

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de Titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:
EVALUACIÓN DE REMOCIÓN DE PLOMO POR ACCIÓN DE PERLAS DE
ALGINATO CON *Chlorella* sp. INMOVILIZADA**

**AUTORA:
NIDIA GEOVANNA TRIVIÑO TONATO**

**TUTORA:
MARÍA FERNANDA GUEVARA**

Quito, diciembre del 2018

Cesión de derechos de autor

Yo Nidia Geovanna Triviño Tonato con documento de identificación N° 080358350-9 manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo de titulación intitulado: “Evaluación de remoción de plomo por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera 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 mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



.....
Nombre: Nidia Geovanna Triviño Tonato
Cédula: 080358350-9
Fecha: diciembre, 2018

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de remoción de plomo por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada” realizado por Nidia Geovanna Triviño Tonato, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, diciembre 2018



.....
María Fernanda Guevara Granja
Cédula de identidad: 100245494-8

Agradecimiento

A Dios por darme las fuerzas para cumplir mis metas e iluminar mi camino cuando todo se tornaba complicado.

A mis padres Marcela Tonato y Ediezon Triviño por el apoyo incondicional que día a día me brindan sin limitarme a nada, por enseñarme que un sueño por más grande que sea, se puede alcanzar.

Mis Hermanos Erika Triviño y Marcelo Triviño porque a pesar de todo siempre están para dar un consejo en el momento preciso, sin importar distancia u hora.

De igual forma agradezco el apoyo de mi tutora María Fernanda Guevara por brindarme su tiempo, conocimiento, paciencia y darme la guía requería durante la realización del proyecto. Al personal del laboratorio por su disponibilidad de tiempo y enseñanzas en el transcurso del proyecto.

Por último, a mis amigos incondicionales que siempre estuvieron para darme esa voz de aliento y ánimo durante el transcurso de la Carrera.

Índice

Resumen

Abstract

Introducción 1

Capítulo I 5

Marco conceptual 5

1.1 Metales pesados 5

1.2 Tipos de metales pesados usados en la industria 6

1.3 Contaminación por metales pesados 7

1.4 Plomo 8

1.4.1 Toxicidad del plomo 8

1.4.2 Fuentes y usos del plomo 10

1.5 Tratamientos para remoción de metales 11

1.6 Biorremediación 12

1.6.1 Factores que afectan el proceso de biorremediación por adsorción de metales pesados 15

1.7 Organismos empleados en la biorremediación de metales pesados 16

1.8 Microalga fitoplanctónica *Chlorella* sp 17

1.9 Mecanismo de acción de algas en la remoción de metales 18

1.10 Inmovilización de células 20

1.11 Tipos de inmovilización 21

1.12	Tipos de matrices naturales para inmovilización	21
1.12.1	Alginato.....	22
Capítulo II.....		25
Marco metodológico.....		25
2.1	Elaboración de perlas de alginato de calcio (perlas sin <i>Chlorella</i> sp.).....	25
2.2	Inmovilización de <i>Chlorella</i> sp. en perlas de alginato	25
2.3	Cuantificación de la concentración de plomo	26
2.4	Planteamiento de diseño experimental	26
2.5	Cinética de remoción de plomo en solución acuosa por acción de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> y perlas de alginato sin <i>Chlorella</i>	27
2.6	Análisis de la remoción de plomo en solución acuosa a diferentes pH.....	28
2.7	Ensayo de viabilidad de <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	28
2.8	Evaluación de la remoción de plomo en solución acuosa por acción de diferentes concentraciones de <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	29
2.9	Análisis de remoción de Pb en solución acuosa en función de diferentes concentraciones del metal por acción de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> , perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> y <i>Chlorella</i> sin inmovilizar.....	29
Capítulo III		31
Resultados y Discusión.....		31
3.1	Elaboración de perlas de alginato de calcio (perlas sin <i>Chlorella</i> sp.).....	31
3.2	Inmovilización de <i>Chlorella</i> sp. en perlas de alginato	32

3.3	Cinética de remoción de plomo en solución acuosa por acción de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> y perlas de alginato sin <i>Chlorella</i>	34
3.4	Análisis de la remoción de plomo en solución acuosa con diferentes pH... 36	
3.5	Ensayo de viabilidad de <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	38
3.6	Evaluación de la remoción de plomo en solución acuosa por acción de diferentes concentraciones de <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	42
3.7	Análisis de remoción de Pb en solución acuosa en función de diferentes concentraciones del metal por acción de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> , perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> y <i>Chlorella</i> sin inmovilizar.....	44
	Conclusiones	48
	Recomendaciones	50
	Bibliografía	51
	Anexos	67

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de tratamientos	27
Tabla 2. Descripción de las características físicas de perlas sin <i>Chlorella</i> sp	31
Tabla 3. Descripción de las características físicas de perlas con <i>Chlorella</i> sp.	33
Tabla 4. Efecto del pH en la remoción de Pb por acción de las perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. y perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.....	37
Tabla 5. Efecto de la densidad celular de <i>Chlorella</i> sp. en la remoción de Pb por acción	43

Índice de figuras

Figura 1. Principales sitios de unión de metales pesados en algas	20
Figura 2. Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada.	32
Figura 3. Estructura física de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. inmovilizada con 1.6x10 ⁷ células/mL.....	33
Figura 4. Descripción grafica de la concentración del plomo empleando perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. y sin <i>Chlorella</i> vs Tiempo.....	35
Figura 5. Crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. en las perlas antes y después de ser sometidos a solución de plomo.	40
Figura 6. Remoción de Pb por de los distintos tratamientos a diferentes concentraciones de metal.	45

Anexos

Anexo 1. Datos de la curva de calibración de plomo. $R=0.99$	67
Anexo 2. Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp.....	68
Anexo 3. Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp.....	69
Anexo 4. Prueba del efecto del pH en el proceso de remoción de plomo.	70
Anexo 5. Análisis del tiempo de contacto para la remoción de plomo por acción de perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. y perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp.....	71
Anexo 6. Análisis de varianza correspondiente al porcentaje de remoción del plomo, obtenido del análisis a diferentes valores de pH.....	72
Anexo 7. Análisis de varianza correspondiente al porcentaje de remoción del plomo, obtenido del análisis a diferentes concentraciones celulares de <i>Chlorella</i> sp. en perlas de alginato.	73
Anexo 8. Ensayo de densidad celular óptima para la remoción de plomo, por acción de diferentes concentraciones de <i>Chlorella</i> sp. y perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp.....	74
Anexo 9. Datos estadísticos del porcentaje de bioadsorción por acción perlas con <i>Chlorella</i> sp., perlas sin <i>Chlorella</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. sin inmovilizar	75
Anexo 10. Efecto de la concentración de Pb en el porcentaje de remoción por acción de perlas con <i>Chlorella</i> sp., perlas sin <i>Chlorella</i> sp. y <i>Chlorella</i> sp. sin inmovilizar.	76

Resumen

El plomo es un metal pesado empleado en minería y combustibles, resulta altamente tóxico al bioacumularse en los diferentes niveles tróficos, causando serios problemas ambientales. La microalga *Chlorella* ha presentado gran potencial en la remediación de metales pesados. Esta investigación planteó evaluar la remoción de plomo por acción de perlas de alginato con esta microalga inmovilizada y como control perlas de alginato sin microalga.

La capacidad de remoción de plomo se analizó mediante el estudio cinético de adsorción en perlas de alginato de calcio, evaluando el efecto del pH 4 y 5, así como la incorporación de la microalga a concentraciones 0.3×10^7 , 1.6×10^7 , 3×10^7 células/mL de alginato. Para medir la concentración de plomo en las soluciones acuosas se empleó espectrofotometría de absorción atómica.

Se evidenció que el máximo de remoción de plomo ocurre en tiempos cercanos a 143 minutos; mientras que variables como pH, concentración celular y diferentes concentraciones del metal no tuvieron efecto significativo en la eliminación del metal. No hay una relación directamente proporcional entre la concentración de la microalga inmovilizada y la capacidad de remoción de Pb. Por último, se comparó la discrepancia en la capacidad de remoción por perlas de alginato con *Chlorella*, perlas de alginato sin *Chlorella* y *Chlorella* sin inmovilizar a diferentes concentraciones de metal (0-20 mg/L) en la solución, mostrando que el tratamiento con perlas de alginato sin *Chlorella* remueven mayor cantidad del contaminante, dado que el alginato de forma individual también presenta acción de remoción.

Palabras clave: Microalga, plomo, remoción, alginato

Abstract

Lead is a heavy metal used in mining and fuel, it is highly toxic to bioaccumulate at different trophic levels, causing serious environmental problems. The microalga *Chlorella* has presented great potential in the remediation of heavy metals. This investigation proposed to evaluate the removal of lead by the action of alginate beads with this immobilized microalga and as a control alginate beads without microalga.

Lead removal capacity was analyzed by the kinetic study of adsorption on calcium alginate beads, evaluating the effect of pH 4 and 5 as well as the incorporation of the microalga at concentrations 0.3×10^7 , 1.6×10^7 , 3×10^7 cells/ mL of alginate. To measure the concentration of lead in the aqueous solutions, atomic absorption spectrophotometry was used.

It was evidenced that the maximum lead removal occurs in times close to 143 minutes; while variables as pH, cell concentration and different concentrations of the metal did not have significant effect on the removal of this metal. There is no directly proportional relationship between the concentration of the immobilized microalgae and the ability to remove Pb. Finally, we compared the discrepancy in the ability to remove alginate beads with *Chlorella*, alginate beads without *Chlorella* and *Chlorella* without immobilizing to different concentrations of metal (0-20 mg / L) in the solution, showing that the treatment with alginate beads without *Chlorella* remove more of the contaminant, since the alginate individually also shows removal action.

Keywords: Microalgae, lead (Pb), removal, alginate

Introducción

Con el afán de crear productos y servicios que satisfagan las necesidades de los seres humanos se genera el uso desmedido de metales pesados que después de cumplir su función y en muchos casos son derramados a ríos, suelo y otros ecosistemas sin realizar ningún previo tratamiento. Las distintas industrias como la minería, producción de combustible, operaciones militares, procesos de fundición, utilización de productos químicos agrícolas, hornos de ladrillos, industrias de pequeña escala y combustión de carbón, son las principales fuentes antropogénicas causantes de la contaminación del medio ambiente con agentes tóxicos lo que provoca irregularidades en la salud del ecosistema, animales y el hombre (Abu Al-Rub, El-Naas, Ashour, & Al-Marzouqi, 2006).

Estos agentes tóxicos pueden ser metales como arsénico, plomo, cadmio, níquel, mercurio, cromo, cobalto, zinc, cadmio, bario, vanadio y selenio, los cuales resultan nocivos a bajas concentraciones, no son biodegradables y se acumulan por largos períodos de tiempo en el medio ambiente e incluso forman parte de la cadena trófica (Vera, Uguña, García, Flores, & Vázquez, 2016). Sin embargo, algunos elementos (zinc, cobre, manganeso, azufre, hierro, boro), pueden ser utilizados a bajas concentraciones por los seres vivos para realizar funciones metabólicas esenciales para sobrevivir. Sin embargo, al existir un consumo excesivo de los mismos, pueden ser perjudiciales para la salud (Verma & Dwivedi, 2013).

Entre los metales pesados altamente tóxicos se encuentra el plomo que se utiliza en actividades antrópicas tales como fabricación de pigmentos, desechos electrónicos, operaciones de fundición, plantas de energía térmica a base de carbón, cerámica, cobertura de cables, plomo laminado, soldaduras, vidriado de cerámica y ciertos tipos

de cristal (Azcona-Cruz, Ramírez y Ayala, & Vicente-Flores, 2015; Verma & Dwivedi, 2013). Este metal altamente tóxico no actúa en ningún proceso metabólico fundamental para las reacciones bioquímicas de los seres vivos (Burger & Pose, 2010) además, cuando el Pb logra ingresar al cuerpo humano por contaminación de comida, agua, el aire o contacto (absorción a través de la piel) tiene efectos agudos y crónicos en la salud humana, distribuyéndose por pulmones y el tracto gastrointestinal (Burger & Pose, 2010; Reyes, Vergara, Torres, Díaz, & González, 2016).

El mecanismo de acción se origina por unión a los grupos sulfhidrilo, siendo nocivo para las enzimas dependientes de zinc (Azcona-Cruz et al., 2015), manifestando problemas neurológicos, cardiovasculares, renales, gastrointestinales, hematológicos y reproductivos (Gautam, Sharma, Mahiya, & Chattopadhyaya, 2014).

La contaminación con metales pesados ha sido abordada por diferentes países, de los cuales Ecuador también ha sido afectado con la contaminación de metales como plomo, arsénico, zinc, cadmio y mercurio (Oviedo, Moína-Quimí, Naranjo-Morán, & Barcos-Arias, 2017). Las principales actividades que perjudican al medio ambiente se realizan en la agricultura (uso de insecticidas), minería, metalurgia centros de acopio de chatarra y fabricación de plásticos los cuales generan lixiviados que terminan en medios acuáticos y suelo (Toscano & Gabriela, 2011).

Para solucionar este problema y disminuir el impacto ambiental generada por la contaminación de metales pesados existen muchos tratamientos convencionales que involucran la utilización de procesos como precipitación química, intercambio iónico, osmosis inversa, electroquímico con la finalidad de eliminar dichos efluentes (Tejada, Núñez, & Villabona, 2015), pero dichos tratamientos presentan desventajas al formar contaminantes secundarios, poca eficiencia de eliminación de metales a bajas concentraciones y así también elevados costos (Barakat, 2011), por lo tanto se ha

optado por buscar soluciones a la problemática que causan los metales pesados en el ecosistema, con tecnologías alternativas de bajo costo y amigables con el medio ambiente, evitando así generar desechos durante su proceso (Cuizano & Nabarro, 2008).

En este contexto, el uso de microalgas en procesos de remoción de contaminantes es una alternativa debido a que las algas fitoplanctónicas presentan grupos funcionales que se ligan a iones metálicos capaces de incorporar a sus estructuras metales como plomo, haciendo que se disminuya la concentración del metal en el medio en el que se encuentra (Sánchez, Garza, Almaguer, Sáenz, & Liñán, 2008). Entre las algas más estudiadas se conoce al género *Chlorella*, la misma que tiene gran importancia a nivel industrial, alimenticio y ambiental (Villalobos & Scholz, 2013). Se ha confirmado la actividad de *Chlorella* en la remoción de diversas sustancias como antibióticos, nitritos, fosfatos y metales pesados (Avila, 2015; Kumar, Frankilin, & Raj, 2013; Montaña, Bula, Angulo, & Mercado, 2017) demostrando su eficiencia en la acumulación de estos últimos en su estructura y a su vez la eliminación de los contaminantes para disminuir el impacto ambiental.

Este proyecto propone evaluar la remoción de plomo por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada mediante espectrofotometría de absorción atómica. Para lo cual se parte con el análisis de la cinética de eliminación de plomo por acción de perlas de alginato con y sin *Chlorella* en solución acuosa a una concentración inicial de 20 mg/L, además se determinó la disminución del metal en soluciones acuosas del metal en función de las diferentes concentraciones de *Chlorella* inmovilizada en perlas de alginato. Dada la influencia de la concentración del metal en el proceso de adsorción de contaminantes también se planteó comparar la diferencia en la capacidad de remoción de plomo utilizando distintos tratamientos (perlas de

alginato con *Chlorella*, perlas de alginato sin *Chlorella* y *Chlorella* sin inmovilizar). Este estudio contribuirá con conocimientos sólidos que ayudarán a la implementación de varios sistemas de remoción, además proporcionará una alternativa para el tratamiento de los metales pesados en medios hídricos contaminados.

