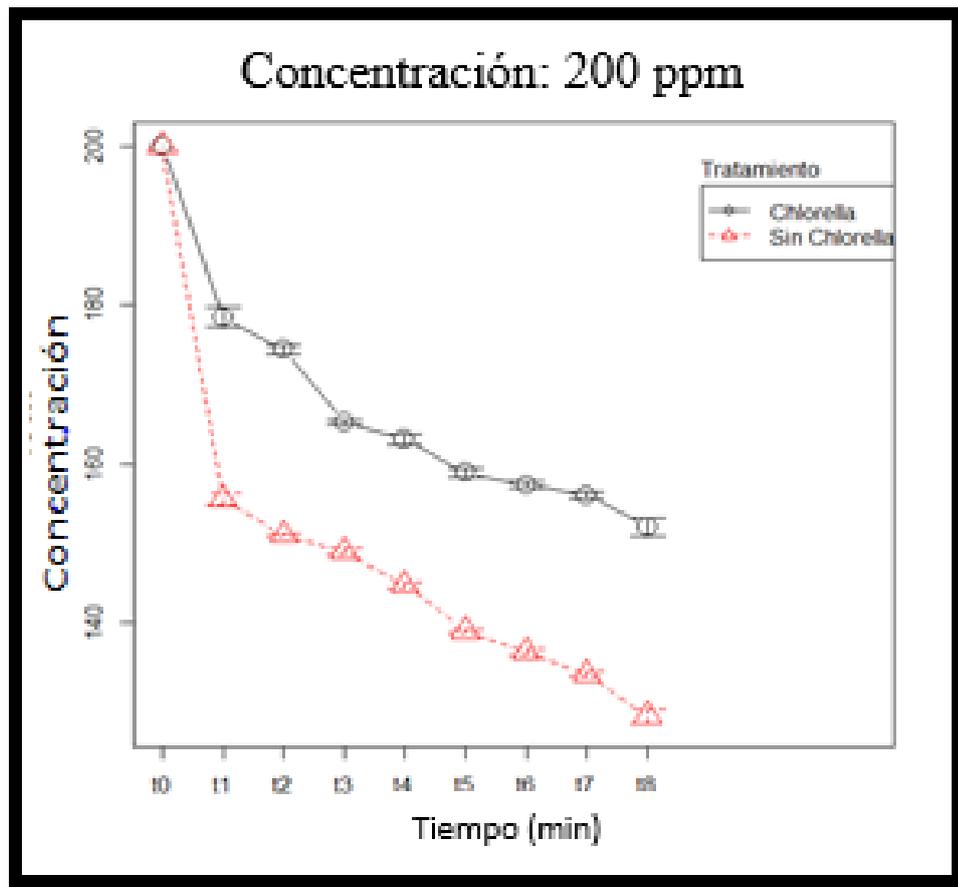
Nota: Variación de la concentración de Cd en la solución acuosa con respecto al tiempo durante el proceso de remoción de 20 ppm de metal por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. Fuente: Los autores, 2017

Anexo 6. Variación de la concentración de 100 ppm de Cd



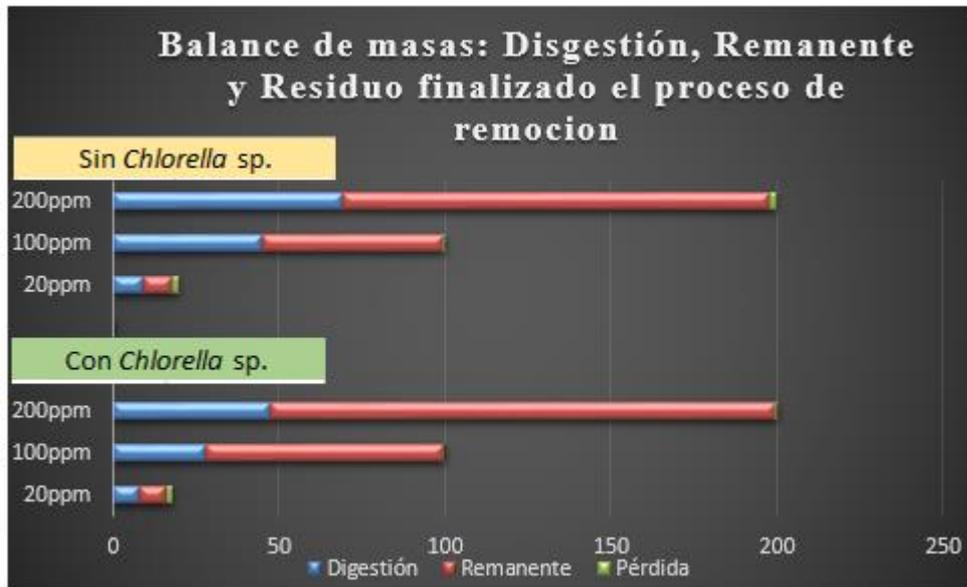
Nota: Variación de la concentración de Cd en la solución acuosa con respecto al tiempo durante el proceso de remoción de 100 ppm de metal por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. Fuente: Los autores, 2017

Anexo 7. Variación de la concentración de 200 ppm de Cd



Nota: Variación de la concentración de Cd en la solución acuosa con respecto al tiempo durante el proceso de remoción de 200 ppm de metal por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* sp. Fuente: Los autores, 2017.

Anexo 8. Balance de masas



Fuente: Los autores, 2017

Anexo 9. Valores de las mediciones de cadmio en solución sin *Chlorella* sp.

