



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CADMIO IN
VITRO UTILIZANDO LA MICROALGA *Chlorella* sp. Y SU POTENCIAL
PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SITIOS NATURALES

Autor

Pedro Vicente Lucas Pachay

Año
2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE CADMIO *IN VITRO* UTILIZANDO LA MICROALGA *Chlorella* sp. Y SU POTENCIAL PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SITIOS NATURALES CONTAMINADOS

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos establecidos para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

Profesor Guía

MSc. Wilson David Tapia López

Autor

Pedro Vicente Lucas Pachay

Año

2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de titulación”.

Wilson David Tapia López

Magister en Gestión y Planificación Ambiental

CI: 171420528-1

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de titulación”.

Mónica Cecilia Vaca Proaño
Magister en Ingeniería de la Energía
CI: 171663129-4

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR CIENTÍFICO

“Declaro haber dirigido científicamente al estudiante para la realización de su trabajo experimental de titulación en base al método científico, conduciéndole con coherencia en el conjunto de experimentos realizados, y orientando sus conocimientos para lograr los objetivos propuestos”.

Jorge David Irazábal Alarcón
Licenciado en Microbiología Clínica y aplicada
CI: 100212247-9

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigente”.

Pedro Vicente Lucas Pachay

CI: 131177940-7

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque es la fuente de toda dadiva buena.

A mis padres, hermanos y abuela por el amor, la motivación y apoyo incondicional.

Al Ing. Wilson Tapia por su apoyo y guía brindada en mi trabajo de titulación.

DEDICATORIA

A Dios, mis padres,
hermanos, que son mi razón
y motivación para seguir
adelante.

RESUMEN

La microalga *Chlorella* sp. ha sido de mucha importancia en los últimos años en la investigación y desarrollo en múltiples áreas como agrícola, alimenticia y ambiental, por su gran capacidad de remoción de metales pesados como el cadmio (Cd). El Cd es un metal pesado que causa toxicidad en el hígado y riñones en el ser humano, se encuentra en el suelo y fuentes hídricas, donde pasa por la cadena alimenticia hasta llegar a ser ingerido por ser humano. *Chlorella* sp. posee las características para una efectiva biorremediación de este contaminante mediante sus mecanismos de bioacumulación y biosorción.

El objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad de remoción de Cd *in vitro* por parte de *Chlorella* sp. inmovilizada en alginato de sodio utilizando cinco concentraciones de solución de Cd (0.5, 1, 2, 3, 5 ppm). Se obtuvo un cultivo puro de la microalga con el medio de cultivo de Nitrofoska al 3%, y se escaló hasta un volumen de 5 L en seis frascos (F1, F2, F3, F4, F5 y F6), de los cuáles los cuatro primeros mantenían aireación y luz artificial led durante 24 horas y los restantes luz natural sin aireación. Se midió la concentración celular en 12 momentos por un lapso de 21 días. Para evaluar la remoción de Cd se realizaron 5 tratamientos formados por perlas de alginato con un concentrado microalgal más las distintas concentraciones de Cd (0.5, 1, 2, 3 y 5 ppm) que se evaluaron mediante espectroscopia de absorción atómica. Se evaluaron estadísticamente los resultados mediante pruebas t de Student y análisis de varianza. Se evidenció que existen diferencias estadísticas significativas en la concentración celular al evaluar como factores al tipo de luz y a la presencia de aireación. El mayor porcentaje de remoción (91.50%) con perlas de alginato más *Chlorella* sp. se produjo con un contenido de 5 ppm de Cd seguido de la concentración de 3 ppm (90.21%). Al evaluar estadísticamente todos los tratamientos se encontraron diferencias significativas en la concentración de remoción de Cd.

ABSTRACT

The microalga *Chlorella* sp. has assumed a great importance in recent years in research and development in many areas such as agricultural, food and environmental, for its great ability to remove heavy metals such as cadmium (Cd). Cd is a heavy metal that causes toxicity in the liver and kidneys in humans, it is found in soil and water sources, where it passes through the food chain until it is ingested by humans. *Chlorella* sp. has the characteristics for an effective bioremediation of this contaminant through its mechanisms of bioaccumulation and biosorption.

The objective of the present investigation was to determine the capacity of removal of Cd in vitro by *Chlorella* sp. immobilized on sodium alginate using five concentrations of Cd solution (0.5, 1, 2, 3, 5 ppm). A pure microalgae culture was obtained with 3% Nitrofoska culture medium and scaled to a volume of 5 L in six flasks (F1, F2, F3, F4, F5 and F6), of which the first four maintained aeration and artificial light led for 24 hours and the remaining natural light without aeration. The cell concentration was measured in 12 moments for a period of 21 days. To evaluate the elimination of Cd, 5 treatments given by alginate beads with a microalgae concentrate plus the different concentrations of Cd (0.5, 1, 2, 3 and 5 ppm) were evaluated by atomic absorption spectroscopy. The results were statistically evaluated using t Student test and analysis of variance. It was evidenced that there are significant statistical differences in the determination of the quality of the factors like the type of light and the presence of aeration. The highest removal percentage (91.50%) with alginate beads plus *Chlorella* sp. was produced with a content of 5 ppm of Cd followed by the concentration of 3 ppm (90.21%). When statistically evaluating all treatments were found significant differences in the concentration of Cd removal.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Objetivos	6
1.3.1. Objetivo General	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
1.4. Justificación de la investigación	7
2. Capítulo II. Marco teórico	8
2.1. Microalgas	8
2.1.1. Características	8
2.1.2. Clasificación de las microalgas	10
2.1.3. Factores reguladores del crecimiento de microalgas	12
2.1.4. Aplicaciones de las microalgas	14
2.1.4.1. Biotecnología de las microalgas	14
2.2. <i>Chlorella</i> sp.	16
2.2.1. Generalidades	16
2.2.2. Morfología, estructura	17
2.2.3. Taxonomía de la microalga	18
2.2.4. Aplicaciones	18
2.2.4.1. Remoción de Nitrógeno	19
2.2.4.2. Remoción de fósforo (P)	20
2.2.4.3. Remoción de metales pesados	21
2.2.5. Medios de Cultivo	23
2.3. Inmovilización de microorganismos	23
2.3.1. Generalidades	23
2.3.2. Ventajas de la inmovilización celular	24

2.3.3. Tipos de inmovilización	24
2.3.3.1. Inmovilización pasiva	24
2.3.3.2. Inmovilización activa	25
2.3.4. Alginato	26
3. Capítulo III. Diseño del plan experimental	27
4. Capítulo IV. Procedimientos	28
4.1. Población y muestra	28
4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos	29
4.2.1. Transporte de las muestras de agua	29
4.2.2. Preparación de la muestra	29
4.2.3. Preparación del medio de cultivo	29
4.2.4. Obtención de cultivo puro	30
4.2.5. Escalado	31
4.2.6. Recuento celular	33
4.2.7. Obtención del concentrado microalgal en fase exponencial	34
4.2.8. Conteo celular del concentrado microalgal	34
4.2.9. Inmovilización del concentrado microalgal del cultivo en fase exponencial de crecimiento del alga <i>Chlorella</i> sp.	35
4.2.10. Contaminación de perlas de alginato con Cd	35
4.2.11. Cuantificación de remoción de Cd	36
4.3. Evaluación estadística de los resultados	36
5. Capítulo V. Resultados y discusión	37
5.1. <i>Chlorella</i> sp.	37
5.1.1. Análisis del recuento celular	37
5.2. Remoción de Cd	43
6. Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones	49
6.1. Conclusiones	49

6.2. Recomendaciones	51
Referencias	52

Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

En los últimos años el mundo se ha enfrentado a problemas en el medio ambiente ocasionados por diversos contaminantes y fuentes de contaminación debido a labores extractivas y de desarrollo de la sociedad. Estos avances han provocado el incremento de la contaminación del suelo y de los recursos hídricos a nivel mundial, con lo que surge la necesidad de generar estrategias para remediar estos daños que en muchos casos han llegado a ser irreparables (Kshirsagar, 2013, p. 340; Fraile et al., 2005, p. 61).

Actualmente no existen mecanismos naturales con una alta eficiencia para la remoción de metales pesados. Cuando los mismos son liberados en el ambiente se distribuyen en los componentes bióticos y abióticos del ecosistema y no pueden ser metabolizados, ni absorbidos en su totalidad por los organismos presentes en el medio (Zayadan, Sadvakasova, Hassan y Beisenova, 2013, p. 32).

Entre los metales pesados generados a nivel industrial y que son considerados como contaminantes se encuentran: cadmio (Cd^{2+}), plomo (Pb^{2+}), cromo (Cr^{2+}), hierro (Fe^{3+}), cobre (Cu^{2+}), zinc (Zn^{2+}), níquel (Ni^{2+}), manganeso (Mn^{2+}), entre otros (Tsekova, Todorova y Ganeva, 2010, p. 447; Nandi, Mukherjee y Saha, 2015, p. 2). Uno de los que causan mayor toxicidad en el medio ambiente es el Cd, considerado como uno de los contaminantes más peligrosos. Su utilidad se da en procesos de la industria entre los que destacan la metalurgia, cerámica y fotografía. La toxicidad del Cd en la salud humana se hace evidente en la variedad de enfermedades y síntomas que provoca, donde están incluidos la disfunción renal, hipertensión, lesión hepática y daño pulmonar (Chen et

al., 2014, p. 176; Kazi, Jalbani, Kazi, Jamali y Pirzado, 2008, p. 738; Kazi et al., 2008, p. 271).

La alta toxicidad del Cd en el agua ha llevado a que se tenga controles estrictos en la concentración de este metal en el agua destinada para el consumo humano. Por esta razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que la concentración de cadmio en agua para consumo humano no debe exceder la concentración de 0.005 mg/L (Edris, Alhamed y Alzahrani, 2014, p. 87).

Uno de los métodos que brinda mayores perspectivas para realizar la remoción biológica de iones metálicos pesados es el uso de microorganismos, lo cual se conoce como biorremediación. Una de sus variantes es la que utiliza microalgas, el cual se conoce como ficorremediación. Las microalgas son reconocidas en la naturaleza por su papel en la purificación del agua y su uso en la remoción de metales pesados. Tienen como ventajas la facilidad de producción de biomasa a bajo costo debido a su capacidad de fotosíntesis (Hernández y Olguín, 2002, p. 1369; Tsekova et al., 2010, p. 447).

Chlorella sp. es uno de los géneros que se usan en la ficorremediación de metales pesados por su alta eficiencia. Esto se debe a que poseen una carga negativa en su membrana celular generada por grupos fosfatos, lo que genera una afinidad por los iones metálicos pesados (Yang, Cao, Xing y Yuan, 2015, p.537). Se conoce que estos microorganismos remueven metales pesados del medio a través de dos mecanismos de captación, uno activo (bioacumulación) y otro pasivo (biosorción) (Edris et al., 2014, p.88; Fraile et al., 2005, p.62).

La ficorremediación con *Chlorella* es una alternativa sustentable y con altos índices de remoción de metales pesados, especialmente en sistemas acuosos. *Chlorella sorokiniana* posee una alta capacidad y

eficiencia en la remoción de Cd. La biosorción de Cd a 10 ppm de concentración con células inmovilizadas fue de 93.5% en solo 5 minutos. Esta observación indica que tiene afinidad de sorción activa y eficiente para este metal (Akhtar, Saeed e Iqbal, 2003, p. 164). Se han realizado estudios donde se ha validado la biosorción de metales pesados por parte de microalgas *Chlorella*. Este proceso se produce como resultado de la combinación de intercambio iónico, interacciones electrostáticas, etc. *Chlorella vulgaris* fue sometida a una concentración de cobre de 100 ppm, donde se llegó a remover hasta el 94,7% del metal en forma iónica, de esa forma se evidencia la capacidad de la microalga para la remoción de estos contaminantes (Al-Rub, El-Naas, Ashour y Al-Marzouqi, M, 2006, p. 459).

Al utilizar *Chlorella* sp. experimentalmente se ha podido llegar a resultados prometedores, como la remoción del 80% del metal pesado a partir de una concentración entre 0.5-1.5 mg/L de Cd luego de tres días de exposición (Alam et al., 2015, p. 38). En otro estudio se obtuvo un resultado de 76.3% de remoción del metal del medio por parte de la microalga (Zayadan et al., p.33). *Chlorella* sp. es muy versátil para la adaptación a medios de cultivo, puede crecer muy bien tanto en medios especializados para algas como en fertilizantes, de los cuales el más utilizado es el Nitrofoska (Brito, Milani, Pereira, González y Morán, 2006, p. 398).

La actividad de remoción de metales pesados se realiza con microalgas libres e inmovilizadas. Un método de inmovilización es el atrapamiento en gel formado por sustancias como polisacáridos, proteínas y poliacrilamida, las que se las conoce como soportes. Entre los polisacáridos más utilizados resalta el alginato de sodio, debido a su baja toxicidad para la célula, estabilidad física y mecánica, facilidad de producción y operación y por último un bajo costo (Meunier, Dandoy y Su, 2010, p. 213; Song, Rashid, Choi y Lee, 2011, p. 8677).

El tamaño del poro es un punto importante para elegir un soporte, donde se recomienda una dimensión entre 0.7 y 1.5 nm de diámetro. Cabe destacar que el alginato de sodio posee un tamaño de poro dentro de este rango (Cañizares-Villanueva, 2000, p.132).

La inmovilización de microalgas tiene ventajas experimentales, donde se ha demostrado que las células libres acumulan menos metales que células inmovilizadas (Alam et al., 2015, p. 38). La inmovilización reduce los efectos negativos que puedan tener el crecimiento descontrolado, pérdida de la biomasa y factores ambientales sobre un cultivo microalgal (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008, p. 24)

1.2. Planteamiento del problema

La contaminación de los recursos naturales en los últimos años ha sido recurrente debido a la expansión de la civilización y al desarrollo que la acompaña, la misma que no ha sido sustentable con el medio ambiente. Existen diferentes contaminantes, ya sea orgánicos, generados por labores antrópicas (hidrocarburos, combustibles fósiles, plaguicidas, abonos, entre otros) e inorgánicos que en algunos casos son desechos de efluentes de industrias dentro de los cuales se encuentran los metales pesados. La presencia de iones metálicos pesados como Pb^{2+} , Cr^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , y particularmente Cd, es muy común en las aguas residuales de la industria metalúrgica, cerámica, textil y minería, ya que no son eliminados de forma adecuada y conducen a la contaminación de las fuentes hídricas (Zeraatkar, Ahmadzadeh, Talebi, Moheimani, y McHenry, 2016, p. 818; D-Bashan y Bashan, 2010, p. 1612). Dichos elementos tienen un efecto tóxico, incluso en bajas concentraciones y se acumulan a lo largo de la cadena alimenticia, lo que puede desencadenar en graves riesgos ecológicos y para la salud humana (Edris et al., 2014, p.88). Particularmente el Cd al ser un metal que no es

biodegradable puede causar trastornos agudos y crónicos en los organismos (Anayurt, Sari y Tuzen, 2009, p. 256).