Capítulo I

Marco conceptual

1.1 Metales pesados

Los metales pesados como plomo, arsénico, zinc, cadmio, mercurio, entre otros (Oviedo et al., 2017) son elementos inorgánicos tóxicos. Su uso en diversas industrias como en la producción minera y de combustibles, genera residuos que alteran la estructura de sistemas hídricos y afectan directamente su productividad, la flora y fauna, además de perturbar la sostenibilidad de la cadena trófica, induciendo riesgos en la naturaleza y sociedad (Cuizano & Nabarro, 2008).

Muchos de estos metales son componentes importantes de la corteza terrestre, otros son indispensables para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos, y además interactúan en las reacciones bioquímicas y fisiológicas de estos organismos; a este tipo de elementos se los utiliza a bajas concentraciones como por ejemplo cobre, zinc y hierro dado que participan en las principales rutas metabólicas (Ferré-Huguet, Schuhmacher, Llobet, & Domingo, 2007). Sin embargo la escases o el exceso de la concentración de estos metales alteran las funciones normales en la célula (Navarro-Aviñó, Aguilar, & López- Moya, 2007).

Se denomina metales pesados a los elementos que presentan una densidad característica mayor o igual a 5 g/cm^3 , masa y peso atómico por encima de 20, estos además producen efectos tóxicos a bajas concentraciones (Abbas, Ismail, Mostafa, & Sulaymon, 2014). Los factores que determinan su efecto nocivo se lo atribuye no solo a sus características químicas (se los puede encontrar sin sufrir modificación o formando complejos con sales sin poder ser mineralizados), sino también a la

concentración en la que se encuentran, y el tipo de compuesto o metabolito que forman (Cañizares-Villanueva, 2000).

Los metales pesados son agentes altamente tóxicos, con presencia menor al 0.1 % en la corteza terrestre (Navarro-Aviñó et al., 2007), están conformados por los elementos de transición, algunos metaloides como el arsénico y selenio que tienen diversos números de oxidación, grado de reactividad, carga iónica y solubilidad. Sin embargo, una vez utilizados son vertidos a ecosistemas acuáticos en su forma de ion metálico, se acumulan indefinidamente en el ambiente, por otro lado son considerados nocivos para la salud, no intervienen en las reacciones metabólicas esenciales y su toxicidad puede conducir a un envenenamiento e inactivación de reacciones bioquímicas (Tejada, Villabona, & Garcés, 2015).

1.2 Tipos de metales pesados usados en la industria

Existe un sin número de elementos químicos que se encuentran a bajas concentraciones en la naturaleza. El uso indiscriminado de estos materiales modificó radicalmente su comportamiento normal en los ciclos bioquímicos y su equilibrio (Bartnicki & Lovblad, 2004). Los metales pesados más dañinos para los seres vivos son: cromo (Cr), mercurio (Hg), arsénico (As), cadmio (Cd), níquel (Ni), zinc (Zn), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), plomo (Pb), entre otros. Los iones de estos agentes tóxicos penetran la célula a través del sistema de transferencia que emplea cationes fisiológicamente significativos como el calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu) y zinc (Zn) (Argota Pérez & Argota Coello, 2012).

Estos compuestos inorgánicos son utilizados en muchas industrias vinculadas con la minería, papel, curtido de pieles, galvanoplastia, producción de baterías, de

fertilizantes, en tecnología, entre otros; siendo estos las principales fuentes de contaminación de sistemas hídricos cuando se descargan a los efluentes sin tratamientos previos al ambiente (Amábilis-Sosa, Siebe, Moeller-Chavez, & Duran-Domínguez, 2015).

1.3 Contaminación por metales pesados

Se puede definir a la contaminación ambiental como la presencia o adición de sustancias extrañas (sólida, líquida, gaseosa) al ecosistema que perjudiquen a los seres vivos y la estructura y concentración del elemento nocivo determina la gravedad de la contaminación (Bermúdez, 2010; Bharucha, 2004; «Significado de Contaminación», 2016)

La contaminación por metales pesados se puede producir de forma natural en fenómenos como: actividad volcánica, procesos de erosión, escapes espontáneos de depósitos profundos y superficiales (Burger & Pose, 2010). Sin embargo, uno de las formas más comunes de polución se realiza por parte de la industrialización en conjunto con la actividad humana con el uso deliberado de elementos químicos que se acumulan e incorporan en la cadena trófica ocasionando daños (Ferré-Huguet et al., 2007).

Al no recibir tratamientos previos a su desecho, los metales pueden alcanzar diferentes sustratos como aire, agua y suelo; su presencia en el medio ambiente tiene efectos contraproducentes para la flora y fauna, impidiendo el funcionamiento normal de los procesos biológicos que garantizan la autoconservación (Ayala & Romero, 2013). Los seres humanos pueden estar expuestos a estos contaminantes como consecuencia del continuo esparcimiento en el medio, por ejemplo, al incorporarse en

alimentos tras implementar agua contaminada en el sistema de riego de estos (Reyes et al., 2016).

1.4 Plomo

Es un metal de símbolo Pb, ubicado en el grupo VI A de la tabla periódica, en el período 6 bloque p, de color gris azulado, número atómico 82, masa atómica 207.2, densidad 11340 kg/m³, sólido a 20 °C, valencia 2 y 4, punto de fusión 327.4 °C (621.3 °F), punto de ebullición 1725 °C (3164 °F) (Muñoz, 2009), configuración electrónica [Xe] 4f¹⁴5d¹⁰6s²6p², radio atómico 175.0 pm, radio covalente 154 pm, electronegatividad 2.33 (Pauling) (Limo, 2003). Este metal se considera un elemento anfótero, por su afinidad de formar sales de plomo con ácidos, metales del ácido plúmbico, forma muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos (González & Rojas, 2008).

1.4.1 Toxicidad del plomo

Se consideran agentes tóxicos aquellos elementos que a determinada concentración resultan nocivos y dañinos para animales, plantas y ser humanos (Navarro-Aviñó et al., 2007). Los minerales de plomo se encuentran combinados con otros metales perjudiciales para los organismos bióticos (Tejada, Villabona, et al., 2015).

Datos reportados por el TULSMA (Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Medio Ambiental), determinan el límite máximo permisible de plomo en sistemas de alcantarillado para servicio público de 0.5 mg/L (Ministerio del

Ambiente, 2015). Los procedimientos que involucran el tratamiento, utilización y eliminación del plomo continuamente contaminan el medio ambiente, provocando que se libere y afecte a los seres vivos (Caviedes, Muñoz, Perdomo, Rodríguez, & Sandoval, 2015). En los seres humanos se considera tóxico una concentración alrededor de 5.0 $\mu\text{g/dL}$ en la sangre la cual genera cambios neurocognitivos (Flores-Ramírez et al., 2012).

El plomo puede ser inhalado y absorbido, después de entrar en contacto con este, (González & Rojas, 2008). Se impregna en el ser humano dependiendo de su forma y tamaño, tránsito gastrointestinal, estado nutricional y edad de la persona, además existe una mayor absorción cuando el organismo presenta deficiencia de hierro o calcio, así como cuando el individuo tiene una gran ingesta de grasa o calorías en su dieta, incluso si el estómago está vacío, en estos casos la absorción de plomo puede ser del 30 a 50 % en niños y del 10 % en adultos (Valdivia, 2005). Después de ingresar al organismo el plomo transita en la sangre unido a los glóbulos rojos, rápidamente se dirige a los tejidos blandos (hígado, riñón, médula ósea y sistema nervioso central), y por último se traslada a los huesos donde es inerte y no es tóxico (González & Rojas, 2008).

La toxicodinámica de este metal determina su interferencia en el metabolismo del calcio, principalmente cuando las concentraciones de calcio son bajas, inhibiendo la bomba de Na-K-ATPasa esto aumenta el calcio intracelular, produciendo consecuencias en la neurotransmisión y en el tono vascular (Luna & Rodríguez, 2016). Compromete el funcionamiento del sistema nervioso central, es decir el plomo en la célula altera los procesos metabólicos y funciones del calcio en el ser humano (Valdivia, 2005).

Estudios muestran que la inhibición de la enzima porfobilinógeno sintasa por el plomo (que puede reaccionar con los grupos sulfhidrilos de la enzima o desplazar el zinc) es causante de daños irreversibles en los seres vivos provocando efectos neurológicos, hematológicos, endócrinos y renales sobre la reproducción y el desarrollo, además de producir efectos cancerígenos en el cuerpo (Pauro, Choque, Poccohuanca, & Mamani, 2009).

1.4.2 Fuentes y usos del plomo

Este elemento se encuentra en estado natural en el medio ambiente, formando parte de estructuras inorgánicas como la galena (sulfuro de plomo), siendo esta el más importante. También se encuentra presente en otros minerales como: la cerusita (carbonato), la anglesita (sulfato), la corcoita (cromato), la wulfenita (molibdato), la piromorfita (fosfato), la mutlockita (cloruro) y la vanadinita (vanadato) (Mafla, 2015). El plomo presenta diversas características de interés para las industrias, es fácil de extraer, trabajar, maleable, y de fundir por lo cual hace atractivo para la actividad humana (Valdivia, 2005). Es uno de los elementos más utilizados desde la antigüedad en las industrias, se emplea de forma sólida o líquida proporcionando polvo, humos o vapores, además es la fuente principal en la metalurgia y minería donde es parte del revestimiento de cables, tuberías, componentes de soldadura y empaste en las empresas automovilísticas para la fabricación de baterías de plomo-ácido para vehículos de motor, también se lo usa en gasolina, pigmentos y pinturas, munición, esmaltes cerámicos, joyería, juguetes e incluso algunos cosméticos y remedios tradicionales (Padilla, Rodríguez-Sierra, & Martínez, 2000).

1.5 Tratamientos para remoción de metales

La degradación de metales pesados del medio ambiente es una problemática a nivel mundial que debe ser resuelta; se pueden realizar muchos métodos con la finalidad de disminuir el impacto en la naturaleza generado por estos contaminantes (Cartaya, Reynaldo, & Piniche, 2008).

Entre estos tratamientos se conocen los procesos convencionales, los más utilizados como el caso de la precipitación química, el cual consiste en la adición de agentes químicos que generan partículas suspendidas por la disolución, resultado de reacciones que se produce con el metal formando un sólido insoluble llamado precipitado (Plaza, 2012). Así también, se puede dar el reemplazo de iones por cationes o aniones con carga similar descrito como intercambio iónico, técnica que emplea matrices sólidas de sustancias insolubles en donde los iones en solución se transfieren a este molde (Caviedes et al., 2015). Por otro lado, la osmosis inversa hacen usos de presión hidrostática sobre una sección afluyente restituyendo así flujo osmótico del sistema entonces la sustancia es obligada a pasar a través de una membrana semipermeable para separar por difusión controlada o cribada los componentes catiónicos del solvente, mientras que los sólidos disueltos permanecen retenidos (Soler, 2014). Otros procesos, hacen uso de reacciones de óxido-reducción como los tratamientos electroquímicos, los cuales consisten en la descomposición de sustancias químicas en solución capaces de recuperar iones metálicos las cuales emplean electricidad para favorecer el paso de una corriente a través de un medio acuoso portador del dicho elemento que contiene una placa de cátodo y un ánodo insoluble (Buitrón, 2015).

Los principales inconvenientes que muestran este tipo de procesos es generalmente en relación a sus elevados costos de implementación para las

industrias, sensibilidad a la temperatura, además producen residuos secundarios y no son eficientes cuando el metal se encuentra a bajas concentraciones (Barakat, 2011; Sala et al., 2010; Soler, 2014).

Sin embargo existen procesos que resultan rentables, efectivos y amigables con el medio ambiente, estos se basan principalmente en el uso de organismos de diferentes especies como hongos, bacterias, algas y plantas, además de cáscaras de frutas, productos agrícolas y algunos tipos de biopolímeros (Maldonado, Luque, & Urquiza, 2012). Encargados de la degradación, eliminación o acumulación para convertir los contaminantes en partículas más sencillas o inocuos para el medio ambiente y el hombre.

1.6 Biorremediación

Muchos organismos vivos pueden convertir componentes tóxicos en elementos inocuos para el ecosistema, dado que tienen la capacidad de modificar la disponibilidad y toxicidad del metal en el medio en el que se encuentre, gracias a esta cualidad se presenta esta tecnología como solución a la contaminación ambiental (Senthil Kumar & Gunasundari, 2018). La biorremediación, se caracteriza por el uso de organismos bióticos (bacterias, hongos, algas, plantas entre otros) en la eliminación o neutralización de agentes tóxicos del ambiente (Mary Kensa, 2011).

La biorremediación se puede realizar *in situ*, este tipo de proceso pretende realizar la remoción en el lugar donde se focalizo la contaminación (Council, Sciences, Systems, & Bioremediation, 1993). En el cual se utilizan todos los medios necesarios para potencializar la acción de los microorganismos para degradar de forma natural el contaminante (U.S. Environmental Protection Agency, 2000). En el que se colocan

nutrientes y receptores de electrones al medio contaminante para que el microorganismo los aproveche y se efectuó la eliminación del metal (Laitinen, 2006).

También se puede realizar de forma *ex situ*. Esta técnica es aplicada para contaminaciones de menor grado (superficial) (Tomei & Daugulis, 2013). Se realiza fuera del lugar donde se produjo la contaminación, es decir, se requiere de la movilización del material contaminado hacia la planta de tratamientos (Williams, 2006), lo cual incrementa costos de operación y procesos. Para realizar este tipo de biorremediación se requiere del uso de equipos como biorreactores, disponibilidad de amplios terrenos y se pueden emplear de tratamientos físico-químicos adicionales. (Xu & Lu, 2010).

En comparación con los procesos convencionales, la biorremediación presenta ventajas puesto que este tipo de tecnología presenta muchas mejoras, dado que requiere de baja inversión económica, son simples de implementar y emplea procesos que genera desechos amigables con el medio ambiente (Caviedes et al., 2015; Dixit et al., 2015; Tejada, Villabona, et al., 2015).

Muchos procesos de biorremediación se dan a través de tecnologías mediadas por bioadsorción o biosorción, estos son tratamientos fisicoquímicos que se fundamentan en el fenómeno de adsorción y absorción de moléculas e iones (Vargas, Cabañas, Gamboa, & Domínguez, 2009), lo que permite la captación de iones metálicos mediante un proceso pasivo que emplea como sorbentes agentes biológicos, biomasa viva o biomasa muerta los cuales se denominan biosorbentes (Tejada, Villabona, et al., 2015). Para desarrollar procesos de biorremediación por biosorción de metales se requiere de la adhesión de los iones a la estructura del biomaterial usado para la descontaminación (Sala et al., 2010).

En este proceso, un sólido de origen natural detiene en su estructura grandes

cantidades de sustancias o compuestos de diferente naturaleza química encontradas en una fase líquida acuosa, a través de una amplia variedad de procesos dependientes o independientes del metabolismo de los organismos utilizados (Buitrón, 2015).

Los procesos de bioadsorción se basan en interacciones iónicas, formación de complejos entre iones metálicos y grupos funcionales del biosorbente los cuales son característicos por ser de bajo costo de operación y alta eficiencia (Abbas et al., 2014). Asimismo, minimiza la obtención de lodos químicos y biológicos, contiene alta relación superficie/volumen, rápida cinética de adsorción y desorción. No requiere de nutrientes adicionales durante el proceso, además este permite la recuperación del bioadsorbente y en ocasiones hasta del metal (Sameera, Naga Deepthi, Srinu Babu, & Ravi Teja, 2011).

Los organismos presentan diferentes mecanismos para lidiar con el metal, por acción de estructuras celulares que se unen a iones, pueden disminuir la toxicidad del metal en el medio, actuando en la valencia del elemento por acción de procesos de oxidación y reducción que efectúan estos organismos en el contaminante, para lo cual el metal debe estar de forma disponible en la naturales (Cervantes et al., 2006; Roane, Pepper, & Gentry, 2015).