Concentración Inicial 20 ppm Cd										
Datos con <i>Chlorella</i> sp.		t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
Repeticiones	Balón	20	15,7	13	12,9	11,6	10,2	9,6	9,5	8,7
		20	15	13,1	13,1	11,3	9,6	10,3	9,3	7,8
		20	16,3	13,4	12	11,8	9,5	10,3	9,3	7,7
	Balón	20	16,9	14,3	11,7	11,7	9,8	9,6	9	7,7
		20	17,8	14,6	12,5	11,3	10,2	10,1	9,5	8,5
		20	17	13,6	13,1	11,1	9,3	9,9	9,3	8,8
	Balón	20	16,5	14,4	13,3	11,5	9,5	9,5	9,3	7,6
		20	17,1	15,1	13,4	11,8	9,9	10,4	9,3	8,2
		20	16	14,7	12,3	9,1	9,3	10,3	9,2	7,6

Concentración Inicial 100ppm Cd										
Datos con <i>Chlorella</i> sp.		t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
Repeticiones	Balón	100	85,4	80,3	78,9	76,5	75	74,9	74	72,5
		100	84,5	81,8	77,8	76,4	75,1	75	74,2	73,9
		100	83,1	82,6	77,8	76,5	75,3	74,9	74,5	74,4
	Balón	100	86,7	83,9	82	81,7	79,2	79,1	74	69,7
		100	88,2	86,5	82,7	81,6	79,2	75,6	72,7	70,2
		100	87,6	85	84,2	83,4	79	75,6	72,7	71,7
	Balón	100	84,7	82,8	80	78,8	78,4	75	73,2	70,5
		100	88,6	86,5	81,1	78,9	77,1	75,3	74,2	72,8
		100	86,8	86	82,3	77,8	78,2	75,3	74,3	70

Concentración Inicial 200 ppm Cd										
Datos con <i>Chlorella</i> sp.		t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
Repeticiones	Balón	200	184,4	175,3	166,1	165	162,5	156,4	156,3	155,8
		200	177,9	175,4	166,5	165	158,4	156,8	156,5	155,9
		200	176,1	175,1	165,3	164	159,6	159,2	158,7	153,8
	Balón	200	172,8	170,8	165,5	161,8	156,7	156	155,3	151,6
		200	176,8	172,4	164,2	161,8	158,3	157,3	153,7	151,2
		200	176,5	173,1	166,4	165,3	159,3	158,2	156,5	149,3
	Balón	200	184,2	176,2	165,8	161,3	160,2	159,3	155,8	153
		200	178	175,4	163,9	160,2	158,3	157	155,7	144,9
		200	179,1	175,8	163,9	163,2	156,6	156	155,9	152,8

Fuente: Los autores, 2017

Anexo 10. Valores de las mediciones de cadmio en solución con *Chlorella* sp.

Concentración Inicial 20 ppm Cd										
Datos sin <i>Chlorella</i> sp.		t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	
Repeticiones	Balón	20	15,1	14,1	13,4	13,4	11	9,9	9,8	9,2
		20	14,9	14,5	12,9	11,2	10,9	10	9,5	8,9
		20	15,4	14,3	13,9	11,5	11,6	10,3	9,1	8,7
	Balón	20	13,9	13,9	12,7	12,6	11,9	9,6	10	9,2
		20	14,2	14,6	12,8	12,3	12	9,4	9,9	9,1
		20	15,3	13,8	14,1	12	10,7	10,6	10,3	9
	Balón	20	14,8	13,9	13,6	11,9	11,3	10,8	10,5	8,6
		20	14,5	14	12,1	11,8	11,8	9,7	9,6	8,2
		20	16,3	13,9	12,9	12,5	10,2	9,6	9,2	9,1

Concentración Inicial 100ppm Cd										
Datos sin <i>Chlorella</i> sp.		t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
Repeticiones	Balón	100	70,8	68,8	66,7	65,8	65	64,6	62,3	59,3
		100	70,4	68,4	66,6	66,5	65,2	64,9	63,4	58,9
		100	70,3	69,2	66,5	65,5	64,8	63,6	61,3	57,6
	Balón	100	69,7	68,2	67,4	65,8	64,9	64,9	62	55,4
		100	68,7	68,5	67,1	65,5	64	63,6	62,9	56,2
		100	69,5	69,4	66,4	65,6	64,3	62,9	60,9	53,2
	Balón	100	71	69,2	67,6	66,7	63,7	62,9	61,7	52,4
		100	72,7	68,9	66,3	65,7	64,8	63	61,3	53,1
		100	71,9	69	65,7	65,3	65,1	63,6	62,4	53

Concentración Inicial 200 ppm Cd										
Datos sin <i>Chlorella</i> sp.		t0	t1	t2	t3	t4	t5	t6	t7	t8
Repeticiones	Balón	200	152,4	150,9	149,8	144,4	139,4	135,7	134,9	130,1
		200	152,5	151,8	149,6	144,2	139,7	134,2	135	129,6
		200	155,7	150,7	149,4	143,9	139	134,8	132,5	128,7
	Balón	200	154,9	151,8	149,8	145,8	138,5	137,4	133,4	125,4
		200	156,5	150,6	150,5	143,5	138,9	137,2	131,7	130,9
		200	155,3	150,3	148,9	142,9	138,7	138,6	134,5	132,3
	Balón	200	155,7	151,1	148	145,5	138,7	136,6	134,1	126,5
		200	157,1	151,8	147,6	146,5	139,7	135,8	132,9	124,7
		200	159,7	150,6	147	146,1	137,7	136,7	133	125,9

Fuente: Los autores, 2017