Los tratamientos tradicionales para eliminar los iones metálicos pesados en agua incluyen algunas técnicas como extracción con disolvente, precipitación química, intercambio iónico, adsorción con carbón activado, quelación, ósmosis inversa, operación electroquímica, por citar a las más utilizadas. Sin embargo, estas técnicas fisicoquímicas poseen desventajas significativas al ser costosas y ambientalmente problemáticas, pues requieren la entrada de aditivos químicos externos o energía, así como la generación de lodos concentrados tóxicos que deben ser eliminados. Estas desventajas son más evidentes a bajas concentraciones de metales que es lo que se encuentra regularmente en aguas residuales. Por esa razón se hace necesario un método que permita descontaminar las fuentes hídricas de iones metálicos pesados que sea eficiente, amigable con el medio ambiente y que sea económica para ser replicada a mayor escala. Por lo tanto, los tratamientos con microalgas, en particular con *Chlorella* sp. representa una opción viable para lograr este propósito (Huang et al., 2003, p.380; Edris et al., 2014, p. 87).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la capacidad de remoción de Cadmio *in vitro* a partir de aguas contaminadas con *Chlorella* sp. inmovilizada en perlas de alginato de sodio.

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener el crecimiento, y desarrollo de un cultivo puro *Chlorella* sp. en un medio de cultivo de Nitrofoska.
- Evaluar los parámetros cinéticos de crecimiento para *Chlorella* sp. con medio de cultivo Nitrofoska.
- Inmovilizar la microalga *Chlorella* sp. en alginato de sodio.
- Cuantificar la concentración de Cadmio absorbida por *Chlorella* sp. inmovilizada *in vitro* en base a un análisis de espectroscopia de absorción atómica.

1.4. Justificación de la investigación

En el Ecuador la contaminación de los recursos hídricos se ha ido incrementando con el paso de los años, con cierto tipo de contaminantes como lo son los metales pesados. Se registran casos de contaminación particularmente en los ríos de la Amazonía y en cuerpos de agua como en la laguna de Yahuarcocha (Escobar, 2002, p. 20).

El origen del Cd está dado por fuentes de origen natural, que refieren a las erupciones volcánicas y actividades del ser humano, así también por las actividades relacionadas a la explotación de minas, agricultura, quema de combustibles fósiles, etc. En el estero Santa Rosa de la Provincia de El Oro, que es un área afectada por la minería ilegal y contaminante, se han reportado valores de concentración de metales pesados entre 11.33 a 28.55 mg.kg⁻¹ de suelo, cuando el límite máximo permitido es de no más de 5 mg.kg⁻¹ (Valarezo, 2014, p. 6). Debido a las zonas volcánicas del país, se ha registrado contaminación natural por Cd en fuentes hídricas y suelos, donde existen reportes de concentraciones entre 0.20 y 0.27 mg.kg⁻¹ y de 1 mg.kg⁻¹ en la ciudad de Cuenca y en fincas cacaoteras de El Oro respectivamente (Mite, Carrillo y Durango, 2010, p. 4-5; Sánchez-Camazano, Sánchez-Martin y Lorenzo, 1994, p. 164)

Este tipo de contaminantes puede ser removido con el uso de microorganismos como las microalgas, que tienen la capacidad de bioacumular los metales pesados tanto en su pared celular como en el interior de la célula y de esta forma disminuir la concentración del contaminante en el agua (Kaplan, 2013; Michalak y Chojnacka, 2010, p. 211). La recolección y selección de microalgas de las fuentes de contaminación es útil para un proceso de biorremediación debido a la exposición a este tipo de contaminantes (Erazo y Jaramillo, 2005, p. 18-20; Oquendo, 2016, p. 4).

Capítulo II. Marco teórico

2.1. Microalgas

2.1.1. Características

Las microalgas son organismos unicelulares de forma y tamaño variados, son fotosintéticos, lo que les permite transformar la energía lumínica en energía química con una alta eficiencia, incluso superior a las plantas. Son de suma importancia ecológica debido a que son productores primarios dentro de la cadena trófica (Torres, Mera, Herrero, Abalde, 2014, p. 1217; Monteiro, Castro y Malcata, 2011, p. 367). Las microalgas son consideradas como la forma primitiva de las plantas, por esta razón se encuentra una alta semejanza fisiológica, bioquímica y evolutiva entre una planta y una microalga clorofita (Mera, Torres, Abalde, 2014, p. 93).

Las microalgas no solo se encuentran presentes en los ecosistemas terrestres, sino también en los acuáticos, lo que da lugar a una gran variedad de especies que se encuentran en lugares inhóspitos y en una diversidad de condiciones ambientales. Se considera que existen alrededor de 50000 especies de microalgas, de las cuales solo se han descrito alrededor de 26000 especies. Al ser microorganismos se presume que dicho número puede incrementar considerablemente por todo lo que aún no se conoce y no se ha explorado (Stevenson, Bothwell, y Lowe, 1996, p. 26; Richmond, 2004, p. 159).

Con el término microalga se señala a un amplio grupo de microorganismos procariotas y eucariotas, fijadores de dióxido de carbono (CO₂), el cual es convertido en materia orgánica. Existen diferencias estructurales y fisiológicas entre las microalgas eucariotas y

procariotas, sin embargo, son similares en el metabolismo fotosintético. (Wolkers, Barbosa, Kleinegris, Bosma y Wijffels, 2011, p. 7).

Las microalgas poseen características de interés para su cultivo a gran escala, entre las que sobresalen las siguientes:

- Elevada producción de biomasa en todas las épocas del año. Un cultivo de microalgas es altamente productivo si se lo compara con uno de plantas. Si se considera su tiempo de duplicación celular es una gran ventaja debido a que es de apenas 3.5 horas, con lo cual en promedio se puede hacer cosechas de biomasa en intervalos entre 8 y 24 horas (Chisti, 2007, p. 296).
- Disminuyen el consumo de agua en comparación con los cultivos vegetales.
- Se pueden cultivar en zonas áridas que no son aptas para la agricultura.

La importancia de las microalgas es tal que todos los organismos vivos tienen una dependencia directa e indirecta para subsistir gracias al proceso de fotosíntesis que realizan, produciendo oxígeno (O_2), que es indispensable para la vida (Richmond, 2004, p. 159).

Las algas están clasificadas por los pigmentos que poseen, por la forma de almacenamiento de nutrientes, por las sustancias químicas en su pared celular y por la ausencia o presencia de estructuras para el movimiento (Wolkers et al., 2011, p. 9).

2.1.2. Clasificación de las microalgas

Existen diferentes formas para clasificar a las microalgas, aunque no todas son aceptadas en su totalidad. Los análisis genéticos han ayudado a generar una clasificación más confiable, sin embargo, la categorización más aceptada se basa en los pigmentos como se muestra en la Tabla 1 (Pulz y Gross, 2004, p. 635; Melis, 2009, p. 272-273).

Tabla 1.

Pigmentos de microalgas de acuerdo a su división

DIVISIÓN	PRINCIPAL PIGMENTO FOTOSINTÉTICO
<i>Cyanophyta</i>	Clorofila a, Ficocianobilina, ficoeritrobilina
<i>Rhodophyta</i>	Clorofila a, Ficoeritrobilina
<i>Chlorophyta</i>	Clorofila a y b
<i>Haptophyta</i>	Clorofila a, c2, fucoxantina
<i>Dinophyta</i>	Clorofila a, c2, peridina
<i>Cryptophyta</i>	Clorofila a, c2, ficocianobilina o ficoeritrina
<i>Euglenophyta</i>	Clorofila a y b

Tomado de (Kumar, 1999).

A continuación, se muestran los principales grupos de acuerdo a su pigmentación:

- Microalgas verdes: a este grupo pertenecen los miembros de la división *Chlorophyta*. Dichas algas contienen clorofila, tal como las plantas, además de una gran cantidad de proteínas. Bajo condiciones de estrés estas producen almidón y lípidos, los que se almacenan en el interior de la célula; esta es una característica importante para su uso en la elaboración de biocombustible.

- Microalgas rojas: estas pertenecen a la división *Rhodophyta*, las cuales son mayormente marinas. Estas microalgas realizan la fotosíntesis a grandes profundidades debido a sus pigmentos, uno rojo como la ficoeritrina. Estos pigmentos absorben ondas de luz verde, violeta y azules, las que logran penetrar a una gran profundidad en el agua.
- Diatomeas: a esta clasificación pertenecen más de 12000 especies, es el grupo que produce más biomasa en la tierra. Son parte fundamental de muchos ecosistemas acuáticos como parte de la cadena trófica.
- Microalgas pardas: en este grupo se encuentran alrededor de 1500 a 2000 especies de algas que subsisten exclusivamente en el mar.
- Microalgas doradas: a este grupo pertenecen cerca de 1000 especies de coloridas algas unicelulares. Se las encuentra principalmente en agua dulce, aunque también se han hallado especies marinas. Poseen flagelos para su desplazamiento.
- Microalgas verde-amarillas: conformadas por aproximadamente 600 especies que están muy relacionadas con las algas pardas, pertenecen a la división *Haptophyta*.
- Microalgas azules o cianobacterias: es un grupo de bacterias fotosintéticas, pertenecen a la división *Cyanophyta*. Producen toxinas que en altas concentraciones pueden afectar seriamente la calidad del agua (Wolkers et al., 2011, p. 10-11).

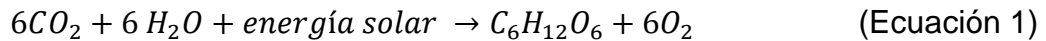
2.1.3. Factores reguladores del crecimiento de microalgas

Existen varios factores que influyen en el crecimiento de las microalgas entre los cuales se encuentran:

- Factores abióticos: la calidad y cantidad de luz, temperatura, concentración de nutrientes, O₂, CO₂, pH, salinidad y sustancias químicas tóxicas
- Factores bióticos: como patógenos, tales como bacterias, hongos, virus y competencia por otras algas.
- Factores operacionales: como una mezcla no homogénea, velocidad de dilución, profundidad, frecuencia de cosecha y adición de compuestos químicos como bicarbonato (Mata, Martins y Caetano, 2010, p. 218)

Las microalgas en su mayoría son organismos fotoautótrofos, por lo cual son capaces de obtener sus nutrientes y almacenarlos, esto es favorable en la utilización de los recursos bajo condiciones adversas. En general para obtener crecimiento de biomasa uno de los nutrientes indispensables es el carbono (C), cuya dependencia está entre el 40-50%. La fotosíntesis depende exclusivamente del suministro adecuado de C y luz (Moheimani, 2005, p. 30; Kaewpintong, Shotipruk, Powtongsook y Pavasant, 2007, p. 290). Sin embargo, las microalgas realizan cambios fisiológicos y bioquímicos por lo que cambian su estructura interna para adaptarse a condiciones adversas. Además, pueden excretar compuestos que mejoran la disponibilidad de nutrientes limitando así el crecimiento de los organismos competidores (Richmond, 2004, p.160). Las microalgas asumen muchos tipos básicos de nutrición, como fotoautotróficos, heterotróficos, mixotróficos, fotoheterotróficos lo que les permite responder con cambios nutricionales a modificaciones

en las condiciones ambientales. Los organismos fotoautotróficos convierten luz en energía química a través de reacciones fotosintéticas. La conversión de energía solar en energía química se rige a la siguiente ecuación (Ripolles y Mena, 2008):



En el tipo de nutrición heterotrófica se emplea compuestos orgánicos de fuentes externas como los azúcares.

En el tipo mixotrófico se emplea fuentes orgánicas e inorgánicas, como fuente de energía. La anfirofía, subtipo de mixotrofía, significa que los organismos pueden vivir autotróficamente o heterotróficamente, dependiendo de la concentración de compuestos orgánicos y de la intensidad luminosa disponible.

En el tipo fotoheterotrófico se requiere la luz para el uso de compuestos orgánicos como fuentes de C (Chojnacka y Marquez-Rocha, 2004, p. 22; Mata et al., 2010, p. 218).

La temperatura es el factor limitante más importante, después de la luz, al momento de cultivar microalgas tanto en sistemas cerrados como al aire libre. El efecto de la temperatura para muchas especies de microalgas en el laboratorio es un crecimiento acelerado, pero la magnitud de los efectos de la temperatura en la producción de biomasa al aire libre aún no está bien establecida por las fluctuaciones que puede tener debido a las condiciones ambientales. Muchas microalgas toleran fácilmente temperaturas con un valor de 15 °C inferior a su temperatura óptima que es de 24°C, pero soportan sólo de 2 a 4 °C por encima de esta última. Si se supera los valores mencionados provocaría la pérdida completa del cultivo (Moheimani, 2005, p.31; Mata et al., 2010, p.219).

La salinidad, tanto en sistemas abiertos como cerrados, afecta el crecimiento y la composición celular de las microalgas. Cada alga tiene un rango diferente de salinidad óptima, la cual se encuentra entre 15 a 35 ppm de acuerdo a su hábitat natural, la que puede aumentar durante las condiciones de clima cálido debido a la alta evaporación (Moheimani, 2005, p.30).

La mezcla es otro parámetro importante de crecimiento ya que al homogeneizar el medio se distribuyen las células, el calor, los metabolitos y se facilita la transferencia de gases. También es necesario un cierto grado de turbulencia, especialmente en la producción a gran escala, con el fin de promover la circulación rápida de células de microalgas de la zona oscura a la zona de luz del reactor (Barbosa, 2003, p.18).

Los contaminantes biológicos comunes como algas no deseadas, moho, levadura, hongos y bacterias, se convierten en otro factor influyente en el crecimiento. Según Moheimani (2005, p.32), una manera de disminuir los contaminantes y mejorar el rendimiento después de eliminar el organismo no deseado es someter al cultivo a un cambio temporalmente extremo de los factores ambientales tales como la temperatura, el pH o la luz.

2.1.4. Aplicaciones de las microalgas

2.1.4.1. Biotecnología de las microalgas

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (2016), la biotecnología incluye una amplia gama de tecnologías aplicadas al medio ambiente, agricultura,

ganadería, silvicultura, pesca, acuicultura, y la agroindustria que se utilizan para diversos fines, como:

- El mejoramiento genético de plantas y animales para aumentar sus rendimientos o eficiencia.
- La caracterización y conservación de los recursos genéticos para la alimentación y la agricultura.
- El diagnóstico de enfermedades de plantas y animales.
- El desarrollo de vacunas.
- La producción de alimentos fermentados.