La bioacumulación se da cuando el metal se acumula en las células, después de la incorporación de éste en la membrana del organismo, se transporta a estructuras más internas (citoplasma u organelos) de manera que van disminuyendo los niveles del contaminante por la actividad metabólica de un organismo vivo (Sala et al., 2010; Vullo, 2003). La facilidad para acumular los metales en los microorganismos depende de la afinidad de estos por las estructuras químicas se encuentren disponibles en el medio que se va a biorremediar (Argota Pérez & Argota Coello, 2012).

En los procesos de biorremediación, los microorganismo también presentan

mecanismos de biotransformación, en donde los compuestos contaminantes son transformados a estructuras menos tóxicas o incluso no tóxicas para el medio ambiente, mediante la interacción de los procesos biológicos de los microorganismos (Dixit et al., 2015) por acción de enzimas, las cuales convierten estos compuestos nocivos en sustancias solubles en agua o volátiles (Vullo, 2003).

1.6.1 Factores que afectan el proceso de biorremediación por adsorción de metales pesados

La bioadsorción está limitada por varios factores, los cuales son esenciales para determinar las condiciones óptimas en el que se produce la adsorción del metal en un sistema, además nos proporcionan información necesaria para establecer el equilibrio del proceso (Ahalya, Ramachandra, & Kanamadi, 2003). Estos factores varían de acuerdo con el metal y tipo de bioadsorbente.

La temperatura en uno de los factores implicados, esta interviene en otros componentes que se relacionan al proceso de bioadsorción, tales como: la estabilidad de iones metálicos, estabilidad del complejos microorganismo-metal dependiendo de los sitios de biosorción, configuración de la pared celular del microorganismo, ionización de restos químicos en la pared celular (Sag & Kutsal, 2000). Estos otros factores pueden alterar de forma individual o en conjunto los sitios de unión en el bioadsorbente, impidiendo la eliminación del metal (Fan, 2013). Generalmente la reacción de adsorción es exotérmica, es decir que la adsorción aumenta con la disminución de la temperatura (Abbas et al., 2014).

El pH es otro de los factores de bioadsorción que se ve involucrado en el medio a biorremediar. El proceso de biosorción que se produce es similar a un proceso de

intercambio iónico. El pH controla las propiedades superficiales del biosorbente, formado por grupos débilmente ácidos y básicos (Abbas et al., 2014). Este influye en las fuerzas de atracción y repulsión (Van der Waals, cizalla), involucradas en la unión entre los grupos funcionales con cargas negativas del biomaterial con los metales en la solución. Por lo tanto, la perla (parte sólida) depende de la concentración de protones de su estructura y el pH de la solución con metal. Esta alteración relaciona la afinidad del absorbente por el adsorbato el cual se refleja en la adsorción del contaminante (Amaringo & Hormaza, 2013; Gómez, 2005; Kiran, Akar, Safa Ozcan, Ozcan, & Tunalı, 2006).

De esta manera, la distribución de cargas en la superficie del biomaterial afecta la biorremediación. Para establecer la capacidad para retener iones (metales), se determina la carga cero (PZC) y el punto isoeléctrico (Amaringo & Hormaza, 2013), estos factores determinan el pH adecuado para la remoción del agente tóxico.

Así mismo, la concentración celular empleada como bioadsorbente afecta directamente el equilibrio en la remoción del metal (Al-Homaidan, Al-Houri, Al-Hazzani, Elgaaly, & Moubayed, 2014). Las células permiten la eliminación del contaminante del medio acuoso, por lo tanto una elevada o escasa concentración de estas en el medio a descontaminar, restringe el acoplamiento entre el sitio de unión y los iones metálico (Abbas et al., 2014).

1.7 Organismos empleados en la biorremediación de metales pesados

Para los procesos de adsorción se emplean diversas fuentes biológicas, con la capacidad de eliminar metales pesados, (Nivetha & Karthick, 2018). La habilidad de adsorción del material empleado como bioadsorbente está relacionado con el área superficial y la polaridad, entonces la eficiencia de remoción se evalúa en base a el

estado iónico del material orgánico empleado (Dhankhar & Hooda, 2011).

Dada la basta diversidad entre los microorganismos, la capacidad de adsorber de los estos puede variar enormemente. La capacidad de adsorción de las bacterias es usada principalmente para efluentes con iones metálicos y colorantes que no son biodegradables (Umar & Halimoon, 2015). Los inconvenientes que presentan las bacterias radican en la forma de aislar, en el cribado y en la bioaumentación de las mismas (Nivetha & Karthick, 2018).

Por otro lado, la utilización de algas como fuente de remediación es un proceso innovador; este tipo de organismos son fáciles de cultivar y bioaumentar, porque presentan un mayor rendimiento y eficiencia para adsorber contaminantes, además cubren una mayor área de contacto con el contaminante para adherir los iones del metal a su estructura (Al-Homaidan et al., 2014).

1.8 Microalga fitoplanctónica *Chlorella* sp.

La microalga *Chlorella* sp. pertenece a la división Chlorophyta, de tamaño pequeño, no móvil y de forma ovoide (Angulo, Catallar, Morales, & Barrios, 2012). Estas células con pared celular delgada y cloroplasto en forma de copa, se propagan formando células hijas o autoesporas idéntica a la célula madre (Infante et al., 2012). Este tipo de microalga tiene un ciclo de vida simple, es fácil de bioaumentar debido a su rápida reproducción (40 horas) con una mínima cantidad de nutrientes, energía solar, y CO₂ (Liu & Chen, 2014).

Son muy conocidas por su gran importancia a nivel industrial, alimenticio y ambiental (Villalobos & Scholz, 2013). Se emplean para procesos de biorremediación con el objetivo de eliminar metales pesados y materia orgánica en medios acuáticos.

La estructura de la pared celular permite su utilización en forma suspendida o inmovilizada, como cepa pura o en consorcio con otros microorganismos (Infante et al., 2012).

La alta producción de contaminantes generados por las industrias conlleva a la eutrofización del medio ambiente y deterioro del ecosistema (He-Jeong & Seung-Mok, 2012). Los avances tecnológicos permiten el uso de microorganismos inmovilizados en matrices de alginato, se ha comprobado la eficacia de *Chlorrella* sp. inmovilizada en remoción de metales como fósforo, nitrógeno, cromo, cadmio, plomo, entre otros (Silva-Benavides & Torzillo, 2012).

En la actualidad la biotecnología presenta gran interés por la acción de microalgas para la biorremoción en sistemas acuáticos, dado que presentan estructuras a las que se acopla el contaminante que permiten la eliminación o acumulación de metales (Pavasant et al., 2006). Se evidencio la acción de las microalgas en remoción de contaminantes como nitrógeno, fósforo y DQO en aguas residuales urbanas (Chacón, Andrade, C Árdenas, Araujo, & Morales, 2018). También se ha demostrado *Chlorella vulgaris* tiene la capacidad de remover metales pesados (Cho, Lee, Park, & Chung, 2008; Dewi & Nuravivah, 2018).

1.9 Mecanismo de acción de algas en la remoción de metales

Muchos microorganismos (procariotas y eucariotas) a lo largo del tiempo han adquirido la capacidad de tolerar niveles de estrés ocasionado por sustancias tóxicas, sin embargo, algunos de estos organismos tienen mecanismos para adherir a sus estructuras sustancias como los metales pesados sin afectar sus funciones metabólicas esenciales. (Kaplan, 2013). Este proceso se realiza gracias a la adsorción de los iones

metálicos por parte de la célula y los componentes de su estructura para incorporarlos (Kotrba, Mackova, & Urbánek, 2011).

Las paredes de algas se caracterizan por ser generalmente celulósicas (Das, Vimala, & Karthika, 2008), además de componerse por alginatos y fucoidanos (Davis, Volesky, & Mucci, 2003) en la cual presentan un sin número de grupos funcionales como carboxilatos, aminas, imidazoles, fosfatos, sulfhidrilos, sulfatos e hidroxilos, que actúan en la unión metal-sorbato. La mayoría están cargados negativamente a excepción de aminas e imidazoles las cuales muestran carga positiva que se activan cuando se protonan adquiriendo carga negativa (Crist, Oberholser, Shank, & Ming, 1981).

Como se muestra en la figura 1, las algas presentan varios sitios de unión específicos para los metales. El proceso de unión metal-sorbente se produce en primera estancia cuando los iones metálicos se adhieren a la estructura superficial de la célula por acción del acoplamiento entre el metal y los grupos funcionales que presenta el alga. Cuando se presenta la saturación de la pared celular pasan a la membrana celular y al citoplasma celular (Das et al., 2008).

Estructura celular de las algas

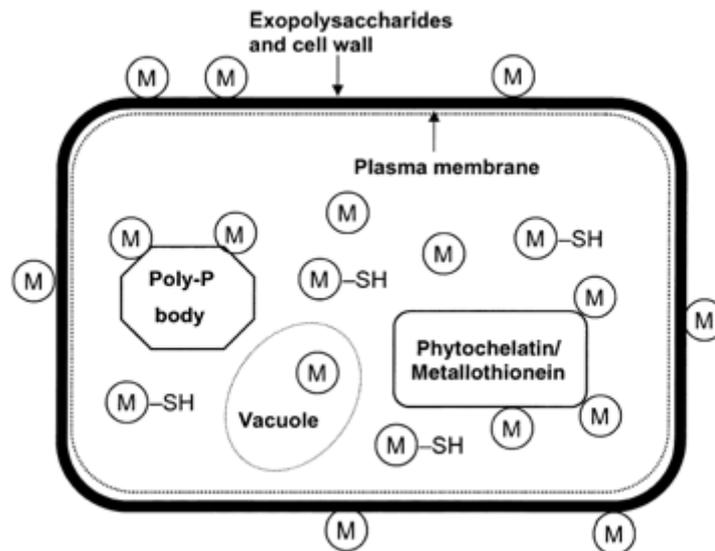


Figura 1. Principales sitios de unión de metales pesados en algas
M= metal pesado (independiente de su estado de oxidación)
Fuente: Mehta & Gaur (2005).

1.10 Inmovilización de células

La metodología de inmovilización se realiza con la finalidad de generar un atrapamiento físico de la célula en una matriz adecuada para que cumplan su desarrollo sin perjudicar su función (Willaert, 2011). Esta tecnología le confiere protección frente a factores físicos (pH, Temperatura, entre otros), genera estabilidad al microorganismo, ayuda a la acumulación de contaminantes a su estructura (Arroyo, 2017; Martins, Martins, Fiúza, & Santaella, 2013).

La inmovilización presenta un entorno en el que se localizan células (sistema celular inmovilizado o agregado de células inmovilizadas), el cual consta de tres unidades claramente identificadas: el organismo biótico, la matriz o soporte de inmovilización, espacio intracelular de la matriz (Willaert, 2009).

1.11 Tipos de inmovilización

La inmovilización puede ser de tipo activa, esta se realiza por acción de agentes floculantes, unión química y encapsulación en gel para permitir que el microorganismo pueda encapsularse en una matriz (Moreno-Garrido, 2008). La inmovilización activa es un proceso fisicoquímico o mecánico, que consiste en encapsular en la parte interna de una matriz la biomasa. Esta matriz puede estar formada de geles de polímeros extraídos de forma natural o sintética los cuales son usados como soporte (Bansode, Banarjee, Gaikwad, Jadhav, & Thorat, 2010). Al inmovilizar células vivas es importante que permita su perfecto desarrollo y reproducción (Roa & Cañizares, 2012).

Así mismo, la inmovilización puede ser de tipo pasiva. Aquí se genera por la afinidad del microorganismo para adherirse a las superficies (naturales o sintéticas) de la estructura de inmovilización sin perjudicar su crecimiento y desarrollo. Esta afinidad se muestra por la presencia de estructuras celulares como, fimbrias en bacterias e hifas en hongos, en organismos vivos (Lapo, 2014).

1.12 Tipos de matrices naturales para inmovilización

En el mercado existe una gran variedad de matrices aptas para inmovilizar microorganismos que genera encapsulados con estructura y tamaño definido sin afectar su crecimiento y desarrollo, aumenta la estabilidad, es decir, no altera la actividad metabólica esencial para los organismos atrapados. También, proporciona resistencia a la toxicidad dependiendo de las características de la base empleada para el microencapsulado (Cañizares-Villanueva, 2000).

Existen muchas matrices que cumplen la función de recubrimiento. El colágeno, es abundante en tejido conectivo, huesos y cartílago de los vertebrados. La estructura principal del colágeno es la secuencia peptídica (Gly-X-Y)_n, donde X e Y pueden ser prolina e 4-hidroxiprolina, respectivamente (Parichehr, Farzaneh, Fariba, & Shima, 2015). También se han estudiado otro tipo de polímeros lineales como la carragenina, de elevado peso molecular, es una mezcla de galactanas sulfatadas, las cuales produce las algas rojas especialmente las Rhodophyceae. Se caracteriza por formar geles a temperatura ambiente, presentar grupos hidroxilo, sulfato en su estructura y solubles en agua. A este grupo pertenece k- carragenano, t- carragenano y λ carragenano (Arroyo, 2017).

Se ha analizado la capacidad de algunos polisacáridos para el encapsulamiento de organismos como el almidón, el cual está conformado por unidades de glucosa unidos por enlaces glucosídicos en el que se presentan dos estructuras, 20 % la amilasa (polímero lineal) unido por enlaces glucosídicos 1.4, y 80 % la amilopeptina (ramificada) unido a enlaces D-1.4 y D-1.6 (Sajilata, Singhal, & Kulkarni, 2006; Yepes, 2015). Sin embargo, estos biomateriales naturales antes mencionados no resultan eficientes para establecer un sistema de remoción de contaminantes (Parichehr et al., 2015) utilizando el proceso de inmovilización, dado que requieren de otros tratamientos adicionales para proporcionar estabilidad a la matriz (Rao & Bhavikatti, 2013; Smiljanic, 2010).

1.12.1 Alginato

Otros tipos de biomateriales más efectivos para diferentes son los alginatos, se postulan como una de las matrices más utilizadas para procesos de inmovilización

debido a su bajo costo, nula toxicidad, fácil manipulación, por ello son ampliamente empleados en la industria alimenticia (Lupo, González, & Maestro, 2012). Además son estudiados en la biotecnología para el microencapsulamiento de organismo, con esta metodología es posible la recuperación de la biomasa inmovilizada (Simental, 2015).

Pertenece al grupo de hidrocoloides que provienen de la extracción de algas marinas (pared celular y espacios intracelulares), se consideran polisacáridos lineales no ramificados con característica hidrofílica constituido por β -D-ácido manúronico (M) y α -L-ácido gulurónico (G) lo que le confiere la habilidad de generar geles con cationes con valencia 2+ (Song, Yu, Gao, Liu, & Ma, 2013). Estos monómeros se distribuyen formando homopolímeros tipo G-bloques (-GGG-), M-bloques (-MMM) o heteropolímeros es decir, los bloques M y G se alteran (-MGMG). La ubicación de los las estructuras principales del alginato en la cadena del polímero, la carga y volumen de los grupos carboxílicos proporcionan propiedades de flexibilidad o rigidez al gel; en el caso de existir mayor cantidad de G-bloques el gel formado es fuerte y frágil, mayor cantidad de M-bloques el gel es suave elástico (Draget, 2009).

Los geles de alginato se produce con la unión de G-bloque del alginato con otro G-bloque mediante iones divalentes generalmente sodio (Simental, 2015), es decir al producir el goteo de la pasta de alginato de sodio en cloruro de calcio se observa una disposición física en forma de perlas, esto se debe a que los iones de calcio se van a unir a las estructuras de conocidas como carboxilato del ácido manurónico y del ácido glucurénico (Ravindra Reddy & Sabitha Reddy, 2010).

Abdel-Hameed, (2006); Ahmad, Bhat, & Buang, (2018); Carrasco, (2018); Luan, Jin, Chan, Wong, & Tam, (2006); Urvina, (2018); Valdez, Perengüez, Mátyás, & Guevara, (2018) determinan, que la inmovilización de *Chlorella* facilita la

eliminación y recuperación de contaminantes que se encuentran en el medio ambiente en una variedad de metales pesados como Pb, Zn, Cr, Cd, Cu y Ni; también se ha evaluado en otros tipos de contaminantes, tributyltin (TBT), nitritos y fosfatos, entre otros (Avila, 2015; Luan, Jin, Chan, Wong, & Tam, 2006). En el encapsulamiento el tamaño de la perla para el proceso de remoción es importante, dado que determina la concentración de células que actúan en el sistema (Rao & Bhavikatti, 2013).

Capítulo II

Marco metodológico

2.1 Elaboración de perlas de alginato de calcio (perlas sin *Chlorella* sp.)

Para la elaboración de perlas de alginato se llevó a cabo el procedimiento realizado por Valdez et al. (2018). Se realizó una disolución de 2 g de alginato de sodio grado alimenticio marca Loba Chemie (alta viscosidad) en 50 mL en agua destilada-desionizada, se mezcló hasta tener una solución homogénea, se ajustó su pH entre 7,8-8,0 utilizando ácido clorhídrico 0.1 M (HCl) o hidróxido de sodio 0.1 M (NaOH), según sea el caso. Por último, se colocó la solución de alginato de calcio en una jeringuilla de 25 mL, sin la aguja metálica y goteó en una solución de cloruro de calcio 1 % (p/v) previamente preparada, como se observa en el anexo 1, una vez formadas las perlas se mantuvieron en agitación por 30 minutos. Posterior a esto se filtraron las perlas empleando una gasa y por último se enjuagó con agua destilada-desionizada.

2.2 Inmovilización de *Chlorella* sp. en perlas de alginato

Para la inmovilización de *Chlorella* sp. se empleó la metodología descrita por Valdez et al. (2018). Primero se realizó el conteo en cámara de Neubauer para conocer la concentración del cultivo de *Chlorella* sp. a emplearse, éste se hallaba en fase exponencial. Se elaboraron perlas con tres concentraciones de la microalga (0.3×10^7 , 1.6×10^7 , 3×10^7 células/mL de alginato). Se realizó una disolución de 2 g de alginato de sodio grado alimenticio marca Loba Chemie en 50 mL de una solución realizada con un volumen determinado del medio de cultivo de *Chlorella* sp., dependiendo de la concentración de microalga requerida en la perla, y aforado con agua destilada-

desionizada. Se homogenizó la mezcla hasta obtener una solución ausente de partículas o grumos. Posteriormente, se ajustó su pH entre 7.8-8.0 utilizando ácido clorhídrico 0.1 M (HCl) o hidróxido de sodio 0.1 M (NaOH) según sea el caso. Por último, se colocó la solución en una jeringuilla de 20 mL y empezó a gotear en una solución de cloruro de calcio 1 % (p/v) en agitación de 100 rpm, una vez formadas las perlas se mantuvieron en agitación por 30 minutos. Posterior a esto, se filtraron las perlas empleando una gasa y finalmente se lavaron con suficiente agua destilada-desionizada estéril.

2.3 Cuantificación de la concentración de plomo

Se cuantificó la concentración de plomo en las muestras de solución acuosa sometidas a procesos de remoción. Se empleó un espectrofotómetro de absorción atómica de aspiración directa marca VARIAN (modelo Spectr AA55) usando flama de aire-acetileno con lámpara de plomo. El proceso se llevó acabo con la preparación de soluciones estándares de concentraciones de 1, 5,10, 20 y 30 mg/L de plomo; se calibró el equipo con el uso de estas soluciones para conseguir la curva con coeficiente de regresión lineal de $r^2=0.9999$ o superior y se procedió a realizar las lecturas respectivas.

2.4 Planteamiento de diseño experimental

El análisis del proceso de remoción de plomo empleando perlas con *Chlorella* sp. inmovilizada se realizó por triplicado utilizando los tratamientos descritos en la tabla 1.

Tabla 1.

Descripción de tratamientos

Tratamientos
T1: Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. en solución con Pb
T2: Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. en solución con Pb
T3: Perlas de alginato con <i>Chlorella</i> sp. en solución sin Pb
T4: Perlas de alginato sin <i>Chlorella</i> sp. en solución sin Pb

Nota: Elaborado por: La autora, 2018.

2.5 Cinética de remoción de plomo en solución acuosa por acción de perlas de alginato con *Chlorella* y perlas de alginato sin *Chlorella*

Para el análisis de la remoción de plomo se requirió añadir 15 mL de solución de plomo (estándar diluido en ácido nítrico), se inició con una concentración de 20 mg/L del metal en matraces de 100 mL. Se agregó 1 g de perlas de alginato de calcio (8-10 perlas) con o sin *Chlorella* sp., según corresponda al tratamiento y controles (tratamientos sin Pb), como lo muestra la tabla número 1. Se empleó 1.6×10^7 células/mL como concentración celular de microalga. Este ensayo se realizó por triplicado con una agitación constante de 125 rpm, a temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), e iluminación solar. El tiempo de remoción se determinó mediante el análisis de ecuaciones obtenidas en cada tratamiento, para esto se tomaron muestras de la solución de Pb cada 20 minutos hasta observar la desorción del metal.

2.6 Análisis de la remoción de plomo en solución acuosa a diferentes pH

Se analizó el efecto del pH en el proceso de remoción, para lo cual se planteó emplear diferentes valores de pH (4-7), en soluciones de Pb a 20 mg/L. Para esto, se preparó la solución de plomo a la concentración antes mencionada, se ajustó el pH a los valores indicados con 0.1 M (HCl) o hidróxido de sodio 0.1 M (NaOH), según corresponda. Posteriormente, se procedió a agregar en matraces de 100 mL de capacidad 15 mL de solución de metal a pH 4 con 1 g de perlas de alginato con o sin *Chlorella* sp. según corresponda el tratamiento. Luego, se mantuvo en agitación constante con el tiempo de remoción determinado, este procedimiento se realizó por triplicado para cada tratamiento. Se empleó una concentración celular de 1.6×10^7 células/mL en los tratamientos con microalga. De igual forma se repitió el proceso para el ensayo a los diferentes valores de pH.

2.7 Ensayo de viabilidad de *Chlorella* sp. inmovilizada

Después de evaluar el pH adecuado para el proceso de remoción en el ensayo, a partir de soluciones de 20 mg/L, se valoró la viabilidad de la microalga en estos tratamientos a pH 4 y 5. Se filtró con ayuda de una gasa las perlas que contenían *Chlorella* sp. inmovilizada, bajo los parámetros de asepsia requeridos para cultivar un microorganismo. Las perlas se cultivaron en tubos de ensayo con 3 mL de medio adecuado para su crecimiento el cual contiene Nitrofoska (3 mL/L) y agua destilada-desionizada. Se sometieron a un fotoperiodo 12:12 luz:oscuridad (intensidad lumínica en rango de 405 a 1071 luxes) y temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$). Para comprobar la viabilidad se requiere observaciones por colorimetría por un transcurso de 15 días.

2.8 Evaluación de la remoción de plomo en solución acuosa por acción de diferentes concentraciones de *Chlorella* sp. inmovilizada

Para establecer la remoción del plomo en función de la concentración celular de *Chlorella* sp. inmovilizada, se emplearon tres concentraciones de microalga (0.3×10^7 , 1.6×10^7 , 3×10^7 células/mL de alginato), en soluciones de Pb a 20 mg/L. Posteriormente, se procedió a agregar en matraces de 100 mL de capacidad 15 mL de solución de metal ajustada al pH previamente establecido y 1 g de perlas de alginato con o sin *Chlorella* sp., según corresponda. Luego, se mantuvo en agitación constante (125 rpm) durante el tiempo determinado anteriormente. Este ensayo se realizó por triplicado a temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$), e iluminación solar.

2.9 Análisis de remoción de Pb en solución acuosa en función de diferentes concentraciones del metal por acción de perlas de alginato con *Chlorella*, perlas de alginato sin *Chlorella* y *Chlorella* sin inmovilizar

Para evaluar la capacidad de remoción de los tratamientos se utilizaron siete concentraciones diferentes de metal (0, 5, 8, 11, 14, 17 y 20 mg/L de Pb) en solución acuosa (agua destilada-desionizada). Se ajustaron las soluciones al pH previamente establecido. Y se procedió a agregar 15 mL de solución de plomo en matraces de 100 mL de capacidad, y 1 g de perlas de alginato con o sin *Chlorella* sp., según corresponda para cada tratamiento. En el caso de *Chlorella* sin inmovilizar, se colocaron 3 mL de solución ajustada al pH antes determinado, y la cantidad de inóculo correspondiente para alcanzar una concentración celular de 3×10^7 células/mL. Luego, se mantuvo en agitación constante (125 rpm) durante el tiempo determinado anteriormente. Este

ensayo se realizó por triplicado a temperatura ambiente ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), e iluminación solar.

Para la cuantificación del plomo en los tratamientos con *Chlorella* sin inmovilizar se procedió a centrifugar por 5 minutos. Posteriormente se extrajo el sobrenadante en otros tubos de ensayos perfectamente etiquetados para su valoración.

Capítulo III

Resultados y Discusión

3.1 Elaboración de perlas de alginato de calcio (perlas sin *Chlorella* sp.)

En la tabla 2, se presentan las características físicas y morfológicas de las perlas de alginato sin *Chlorella* sp. que se formaron a partir de la solución de 2 g de alginato de calcio en 50 mL de agua destilada-desionizada.

Tabla 2.

Descripción de las características físicas de perlas sin *Chlorella* sp

Característica	Descripción
Forma	Redonda
Color	beige-blanco
Tamaño	4.2-4.6 mm (diámetro)
Total	Aproximadamente 350, a partir de 2 g de alginato de calcio

Elaborado por: La Autora, 2018

La figura 2, permite observar las perlas de alginato de calcio sin *Chlorella* sp.

Perlas de alginato sin *Chlorella* sp.

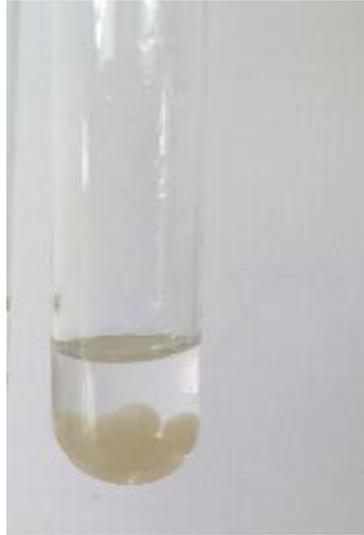


Figura 2. Perlas de alginato sin *Chlorella* sp. inmovilizada.
Fotografía tomada en la Universidad Politécnica Salesiana, por La autora, 2018.

Carrasco (2018) y Urvina (2018) describe que las características físicas como forma y tamaño de las perlas son factores importantes para la obtención de resultados homogéneos en todos los ensayos, para lo cual se deben descartar perlas que no se encuentren perfectamente esféricas. Valdez et al (2018) determinan que las perlas control deben presentar coloración crema pálido para considerarse ideales para realizar los ensayos.

3.2 Inmovilización de *Chlorella* sp. en perlas de alginato

En la tabla 3, se presentas las características físicas y morfológicas de las perlas con *Chlorella* sp. a partir de la solución elaborada de 2 g de alginato de calcio en 50 mL de agua destilada-desionizada.

Tabla 3.

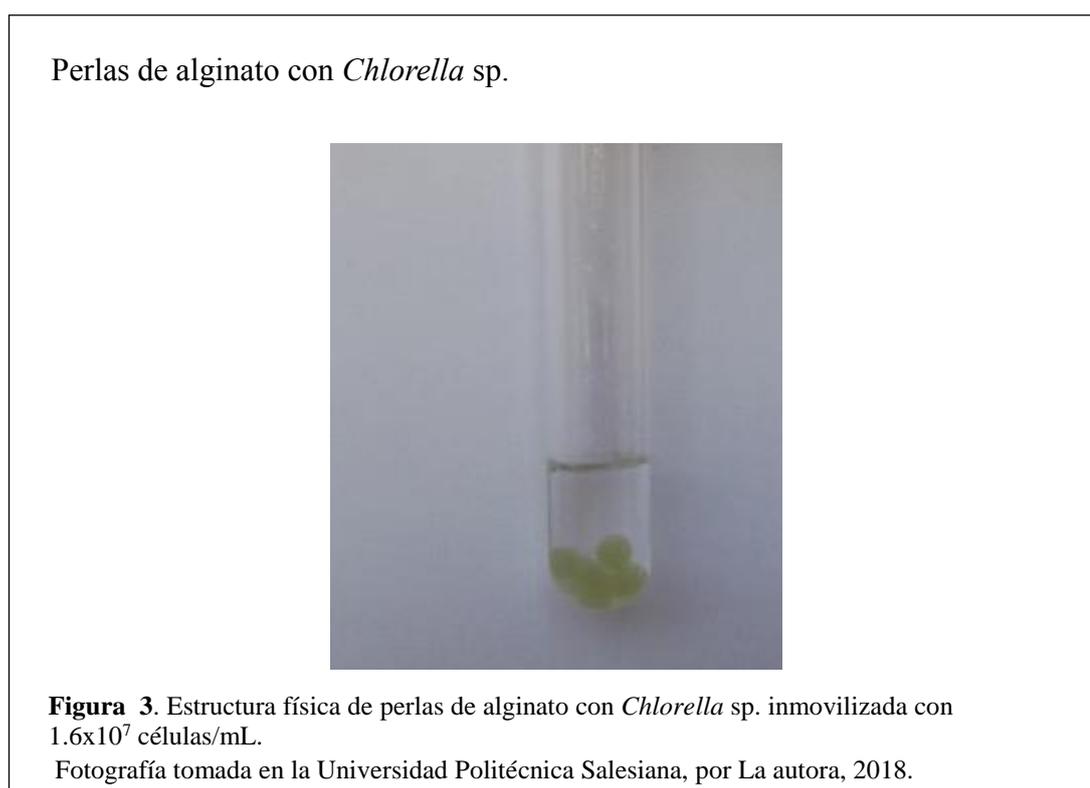
Descripción de las características físicas de perlas con *Chlorella* sp.

Característica	Descripción
Forma	Redonda
Color	verde claro
Tamaño	4.2-4.6 mm (diámetro)
Total	Aproximadamente 350, a partir de 2 g de alginato de calcio

Concentración celular 1.6×10^7 células/mL.

Elaborado por: La autora, 2018

La figura 3, permite visualizar las perlas de alginato con *Chlorella* sp.



La única diferencia es la presencia o ausencia de *Chlorella*, razón por la cual cambia el color en cada tipo de perla. Vinueza (2017), Carrasco (2018), Urvina (2018) (2018) y Valdez et al. (2018) señalan que la inmovilización de *Chlorella* sp, se caracteriza por su coloración verde lo que indica viabilidad de la microalga.

3.3 Cinética de remoción de plomo en solución acuosa por acción de perlas de alginato con *Chlorella* y perlas de alginato sin *Chlorella*

Los resultados se analizaron mediante la elaboración de una gráfica de concentración de plomo (Pb) en relación al tiempo (min) y se consideró la regresión lineal obtenida en cada tratamiento (figura 4).

En la figura 4, se describe la cinética de remoción para las perlas con *Chlorella* sp. (T1) y las perlas sin *Chlorella* sp. (T2) obtenida en el intervalo de 0-180 min, lo cual nos facilita la elaboración de la ecuación correspondiente para determinar los tiempos para la remoción. En el caso del T1 el mejor tiempo fue de 143 minutos con un ajuste de su regresión lineal de $R^2=0.876$. Con respecto al T2, que estuvo en contacto con plomo se encontró un tiempo de 148 min con un ajuste de su regresión lineal de $R^2=0.806$.