Las aplicaciones citadas anteriormente se relacionan directa o indirectamente con las microalgas. Las cuales son de gran interés científico porque son utilizadas en su totalidad o por medio de sus metabolitos en la industria, alimentación humana y animal, así como en tratamientos de biorremediación de aguas residuales y en la reducción del CO₂. La utilización de microalgas para la remoción de contaminantes en agua es una de las mayores aplicaciones realizadas en los últimos años, en donde el género *Chlorella* tiene una alta eficiencia con metales pesados, nitratos (NO₃⁻) y fosfatos (PO₄⁻³). Además, es importante mencionar la afinidad de dicha microalga con los metales polivalentes (Chiu et al., 2008, p. 3390).

En el estudio de las microalgas se han realizado aplicaciones ambientales a escala industrial para la remoción de contaminantes. Varias microalgas presentan una alta capacidad de unión de metales. Estas células, vivas o muertas y sus subproductos pueden ser bioacumuladores eficaces tanto de formas solubles como de partículas de metales. Varias especies de microalgas han demostrado ser eficaces en la bioacumulación de cromo, hierro, cobre y otros iones metálicos de los efluentes contaminados tanto como células libres e inmovilizadas. *Anabaena* sp. y *Chlorella* sp. son dos de los géneros representativos en lo que respecta a la biosorción

de metales pesados (Ahluwalia y Goyal, 2007, p. 2245; Chatterjee, Bhattacharjee y Chandra, 2010, p. 118).

Dentro de la investigación biotecnológica, las microalgas se han estudiado por sus aplicaciones en el campo agrícola, acuícola y ambiental (Chisti, 2007, p.296). Su uso se hizo más común durante la Segunda Guerra Mundial, donde se buscó un suplemento alimenticio completo con alto contenido en lípidos y proteínas (Albarracín, 2007, p.4).

2.2. *Chlorella* sp.

2.2.1. Generalidades

Chlorella sp. en el transcurso de los últimos años ha sido objeto de muchos estudios por sus beneficios, razón por la cual se la ha cultivado de forma exhaustiva. Generalmente se realizan cultivos a gran escala bajo el sistema de lotes por el bajo riesgo de contaminación y la facilidad de ejecución (Chiu et al., 2008, p. 3390). *Chlorella* sp. puede ser cultivada en condiciones fotoautotróficas, heterotróficas y mixotróficas, siendo la primera la más común debido a la utilización de luz natural o artificial para su cultivo. Durante el crecimiento fotoautotrófico, las algas utilizan la energía del sol o de una fuente externa, nutrientes como el nitrógeno (N) y fósforo (P) del medio y CO₂, lo que permite aumentar la densidad celular. La principal ventaja de la condición de crecimiento fotoautotrófico es que reduce el CO₂ para producir compuestos orgánicos útiles para su metabolismo, como la glucosa. Sin embargo, es importante mencionar que a medida que aumenta la densidad de las algas, la exposición a la luz de las células de las algas disminuye, limitando la remoción de contaminantes de las aguas residuales (Bhagyalaskhmi y Sarma, 2016, p. 643; Aksu y Donmez, 2006, p. 863).

2.2.2. Morfología, estructura

Las microalgas *Chlorella* son células pequeñas, verdes, esféricas e inmóviles, que se encuentran solitarias o formando colonias de forma irregular. En el último caso las células que la componen son del mismo tamaño y mantienen su forma esférica, no se comprimen. La división celular en *Chlorella* sp. se produce mediante división interna de la célula madre en cuatro u ocho células hijas (Barsanti y Gualteri, 2006, p. 17).

Chlorella sp. es una microalga eucariota, que posee clorofila a y b para realizar la fotosíntesis lo que les brinda un color verde. Esta coloración puede variar por las condiciones ambientales a las que esté sometido el cultivo, tales como la cantidad de luz disponible, nutrientes, entre otros (Chisti, 2007, p. 296).

Las especies de este género se encuentran en muchos hábitats y ambientes, sin embargo, la mayoría se encuentra en los cuerpos de agua dulce como ríos, arroyos y lagunas. Poseen ciertas características que las acercan a plantas vasculares en las que se citan:

- Contienen otros pigmentos como la luteína, xantofilas y zeaxantina en los cloroplastos además de la clorofila, sin embargo, estos se encuentran en una concentración muy baja por lo que predomina la clorofila.
- Su pared celular está compuesta en su mayoría por celulosa al igual que en las plantas (Martínez-Trujillo y García-Rivero, 2012, p. 56).

2.2.3. Taxonomía de la microalga

A continuación, en la Tabla 2, se describe la taxonomía de *Chlorella* sp.

Tabla 2.

Taxonomía de *Chlorella* sp.

DIVISIÓN	<i>Chlorophyta</i>
CLASE	<i>Trebouxiophyceae</i>
ORDEN	<i>Chlorellales</i>
FAMILIA	<i>Chlorellaceae</i>
GÉNERO	<i>Chlorella</i>
ESPECIES	<i>Chlorella autotrophica</i> <i>Chlorella minutissima</i> <i>Chlorella pyrenoidosa</i> <i>Chlorella sorokiniana</i> <i>Chlorella variabilis</i> <i>Chlorella vulgaris</i>

Tomado de (SIB, s.f.)

2.2.4. Aplicaciones

Actualmente se han estudiado varias especies del género *Chlorella* debido a su potencial bioquímico, estructural y por los metabolitos que producen. Dentro de las aplicaciones se destacan las siguientes:

- Materia prima en la elaboración de biocombustibles: *Chlorella* sp., tiene la capacidad de producir una cantidad considerable de lípidos, como ácidos grasos poliinsaturados, lo que puede llegar a representar hasta el 40% de su peso. Dicho proceso se produce por transesterificación (Hu et al., 2008, p. 623).

- Suplementos nutricionales: Se las utiliza como complemento nutricional gracias a que son una rica fuente de proteínas, lípidos poliinsaturados y carbohidratos lo que favorece la actividad del sistema inmunológico (González-Delgado, 2014, p. 128).
- Biorremediación: Este género posee características fisiológicas que le permiten remover contaminantes orgánicos e inorgánicos, entre los principales se encuentran: N, P y metales pesados (López, 2016, p. 3; Raeesossadati, Ahmadzadeh, McHenry y Moheimani, 2014, p. 79).

El C, N, P y el azufre (S), se encuentran en efluentes de industrias contaminantes, sin embargo, son los principales componentes responsables del crecimiento de *Chlorella* sp. por lo que son utilizados por esta en su metabolismo, reduciendo la polución. Además, metales como potasio (K), sodio (Na), calcio (Ca), Fe y magnesio (Mg) sirven como micronutrientes para su crecimiento. Por ende, es importante la absorción de N y P, sin dejar de lado remoción de metales pesados por la biomasa de algas (Cai, Park y Li, 2013, p.362).

2.2.4.1. Remoción de Nitrógeno

El N orgánico es un elemento clave en moléculas biológicas como las enzimas, los péptidos, las proteínas, las clorofilas y las moléculas de transferencia de energía como ADP (adenosina difosfato) y ATP (adenosina trifosfato) (Barsanti y Gualtieri, 2006, p. 82). El N orgánico se deriva de fuentes inorgánicas que incluyen nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), ácido nítrico (HNO_3), amoníaco (NH_3), amonio (NH_4^+) y N gaseoso (N_2). *Chlorella* sp. tiene la capacidad de convertir el N inorgánico de las formas de NO_2^- , NO_3^- , NH_4^+ a N orgánico a través de un proceso llamado

inmovilización. Sólo las algas eucariotas como *Chlorella* sp. pueden realizar la asimilación de nitrógeno inorgánico (Cai et al., 2013, p. 361).

En la Figura 1 se describe el proceso de asimilación del N inorgánico. La translocación de N inorgánico tiene lugar a través de la membrana plasmática donde también se produce la reducción de NO_3^- , seguida por la formación de NH_4^+ en aminoácidos y glutamina. Inicialmente el NO_3^- se reduce a NO_2^- por una nitrato reductasa dependiente de NADH y el nitrito se reduce a NH_4^+ por nitrito reductasa ligada a NADPH presente dentro de *Chlorella* sp. El NH_4^+ resultante es asimilado para formar aminoácidos por glutamina y glutamato sintasa dentro del fluido intracelular usando ATP, glutamato (Glu) y glutamina sintasa. Así, todas las formas inorgánicas de N se reducen finalmente a forma orgánica, es decir a aminoácidos (Cai et al., 2013, p. 362).

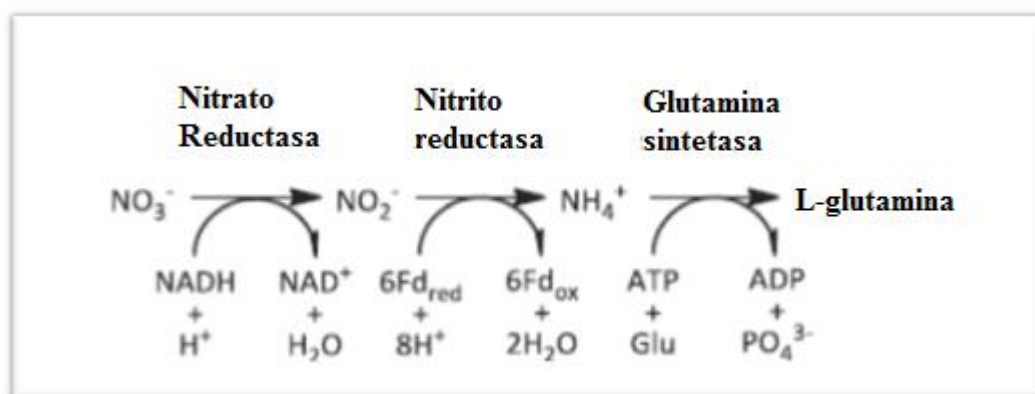


Figura 1.- Proceso de conversión del nitrógeno inorgánico a orgánico. Adaptado de (Cai et al., 2013, p. 363).

2.2.4.2. Remoción de fósforo (P)

El P se encuentra en lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Cumple un papel crucial en el crecimiento celular y el metabolismo de *Chlorella* sp. Durante su metabolismo, el P está presente principalmente en las

formas de ion di hidrógeno fosfato (H_2PO_4^-) e ion fosfato de hidrógeno (HPO_4^{2-}) los que se incorporan a los compuestos orgánicos a través de un proceso llamado fosforilación, el mismo que es un proceso activo y requiere energía. Esta energía proviene de la oxidación de los sustratos respiratorios, del sistema de transporte de electrones de las mitocondrias o de la luz. La generación de ATP a partir de ADP tiene lugar durante la fosforilación y las microalgas son capaces de asimilar y almacenar P en exceso dentro de la célula en forma de gránulos de volutina. Estas reservas estarán disponibles durante el ciclo de crecimiento en ausencia de P en los medios de cultivo (Larsdotter, 2006, p. 33).

2.2.4.3. Remoción de metales pesados

Las microalgas también requieren metales para sus funciones biológicas, como Fe, S, Mg, entre otros. Las microalgas tienen el potencial de acumular altas concentraciones de metales de los sistemas acuáticos contaminados. La acumulación de metales en las algas involucra dos procesos: una adsorción inicial rápida, un proceso pasivo, seguida de una absorción mucho más lenta, que es un proceso activo, conocido como quimisorción, que en conjunto ambos procesos conforman la biosorción. Además, se puede dar un proceso de bioacumulación que se produce en la pared celular (Bates, Tessier, Campbell y Buffle, 1982, p. 521). En el caso de la biosorción, durante la captación pasiva, tiene lugar la adsorción física en la que los iones metálicos se adsorben muy rápidamente sobre la superficie celular en pocos segundos o minutos y este proceso es independiente del metabolismo. A continuación, se realiza la quimisorción que es un proceso dependiente del metabolismo, en el cual se realiza cuando los iones son transportados lentamente a través de la membrana celular en el citoplasma.

La pared celular de las algas tiene una superficie aniónica y contiene muchos grupos funcionales, tales como hidroxilo (-OH), carboxilo (-COOH), amino (-NH₂), sulfhidrilo (-SH), entre otros. Dado que los iones metálicos en el agua están generalmente en la forma catiónica, pueden ser absorbidos sobre la superficie celular por diferencia de cargas (Crist, Oberholser, Shank y Nguyen, 1981, p. 1213; Yu y Wang, 2004, p. 444). Los gránulos de polifosfato están presentes en las algas y proporcionan una piscina de almacenamiento para los metales. Varios investigadores han establecido que los metales como Cd, Co, Hg, Ni, Cu, Ti, Pb, Mg, Zn, se secuestran en los gránulos de polifosfato en *Chlorella* sp. (Yu y Wang, 2004, p. 445). Una vez que el metal se acumula dentro de la célula, los iones metálicos están preferentemente ubicados dentro de orgánulos específicos o también se unen con proteínas como una metaloproteína como se muestra en la Figura 2 (Zhou, Huang y Lin, 1998, p. 69).

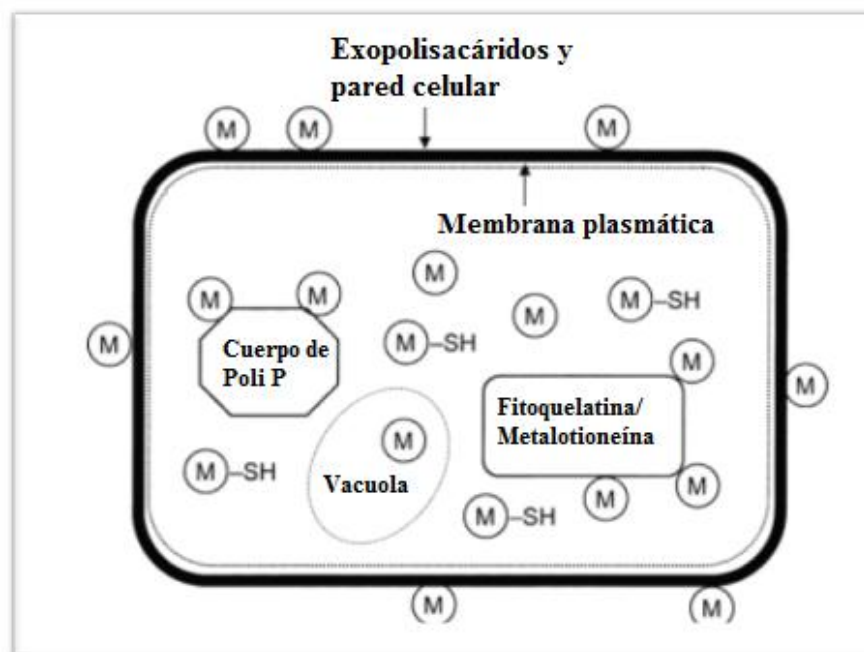


Figura 2.- Sitios de unión de metal de una microalga.

Adaptado de (Mehta y Gaur, 2005, p. 115).