Finalmente se determinó como tiempo de remoción 143 minutos puesto que es el menor tiempo registrado, es decir las perlas de alginato con *Chlorella* presentan una mejor respuesta que las perlas de alginato sin microalga, frente al tiempo de remoción. La diferencia del tiempo con relación al tratamiento sin alga justamente podría corresponder a la acción del microorganismo, lo cual se podría determinar en los ensayos que se presentan a continuación.

Cinética de remoción de Plomo T1 y T2 (Perlas de alginato con y sin *Chlorella* sp. en solución con plomo)

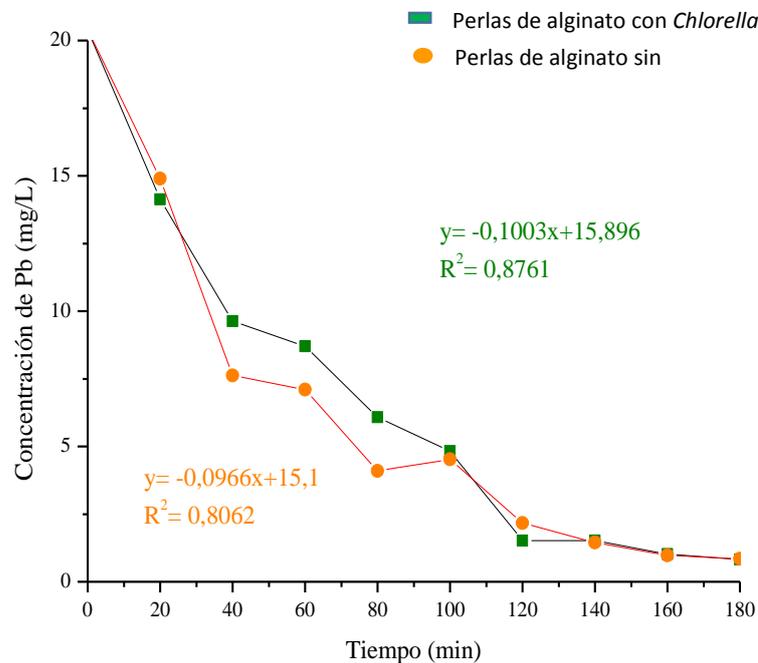


Figura 4. Descripción gráfica de la concentración del plomo empleando perlas de alginato con *Chlorella* sp. y sin *Chlorella* vs Tiempo. Se empleó una concentración celular de 1.6×10^7 células/mL de *Chlorella*, perlas sin *Chlorella* sp. a $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3$ y 20 mg/L de metal. Con el uso de Origin Lab (Origin Lab, 2016) Elaborado por: La autora, 2018

La capacidad de *Chlorella* sp. para adherir en su estructura agentes tóxicos favorece a la retención del metal (Oliveira, Mauricio, & Garcia, 2011), así mismo, el alginato también presenta esta característica, y en forma conjunta presentarían más sitios disponibles para la unión con dicho contaminante haciendo más eficiente la remoción en relación al tiempo. Travieso, Cañizares-Villanueva, Borja, Benítez, Domínguez-Bocanegra, Dupeyrón & Valiente (1999) atribuyen su eficiencia a la afinidad de las microalgas por los iones que corresponden a los metales pesados.

El tiempo determina la velocidad de remoción del sorbente mostrando su equilibrio al permanecer constante, este puede ser de minutos e incluso horas, la variación depende de la capacidad de retención del sorbente y la disponibilidad del

metal en el sistema empleado. La remoción del metal se realiza hasta que el biomaterial satura todos los sitios de unión, entonces ocurre la desorción, en este caso se evidencia pasado los 180 minutos, posterior a este tiempo se evidencio un aumento de la concentración de Pb en el sistema. Se entiende como desorción al fenómeno contrario a la adsorción o absorción, es decir, en un sistema de remoción que se encuentra en equilibrio entre la matriz de remoción y solución acuosa del contaminante se produce la expulsión del contaminante previamente adsorbido por la matriz (Tenorio, 2006).

3.4 Análisis de la remoción de plomo en solución acuosa con diferentes pH

El efecto de pH en la actividad de remoción de metal es un factor a considerar, puesto que influye directamente en la disponibilidad de los grupos funcionales y la afinidad del metal con el biosorbente (Oliveira et al., 2011).

En la tabla 4, se describe que T1 muestra porcentualmente una respuesta ligeramente superior al presentar el 98.35 % de disminución del metal en la solución; mientras que, para el T2 se removió el 97.70 % del contaminante. Se encontró mejor efecto de remoción a pH 5 en ambos tratamientos, considerando el valor de pH ligeramente ácido adecuado para el proceso de adsorción del plomo.

Con los valores de pH de 6 y 7, el metal se precipita formando hidróxido, lo cual perjudica la remoción por parte del bioadsorbente, de manera que no es viable la aplicación de los tratamientos.

Tabla 4.

Efecto del pH en la remoción de Pb por acción de las perlas de alginato con *Chlorella* sp. y perlas de alginato sin *Chlorella* sp. inmovilizada.

Plomo (Concentración inicial 20 mg/L)			
TRATAMIENTO	pH	Conc. Final	(% R)
Perlas con <i>Chlorella</i> sp. en	4	0.40	98.00
solución con Pb	5	0.33	98.35
Perlas sin <i>Chlorella</i> sp. en	4	0.60	97.00
solución con Pb	5	0.46	97.70

Nota: procedimiento realizado a $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 143 minutos, concentración inicial de 20 mg/L de plomo y concentración celular de 1.6×10^7 células/mL. No se muestran los valores de los tratamientos testigos (sin metal). % R= porcentaje de remoción, Conc. Final=concentración del metal en la solución acuosa en mg/L.

Elaborado por: La autora, 2018.

Sin embargo, dado que no se encontró diferencia significativa ($p= 0.4715$, anexo 6) al analizar el porcentaje de remoción del plomo a partir de diferentes valores de pH se decidió tomar como pH de remoción al valor de 5, puesto que *Chlorella* inmovilizada se adapta mejor a este nivel de pH para realizar su actividad metabólica y fotosintética, puesto que está más cercano al pH ideal para cultivos de *Chlorella*. Cada organismo requiere un pH adecuado para realizar sus actividades metabólicas, entre ellas la remoción de los contaminantes. En *Chlorella* sin inmovilizar el pH idóneo para su desarrollo es de 8.2-8.7 (Alvear, Castillo, & Henao, 2011).

El pH, es uno de los parámetros indispensables para el proceso de remoción dado que afecta la estabilidad del metal y disponibilidad los grupos funcionales presentes en la estructura del bioadsorbente (Chuquilín & Rosales, 2016) en este estudio se requiere de condiciones ligeramente ácidas para establecer afinidad entre el metal y el sorbente.

Ahmad, Bhat, & Buang (2018) determinan que se debe conocer el comportamiento de la estructura del alga para la unión con el metal, es así que, *Chlorella vulgaris* dispone como grupo funcional más abundante al carboxilo (grupo funcional ácido) que se verá afectado por la química del metal. En el caso de pH 3 los puntos de unión de la pared celular de la microalga están relacionados con iones de hidronio y las fuerzas de repulsión restringen el enlace con el ion, mientras que a pH 6 los grupos químicos como amino y carboxilo están disponibles generando cargas negativas; al sobrepasar el pH adecuado para la remoción, pueden no estar utilizables los sitios de unión del sorbente. Aung, Hlaing, & Aye (2013) evidencio que al aumentar el pH a 6 se incrementa la remoción de Pb (500 mg/L de metal) hasta el 99.4 % al utilizar *Chlorella vulgaris*.

De manera que, probablemente al incrementar en los presentes ensayos el valor de pH a 6 (considerado más cercado al idóneo para el desarrollo de *Chlorella*) se observaría una mayor remoción por parte del bioadsorbente, dado que al subir el pH en la solución acuosa, de valores de 4 o 5 a 6, los sitios con grupos funcionales con carga negativa procederían a aumentar (Shu-kui, Ying-jiu, & Hai-yang, 2011), lo contrario ocurre con los sitios con grupos funcionales positivos. Sin embargo, al realizar los ensayos a pH 6 y 7, el metal se precipitó obstaculizando el análisis de la remoción al formar hidróxidos, lo que provocó que el plomo se encuentre menos disponible.

3.5 Ensayo de viabilidad de *Chlorella* sp. inmovilizada

En esta prueba se analizó la capacidad de *Chlorella* sp. para desarrollarse después de ser sometida al estrés de la presencia de plomo en soluciones con un pH de

4 y 5, respectivamente. El resultado se evaluó por medio de colorimetría de las perlas con *Chlorella* sp. inmovilizada.

En la figura 5, se muestra la coloración de *Chlorella* sp. al inicio y final del período de ensayo, las perlas de alginato con la microalga se incubaron por 15 días en un medio de cultivo líquido apto para su crecimiento (Nitrofoska, 3 mL/L). Se compararon las perlas con *Chlorella* sp. sometidas a remoción de plomo contra las perlas con *Chlorella* sp. del tratamiento control en el cual no hubo presencia de metal.

El tratamiento de las perlas con microalga que fueron sometidas a la solución con 0 mg/L del metal (figura 5 A), mostraron un crecimiento y desarrollo óptimo exponiendo coloración verde claro al primer día y posteriormente, a los 15 días (figura 5 B) su coloración se intensificó a verde oscuro, lo que indica que hay incremento en la concentración celular y actividad fotosintética puesto que las microalgas se encuentran viables.

En el caso de las perlas con *Chlorella* sp. que se sometieron al estrés con el Pb (figura 5 C,E), se revelaron los mismos efectos que en las perlas control (sometidas a soluciones acuosas con 0 mg/L del metal), es decir presentaron coloración verde claro al primer día y al término de los 15 días (figura 5 D,F) su coloración cambió a verde oscuro, similar a lo observado en el tratamiento control, lo cual significa su adecuado crecimiento aun después de ser sometidos a la remoción del metal.

Viabilidad de *Chlorella* sp. a pH 4 y 5

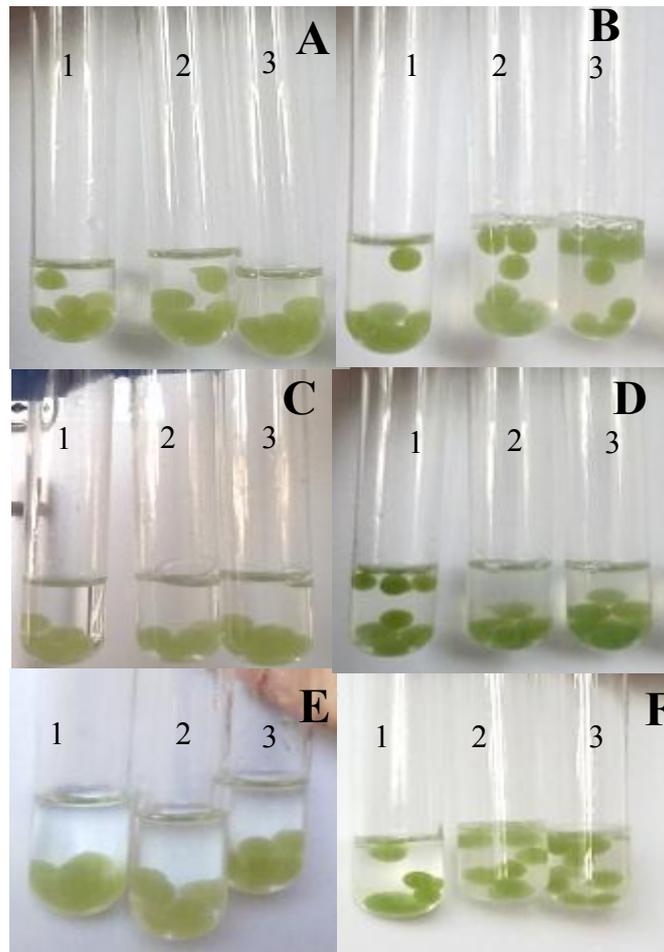


Figura 5. Crecimiento de *Chlorella* sp. en las perlas antes y después de ser sometidos a solución de plomo.

A: perlas control de alginato con *Chlorella* sp. día uno, B: perlas control de alginato con *Chlorella* sp. día 15. C: Perlas de alginato con *Chlorella* sp. a pH4 día 1; D: Perlas de alginato con *Chlorella* sp. a pH4 día 15; E: Perlas de alginato con *Chlorella* sp. a pH5 día 1; F: Perlas de alginato con *Chlorella* sp. a pH5 día 15.

Fotografía tomada en la Universidad Politécnica Salesiana, por La autora, 2018.

Después de someter a *Chlorella* sp. inmovilizada a condiciones de estrés, dicha alga sigue mostrando su característica fotosintética, esto se debe a su capacidad de adoptarse a diferentes hábitats para su desarrollo (Villalobos & Scholz, 2013), así mismo Ávila (2015) demuestra que la inmovilización de microalgas (*Chlorella* sp. y *Chlamydomonas* sp.) para usos en biorremediación de nitritos y fosfatos no interviene en el crecimiento de la misma, de igual manera que lo que se observa en el presente ensayo al someter a la microalga a soluciones con plomo. Sin embargo, su crecimiento

también se puede ver influenciado por la toxicidad del metal como lo reporta Urvina (2018), usando perlas de alginato con *Chlorella* sp. a una concentración celular de 1.6×10^7 células/mL a pH 4, para remoción de cromo en el que se reporta que la microalga presentaba coloración marrón a los 10 días de exposición al metal a concentración de 20 mg/L, lo que se relaciona muerte de la célula, siendo así que la microalga se adapta de mejor manera a soluciones con plomo en comparación con el cromo a igual concentración y pH. En el caso de pH 5 y 20 mg/L de cromo Urvina (2018) señala el adecuado desarrollo de la microalga mostrando su coloración verde oscura, lo que indica su efectiva actividad fotosintética. De manera que el pH del medio es interviene en la resistencia a las condiciones tóxicas de los metales.

Por otro lado, Valdez et al (2018), reportan que a altas concentraciones de cadmio (100 y 200 mg/L) se observa la falta de tolerancia al metal de *Chlorella* sp. libre (sin inmovilizar), ocasionando coloración marrón grisácea, resultando tóxico para la actividad del organismos analizado. Otros estudios también describen la falta de tolerancia de las algas a la combinación de metales, Hajdu-Rahkama (2014) empleó 1×10^6 células/mL en cultivo líquido sin inmovilizar, a pH 3, en aguas artificiales que contenían As (30 μ L), Pb (300 μ g/L), Cd (30 μ g/L) y Hg (30 μ g/L) en el que se observó que el cultivo de *Desmodesmus subspicatus* presentó cambio de color grisácea a los 3 días de su contacto, esto era indicador de cultivo no viable demostrando la sensibilidad del algas a bajas concentraciones de metales ocasionada por la toxicidad que provoca su acción conjunta.

Al analizar los resultados se puede considerar que *Chlorella* sp. es un alga resistente a Pb ya que es capaz de desarrollarse en condiciones de estrés por presencia de plomo en concentraciones de hasta 20 mg/L, permitiendo su actividad metabólica

y su capacidad de retención del metal, sin afectar su crecimiento, lo que permitiría su uso en procesos de remoción de este contaminante.