2.2.5. Medios de Cultivo

Por la importancia de los estudios en *Chlorella* sp. y demás microalgas se ha buscado generar medios de cultivos que puedan producir una alta densidad celular y que sean de bajo costo. Una alternativa a los medios comerciales tradicionales es el uso de fertilizantes inorgánicos, que podrían cumplir con las exigencias nutricionales de las microalgas, así se conseguirá un beneficio en la parte productiva con un bajo costo (Ancín, 2011, p.67).

Nitrofoska es un fertilizante foliar inorgánico que cumple la función de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas. En su formulación contiene una mezcla de los nutrientes requeridos por una planta para ayudar a su equilibrio fisiológico. Nitrofoska es una de las alternativas más utilizadas como medio de cultivo para microalgas, en estudios anteriores se ha demostrado un mejor desarrollo del microorganismo usando este como nutriente principal (Maldonado, 2014, p.48). Con Nitrofoska como medio de cultivo se obtuvo cinco veces la cantidad de biomasa obtenida utilizando los medios Algaezim y Fuerza verde (Granda, 2015, p.59).

2.3. Inmovilización de microorganismos

2.3.1. Generalidades

La inmovilización de microorganismos ha sido muy relevante en los últimos años debido al mejoramiento de los sistemas para tratamientos de aguas, suelo y aire. Para lograr una inmovilización exitosa se deben tomar en cuenta ciertos factores, tales como la presencia de una superficie de adherencia amplia, facilidad de operación, tamaño del poro, intercambio de sustancias entre el medio y el interior del soporte, estabilidad biológica, química y térmica, resistencia a agentes externos

como enzimas, solventes y el metabolismo del microorganismo inmovilizado (Kourkoutas, Bekatorou, Banat y Marchant, 2004, p.377)

2.3.2. Ventajas de la inmovilización celular

Entre las ventajas de la inmovilización en comparación con el uso de microorganismos libres, se citan las siguientes:

- Aumenta la concentración de biomasa (Angelova, Pashova, y Slokoska, 2000, p.545)
- Mantiene o mejora la actividad metabólica.
- Mejora la resistencia a la toxicidad (Kourkoutas, et al., 2004, p.378).

2.3.3. Tipos de inmovilización

2.3.3.1. Inmovilización pasiva

Algunas microalgas pueden formar aglomerados o unirse a una superficie y crecer sobre ella, este tipo de casos se da por la intervención de estructuras de adhesión en bacterias como son las fimbrias y las hifas en el caso de hongos. En la inmovilización pasiva se produce biofilm, pero tan solo un 15-25% son células vivas, mientras que el porcentaje restante corresponde a exopolisacáridos, ácidos nucleicos y agua (Kourkoutas et al., 2004, p. 254) La formación de biofilm se da en cuatro pasos (Figura 3), primero las células perciben una superficie de adherencia y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie. Segundo, la biomasa celular aumenta, con lo que se forman micro colonias alrededor del área de adherencia produciendo

una unión irreversible. Tercero, la biofilm crece y madura, lo cual permite la adhesión de nuevas colonias de microorganismos. Por último, las células individuales o colonias se desprenden del biofilm por erosión, abrasión o separación y se forman nuevos conglomerados (Nazar, 2007, p. 312).

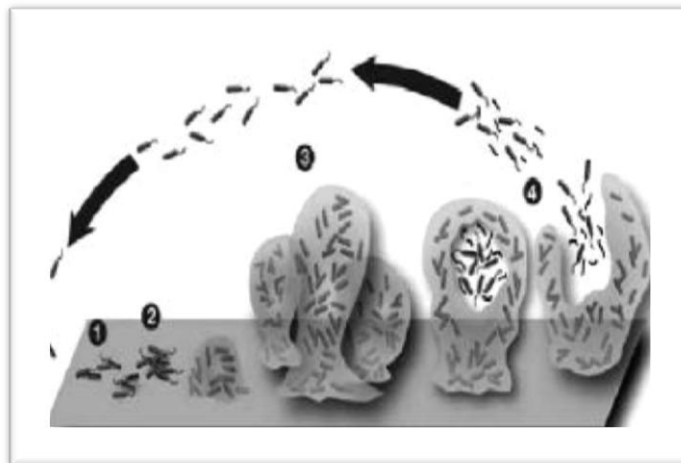


Figura 3.- Formación de biofilm en cuatro pasos.
Tomada de (Nazar, 2007, p. 312).

2.3.3.2. Inmovilización activa

La inmovilización activa e inmovilización artificial se diferencian por el ataque químico, atrapamiento en geles naturales o sintéticos y uso de flocculantes. Este tipo de inmovilización es más usada ya que utiliza una matriz porosa, lo que permite un fácil intercambio de sustancias con el medio. Este puede darse en polímeros sintéticos, como resinas, acrilamidas, poliuretanos, proteínas como gelatina, colágeno, albúmina de huevo, o polisacáridos naturales, como agares, carragrenanos o alginatos (Moreno, 2008, p.3950)

2.3.4. Alginato

El alginato es un hidrocoloide, de origen en algas marinas que tiene propiedades gelificantes, estabilizantes y espesantes, por lo que ha sido de gran interés para la industria alimentaria. El alginato es un polisacárido lineal poliiónico e hidrofílico, que está conformado por dos monómeros en su estructura, el ácido α -L-gulurónico (G) y el ácido β -D-manurónico (M), estos forman homopolímeros del tipo bloque G (-GGG-) y bloque M (-MMM-) o una tercera estructura denominada heteropolímeros, donde se alterna los bloques G y M (-MGMG-).

La gelificación se produce cuando existe una zona de unión entre un bloque G de una molécula de alginato que se enlaza físicamente a otro bloque G presente en otra molécula de alginato a través del ión calcio. La visualización de la estructura física es denominada modelo “caja de huevos”, la que se muestra en la Figura 4 (Draget, 2000, p. 98; Reddy, y Reddy. 2010, p. 2199) Entre las sales de alginato más utilizadas está la sal de sodio debido a su alta solubilidad en agua fría y su característica transición sólido-gel de forma instantánea e irreversible cuando reacciona con el ión calcio (Funami et al., 2009, p.1747)

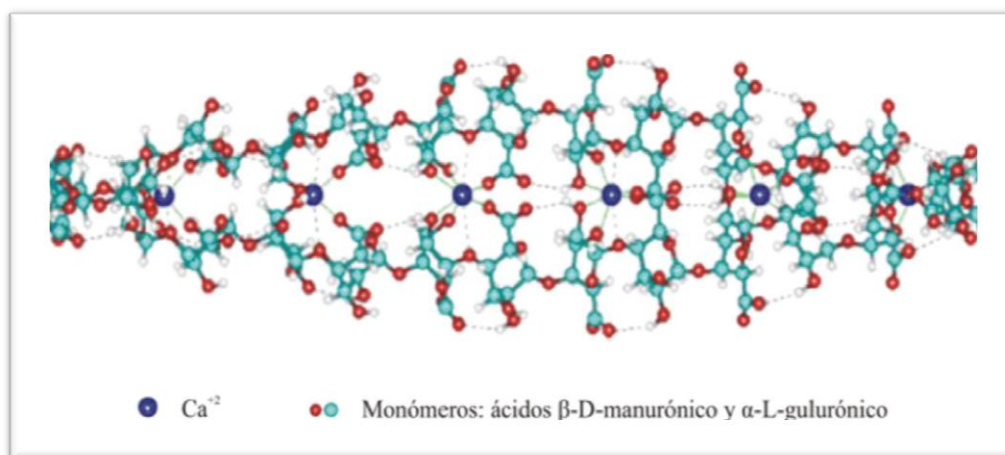


Figura 4.- Estructura del alginato denominada “caja de huevos”.
Tomado de (Draget, 2000, p. 218)

Capítulo III. Diseño del plan experimental

En esta investigación se utilizó el diseño experimental completamente al azar, con cinco tratamientos (0.5, 1, 2, 3, 5 ppm Cd) y cuatro repeticiones por cada tratamiento. Como blanco se utilizaron perlas de alginato sin microalgas en contacto con Cd con las mismas concentraciones. La variable de respuesta fue la concentración de Cd removida de la solución en cada tratamiento.

Tabla 3.

Diseño experimental de la investigación

Unidad experimental	N°1	N°2
Concentración (ppm Cd)	Blanco (esfera alginato)	(Esferas alginato + <i>Chlorella</i> sp.)
0.5	BL + 0.5	AL+CL + 0.5
1	BL + 1	AL+CL + 1
2	BL + 2	AL+CL + 2
3	BL + 3	AL+CL + 3
5	BL +5	AL+CL + 5

Nota: BL: Blanco; AL: Alginato; CL: *Chlorella* sp.

Capítulo IV. Procedimientos

4.1. Población y muestra

Se tomó una muestra representativa de agua de la laguna de Yahuarcocha, en cinco puntos de muestreo que se aprecian en la Figura 5. Se obtuvieron 20 muestras en total de un volumen entre los 400 y 500 mL. Posteriormente se purificó para obtener un cultivo puro de *Chlorella* sp. en el laboratorio de microbiología de Agrocalidad.



Figura 5.- Imagen satelital de la Laguna de Yahuarcocha con los puntos de muestreo.

Tomado de (Google Earth, 2016)

4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos

4.2.1. Transporte de las muestras de agua

El transporte de las muestras desde la laguna hacia el laboratorio se lo realizó en un contenedor aislante de la temperatura y luz externa. Se las mantuvo a bajas temperaturas dentro de recipientes plásticos herméticos transparentes.

4.2.2. Preparación de la muestra

En la etapa preliminar se filtraron las muestras para eliminar cualquier elemento que obstruya el proceso de purificación, como material vegetal y zooplancton que se podía observar a simple vista. Se usó la cámara Sedgewick Rafter (Wildlife) en conjunto con el uso de una pipeta Pasteur de vidrio para separar las algas del género *Chlorella* de las demás que se encontraban en la muestra. Para ello se utilizaron criterios morfológicos, debido a que presentan una forma y pigmentación muy característica del género (Han, Wong, Fung y Tam, 2006, p. 366).

4.2.3. Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo con el fertilizante Nitrofoska foliar se realizó a una concentración del 3%. La composición del medio se observa en la Tabla 4.

Tabla 4.

Composición del medio Nitrofoska

COMPOSICIÓN DEL MEDIO (1L)		
MACROELEMENTOS (%)		
Nitrógeno	(N)	10.0%
Potasio	(K ₂ O)	7.0
Fósforo	(P ₂ O ₅)	4.0%
Magnesio	(MgO)	0.2%
Azufre	(S)	0.2%
MICROELEMENTOS (ppm)		
Hierro	(Fe)	70 ppm
Boro	(B)	11 ppm
Cobre	(Cu)	140ppm
Manganeso	(Mn)	0.8%
Zinc	(Zn)	2 ppm
Cobalto	(Co)	12 ppm
Molibdeno	(Mo)	1 ppm

Tomado de (Brito et al., 2006).

Después de preparado el medio se autoclavó a 121 °C por 15 minutos.

4.2.4. Obtención de cultivo puro

Este procedimiento correspondió a la fase preliminar al escalado. Las microalgas obtenidas en el paso 4.2.2 fueron colocadas en una placa de serología donde en cada celda se añadió 1 mL del medio con Nitrofoska. Se colocaron 12 muestras de microalgas en igual número de celdas con 3 repeticiones. El cultivo se mantuvo a temperatura ambiente con luz natural. Cada 3 días se observó las muestras y luego de 9 días se descartaron las que estaban contaminadas. Posteriormente a las observaciones solo 6 de los 36 cultivos llegaron a un estado de purificación adecuado, los cuales pasaron posteriormente a la fase de

escalado. Para esto se colocó 1 mL de medio con Nitrofoska en un tubo de ensayo de 10 mL y se agregó el contenido de los seis cultivos purificados obtenidos.

4.2.5. Escalado

Este proceso contó con dos fases, la primera fue desde el volumen de 10 mL hasta los 100 mL de cultivo y la segunda fase desde 100 mL a 1 L de cultivo, cada fase tuvo una duración de 14 días.

Escalado a 10 mL: en 6 tubos se colocó 2 mL de cultivo puro de *Chlorella* sp. Se agregaron 4 mL de medio de cultivo Nitrofoska. El cultivo se mantuvo a una temperatura de $21\pm 2^{\circ}\text{C}$ y con un fotoperiodo de 12 horas luz. Simultáneamente cada día se realizó una homogeneización en todas las muestras para garantizar que las células recibieran la misma cantidad de luz. El siguiente paso fue llevar el cultivo a 10 mL adicionando 4 mL de medio de cultivo. El proceso de escalado se fue realizó cada 7 días para permitir que el cultivo crezca adecuadamente.

Escalado a 100 mL: se tomó cada tubo con 10 mL de cultivo obtenidos hasta el momento, se colocó su contenido en frascos de vidrio y se aforó a 100 mL con medio de cultivo estéril con Nitrofoska, el que se conservó en las mismas condiciones iniciales. El cultivo se mantuvo durante 7 días.

Escalado a 250 mL: en la segunda fase se utilizaron seis frascos estériles (F1, F2, F3, F4, F5, F6) de 500 mL de capacidad, donde se colocaron 100 mL del cultivo de la fase previa y posteriormente se aforó al volumen de 250 mL con el medio de cultivo estéril. Se empleó luz

natural y artificial, esta última se originó a partir de cuatro lámparas led de 40 W, además aireación superficial mediante una bomba de pecera. Para F1, F2, F3 y F4 se utilizó luz artificial con un tiempo de exposición de 24 horas y aireación, mientras que para F5 y F6 se mantuvieron con luz natural (12 horas), sin aireación. En la Figura 6 se muestra un esquema de los frascos con sus respectivas condiciones de cultivo.

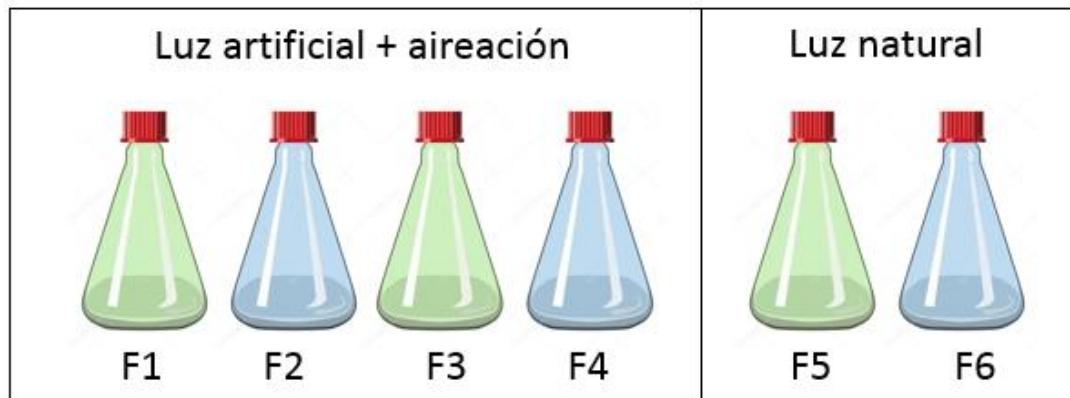


Figura 6.- Esquema de las condiciones de cada frasco para el crecimiento de *Chlorella* sp.