3.6 Evaluación de la remoción de plomo en solución acuosa por acción de diferentes concentraciones de *Chlorella* sp. inmovilizada

Se estableció que todos los promedios de remoción, tanto para los tratamientos de perlas de alginato con diferentes concentraciones de microalga, así como perlas de alginato sin *Chlorella*, están alrededor del 91 % (tabla 5), donde el mejor porcentaje de remoción de Pb se obtuvo con perlas de alginato sin *Chlorella* con el 91.67 %. Esto indicaría que la presencia del alga no afectó el proceso de disminución del metal, corroborándose mediante el análisis de varianza (ANOVA), de manera que no existe diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos con *Chlorella* sp. y sin microalga (anexo 7), es así que todos los tratamientos usados tuvieron similar efecto en el proceso de biorremediación.

Tabla 5.Efecto de la densidad celular de *Chlorella* sp. en la remoción de Pb por acción

Tratamientos	Pb (Concentración inicial 20 mg/L)		
	Densidad celular (cel/mL de alginato)	Concentración final Pb (mg/L)	(% R) de Pb
Perlas con <i>Chlorella</i> sp. en solución con Pb	0.3x10 ⁶	1.73	91.30
	1.6x10 ⁷	1.80	91.00
	3x10 ⁷	1.75	91.25
Perlas sin <i>Chlorella</i> sp. en solución con Pb	0	1.67	91.67

Nota: Se empleó 20 mg/L de plomo, 22 °C ± 3 °C, pH 5 y a 143 minutos. Cel= células, (% R)= porcentaje de remoción.

Elaborado por: La autora, 2018.

Diversos autores reportan resultados en los que las perlas de alginato con *Chlorella* inmovilizada remueven mayor cantidad de plomo que las perlas de alginato sin microalga (Abdel-Hameed, 2006; Garza González, Almaguer Cantú, Rivera de la Rosa, & Loredó Medrano, 2010; Singh, 2018) Al contrario, Rao & Bhavikatti (2013) demuestran que el tratamiento con perlas de alginato sin microalga resulta ligeramente mejor en comparación con la inmovilización de *Chlorella pyrenoidosa*, en un sistema de remoción de cromo a 150 mg/L de solución, esto se observó en el análisis de variación de la concentración de metal (25, 50, 75, 100, 150 mg/L), de manera que, en cuanto aumenta la concentración inicial del contaminante la capacidad de eliminación disminuye por parte de las perlas con algas. La naturaleza y estructura del metal perjudica la actividad por parte de la microalga, por esta razón en este ensayo las perlas con alginato resultan ligeramente más viables para establecer un sistema de adsorción, dado que presenta mejor afinidad con este contaminante.

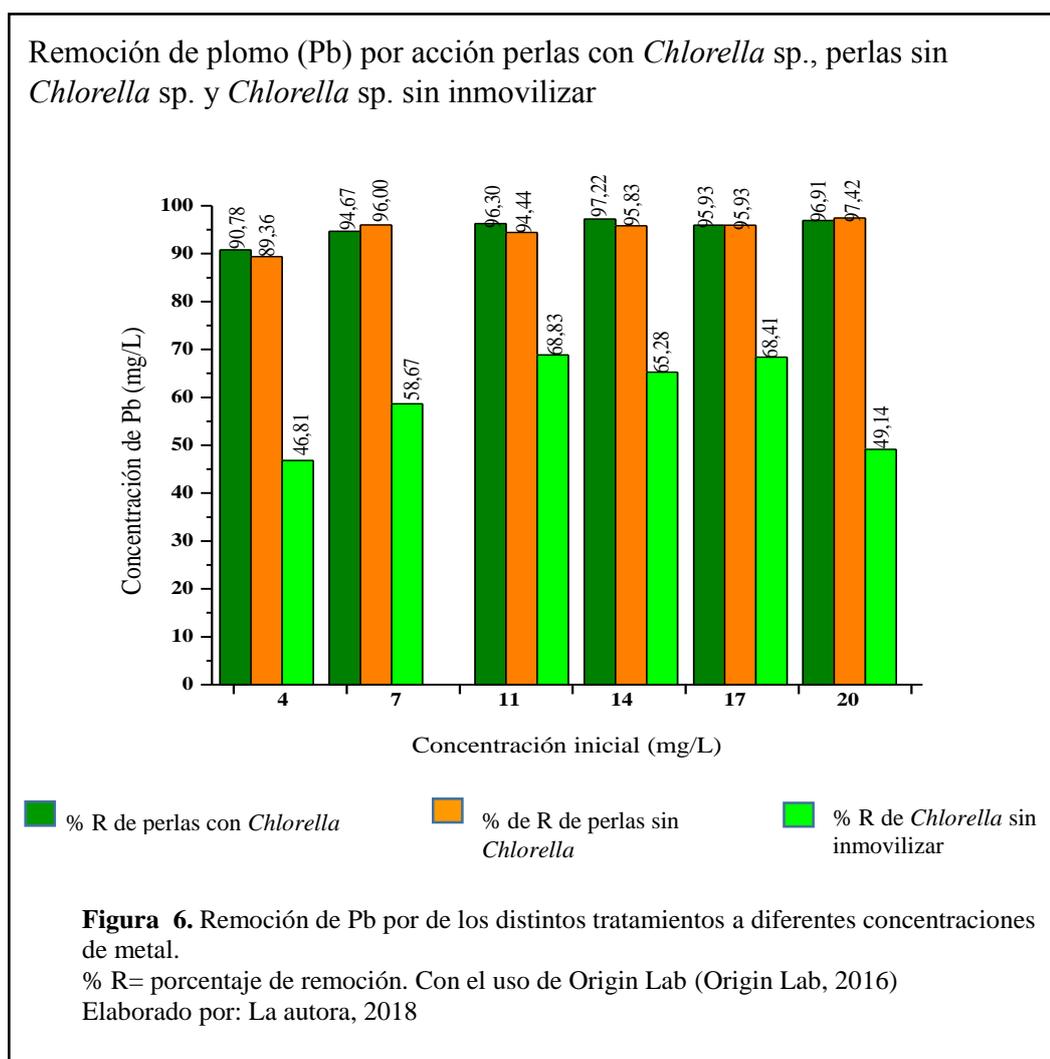
En los estudios reportados se evidencia que emplearon concentraciones de *Chlorella* en perlas distintas a las ensayadas en el presente estudio. Esto, sumado a que en el presente estudio no hay una relación directamente proporcional entre la concentración de la microalga inmovilizada y la capacidad de remoción de Pb, sugiere que se evalúen diversas concentraciones de *Chlorella* en perlas de alginato en soluciones acuosas con Pb, a fin de determinar las condiciones óptimas para remoción de este metal. Los valores a encontrarse junto con mayores análisis podrían conducir a la elaboración de análisis isotérmicos.

A diferencia de lo que sugieren Carrasco (2018) y Urvina (2018) en donde se puede apreciar que a mayor concentración de la microalga, se daría mayor remoción del metal, en este estudio se deduce que la concentración óptima para la remoción de plomo en solución acuosa estaría entre los rangos evaluados en este proyecto. Por lo tanto, se recomienda realizar futuros ensayos con muchas más concentraciones de *Chlorella* inmovilizada en alginato y de esta manera poder determinar una concentración óptima de microalga por mL de alginato para la remoción de Pb.

3.7 Análisis de remoción de Pb en solución acuosa en función de diferentes concentraciones del metal por acción de perlas de alginato con *Chlorella*, perlas de alginato sin *Chlorella* y *Chlorella* sin inmovilizar

En este análisis comparativo, la remoción de plomo se estudió mediante la disminución del metal en la solución acuosa por acción de: perlas con *Chlorella* sp. (3×10^7 células/mL de alginato) (T1), perlas sin *Chlorella* sp. (T2) y *Chlorella* sp. sin inmovilizar. Se realizaron los ensayos a pH 5 y con diferentes concentraciones del contaminante (0, 4, 7, 11, 14, 17 y 20 mg/L).

La figura 6, indica la acción de remoción por los bioadsorbentes (T1 y T2 y *Chlorella* sp. sin inmovilizar), aquí se muestra que el tratamiento con *Chlorella* sin inmovilizar remueve considerablemente menos metal que T1 o T2. Así mismo, al comparar T1 y T2 no se observa mayor diferencia en porcentajes de remoción, esto se corrobora con los análisis estadísticos realizados de forma que entre T1 y T2 no hay diferencia significativa ($p= 0.7636$, anexo 9B), mientras que al comparar los tres tratamientos se ven respuestas diferentes ($p= <0.0001$, anexo 9A). Es así que, tanto T1 y T2 alcanza valores de remoción al rededor del 90 % en todos los casos mientras que *Chlorella* sp. sin inmovilizar alcanza porcentajes inferiores, mismos que varían de 46.81 % a 68.83 %.



Como se demostró al analizar la remoción de Pb en perlas de alginato con diferentes concentraciones de microalga, no existe diferencia en el porcentaje de disminución del metal entre perlas de alginato con y sin *Chlorella*. De igual forma, se evidencia una respuesta similar al analizar la remoción del contaminante en solución acuosa en función de diferentes concentraciones del metal por acción de T1 y T2, ya que no hay diferencia significativa entre estos tratamientos.

El alginato es producido a partir de algas pardas (Andrade et al., 2004), y al igual que la microalga *Chlorella*, también presenta la capacidad de adherir a su estructura contaminantes como lo demuestran los ensayos realizados. Así mismo, estudios elaborados por Chaw, Khaing, & Thida (2011) luego de evaluar algunos tipos de adsorbente para la remoción de metales pesados, demostraron que el alginato de calcio presenta una efectividad de remoción de 87.5 % de plomo bajo condiciones de pH 5, concentración inicial de 500 mg/L y tiempo de 60 minutos, esto se debe a los grupos funcionales presentes en la superficie del alginato le confiere la capacidad de unión metal-bioadsorbente.

Como se evidencio en la gráfica, la biomasa de *Chlorella* libre presenta la capacidad de remover metales en solución acuosa pero no resulta tan efectiva en comparación con T1 y T2, dada que la inmovilización de microalgas pretende potencializar la actividad de remoción. Resultados similares presento Abdel-Hameed (2006) con porcentajes de remoción de 92 % y 90 % para alginato con *Chlorella vulgaris* inmovilizada y alginato sin microalga, respectivamente, mientras que, en el caso de células libres el porcentaje fue de 88.6 %, con una concentración inicial de 50 mg/L, pH 6 y 2 horas. Este incremento en la remoción del contaminante se debe a las características que confiere la matriz de inmovilización a la microalga para proteger al organismo dentro de la matriz y sobre todo a la afinidad del alginato por el metal.

El sistema de remoción está ampliamente relacionado con las condiciones como: pH, tiempo de remoción, concentración de metal en la solución, temperatura, tipo y dosis de organismo a utilizar, entre otros (Malik & Ahemand, 2011). Con estos resultados presentados se propone realizar los ensayos a diferentes concentraciones de *Chlorella* inmovilizada y quizá al trabajar en soluciones con pH 6 que no presenten precipitación del metal.

Conclusiones

- La metodología empleada para la elaboración de las perlas permitió obtener perlas adecuadas para los tratamientos, presentando características homogéneas en diámetro, coloración y forma.
- El análisis de la cinética de remoción establece que para el tratamiento de perlas de alginato con *Chlorella* sp. inmovilizada el tiempo de eliminación de plomo fue 143 min, mientras que para perlas de alginato sin *Chlorella* sp. fue de 148 min. En ambos casos la desorción ocurre después de los 180 minutos.
- El análisis de pH no presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), mostrando que el crecimiento de *Chlorella* sp. no fue afectada negativamente por el estrés ocasionado por el pH ni por la concentración de metal, sin embargo, porcentualmente pH 5 presentó mayor remoción con 98.35 % y 97.70 % en perlas de alginato con *Chlorella* sp. y perlas de alginato sin *Chlorella* sp. a 143 min de contacto con la solución de metal. Se espera que al trabajar con pH 6 se obtengan mejores resultados de remoción del metal.
- Estadísticamente no se mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones de *Chlorella* utilizadas y el tratamiento control. No hay una relación directamente proporcional entre la concentración de la microalga inmovilizada y la capacidad de remoción de Pb, por lo que se deberán ensayar diversas concentraciones adicionales, se esperaría que la concentración óptima para la remoción de plomo en solución acusa esté entre los rangos evaluados (0.3×10^6 - 3×10^7 células/mL).

- Al ensayar la remoción de Pb a partir de soluciones con diferentes concentraciones de metal, no existe diferencia en el porcentaje de disminución del contaminante entre perlas de alginato con y sin *Chlorella*, pero el tratamiento con *Chlorella* sin inmovilizar remueve considerablemente menos metal. La mejor respuesta presentada por los tratamientos con alginato se debe sobre todo a la afinidad del alginato por el metal.

Recomendaciones

- No emplear pHs muy ácidos en la elaboración de perlas de alginato, dado que afecta directamente a la estructura de la perla, haciendo susceptible a degradación.
- Analizar rangos de pH más amplios para establecer el sistema de remoción ideal para este contaminante, se sugiere dar mayor atención a valores de pH alrededor de 6.
- Evaluar diversas concentraciones de *Chlorella* en perlas de alginato en soluciones acuosas con Pb, a fin de determinar las condiciones óptimas para remoción de este metal. Los valores a encontrarse junto con mayores análisis podrían conducir a la elaboración de análisis isotérmicos.

Bibliografía

- Abbas, S., Ismail, I., Mostafa, T., & Sulaymon, A. (2014). Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology*, 3(4), 74-102.
- Abdel-Hameed, M. (2006). Continuous Removal and Recovery of Lead by Alginate Beads, free and alginate-immobilized *Chlorella vulgaris*. *African Journal of Biotechnology*, 5 , 1819-1823.
- Abu Al-Rub, F., El-Naas, M., Ashour, I., & Al-Marzouqi, M. (2006). Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *PROCESS BIOCHEMISTRY*, 41 , 457-464.
- Ahalya, N., Ramachandra, T., & Kanamadi, R. (2003). Biosorption of Heavy Metals. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 7(4).
- Ahmad, A., Bhat, A. H., & Buang, A. (2018). Enhanced biosorption of transition metals by living *Chlorella vulgaris* immobilized in Ca-alginate beads. *Environmental Technology*, 1-17.
<https://doi.org/10.1080/09593330.2018.1430171>
- Al-Homaidan, A. A., Al-Houri, H. J., Al-Hazzani, A. A., Elgaaly, G., & Moubayed, N. M. S. (2014). Biosorption of copper ions from aqueous solutions by *Spirulina platensis* biomass. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(1), 57-62.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.05.022>
- Alvear, M., Castillo, C., & Henao, D. (2011). *Evaluación del pH y concentración de nitrógeno en el cultivo de las microalgas Dunaliella salina y Chlorella nativa como fuente de aceite vegetal para la producción de biodiesel* (Tesis de pregrado). Universidad de Cartagena, Cartagena.

- Amábilis-Sosa, L., Siebe, C., Moeller-Chavez, G., & Duran-Domínguez, M. (2015). Remoción de mercurio, cromo y plomo por humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes. *Tecnología y Ciencias del agua*, 6(2), 21-34.
- Amaringo, F., & Hormaza, A. (2013). Determinación del punto de carga cero y punto isoeléctrico de dos residuos agrícolas y su aplicación en la remoción de colorantes. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4(2).
- Andrade, L. R., Salgado, L. T., Farina, M., Pereira, M. S., Mourão, P. A. S., & Amado Filho, G. M. (2004). Ultrastructure of acidic polysaccharides from the cell walls of brown algae. *Journal of Structural Biology*, 145(3), 216-225. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2003.11.011>
- Angulo, E., Catallar, G., Morales, E., & Barrios, M. (2012). Remoción de azul de metileno por la microalga *Chlorella* sp. Viva Removal methylene blue by microalgae *Chlorella* sp. Alive. *Prospect.*, 10, 53-60.
- chlorell *MEDISAN*, 16(8), 1207-1214.
- Arroyo, D. M. (2017). Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica*, 39(2), 23-29. <https://doi.org/10.30827/ars.v39i2.6008>
- Aung, W., Hlaing, N., & Aye, K. (2013). Biosorption of Lead (Pb²⁺) by using *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS)*, 1(2).
- Avila, J. (2015). *Evaluación de la remoción de nitratos y fosfatos a nivel laboratorio por microalgas libres e inmovilizadas para el Tratamiento Terciario de Aguas Residuales Municipales* (Tesis de licenciatura). Universidad de Ricardo Palma, Lima. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Jose_Avila-Peltroche/publication/277021476_Nitrate_and_phosphate_removal_from_fre

e_and_immobilized_microalgae_from_wastewaters_for_Biological_Tertiary_Treatment_Thesis/links/555fa18a08ae9963a118b538.pdf

- Ayala, J., & Romero, H. (2013). Presencia de metales pesados (arsénico y mercurio) en leche de vaca al sur de Ecuador. *La Granja*, 17(1), 36-46.
- Azcona-Cruz, M. I., Ramírez y Ayala, R., & Vicente-Flores, G. (2015). Efectos tóxicos del plomo. *Revista de Especialidades Médico-Quirúrgicas*, 20(1). Recuperado de <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=47345916012>
- Bansode, S., Banarjee, S., Gaikwad, D., Jadhav, S., & Thorat, R. (2010). Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharmaceutical Science Review and Research*, 1(2), 38-42.
- Barakat, M. A. (2011). New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. *Arabian Journal of Chemistry*, 4(4), 361-377. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.07.019>
- Bartnicki, J., & Lovblad, G. (2004). *EMEP assessment part II - national contributions*. Oslo: Norwegian Meteorological Institute.
- Bermúdez, M. (2010). Contaminación y Turismo Sostenible. Recuperado de <http://galeon.com/mauriciobermudez/contaminacion.pdf>
- Bharucha, E. (2004). Pollution. En *Environmental Studies* (University Grants Commission, pp. 112-161). New Delhi: Natural Resources.
- Buitrón, D. (2015). *Biosorción de cromo y níquel en aguas contaminadas usando Quitosano* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito-Ecuador.
- Burger, M., & Pose, D. (2010). *Plomo Salud y Ambiente Experiencia en Uruguay*. Montevideo-Uruguay.

- Cañizares-Villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42 , 131-143.
- Carrasco, A. (2018). *Estudio isotérmico de biosorción de cadmio en solución acuosa empleando perlas de alginato con Chlorella sp. inmovilizada* (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15821>
- Cartaya, O., Reynaldo, I., & Piniche, C. (2008). Cinética de adsorción de iones cobre (II) por una mezcla de oligogalacturónidos. *Revista Iberoamericana de Polímero*, 9(5), 473-478.
- Caviedes, D., Muñoz, R., Perdomo, A., Rodríguez, D., & Sandoval, I. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. *Revista Ingeniería y Región*, 13(1), 73-90.
- Cervantes, C., Saldaña, A. E., Aguilar, F. A., Rodríguez, I. L., Cano, M. R., Rodríguez, M. A., ... Sánchez, R. M. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203-210.
- Chacón, C., Andrade, C., C Árdenas, C., Araujo, I., & Morales, E. (2018). Uso de *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* en la remoción de nitrógeno, fósforo y DQO de aguas residuales urbanas de Maracaibo, Venezuela. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas*, 38(2).
- Chaw, H., Khaing, K., & Thida, W. (2011). Removal of Some Toxic Heavy Metals by means of Adsorption onto Biosorbent Composite (Coconut Shell Charcoal - Calcium Alginate) Beads. *Universities Research Journal*, 4(3), 238-250.
- Cho, D., Lee, S., Park, S., & Chung, A. (2008). Studies on the Biosorption of Heavy Metals onto *Chlorella vulgaris*. *Revista de Ciencia y Salud Ambiental*, 29(2), 389-409. <https://doi.org/10.1080/10934529409376043>

- Chuquilín, R., & Rosales, D. (2016). Estudio de la biosorción de Cd (II) Y Pb (II) usando como adsorbente *Nostoc sphaericum* Vaucher. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(1), 49-60.
- Council, N. R., Sciences, D. on E. and P., Systems, C. on E. and T., & Bioremediation, C. on I. S. (1993). *In Situ Bioremediation: When Does it Work?* National Academies Press.
- Crist, R., Oberholser, K., Shank, N., & Ming, N. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science & Technology*, 15(10), 1212-1217. <https://doi.org/10.1021/es00092a010>
- Cuizano, N., & Nabarro, A. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones, 12(0), 120-124.
- Das, N., Vimala, R., & Karthika, P. (2008). Biosorption of Heavy Metals – an Overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 7(2), 159-169.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37(18), 4311-4330. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)
- Dewi, E. R. S., & Nuravivah, R. (2018). Potential of Microalgae *Chlorella vulgaris* As Bioremediation Agents of Heavy Metal Pb (Lead) On Culture Media. *E3S Web of Conferences*, 31, 05010. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183105010>
- Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011). Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*, 32(5), 467-491. <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>

- Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2013). InfoStat (Versión 2013). Córdoba-Argentina: Grupo InfoStat. Recuperado de <http://www.infostat.com.ar>
- Dixit, R., Wasiullah, Malaviya, D., Pandiyan, K., Singh, U., Sahu, A., ... Paul, D. (2015). Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. *Sustainability*, 7(2), 2189-2212. <https://doi.org/10.3390/su7022189>
- Draget, K. I. (2009). 29 - Alginates. En *Handbook of Hydrocolloids (Second edition)* (pp. 807-828). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9781845695873.807>
- Fan, J. (2013). *Application of Cupriavidus metallidurans and Ochrobactrum intermedium for copper and chromium Biosorption* (Master's Thesis). Universidad de Houston, Houston.
- Ferré-Huguet, N., Schuhmacher, M., Llobet, J., & Domingo, J. (2007). Diseño de un software para evaluar riesgos de la exposición ambiental a través del agua, suelo y aire. MAPFRESEGURIDAD. Recuperado de <https://www.mapfre.com/ccm/content/documentos/fundacion/prev-ma/revista-seguridad/n108-programa-hra-metales-pesados.pdf>
- Flores-Ramírez, R., Rico-Escobar, E., Núñez-Monreal, J. E., García-Nieto, E., Carrizales, L., Ilizaliturri-Hernández, C., & Díaz-Barriga, F. (2012). Exposición infantil al plomo en sitios contaminados. *Salud Pública de México*, 54(4), 383-392.
- Garza González, M. T., Almaguer Cantú, V., Rivera de la Rosa, J., & Loredó Medrano, J. Á. (2010). Bioingeniería ambiental aplicada a una columna empacada con

- Chlorella* sp. inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Ciencia UANL*, 13(0). Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/2137/>
- Gautam, R., Sharma, S., Mahiya, S., & Chattopadhyaya, M. (2014). *Heavy Metals In Water : Presence, Removal and Safety*.
- Gómez, N. (2005). *Remoción de Materia Orgánica por Coagulación-Floculación* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Manizales-Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/1214/1/nestoralejandrogomezpuentes.2005.pdf>
- González, D., & Rojas, W. (2008). *Relación entre la exposición crónica ocupacional al plomo y los efectos neurocomportamentales* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co>
- Hajdu-Rahkama, R. (2014). *Bioremediation of heavy metal by using the microalga *Desmodesmus subspicatus** (Bachelor Thesis). Ostfalia University of Applied Sciences, Alemania.
- He-Jeong, C., & Seung-Mok, L. (2012). Effects of Microalgae on the Removal of Nutrients from Wastewater: Various Concentrations of *Chlorella vulgaris*. *Environmental Engineering Research*, 17(1), 3-8.
- Infante, C., Angulo, E., Zarate, A., Flores, J., Barrios, F., & Zapata, C. (2012). Propagación de la microalga *Chlorella* sp. en cultivo por lote: cinética de crecimiento celular. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 3(2), 159-164.
- Kaplan, D. (2013). Absorption and adsorption of heavy metals by microalgae. En *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology* (2.^a ed., pp. 439-447). Phycol. Biotechnol.

- Kiran, I., Akar, T., Safa Ozcan, A., Ozcan, A., & Tunali, S. (2006). Biosorption kinetics and isotherm studies of Acid Red 57 by dried *Cephalosporium aphidicola* cells from aqueous solutions, *31* , 197-203.
- Kotrba, P., Mackova, M., & Urbánek, V. (Eds.). (2011). *Microbial Biosorption of Metals, Texto original*. Springer Netherlands. Recuperado de [//www.springer.com/gp/book/9789400704428](http://www.springer.com/gp/book/9789400704428)
- Kumar, R. M., Frankilin, J., & Raj, S. P. (2013). Accumulation of heavy metals (Cu, Cr, Pb and Cd) in freshwater micro algae (*Chlorella* sp.). *Journal of Environmental Science & Engineering*, *55*(3), 371-376.
- Laitinen, J. (2006). *In-Situ soil and groundwater bioremediation techniques and applicatios* (Thesis). Tampere Polytechnic. Recuperado de <https://www.theseus.fi/bitstream/handle/10024/8455/TMP.objres.427.pdf>
- Lapo, B. (2014). *Estudio de medios de soporte para crecimiento bacteriano aplicado al tratamiento biológico aerobio en aguas residuales* (Tesis de master). Universidad Politécnica Nacional, Quito- Ecuador.
- Limo, U. (2003). *Estudio sobre la presencia del plomo en el medio ambiente de Talara en el año 2003* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Liu, J., & Chen, F. (2014). Biology and Industrial Applications of *Chlorella*: Advances and Prospects. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *153* . https://doi.org/10.1007/10_2014_286
- Luan, T. G., Jin, J., Chan, S. M. N., Wong, Y. S., & Tam, N. F. Y. (2006). Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, *41*(7), 1560-1565. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.02.020>

- Luna, R., & Rodríguez, V. (2016). *Determinación de la concentración de cadmio y plomo en papa (Solanum tuberosum) cosecha en la cuenca de los ríos Mashcón y Chonta- Jacamarca* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Lupo, B., González, C., & Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de alimentos*, 3(1), 130-151.
- Mafla, E. (2015). *Determinación de cromo, plomo y arsénico en aguas del canal de riego Latacunga-Salcedo-Ambato y evaluación de la transferencia de dichos metales a hortalizas cultivadas en la zona; mediante espectrofotometría de absorción atómica* (Tesis de master). Universidad Central del Ecuador, Quito.
- Maldonado, A., Luque, C., & Urquiza, D. (2012). Biosorción de plomo de aguas contaminadas utilizando *Pennisetum clandestinum* Hochst (Kikuyo), 52-54.
- Malik, A., & Ahemand, M. (2011). Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soil irrigated with wastewater. *Bacteriology Journal*, 2 , 12-21, 201.
- Martins, S. C. S., Martins, C. M., Fiúza, L. M. C. G., & Santaella, S. T. (2013). Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, 12(28). <https://doi.org/10.5897/AJB12.2677>
- Mary Kensa, V. (2011). *Bioremediation - An overview* (Vol. 27) .
- Ministerio del Ambiente. (2015). Libro VI. En *Texto Unificado de la Legislación Secundaria* (cep Corporación de Estudios y Publicación, pp. 301-302). Ecuador. Recuperado de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112180.pdf>

- Montaño, A., Bula, L., Angulo, E., & Mercado, I. (2017). Evaluación del uso de la microalga *Chlorella* sp., no viva en la remoción de cefalexina. *Memorias III Seminario Internacional de Ciencias Ambientales SUE-Caribe*, 107-110.
- Moreno-Garrido, I. (2008). Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource Technology*, 99(10), 3949-3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Muñoz, N. (2009). *Determinación de plomo y cadmio en hierbas medicinales* (Tesis de pregrado). Universidad de Belgrano, Buenos Aires.
- Navarro-Aviñón, J., Aguilar, I., & López- Moya, J. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Revista científica de Ecología y Medio Ambiente*, 16(2).
- Nivetha, S., & Karthick, R. (2018). Studies on the biosorption on removal of heavy metal copper in printed circuit boards. *International Reasearch Journal of Engineering and Technology*, 5(3), 753-757.
- Oliveira, R., Mauricio, P., & Garcia, O. (2011). Biosorption of Metals: State of the Art, General Features, and Potential Applications for Environmental and Technological Processes. *Open access peer-reviewed chapter*, 152-171. <https://doi.org/10.5772/17802>
- Origin Lab. (2016). (Versión 2016). MA-USA: Origin Lab Corporation.
- Oviedo, A., Moína-Quimí, E., Naranjo-Morán, J., & Barcos-Arias, M. (2017). Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera. *Bionatura*, 2, 437-441. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.5>
- Padilla, A., Rodríguez-Sierra, N., & Martínez, A. (2000). Plomo. En *Protocolos de vigilancia sanitaria específica* (1.^a ed., pp. 13-45). Victoria-Gasteiz: Osalan.

- Parichehr, H., Farzaneh, J., Fariba, J., & Shima, M. (2015). Immobilization of the Alkaline Phosphatase on Collagen Surface via Cross-Linking Method, *13*(3), 32-38.
- Pauro, J., Choque, M., Poccohuanca, R., & Mamani, A. (2009). Estudios de bioadsorción de plomo por *Saccharomyces cereviceae* en soluciones acuosas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *11*(1), 33-39.
- Pavasant, P., Apiratikul, R., Sungkhum, V., Suthiparinyanont, P., Wattanachira, S., & Marhaba, T. F. (2006). Biosorption of Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, and Zn²⁺ using dried marine green macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Bioresource Technology*, *97*(18), 2321-2329. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.10.032>
- Plaza, J. (2012). *Remoción de metale pesados empleando algas marinas* (Tesis doctoral). Universidad Nacional de la Plata, La Plata-Argentina.
- Rao, P. V., & Bhavikatti, S. S. (2013). Removal of Chromium (VI) from Synthetic Waste water using Immobilized Algae. Recuperado de /paper/Removal-of-Chromium-(-VI-)from-Synthetic-Waste-Rao-Bhavikatti/b65925b0489005742620e23c50d6e46f2a7d3397
- Ravindra Reddy, K., & Sabitha Reddy, P. (2010). Effect of different co-polymers on sodium alginate microcapsules containing isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*, *2*, 2198-2203.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación por Metales Pesados: Implicaciones en Salud, Ambiente y Seguridad Alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, *16*(2), 66-77. <https://doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447>

- Roa, A., & Cañizares, R. (2012). Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 71-79.
- Roane, T. M., Pepper, I. L., & Gentry, T. J. (2015). Chapter 18 - Microorganisms and Metal Pollutants. En I. L. Pepper, C. P. Gerba, & T. J. Gentry (Eds.), *Environmental Microbiology (Third Edition)* (pp. 415-439). San Diego: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394626-3.00018-1>
- Sag, Y., & Kutsal, T. (2000). Determination of the biosorption activation energies of heavy metal ions on *Zoogloea ramigera* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochemical Engineering Journal*, 35(8), 801-807. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00154-5](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00154-5)
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S., & Kulkarni, P. R. (2006). Resistant Starch—A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(1), 1-17. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x>
- Sala, L., García, S., González, J., Frascaroli, M., Bellú, S., Mangiameli, F., ... Salas, J. (2010). Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho. *Real Sociedad Española de Química*, 106(2), 114-120.
- Sameera, V., Naga Deepthi, C., Srinu Babu, G., & Ravi Teja, Y. (2011). Role of Biosorption in Environmental Cleanup. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 3(1). <https://doi.org/10.4172/1948-5948.R1-001>
- Sánchez, E., Garza, M., Almaguer, V., Sáenz, I., & Liñán, A. (2008). Estudio cinético e isotermas de adsorción de Ni (II) y Zn (II) utilizando biomasa del alga *Chlorella* sp. inmovilizada. *Ciencia UANL*, 11.
- Senthil Kumar, P., & Gunasundari, E. (2018). Bioremediation of Heavy Metals. En S. J. Varjani, A. K. Agarwal, E. Gnansounou, & B. Gurunathan (Eds.),

Bioremediation: Applications for Environmental Protection and Management (pp. 165-195). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7485-1_9

Shu-kui, Z., Ying-jiu, L., & Hai-yang, J. (2011). Experimental study of bio-sorption on Pb²⁺ by *Chlorella*. *2011 International Conference on Electric Technology and Civil Engineering (ICETCE)*, 1238-1241. <https://doi.org/10.1109/ICETCE.2011.5774432>

Significado de Contaminación. (2016, Febrero 5). Recuperado 22 de octubre de 2018, de <http://www.significados.com/contaminacion/>

Silva-Benavides, A. M., & Torzillo, G. (2012). Nitrogen and phosphorus removal through laboratory batch cultures of microalga. *Journal of Applied Phycology*, 24(2), 267-276. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9675-2>

Simental, D. (2015). *Inmovilización de Lactobacillus acidophilus en mezclas de alginato, gelatina y mucílago de nopal* (Tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional, México, D. F.