Escalado a 1000 mL: cada cultivo de la fase anterior se trasvasó a frascos de vidrio autoclavados de 1000 mL. Se mantuvieron las mismas condiciones de luminosidad artificial, aireación superficial además de agitación manual para evitar la generación de biofilm. El objetivo fue obtener 5 L de cultivo puro de *Chlorella* sp.

Cabe destacar que todos los cambios de condición en cada fase de escalado se realizaron con total asepsia para evitar algún tipo de contaminación. A los 21 días se obtuvo un cultivo en fase exponencial, teniendo como punto de partida la fase para obtener 100 mL de cultivo. Para esta investigación se utilizó una muestra del concentrado de microalgas del cultivo de *Chlorella* sp. en fase exponencial

4.2.6. Recuento celular

El recuento celular se realizó durante todo el proceso, el cual inició cuando se obtuvo el cultivo puro a un volumen inicial de 2 mL. Se efectuó el conteo celular mediante el uso de la cámara de Neubauer, el cual permitió cuantificar la cantidad de células en cada medio, así como identificar a microorganismos contaminantes. El contaje se realizó en un microscopio óptico con el lente de 40X.

Se preparó la cámara realizando una limpieza con alcohol al 70%. Se colocó un cubreobjetos sobre la cámara, se tomó una muestra de 10 μL , y se la colocó en un extremo de la parte central de la cámara, se soltó el pistón dejando que ingrese la muestra por capilaridad. Se dejó reposar el líquido por un minuto hasta que las células se hayan distribuido en la superficie colocada. Posteriormente se realizó el conteo de células distribuidas en los cuatro cuadrantes mayores.

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de la densidad celular:

$$DC = N \times 10^4 \times Fd \quad (\text{Ecuación 2})$$

Dónde:

DC: densidad celular (células/mL)

N: promedio de células presentes en 1 mm^2 . Es la división entre el número de células contadas y el número de cuadros.

$$N = \frac{\text{Número de células}}{\text{Número de cuadrantes}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

10^4 : factor de conversión de 0.1 μL a mL

Fd: factor de dilución

$$Fd = \frac{\text{volumen inicial} + \text{volumen final}}{\text{volumen inicial}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Este proceso se realizó cada día durante el escalado de 2 mL hasta 10 mL y cada 3 días desde el volumen de 100 mL hasta 1000 mL de cultivo.

4.2.7. Obtención del concentrado microalgal en fase exponencial

Luego de 21 días de cultivo se tomó alrededor de 45ml de cultivo en fase exponencial de crecimiento de la microalga *Chlorella* sp. y se lo repartió equitativamente en tubos de centrifugación. Se centrifugó por 20 minutos a 2500 rpm. Transcurrido ese tiempo, se recolectó de cada tubo de centrifugación el sedimento de microalga (Morales-Avendaño y Rosales, 2012). El procedimiento se repitió hasta obtener 100 mL de concentrado microalgal.

4.2.8. Conteo celular del concentrado microalgal

Se tomó 1 mL del concentrado microalgal homogeneizado del cultivo en fase exponencial de crecimiento del alga en una probeta estéril de 100 mL. Se completó el volumen a 100 mL con agua autoclavada. Se tomó 1 mL y se lo colocó en un tubo de ensayo con tapa y se homogeneizó en equipo vórtex por 15 minutos.

Luego de la homogeneización, se tomó una muestra con una pipeta Pasteur de vidrio y se la colocó en la cámara de Neubauer. Se colocó la muestra en la cámara, se llevó al microscopio, y se realizó el recuento celular.

4.2.9. Inmovilización del concentrado microalgal del cultivo en fase exponencial de crecimiento del alga *Chlorella* sp.

Se disolvió 2.25 g de alginato de sodio en 180 mL de medio de cultivo Nitrofoska utilizando un agitador magnético. Cuando no quedaron grumos aparentes, se filtró a través de una gasa estéril, obteniéndose una solución uniforme. Se ajustó el pH de la solución entre 7.8-8.0 mediante la adición de gotas de hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) según fuera necesario. A los 180 mL de la solución se añadió 18 mL de concentrado de microalgas obtenidas en el paso 4.2.7. y se mezcló hasta obtener una mezcla homogénea con la solución de alginato.

Se prepararon 360 mL de una solución de cloruro de calcio (CaCl_2) 1% (peso/volumen) en agua autoclavada. Se tomó la solución de alginato y se colocó en una bureta y se dejó gotear este último suavemente en la solución de CaCl_2 bajo agitación constante. Luego se dejó reposar por treinta minutos, para lograr el máximo endurecimiento de las perlas. Posteriormente se filtraron las perlas con una gasa estéril, se lavaron con agua autoclavada y se transfirieron a un recipiente con agua destilada estéril.

Se prepararon cuatro frascos por cada tratamiento y se colocaron alrededor de 14 g de perlas de alginato en cada uno. Adicionalmente a esto se prepararon otras perlas de alginato de sodio las cuales sirvieron como blanco, en las cuales se realizó el mismo procedimiento de inmovilización exceptuando la adición del concentrado microalgal.

4.2.10. Contaminación de perlas de alginato con Cd

Inicialmente se preparó una solución estándar de Cd con una concentración de 100 ppm. A partir de esta se prepararon 200 mL de

cada concentración que fue evaluada, 0.5, 1, 2, 3 y 5 ppm de Cd. En el frasco de vidrio que contenía las perlas de alginato se procedió a contaminar con 45 mL de cada solución en las diferentes concentraciones de Cd, con 4 repeticiones por ensayo. Se usó un blanco por cada concentración, el blanco contenía perlas de alginato sin microalgas y se contaminó con la solución de Cd con las mismas concentraciones.

4.2.11. Cuantificación de remoción de Cd

Luego de siete días posteriores a la contaminación, se procedió a medir la remoción de Cd en la solución, proceso que se realizó mediante espectroscopia de absorción atómica, por medio de un espectrómetro de absorción atómica. Se preparó el equipo, el cual necesitó la conexión de la lámpara de grafito para la medición de Cd lo cual tomó cerca de 45 minutos, luego de este tiempo se empezó midiendo los estándares ya conocidos y estandarizados en el equipo. Finalmente se midió cada muestra previamente filtrada para eliminar cualquier pequeño grumo que pudiera obstruir el funcionamiento del equipo y como validación de resultados se midió uno de los estándares luego de cada tres muestras medidas para evitar errores y falsos resultados ya que el equipo es muy susceptible a fallas por cambios de voltaje.

Se ejecutaron dos repeticiones de todo el proceso para validar los resultados obtenidos.

4.3. Evaluación estadística de los resultados

Los datos obtenidos del estudio fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba estadística t de Student con la utilización de la herramienta de análisis de datos de Microsoft Excel.

Capítulo v. Resultados y discusión

5.1. *Chlorella* sp.

5.1.1. Análisis del recuento celular

Durante la fase preliminar de crecimiento donde se obtuvieron cultivos puros no existió variación en las condiciones de cultivo con respecto a la luz y aireación. En el escalado del cultivo se utilizaron dos fuentes de energía lumínica, luz solar y artificial led con aireación superficial. En la Figura 7 se observa que las curvas de crecimiento guardan una tendencia lineal. Dicho resultado se contrasta con el estudio realizado por Wang et al. (2010, p.1178) donde se cultivó *Chlorella* sp. en cuatro tipos de aguas residuales, en donde tres de estas guardaron similar tendencia a excepción de un tipo especial de agua residual. Además, en cultivos por lotes de esta microalga, Bashan et al. (2002, p. 2943) obtuvo una cinética de crecimiento del tipo lineal, para lo que emplearon agua residual sintética como medio de cultivo y el microorganismo co-inmovilizado. Así mismo se observaron diferencias en cuanto al crecimiento en los frascos con iluminación artificial led y aireación superficial con respecto a los que solo tuvieron luz natural. Por su parte Ortiz-Moreno et al. (2011, p.14) evaluó el crecimiento de una microalga del género *Chlorella* con cuatro medios de cultivos distintos en condiciones autotróficas y mixotróficas con luz artificial por un periodo de 12 horas por día, obteniendo densidad celular lineal para cada uno de los cultivos.

En F2 existió una mayor concentración celular que en los demás frascos donde se mantuvieron las mismas condiciones de cultivo. Este resultado se puede deber a los efectos de la luz artificial ya que repercute directamente en las tasas de fijación de CO₂ en *Chlorella* sp. Esto fue

estudiado por Hirata et al. (1996, p. 472) donde se demostró que cultivos que crecían bajo luz artificial alcanzaban una mayor tasa de fijación de CO_2 ($0.865 \text{ g.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) y concentración de biomasa (0.842 g.L^{-1}). Raeesossadati et al. (2014, p.83) expone que el aumento de la intensidad de la luz suele repercutir en el aumento de las tasas de fijación de CO_2 en los cultivos de microalgas, sin embargo, los sistemas fotosintéticos tienen un punto de saturación donde el aumento de la intensidad lumínica no producirá ningún beneficio e incluso disminuirá la productividad.

Se observó el crecimiento en F1 a F4, donde existieron diferencias en cuanto al crecimiento a pesar de estar sometidos a las mismas condiciones de cultivo. Este efecto se pudo ocasionar por condiciones ambientales como la intensidad lumínica recibida por cada frasco debido a la ubicación respecto a la fuente de luz o el flujo de aireación proporcionado individualmente.

En la Figura 7 se observa que la densidad celular, a pesar de ser lineal se distinguen fases: desde el día 0 hasta el día 5 se observó un crecimiento casi similar en cada uno de los frascos, debido posiblemente a la adaptación al pasar a un mayor volumen de medio de cultivo. Del día 9 en adelante se observaron diferencias mayores en la concentración celular, con cambios más notorios en F2. A partir del día 11 la gráfica muestra un ligero cambio exponencial en F2 y F3, lo que se mantuvo hasta el día 21.

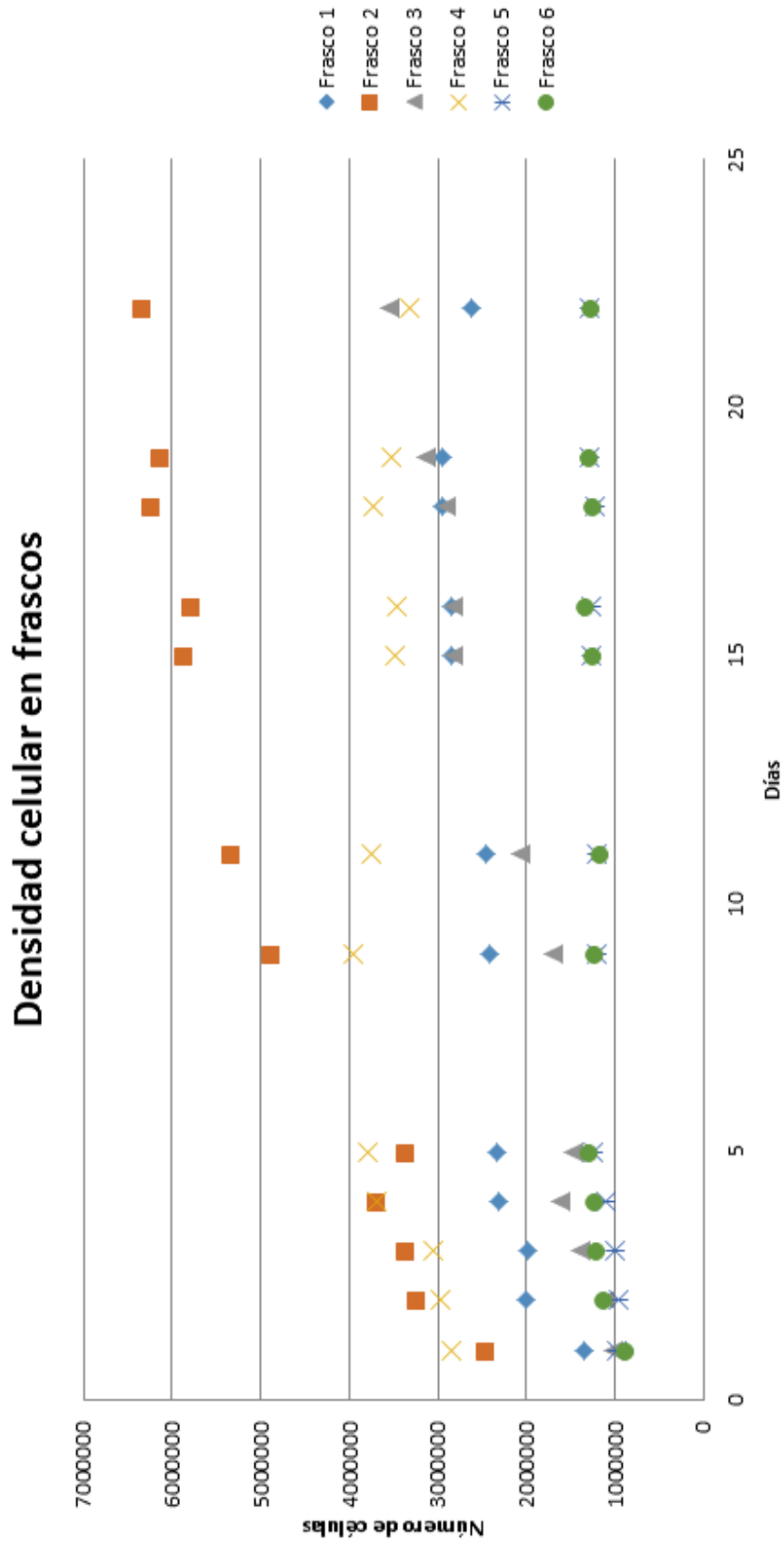


Figura 7.- Concentración celular promedio para *Chlorella* sp. durante el escalado del cultivo.

La concentración inicial para la microalga *Chlorella* sp. fue de 1.3×10^6 , 2.4×10^6 , 1×10^6 , 2.8×10^6 , 9×10^5 , $8,7 \times 10^5$ células.mL⁻¹, las que corresponden de F1 a F6 respectivamente. Luego de 21 días de cultivo celular se obtuvieron las siguientes concentraciones: 2.6×10^6 , 6.3×10^6 , 3.5×10^6 , 3.3×10^6 , 1.29×10^6 , 1.27×10^6 , en el mismo orden mencionado anteriormente. En la Figura 8 se contrasta el crecimiento al comparar la concentración inicial del inóculo y la concentración final del cultivo luego del tiempo mencionado anteriormente.