Singh, R. (2018). *Selective separation of lead ions from waste water by immobilized Chlorella based biosorbents* (Vol. 3) .

Smiljanic, T. (Ed.). (2010). *Biopolymers* (Assoc. Prof. Dr. Magdy M.). Croacia: sciyo.

Soler, L. (2014). *Estudio del proceso de biosorción del níquel de aguas residuales mediante residuos de raspo de uva* (Tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Catalunya, Barcelona.

Tejada, C., Núñez, J., & Villabona, Á. (2015). Uso de biomasas para la adsorción de plomo, níquel, mercurio y cromo. *ResearchGate*. <http://dx.doi.org/10.21774/ingenium.v9i24.520>

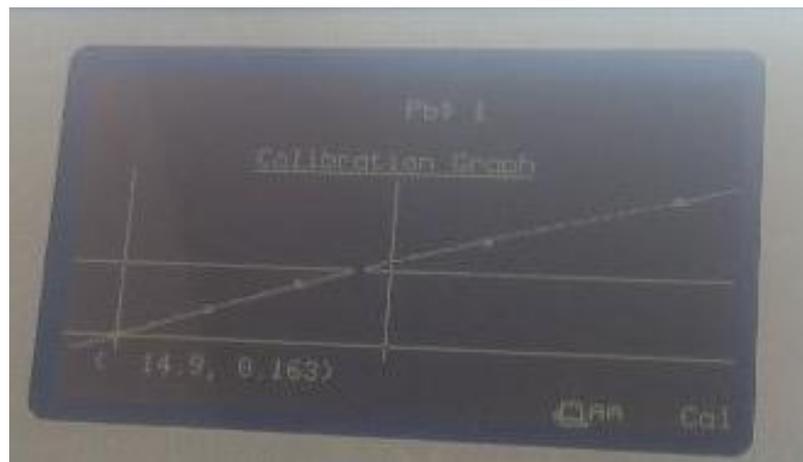
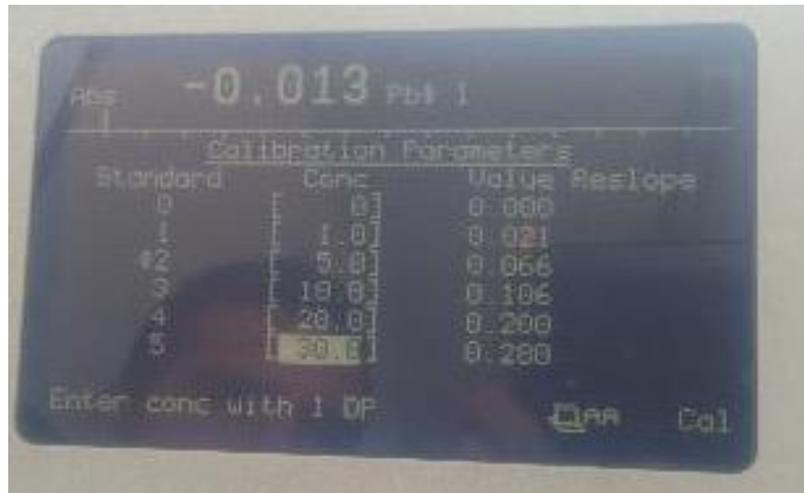
- Tejada, C., Villabona, Á., & Garcés, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 18(34), 109-1023.
- Tenorio, G. (2006). *Caracterización de la Biosorción de Cromo con hueso de aceituna* (Tesis doctoral). Universidad de Granada, Granada.
- Tomei, M. C., & Daugulis, A. J. (2013). Ex Situ Bioremediation of Contaminated Soils: An Overview of Conventional and Innovative Technologies, 43, 2107–2139. <https://doi.org/10.1080>
- Toscano, C., & Gabriela, S. (2011). Determinación de metales pesados (plomo, cadmio y níquel) en el cilantro (*Coriandrum sativum* L.) en Aloag, cantón Mejía, provincia de Pichincha por espectrofotometría de absorción atómica de llama. Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec:80/xmlui/handle/22000/12765>
- Travieso, L., Cañizares-Villanueva, R., Borja, R., Benítez, F., Domínguez-Bocanegra, A., Dupeyrón y, R., & Valiente, V. (1999). *Heavy Metal Removal by Microalgae* (Vol. 62). <https://doi.org/10.1007/s001289900853>
- Umar, M., & Halimoon, N. (2015). Microorganisms and Biosorption of Heavy Metals in the Environment: A Review Paper. *Journal Microb Biochem Technol*, 7(5), 253-256. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000219>
- Urvina, A. (2018). *Estudio isotérmico de remoción de cromo (VI) en solución acuosa empleando perlas de alginato con Chlorella sp. inmovilizada*. (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/15253>
- U.S. Environmental Protection Agency. (2000). *Engineered Approaches to in Situ Bioremediation of Chlorinated Solvents: Fundamentals and Field Applications*. DIANE Publishing.

- Valdez, C., Perengüez, Y., Mátyás, B., & Guevara, M. F. (2018). Analysis of removal of cadmium by action of immobilized *Chlorella* sp. micro-algae in alginate beads. *F1000Research*, 7, 54. <https://doi.org/10.12688/f1000research.13527.1>
- Valdivia, M. (2005). Intoxicación por plomo. *Rev. Soc. Per. Med. Inter.*, 18(1).
- Vargas, M., Cabañas, D., Gamboa, M., & Domínguez, X. (2009). Evaluación de procesos de biosorción con cascaras de naranja para la eliminación del colorante comercial Lanosol Navy CE en aguas residuales de la industria textil. *Ingeniería*, 13(3), 39-43.
- Vera, L., Uguña, M., García, N., Flores, M., & Vázquez, V. (2016). Eliminación de los metales pesados de las aguas residuales mineras utilizando el bagazo de caña como biosorbente - PDF. *AFINIDAD LXXIII*, 573. Recuperado de <https://docplayer.es/29855522-Eliminacion-de-los-metales-pesados-de-las-aguas-residuales-mineras-utilizando-el-bagazo-de-cana-como-biosorbente.html>
- Verma, R., & Dwivedi, P. (2013). *Heavy metal water pollution- A case study*. (Recent Research in Science and Technology, Vol. 5).
- Villalobos, N., & Scholz, C. (2013). Microalgas en Estanques de Tilapia y su Potencial Biotecnológico, Ambiental e Industrial. *Biocenosis*, 27(1), 50-55.
- Vinueza, A., & Mishell, A. (2017). *Análisis de remoción de cromo por acción de la microalga Chlorella sp. inmovilizada en perlas de alginato* (Tesis de pregrado). Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/13639>
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2(3), 96-99.
- Willaert, R. (2009). Engineering aspects of cell immobilization. En *Encyclopedia of industrial biotechnology* (Michael C. Flickinger, pp. 1385-1413).

- Willaert, R. (2011). Cell Immobilization and Its Applications in Biotechnology. En *Fermentation microbiology and biotechnology* (thirdPublisher).
<https://doi.org/10.1201/b11490-13>
- Williams, J. (2006). Bioremediation of Contaminated Soils : A Comparison of In Situ and Ex Situ Techniques. Recuperado de [/paper/Bioremediation-of-Contaminated-Soils-%3A-A-Comparison-Williams/4c6afc722040e0d4807a744b7f89a5e7b9dac97f](#)
- Xu, Y., & Lu, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 395-401.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.038>
- Yepes, D. M. (2015). Acetilación enzimática de almidones: una opción de valor agregado. *Revista Tumbaga*, 1(10). Recuperado de <http://revistas.ut.edu.co/index.php/tumbaga/article/view/995>

Anexos

Anexo 1. Datos de la curva de calibración de plomo. $R=0.99$



Fuente: La autora, 2018

Anexo 2. Perlas de alginato sin *Chlorella* sp.



Fuente: La autora, 2018

Anexo 3. Perlas de alginato con *Chlorella* sp.



Fuente: La autora, 2018

Anexo 4. Prueba del efecto del pH en el proceso de remoción de plomo.



Nota: Se emplearon pH 4 y 5, a temperatura ambiente 23 °C, 20 mg/L y al tiempo ya determinado.
Fuente: La autora, 2018

Anexo 5. Análisis del tiempo de contacto para la remoción de plomo por acción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. y perlas de alginato sin *Chlorella* sp.

	T1	T2
Tiempo (min)	mg/L de Pb en perlas con <i>Chlorella</i> sp.	mg/L de Pb en perlas sin <i>Chlorella</i> sp.
0	20.400	20.400
20	14.125	14.900
40	9.625	7.625
60	8.700	7.100
80	6.075	4.100
100	4.825	4.525
120	1.525	2.175
140	1.525	1.450
160	1.025	0.975
180	0.825	0.850
200	1.050	1.275
220	1.250	1.375

Nota: el ensayo se realizó a temperatura ambiente de 23 °C, soluciones reguladas a pH 5, las muestras se tomaron cada 20 min.

Fuente: La autora, 2018

Anexo 6. Análisis de varianza correspondiente al porcentaje de remoción del plomo, obtenido del análisis a diferentes valores de pH.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% remoción de Pb	4	0,28	0,00	0,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,28	1	0,28	0,78	0,4715
PH	0,28	1	0,28	0,78	0,4715
Error	0,71	2	0,36		
Total	0,99	3			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,56365

Error: 0,3556 gl: 2

PH	Medias	n	E.E.
4	97,50	2	0,42 A
5	98,03	2	0,42 A

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

Nota: se analizó con un nivel de significación del 95 %, de la concentración final obtenida en los diferentes tratamientos de remoción del plomo por acción de las perlas de *Chlorella* sp. y perlas sin *Chlorella* sp, mediante el Software estadístico Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2013).

Fuente: La autora, 2018

Anexo 7. Análisis de varianza correspondiente al porcentaje de remoción del plomo, obtenido del análisis a diferentes concentraciones celulares de *Chlorella* sp. en perlas de alginato.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% de remoción de Pb	4	0,72	0,58	0,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,17	1	0,17	5,10	0,1525
tratamiento	0,17	1	0,17	5,10	0,1525
Error	0,06	2	0,03		
Total	0,23	3			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,89490

Error: 0,0325 gl: 2

tratamiento	Medias	n	E.E.
Perlas Chlorella sp + Pb	91,20	3	0,10 A
Perlas sin Chlorella sp + ..	91,67	1	0,18 A

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

Nota: se analizó con un nivel de significación del 95 %, por acción de diferentes concentraciones de la microalga inmovilizada para la de remoción del plomo, mediante el Software estadístico Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. (2013).

La autora, 2018

Anexo 8. Ensayo de densidad celular óptima para la remoción de plomo, por acción de diferentes concentraciones de *Chlorella* sp. y perlas de alginato sin *Chlorella* sp..



Nota: Se empleó las condiciones óptimas calculadas de tiempo de contacto y pH, a temperatura ambiente 23 °C, 20 mg/L y 3 concentraciones celulares (0.3×10^7 , 1.6×10^7 , 3×10^7 células/ mL de alginato).

Fuente: La autora, 2018

Anexo 9. Datos estadísticos del porcentaje de bioadsorción por acción perlas con *Chlorella* sp., perlas sin *Chlorella* sp. y *Chlorella* sp. sin inmovilizar

Anexo 9. A) Análisis estadístico de Remoción de plomo (Pb) por acción perlas con *Chlorella* sp., perlas sin *Chlorella* sp. y *Chlorella* sp. sin inmovilizar.

```

Análisis de la varianza
/
  Variable      N   R2  R2 Aj  CV
% Remoción de Pb 18 0,90  0,89  7,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)
  F.V.      SC   gl  CM   F   p-valor
Modelo.    5054,16  2 2527,08 70,50 <0,0001
Tratamiento 5054,16  2 2527,08 70,50 <0,0001
Error      537,70 15  35,85
Total     5591,86 17

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=8,97871
Error: 35,8466 gl: 15
  Tratamiento      Medias n  E.E.
%R Chlorella sin inmoviliz.. 59,52  6 2,44 A
%R de perlas sin Chlorella.. 94,83  6 2,44  B
% R de perlas con Chlorell.. 95,30  6 2,44  B
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)
    
```

Anexo 9. B) Análisis estadístico de Remoción de plomo (Pb) por acción perlas con *Chlorella* sp., perlas sin *Chlorella* sp.

```

Análisis de la varianza

  Variable      N   R2  R2 Aj  CV
% Remoción de Pb 12 0,01  0,00  2,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)
  F.V.      SC   gl  CM   F   p-valor
Modelo.    0,66  1 0,66  0,10  0,7636
Tratamiento 0,66  1 0,66  0,10  0,7636
Error      68,85 10  6,89
Total     69,51 11

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,37554
Error: 6,8853 gl: 10
  Tratamiento      Medias n  E.E.
%R de perlas sin Chlorella.. 94,83  6 1,07 A
% R de perlas con Chlorell.. 95,30  6 1,07 A
Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)
    
```

Fuente: La autora, 2018

Anexo 10. Efecto de la concentración de Pb en el porcentaje de remoción por acción de perlas con *Chlorella* sp., perlas sin *Chlorella* sp. y *Chlorella* sp. sin inmovilizar.

Anexo 10 (A). Datos de remoción obtenidos por acción de perlas con *Chlorella* sp.

Concentración inicial (mg/L)	Concentración Final (mg/L)	% de remoción de Pb
0.000	0.000	0.000
4.700	0.433	90.780
7.500	0.400	94.667
10.800	0.400	96.296
14.400	0.400	97.222
17.200	0.700	95.930
19.400	0.600	96.907

Nota: Se empleó 6 concentraciones de metal, pH 5, 143 min y 3×10^7 células/ mL de alginato.
Fuente: La autora, 2018

Anexo 10 (B). Datos de remoción obtenidos por acción de perlas sin *Chlorella* sp.

Concentración inicial (mg/L)	Concentración Final (mg/L)	% de remoción de Pb
0.000	0.000	0.000
4.700	0.500	89.362
7.500	0.300	96.000
10.800	0.600	94.444
14.400	0.600	95.833
17.200	0.700	95.930

19.400	0.500	97423
<p>Nota: Se empleó 6 concentraciones de metal, pH 5, 143 min. Fuente: La autora, 2018</p>		
<p>Anexo 10 (C). Datos de remoción obtenidos por acción <i>Chlorella</i> sp. sin inmovilizar.</p>		
Concentración inicial	Concentración Final	% de remoción de Pb
(mg/L)	(mg/L)	
0.000	0,000	0,000
4.700	0,5	46.809
7.500	0,3	58.667
10.800	0,6	68.827
14.400	0,6	65.278
17.200	0,7	68.411
19.400	0,5	49.141
<p>Nota: Se empleó 6 concentraciones de metal, pH 5, 143 min a concentración de 3×10^7 células/ mL de alginato. Fuente: La autora, 2018</p>		