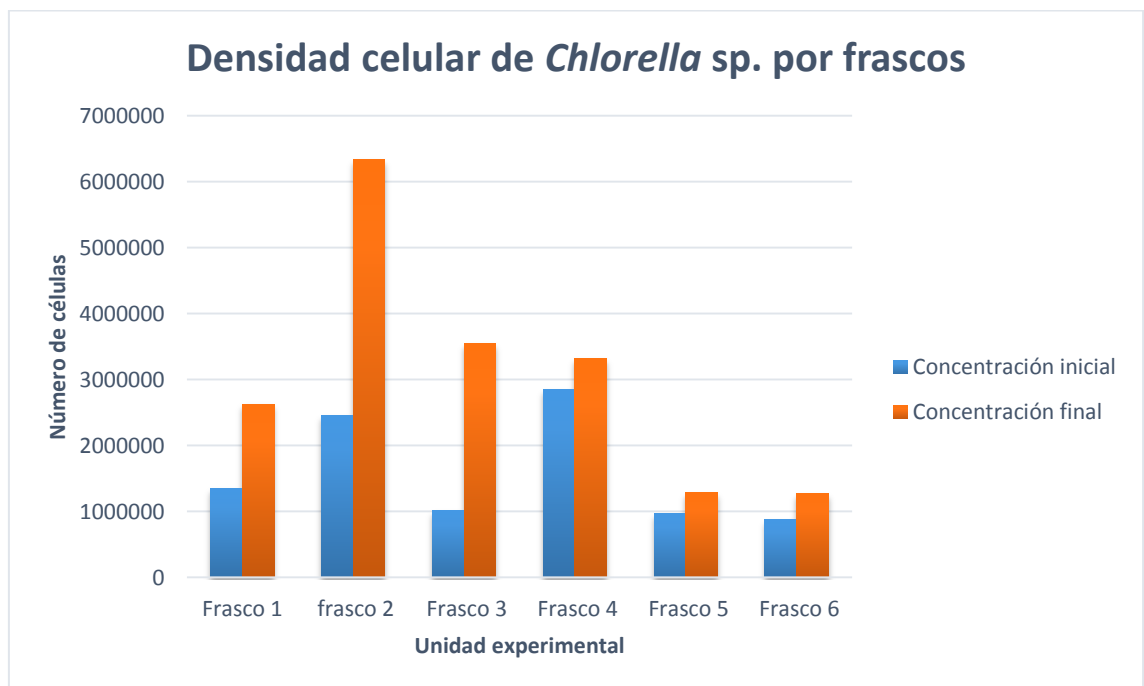


Figura 8.- Imagen comparativa del crecimiento de *Chlorella* sp. en los seis frascos.

Los datos de densidad celular en los cultivos muestran diferencias significativas al contrastar los cultivos con luz natural y artificial. Esto se confirmó estadísticamente mediante la prueba de t de Student para muestras independientes, con un valor P de 0.023 menor al valor de significancia prefijado (0.05).

Al tener como referencia la concentración inicial y final de cada cultivo se calculó la relación porcentual del crecimiento. Los datos del crecimiento porcentual se muestran en la Figura 9. Cabe destacar que F3 tuvo el mayor porcentaje de crecimiento con un 250.2%, lo que corresponde a que la concentración celular creció 2.5 veces más a partir de la concentración inicial. A pesar de que F2 tuvo la mejor concentración celular final, fue superado en el porcentaje de crecimiento celular por el F3. F4 con el 16.5% mostró el menor porcentaje de crecimiento, en este caso la luz artificial no tuvo el mismo efecto que en las demás unidades experimentales debido a que estuvo en el extremo de las lámparas. El crecimiento con luz blanca a diferentes intensidades pudo ocasionar las diferencias en cuanto a densidad celular. Gutiérrez et al. (2016, p.1191) encontraron que a una menor intensidad lumínica los cultivos de microalgas desarrollan mayor biomasa. A pesar que la luz tiene un efecto directo sobre el crecimiento, no se deben descartar factores ambientales externos como la temperatura ambiental, flujo de aire, etc.

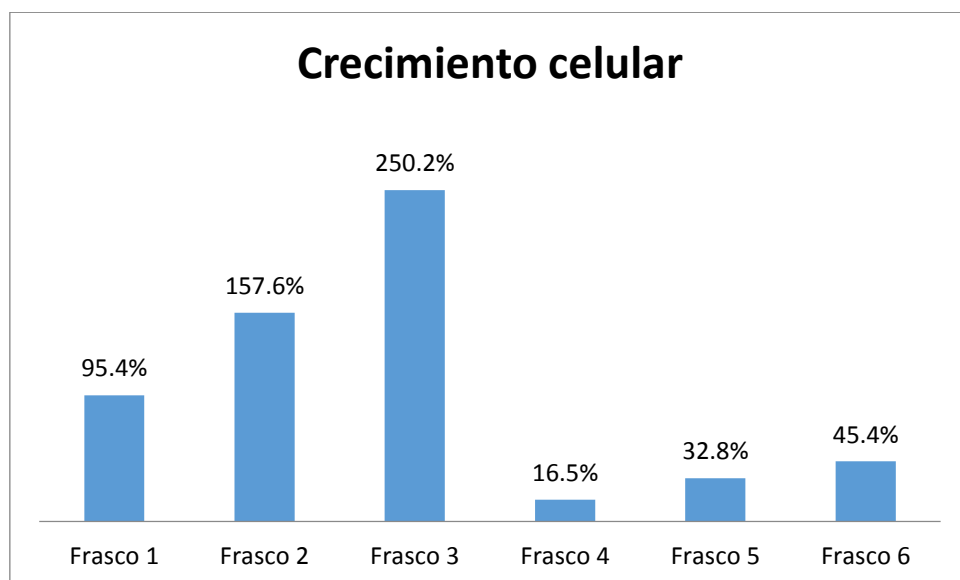


Figura 9.- Porcentaje de crecimiento celular para *Chlorella* sp. en los frascos

En un estudio realizado por Melis (2009, p. 275) referente a eficiencia en la conversión de la energía solar en la fotosíntesis, se expuso que las microalgas expuestas a una intensidad lumínica menor que la luz solar mostraban mayor eficiencia fotosintética, por ende mayor clorofila, mientras que las que estaban con la luz solar podían llegar a una saturación lumínica disipando el exceso de energía absorbida, lo que los hace menos eficientes. Para el uso de luz artificial, es indispensable el uso de luz blanca fría. En este estudio, el crecimiento varió de acuerdo a la fuente de luz y al tiempo de exposición, donde los cultivos con luz natural (F5 y F6) tenían un periodo de exposición de 12 horas diarias, mientras que los cultivos con luz artificial (F1, F2, F3 y F4) estaban expuestos a la luz las 24 horas del día, en el primer caso el crecimiento alcanzó una media de 1.28×10^6 células.mL⁻¹ y en el segundo 3.96×10^6 células.mL⁻¹. Según Blair, Kokabian y Gude (2014, p. 667) en el estudio sobre el efecto de la luz en la producción de biomasa de *Chlorella vulgaris* se probaron cuatro tipos de luces led artificiales: rojo, azul, verde y blanca, siendo esta última la que generó el mayor impacto sobre el crecimiento y la fotosíntesis de las microalgas. Se nota que todos los colores forman parte del espectro de la luz solar, a excepción del color blanco ya que es la conjugación de todo el espectro. Este se encuentra presente en la luz que emiten las lámparas led de luz blanca, por lo tanto, al tener una intensidad lumínica menor a la luz solar generó las diferencias en el crecimiento, siendo este mayor con luz artificial en relación con la luz solar. Por otro lado, Khoeyi, Seyfabadi y Ramezanpour (2012, p. 43-44) evaluaron el crecimiento del cultivo de *Chlorella vulgaris* en tres diferentes fotoperiodos con luz artificial (8:16, 12:12, 16:8 horas luz-oscuridad respectivamente), donde la mayor cantidad de biomasa se obtuvo luego de ocho días de cultivo en el fotoperiodo 16:8, lo que demuestra el efecto positivo de un mayor tiempo de exposición sobre el crecimiento celular de las microalgas.

Además, en F3 se observó el mayor crecimiento celular porcentual a pesar de que los F1, F2, F3 y F4 se mantuvieron con iguales condiciones de concentración del medio de cultivo, luminosidad, aireación y agitación (Figura 9). La aireación fue otro punto relevante dentro del experimento, en el F5 y F6 que no tuvieron aireación se observa una diferencia significativa en cuanto a la densidad celular (Figura 7), lo que se corroboró mediante la prueba estadística t de Student donde se mostró que existen diferencias significativas entre los tratamientos, con un valor P de 0.023 menor al valor de significancia prefijado (0.05). Raeesossadati et al. (2014, p. 79) analizó los efectos que pueden tener la luz, temperatura, concentración de CO₂ sobre la concentración de biomasa en un fotobiorreactor, dentro de los cuales se demostró que la aireación afecta positivamente al crecimiento del cultivo, dando mejores resultados la aireación superficial. Este efecto también fue reportado por Garg, Li, Wang y Shenk (2012, p. 472).

5.2. Remoción de Cd

En la Tabla 5 se encuentran los resultados promedio obtenidos en los dos ensayos realizados con cuatro repeticiones. En términos generales se aprecia que la remoción de perlas de alginato con *Chlorella* sp. fue efectiva y se removió casi en su totalidad el Cd de la solución, llegando hasta un 91.5 % de remoción. Esto brinda una nueva perspectiva para la utilización en múltiples aplicaciones de esta microalga, tales como las ambientales. Además, una vez realizadas las pruebas se encontró que la unidad experimental utilizada como blanco removió una parte de la concentración inicial del metal.

Tabla 5.

Resultados promedio de la remoción de Cd

Concentración de Cd (ppb)	Solución inicial (ppb)	Concentración final (ppb)	Remoción Muestra <i>Chlorella</i> sp.	Concentración final Blanco (ppb)	Remoción Blanco
0.5	480.8	155.1	325.7	248.3	232.5
1	876.5	179.3	697.2	334.6	541.9
2	1683.5	229.0	1454.5	435.2	1248.3
3	2485.0	243.3	2241.7	548.5	1936.5
5	4003.5	340.2	3663.3	670.6	3333.0

Como se muestra en la Tabla 5 y Figura 10 la remoción más alta se da con el tratamiento con microalga inmovilizada de 3 y 5 ppm, con valores en porcentaje de 90.21% y 91.50%, respectivamente, mientras que la menor se produjo a los 0.5 ppm. Estos datos guardan relación con el trabajo del equilibrio y cinética de *Chlorella vulgaris* en la biosorción de Cd y Pb en soluciones acuosas realizado por Edris et al. (2014, p. 90) donde se evaluó el efecto de estos metales pesados en el crecimiento de la microalga y se obtuvo datos de remoción hasta de 149.9 ppm de Cd.

Gráficamente la remoción realizada en los cinco tratamientos (perlas de alginato con *Chlorella* sp.) y el blanco (perlas de alginato) se observan en la Figura 10. Los valores bajos de remoción con *Chlorella* sp. y el blanco se produjeron en las concentraciones de 0.5 y 1 ppm, con valores de 67.75 y 79.54 para la primera concentración y 79.54 y 61.83 en la segunda, de acuerdo a cada tratamiento aplicado (Figura 10). Aksu y Donmez (2006, p.863) en el estudio de la biosorción con una especie del género *Chlorella* encontraron datos similares a los presentados previamente, donde con una concentración baja de Cd (24.9 ppm) se removió un 79.9% del metal y con una concentración mayor (153.2 ppm) el porcentaje fue de 44.3%, con lo que

se ratifica la capacidad de *Chlorella* sp. para remover el contaminante a bajas concentraciones. Cabe destacar que el proceso se realizó con la microalga seca, aun así, la capacidad de biosorción sigue siendo alta, aunque se ve afectada cuando la concentración del metal aumenta considerablemente.

Ruangsomboona y Wongrat (2006, p. 17) efectuaron un estudio con la finalidad de medir la capacidad de bioacumulación de Cd en dos organismos y *Chlorella vulgaris*, donde obtuvieron que en el caso de la microalga la concentración de Cd removida fue directamente proporcional a la concentración del metal. Estos autores utilizaron 0.35 y 3.5 ppm de Cd y se reportó que la acumulación de Cd en *Chlorella vulgaris* expuesta a 3.50 mg.L⁻¹ fue 6 veces mayor a la de los cultivos expuestos a 0,35 mg.L⁻¹, lo que generó una tendencia similar a la obtenida en este estudio.

Según Jain, Garg, y Kadirvelu (2013, p. 245) realizaron un estudio con una microalga del género *Chlorella* inmovilizada para la eliminación del Cd de un medio acuoso contaminado. Este proceso se realizó con concentraciones bajas del metal, 10 y 25 ppm, en ambos casos el proceso de la remoción se realizó bastante rápido debido a la afinidad de sorción activa y eficiente para Cd²⁺ que tiene la microalga. Para la concentración de 10 ppm de Cd, removieron el 93.5% en 5 minutos y el 97.95% en 60 minutos. Además, en ese estudio se comparó la remoción con células libres e inmovilizadas donde con estas últimas se removió un porcentaje mayor lo que se corrobora de manera general con lo obtenido en el presente estudio.

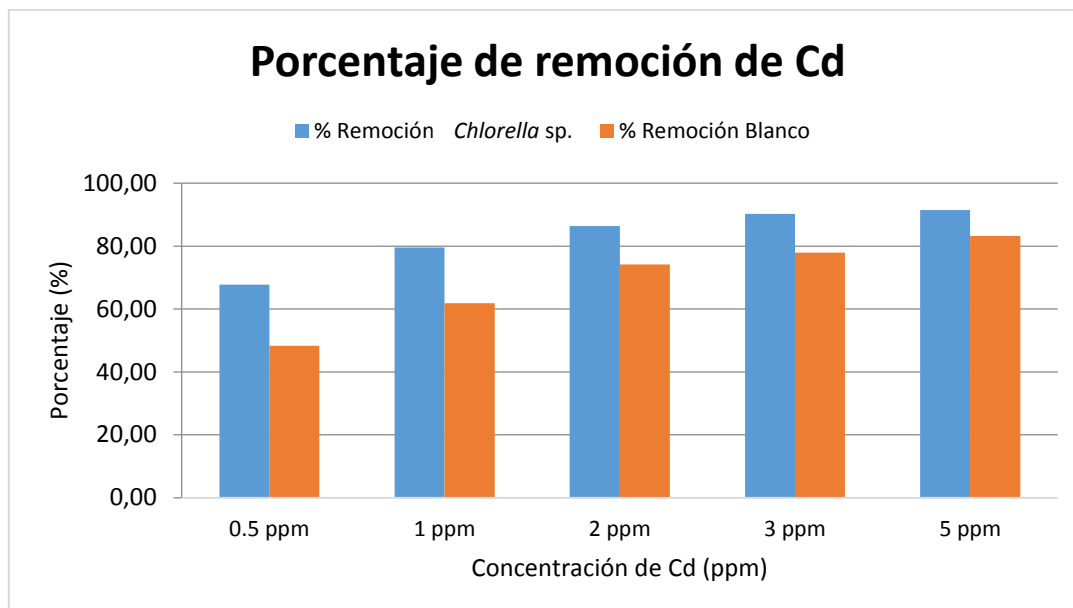


Figura 10.- Remoción de Cd en el ensayo representada en porcentaje

En la Figura 11 se muestra la diferencia en porcentaje de remoción que se le podría atribuir directamente a la microalga *Chlorella* sp. Esto parte del contraste presentado entre el tratamiento y el blanco que es visible en la Figura 10. Teniendo esto como punto de partida, se observa que la microalga actúa con mayor eficiencia para la remoción con concentraciones menores de contaminante donde con 0.5 ppm se obtuvo una remoción del 19.32% que contrasta fuertemente con el 8.17% con 5 ppm de Cd en la solución. Esto contrasta con la remoción total realizada por la microalga inmovilizada, en donde la interacción del microorganismo y el soporte genera hasta un 91.50 % de remoción. Para *Chlorella* sp. se encontró una relación inversamente proporcional entre la concentración del metal y el porcentaje de remoción. Según estudios de Aksu y Donmez (2006, p. 862), la concentración del Cd puede funcionar como un inhibidor del crecimiento de las microalgas, así también afecta a la remoción de este metal, una concentración mayor incide en la capacidad de absorción de *Chlorella* sp.

La remoción por parte del blanco compuesto únicamente por esferas de alginato fue de 83.25% en la concentración más alta 5ppm como se aprecia

en la Figura 10. Según Fourest y Volesky (1997, p. 222) este efecto se debe a la formación de heterobloques de unidades GGG (G:ácido α -L-gulurónico), que forman parte de la estructura del alginato como se mencionó previamente. Esta formación le brinda la capacidad de adhesión con iones metálicos pesados con carga 2^+ debido a su electronegatividad. Según el autor esto puede interferir en otros procesos donde sea necesario medir concentración de los iones.

Papageorgiou et al. (2006, p. 1767) estudió la capacidad de adsorción de metales pesados por parte del alginato. Para el caso particular del Cd obtuvieron una remoción de 129.95 mg.g^{-1} en un ensayo realizado con una solución del metal expuesto por 24 horas a 25°C y agitación de 190 rpm. Estos datos demuestran la gran capacidad del alginato para remover este metal. Según Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta (2008, p. 30), a pesar de que el alginato de sodio es un polímero altamente estable, posee una alta permeabilidad para el N, O y metales, por lo cual es posible que pueda tener interacciones con estos últimos y acumularlos en el interior de los poros.

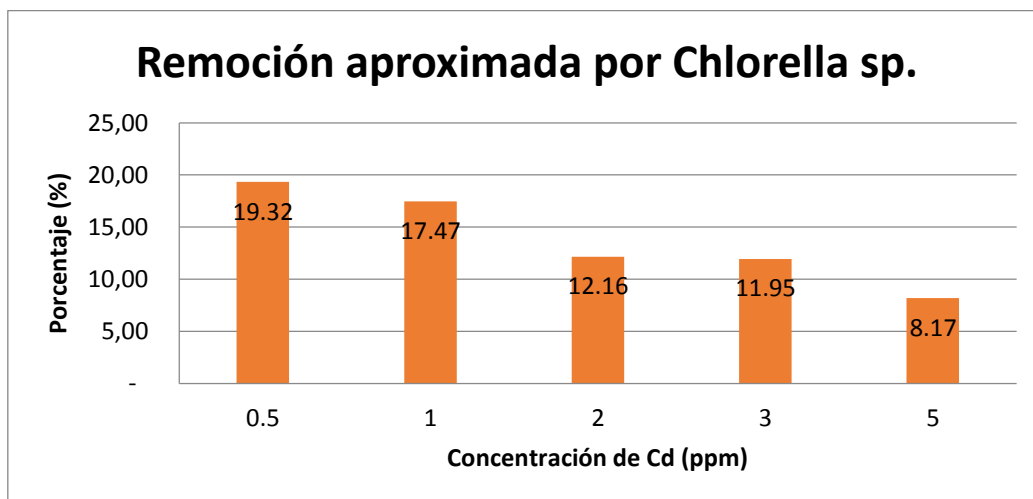


Figura 11.- Porcentaje de remoción aproximado de *Chlorella* sp.

Se realizó el análisis estadístico de los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de Cd removido por cada tratamiento y el blanco

mediante el análisis de varianza que se encuentra en la Tabla 6. Se muestra que el valor P para la variable remoción de Cd, en relación con el valor de significancia prefijado de 0.05 es menor por lo tanto existen diferencias significativas entre los distintos tratamientos.

Tabla 6.

Análisis de varianza de un factor (remoción de Cd)

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	3,71E+07	4	9,28E+06	497,75	1,0318E-19	2,87
Dentro de los grupos	3,73E+05	20	1,87E+04			
Total	3,75E+07	24				

Los cinco tratamientos realizados en este trabajo se realizaron con concentraciones bajas de Cd lo que evalúa el potencial para reducir la concentración de este contaminante a bajas concentraciones. Esto da como resultado variaciones significativas entre cada tratamiento.

La concentración inicial del Cd es una de las condiciones importante para la obtención de resultados en este tipo de ensayos, debido al efecto de este metal sobre las células a grandes concentraciones. Matsunaga et al. (1999, p. 35) obtiene una remoción con *Chlorella* sp. entre 0.7 a 48.7% a partir de una concentración de 50 ppm en un cultivo de doce días de duración. Las variaciones de remoción en este ensayo se podrían deber a factores como los ambientales, sin embargo, se observa que la microalga *Chlorella* sp. remueve de una manera efectiva concentraciones bajas de Cd, pero cuando se trata de concentraciones altas existe inhibición de este proceso.

Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones

6.1. Conclusiones

El medio de cultivo de Nitrofoska al 3% permitió obtener un cultivo puro a partir de muestras de la laguna de Yahuarcocha, obteniéndose un crecimiento óptimo al alcanzar su fase estacionaria luego de 21 días de cultivo. Condiciones como la luz artificial led junto con la aireación superficial por 24 horas diariamente permitieron un crecimiento acelerado de los cultivos. Con 6.3×10^6 células.mL⁻¹ F2 tuvo mayor densidad celular al final del crecimiento, sin embargo, F4 tuvo un crecimiento de 2.5 veces su concentración inicial en contraste con el 1.57 de F2.

Las curvas de crecimiento para los seis medios de cultivo de *Chlorella* sp. siguieron una tendencia lineal con una fase lag casi nula debido a la previa adaptación del microorganismo al medio de cultivo, teniendo como punto de inflexión el día 15, donde se observó una densidad celular mayor. Con la luz artificial led se obtuvieron mejores resultados de crecimiento debido al mejoramiento de la capacidad fotosintética de las microalgas por el mayor tiempo de exposición a la luz.

El método de inmovilización aplicado fue viable pues protege a la microalgas de microorganismos competidores como bacterias y hongos, por medio de polímeros, los que a su vez no permiten la pérdida de biomasa al ser un método de atrapamiento irreversible. Las ventajas del alginato de sodio por su tamaño de poro y permeabilidad a los nutrientes permitieron el paso de los iones metálicos hacia la célula. Las perlas de alginato se mantuvieron estables durante todo el proceso, debido a la concentración utilizada de cloruro de calcio al 1%.

La remoción de Cd por parte de las perlas de alginato de sodio junto con *Chlorella* sp. fue de hasta un 91.50% a 5 ppm, por lo que la efectividad del proceso quedó demostrada. El mejor efecto se observa sobre rangos de concentraciones relativamente bajos, como las que se evaluaron, a concentraciones muy elevadas se da un efecto inhibitorio para la microalga.

Al contrastar el experimento realizado con la microalga inmovilizada y el blanco se asumió un porcentaje de remoción de Cd realizado por la microalga *Chlorella* sp., dado por la diferencia entre ambos tratamientos. La microalga actúa de forma efectiva en la remoción del metal, obteniéndose un 19.32% a una concentración del contaminante de 0.5 ppm, sin embargo, a una concentración de 5 ppm el porcentaje atribuido directamente a la microalga es de 8.17%, lo que deja entrever una mayor efectividad con concentraciones bajas del metal.

6.2. Recomendaciones

Se sugiere la utilización de antibióticos y antimicóticos en los medios de cultivos iniciales previo a la obtención del cultivo puro para evitar contaminación con microorganismos no deseados.

Utilizar luz artificial led para el crecimiento de microalgas debido a que es más efectivo para el aumento de la densidad celular en el medio de cultivo.

Realizar cultivos a mayor escala para evaluar la remoción de metales pesados en fuentes hídricas o para la biorremediación de los residuos industriales.

Se recomienda realizar pruebas con rangos de concentraciones mayores a los evaluados (0.5-5 ppm Cd) para determinar protocolos efectivos de remoción de este metal y otros (Pb, Cr, Hg) que se encuentran en fuentes hídricas y suelo.

REFERENCIAS

- Ahluwalia, S. y Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. 98(1), Recuperado el 15 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405005675>
- Aksu, Z. y Donmez, G. (2006). Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. *Process Biochemistry*. 41(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305004411>
- Al-Rub, F., El-Naas, M., Ashour, I. y Al-Marzouqi, M. (2006). Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *Process Biochemistry*. 41(1), Recuperado el 17 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511305003156>
- Angelova, M., Pashova, S. y Slokoska, K. (2000). Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. *Enzyme Microbiology Technology*. 26(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10771058>
- Alam, A., Wan, C., Zhao, X., Chen, L., Chang, J., Bai, F. (2015). Enhanced removal of Zn^{2+} or Cd^{2+} by the flocculating *Chlorella vulgaris* JSC-7. *Journal of Hazardous Materials*. 289(1), Recuperado el 14 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438941500093X>
- Anayurt, R., Sari, A., Tuzen, M. (2009). Equilibrium, thermodynamic and kinetic studies on biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution by macrofungus (*Lactarius scrobiculatus*) biomass. *Chemical Engineering Journal*. 151(1), Recuperado el 17 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894709001715>

- Ancín, M. (2011). Evaluación de diferentes tipos de fertilizantes químicos y orgánicos en la producción de frijol (*Phaseolus vulgaris* L. var. Alubia) en el distrito de San Juan de Castrovirreyna-Huancavelica (Perú). Navarra, España: Universidad Pública de Navarra. Recuperado el 25 de enero de 2017 de <http://academica-e.unavarra.es/xmlui/bitstream/handle/2454/3454/577423.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Albarracín, I. (2007). XV Simposio electrónico internacional. La producción de Biocombustibles La producción de Biocombustibles con eficiencia, estabilidad y equidad. Microalgas: potenciales productoras de biodiesel. Recuperado el 19 de enero de 2017 de http://www.ceid.edu.ar/biblioteca/biocombustibles/isabel_albarracin_micr_oalgas_potenciales_productoras.pdf
- Barbosa, M. (2003). Microalgal photobioreactors: Scale-up and optimisation. (Tesis doctoral). Wageningen University. Recuperado el 21 de enero de 2017 de <http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/fulltext/121438>
- Barsanti, L. y Gualteri, P. (2006). Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology. Boca Ratón, Florida: Taylor & Francis Group.
- Bashan, L., Moreno, M., Hernandez, J. y Bashan, Y. (2002). Removal of ammonium and phosphorus ions from synthetic wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* co-immobilized in alginate beads with the microalgae growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Water Research: 36*(1), Recuperado el 15 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004313540100522X>
- Bates, S., Tessier, A., Campbell, P. y Buffle, J. (1982). Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *Journal Phycology. 18*(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.1982.tb03218.x/full>

- Bhagyalaskhmi, M. y Sarma, P. (2016). Biosorption of Cadmium from Aqueous Solutions using Blue Green Algae. *Bioengineering Environmental Sciences*. 15(2), Recuperado el 18 de enero de 2017 de <https://search.proquest.com/openview/bf09e0c59b9f311d0e51739a8bca73f7/1.pdf?pq-origsite=gscholar&cbl=1606374>
- Blair, M., Kokabian, B. y Gude, V. (2014). Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. (2)1, Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343713002200>
- Brito, D., Milani, N., Pereira, G., González, M., Morán, R. (2006). Crecimiento de microalgas de agua dulce, en dos medios de cultivo Guillard y un fertilizante comercial Nitrofoska. *Ciencia*. 14(4), Recuperado el 19 de enero de 2017 de <http://www.produccioncientifica.luz.edu.ve/index.php/ciencia/article/view/9505>
- Cai, T., Park, S. y Li, Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 19(1), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032112006429>
- Cañizares-Villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42(1), Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>
- Chatterjee, S., Bhattacharjee, I., Chandra, G. (2010). Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Hazardous Materials*. 175(1), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864059>
- Chen, B., Chen, C., Guo, W., Chang, H., Chen, W., Lee, D., Huang, C., Ren, N., Chang, J. (2014). Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized *Scenedesmus obliquus* CNW-N cells on loofa (*Luffa*

cylindrica) sponge. *Bioresource Technology*. 160(1), Recuperado el 30 de enero de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/260444491_Fixedbed_biosorption_of_cadmium_using_immobilized_Scenedesmus_obliquus_CNW-N_cells_on_loofa_Luffa_cylindrica_sponge

Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. Palmerston North. Nueva Zelanda: Elsevier. Recuperado el 25 de enero de 2017 de <https://www.massey.ac.nz/~ychisti/Biodiesel.pdf>

Chiu, S., Kao, C., Chen, C., Kuan, T., Ong, S. y Lin, C. (2008). Reduction of CO₂ by a high-density culture of *Chlorella* sp. in a semicontinuous photobioreactor. *Bioresource Technology*. 99(1), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17904359>

Chojnacka, K. y Márquez-Rocha, F. (2004). Kinetic and Stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*. 3(1), Recuperado el 27 de enero de 2017 de <http://scialert.net/abstract/?doi=biotech.2004.21.34>

Cristo, R., Oberholser, K., Shank, N. y Nguyen, M. (1981). Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environmental Science & Technology*. 15(10), Recuperado el 25 de enero de 2017 de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es00092a010>

De Bashan, L., Bashan, Y. (2010). Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*. 101(1), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852409012498>

Draget, K. (2000). Handbook of hydrocolloids-alginates. Cambridge: England. Woodhead Publishing Limited. Boca Raton; Florida, USA: CRC Press. Recuperado el 24 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/book/9781845694142>

Edris, G., Alhamed, Y., Alzahrani, A. (2014). Biosorption of Cadmium and Lead from Aqueous Solutions by *Chlorella vulgaris* Biomass: Equilibrium and

Kinetic Study. *Arabian Journal for Science and Engineering*. 39(1), Recuperado el 30 de enero de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/s13369-013-0820-x>

Erazo, A., Jaramillo, B. (2005). Evaluación de impacto ambiental y propuesta del plan de manejo de los procesos de la primera etapa de la Laguna de Yahuarcocha. Universidad Técnica del Norte, Ibarra, Ecuador.

Escobar, J. (2002). La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. CEPAL. *División de Recursos Naturales e Infraestructura*. 50(1), Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <http://www.cepal.org/es/publicaciones/6411-la-contaminacion-rios-sus-efectos-areas-costeras-mar>

FAO. (s.f.). Biotecnología. Recuperado de: <http://www.fao.org/biotechnology/es/>

Fourest, E. y Volesky, B. (1997). Alginate Properties and Heavy Metal Biosorption by Marine Algae. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 67(1), Recuperado el 12 de febrero de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02788799>

Fraile, A., Penche, S., González, F., Blázquez, L., Muñoz, A., y Ballester, A. (2005). Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chemistry and Ecology*. 21(1), Recuperado el 15 de enero de 2017 de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/02757540512331334933>

Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K., Nishinari, K. y Phillips, G. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures an Ca binding. *Food Hydrocolloids*. 23(7), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=21641792>

- Garg, S., Li, Y., Wang, L. y Schenk, P. (2012). Flotation of marine microalgae: Effect of algal hydrophobicity. *Bioresource Technology*. 121(1), Recuperado el 22 de enero de 2017 de <https://researchonline.jcu.edu.au/28107/>
- Garzón-Jiménez, C. y Barragán-Huerta, B. (2008). Inmovilización microbiana: técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales*. 2(1), Recuperado el 25 de enero de 2017 de <https://es.scribd.com/document/81557471/INMOVILIZACION>
- González-Delgado, A., Peralta_Ruiz, Y., Córdoba, L., López, L. y Kafarov, V. (2014). Experimentación y optimización conjunta de la disrupción celular de microalgas y extracción Soxhlet de aceite para alimentación y biocombustibles. *Revista Especializada en Ingeniería*. 8(1), Recuperado el 19 de enero de 2017 de <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/publicaciones-e-investigacion/article/view/1295>
- Granda, R. (2015). Producción de Astaxantina a partir de la microalga *Haematococcus pluvialis*. Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias. UDLA. Quito. Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://slidedoc.es/facultad-de-ingenieria-y-ciencias-agropecuarias-produccion-de-astaxantina-a-partir-de-la-microalga-haematococcus-pluvialis-pdf>
- Gutiérrez-Mosquera, Ocampo-Gómez, Montoya-Barreto y Sánchez-Toro (2016). Efecto de tres tipos de luz sobre el crecimiento de microalgas de *Scenedesmus* sp. *Agronomía Colombiana*. 34(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://iicta.com.co/wp-content/uploads/2017/02/1190D150.pdf>
- Han, X., Wong, Y., Fung, N. y Tam, Y. (2006). Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, *Chlorella miniata*. *Journal of Colloid and Interface Science*. 303(1),

Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://repository.ust.hk/ir/Record/1783.1-20265>

Hernández, E., y Olguín, J. (2002). Biosorption of heavy metals influenced by the chemical composition of *Spirulina* sp. *Environmental Technology*. 23(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09593332508618442>

Hirata, S., Hayashitani, M., Taya, M. y Tone, S. (1996). Carbon Dioxide Fixation in Batch Culture of *Chlorella* sp. Using a Photobioreactor with a Sunlight-Collection Device. *Journal of fermentation and bioengineering*. 81(5), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP9607483>

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M. y Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *The plant journal*. 54(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476868>

Huang, C., Su, C., Hsieh, J., Tseng, C., Lin, P., Chang, J. (2003). Polypeptides for heavy-metal biosorption: capacity and specificity of two heterogeneous MerP proteins. *Enzyme and Microbial Technology*. 33(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022903001340>

Jain, M., Garg, V. y Kadirvelu, K. (2013). Cadmium(II) sorption and desorption in a fixed bed column using sunflower waste carbon calcium–alginate beads. *Bioresource Technology*. 129(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412017117>

Kaewpintong, K., Shotipruk, A., Powtongsook, S., Pavasant, P. (2007). Photoautotrophic high-density cultivation of vegetative cells of *Haematococcus pluvialis* in airlift bioreactor. *Bioresource Technology*

98(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16516464>

- Kaplan, D. (2013). Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. En A. Richmond. *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*. Second Edition: John Wiley & Sons, Ltd.
- Kazi, T., Jalbani, N., Kazi, N., Jamali, M., Pirzado, Z. (2008). Evaluation of Toxic Metals in Blood and Urine Samples of Chronic Renal Failure Patients, before and after Dialysis. *Renal Failure*. 30(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18704823>
- Kazi, T., Memon, A., Afridi, H., Jamali, M., Arain, M., Jalbani, N., Sarfraz, R. (2008). Determination of cadmium in whole blood and scalp hair samples of Pakistani male lung cancer patients by electrothermal atomic absorption spectrometer. *Science of the total environment*. 389(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919685>
- Khoeyi, Z. Seyfabadi, J. Ramezanpour, Z. (2012). Effect of light intensity and photoperiod on biomass and fatty acid composition of the microalgae, *Chlorella vulgaris*. *Aquaculture International*. 20(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10499-011-9440-1>
- Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I., Marchant, R., Kuotinas, A. (2004). Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol*. 21(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002003001072>
- Kshirsagar, A. (2013). Biorremediation of Wasterwater by using microalgae: an experimental study. *International journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*. 2(3), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.ijlbpr.com/index.php?m=content&c=index&a=show&catid=120&id=155>

- Kumar, H.D. (1999): Introductory Phycology. Affiliated East West Press Ltd. New Delhi:India.
- Larsdotter, K. (2006). Wastewater treatment with microalgae- a literature review. VATTEN. 62(1), Recuperado el 21 de enero de 2017 de http://www.tidskriftenvatten.se/wpcontent/uploads/2017/04/48_article_2125.pdf
- López, I. (2016). Análisis de efectividad de *Chlorococcum littorale* y *Scenedesmus* sp. En biorremediación de aguas residuales. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/5733>
- Maldonado, E. (2014). Evaluación de la capacidad mixotrófica de la microalga *Graesiella emersonii* (*Chlorella emersonii*) con sustratos amiláceos. Quito, Ecuador. Escuela Politécnica del Ejército. Recuperado el 23 de enero de 2017 de <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/8367>
- Martínez-Trujillo y García-Rivero. (2012). Revisión: aplicaciones ambientales de microorganismos inmovilizados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-27382012000100005
- Mata, T., Martins, A. y Caetano, N. (2010). Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 14(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364032109001646>
- Matsunaga, T., Takeyama, H., Nakao, T. y Yamazawa, A. (1999). Screening of marine microalgae for bioremediation of cadmium-polluted seawater. *Journal of Biotechnology*. 70(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165699000553>

- Mehta, S. y Gaur, J. (2005). Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25(3), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16294830>
- Melis, A. (2009). Solar energy conversion efficiencies in photosynthesis: Minimizing the chlorophyll antennae to maximize efficiency. *Plant Science*. 177(1). Recuperado el 19 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168945209001861>
- Mera, R., Torres, E., Abalde, J. (2014). Sulphate, more than a nutrient, protects the microalga *Chlamydomonas moewusii* from cadmium toxicity. *Aquatic Toxicology*. 148(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24463493>
- Meunier, C., Dandoy, P., Su, B. (2010). Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials. *Journal of Colloid and Interface Science*. 342(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944428>
- Michalak, I., Chojnacka, K. (2010). Interactions of metal cations with anionic groups on the cell wall of the macroalga *Vaucheria* sp. *Engineering in Life Sciences*. 10(3), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elsc.200900039/abstract>
- Mite, F., Carrillo, M., Durango, W. (2010). Avances del monitoreo de presencia de cadmio en almendras de cacao, suelos y aguas en Ecuador. XII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. Universidad tecnológica Equinoccial. Recuperado el 24 de enero de 2017 de <http://www.secsuelo.org/wp-content/uploads/2015/06/6.-Francisco-Mite.-Cadmio.-INIAP.pdf>
- Moheimani, N. (2005). The culture of Coccolithophorid algae for carbon dioxide biorremediation. (Tesis doctoral). Murdoch University. Recuperado el 24 de enero de 2017 de

https://www.researchgate.net/publication/43979765_The_culture_of_coccolithophorid_algae_for_carbon_dioxide_bioremediation

Monteiro, C., Castro, P., Malcata, X. (2011). Microalga-Mediated Bioremediation of Heavy Metal–Contaminated Surface Waters. Khan et al. (eds.). *Biomangement of Metal-Contaminated Soils. Environmental Pollution*. Springer Science and Business Media.

Morales-Avenidaño, E., y Rosales, N. (2012). Universidad Central del Ecuador: Seminario Taller Internacional sobre Biotecnología Ambiental y Cultivo de Microalgas. Inmovilización de microalgas y cianobacterias. Quito, Pichincha.

Moreno, I. (2008) Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresource technology*. 99(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/6222376_Microalgae_immobilization_Current_techniques_and_uses

Nandi, R., Mukherjee, K. y Saha, B. (2015). Surfactant Assistant Enhancement of Bioremediation Rate for Hexavalent Chromium by Water Algae. *Biochemistry and Physiology*. 4(3), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.omicsgroup.org/journals/surfactant-assistant-enhancement-of-bioremediation-rate-for-hexavalent-chromium-by-water-algae-2168-9652-1000173.php?aid=59814>

Nazar, J. (2007). Biofilms bacterianos. *Revista de otorrinolaringología*. 67(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S071848162007000100011

Oquendo, J. (2016). Evaluación de *Thypha latifolia* en la absorción de plomo y propuesta de fitorremediación de aguas residuales con metales pesados en la laguna de Yahuarcocha. (Tesis de Maestría). Universidad Internacional SEK. Recuperado el 28 de enero de 2017 de <http://repositorio.uisek.edu.ec/handle/123456789/1606>

- Ortíz-Moreno, M., Cortés-Castillo, C. , Sánchez-Villarraga, J., Padilla, J. y Otero-Paternina, A. (2011). Evaluación del crecimiento de la microalga *Chlorella sorokiniana* en diferentes medios de cultivo en condiciones autotróficas y mixotróficas. *ORINOQUIA*. 16(1), Recuperado el 2 de febrero de 2017 de <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v16n1/v16n1a02.pdf>
- Papageorgiou, S., Katsaros, F., Kouvelos, E., Nolan, J., Le Deit, H., Kanellopoulos, N. (2006). Heavy metal sorption by calcium alginate beads from *Laminaria digitata*. *Journal of Hazardous Materials*. 137(2), Recuperado el 12 de marzo de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389406004705>
- Pulz, O. y Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*. 65(1), Recuperado el 29 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15300417>
- Raesossadati, M., Ahmadzadeh, H., McHenry, M. y Moheimani, N. (2014). CO₂ bioremediation by microalgae in photobioreactors: Impacts of biomass and CO₂ concentrations, light, and temperature. *Algal Research*. 6(1), Recuperado el 30 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211926414000903>
- Reddy, R. y Reddy, S. (2010). Effect of different Co-polymers on Sodium Alginate Microcapsules Containing Isoniazid. *International Journal of PharmTech Research*. 2(4), Recuperado el 31 de enero de 2017 de https://www.researchgate.net/publication/281560297_Effect_of_different_co-polymers_on_sodium_alginate_microcapsules_containing_isoniazid
- Richmond, A. (2004). Handbook of Microalgal Culture. Biotechnology and Applied Phycology. *Journal of Applied Phycology* 16(1), 159-160. Recuperado el 18 de enero de 2017 de <http://www.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0632059532.html>
- Ripolles, J. y Mena, J. (2008). Patente de invencion de un fotobiorreactor. España: Recuperado de: <http://patentados.com/patente/fotobiorreactor/>

- Ruangsomboona, S. y Wongrat, L. (2006). Bioaccumulation of cadmium in an experimental aquatic food chain involving phytoplankton (*Chlorella vulgaris*), zooplankton (*Moina macrocopa*), and the predatory catfish *Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*. *Aquatic Toxicology* 78(1), Recuperado el 16 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16504313>
- Sánchez-Camazano, M., Sánchez-Martin, M., Lorenzo, L. (1994). Lead and cadmium in soils and vegetables from urban gardens of Salamanca (Spain). *The Science of the Total Environment*. 146(1), Recuperado el 24 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8016634>
- SIB. (s.f.). Taxonomía para *Chlorella* sp. Recuperado de: <http://www.sib.gov.ar/taxonomia/genero/chlorella>
- Song, W., Rashid, N., Choi, W., Lee, K. (2011). Biohydrogen production by immobilized *Chlorella* sp. using cycles of oxygenic photosynthesis and anaerobiosis. *Bioresource Technology*. 102(1), Recuperado el 23 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398113>
- Stevenson, J., Bothwell, M. y Lowe, R. (1996). Algal Ecology Freshwater Benthic Ecosystems. USA: Elsevier. Recuperado el 28 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780126684506>
- Torres, E., Mera, R., Herrero, C., Abalde, J.(2014). Isotherm studies for the determination of Cd (II) ions removal capacity in living biomass of a microalga with high tolerance to cadmium toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(22), Recuperado el 21 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24954392>
- Tsekova, K., Todorova, D., Ganeva, S. (2010). Removal of heavy metals from industrial wastewater by free and immobilized cells of *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64(1), Recuperado el 28 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483051000079X>

- Valarezo, S. (2014). Evaluación de la distribución del contenido total y biodisponibles de los metales pesados, Cu, Cd, Pb y Hg en sedimentos superficiales del estero de Santa Rosa, Provincia de El Oro, Ecuador. Universidad Técnica de Machala.
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y. (2010). Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. In Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied Biochemistry Biotechnology*. 162(4), Recuperado el 23 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19937154>
- Wolkers, H., Barbosa, M., Kleinegris, D., Bosma, R. y Wijffels, R. (2011). Microalgae: the Green gold of the future. Wageningen UR.
- Yang, J., Cao, J., Xing, G., Yuan, H. (2015). Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology*. 175(1), Recuperado el 31 de enero de 2017 de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852414015569>
- Yu, R. y Wang, W. (2004). Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*. 129(1), Recuperado el 26 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016465>
- Zayadan, B., Savakasova, A., Hassan, M. y Beisenova, A. (2013). Biorremediation of heavy metal contaminated water by microalgae. *International Journal of Biology and Chemistry*. 5(1), Recuperado el 13 de febrero de 2017 de <http://ijbch.kaznu.kz/index.php/kaznu/article/view/77>
- Zeraatkar, A., Ahmadzadeh, H., Talebi, A., Moheimani, N., McHenry, M. (2016). Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management*. 181(1), Recuperado el 31 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093099>

Zhou, J., Huang, P., Lin, R. (1998). Sorption and desorption of Cu and Cd by macroalgae and microalgae. *Environmental Pollution*. 101(1), Recuperado el 30 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15093099>

