

# UNIVERSIDAD PERUANA UNIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



*Una Institución Adventista*

Aplicación de biomasa de microalga deshidratada para bioabsorción de Plomo en soluciones acuosas a escala laboratorio.

Por:

Jhonatan Leiva Colos

Asesora:

Mg. Milda Amparo Cruz Huaranga

**Lima, Marzo de 2020**

## **DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA DEL INFORME DE TESIS**

Mg. Milda Amparo Cruz Huaranga, de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura,  
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental, de la Universidad Peruana Unión.

DECLARO:

Que el presente informe de investigación titulado: “APLICACIÓN DE BIOMASA DE MICROALGA DESHIDRATADA PARA BIOABSORCIÓN DE PLOMO EN SOLUCIONES ACUOSAS A ESCALA LABORATORIO” constituye la memoria que presenta el Bachiller Jhonatan Leiva Colos para aspirar al título Profesional de Ingeniería Ambiental, cuya tesis ha sido realizada en la Universidad Peruana Unión bajo mi dirección.

Las opiniones y declaraciones en este informe son de entera responsabilidad del autor, sin comprometer a la institución.

Y estando de acuerdo, firmo la presente declaración en Lima, a los 21 días de Julio del año 2020.



Mg. Milda Amparo Cruz Huaranga

Aplicación de biomasa de microalga deshidratada para bioabsorción  
de Plomo en soluciones acuosas a escala laboratorio

# TESIS

Presentada para optar el Título profesional de Ingeniero Ambiental

## JURADO CALIFICADOR



Ph.D. Leonor Segunda Bustinza Cabala  
**Presidenta**



Mg. Jackson Edgardo Perez Carpio  
**Secretario**



Ph.D. Alex Rubén Huamán De La Cru  
**Vocal**



Mg. Joel Hugo Fernández Rojas  
**Vocal**



Mg. Milda Amparo Cruz Huaranga  
**Asesora**

Lima, 11 de marzo de 2020

## **DEDICATORIA**

A Dios, la fuente de sabiduría y entendimiento para hacer realidad un proyecto más en mi vida profesional. A mis padres Victoria Colos Roca y Eddy Leiva Damián, por ser los pilares y el más importante soporte de la vida, quiénes me brindaron su apoyo incondicional en la realización de ésta investigación. A mis queridos hermanos Joel Eddy Leiva Colos y Flor Victoria Leiva Colos, quiénes me motivaron a alcanzar este logro. Y a Bonifacia Roca Colos que ya descansa en el Señor, mi querida, amada abuelita y segunda madre, quién con sus sabios consejos desde mi niñez me impulsó a dirigir mis pasos a Dios.

*Jhonatan Leiva Colos*

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, agradezco a Dios, por ser creador de todo lo que existe ya través de su voluntad se pudo lograr éste objetivo en mi vida.

Gratitud a mis padres y familiares, Eddy Leiva Damián y Victoria Colos Roca quienes incondicionalmente me apoyaron y respaldaron en todos los aspectos; a Joel y Flor, mis hermanos quienes me motivaron y apoyaron en todo el proceso de mi vida universitaria, éste logro no sería posible sin ellos.

Un agradecimiento muy especial a la Ing. MSc. Milda Amparo Cruz Huaranga y al Ing. PhD Noé Pampa Quispe quienes fueron mis asesores y siempre nos mostraron su apoyo incondicional en todo momento, desde el proyecto hasta el trayecto final. Mil gracias por compartir sus conocimientos, incentivar a la investigación y por su grata amistad.

De la misma manera, a los docentes Hugo Fernández, Alex Huamán de la Cruz y Ginnie Díaz gracias por su apoyo, su tiempo, dedicación y motivación en cada momento. A la Ing. PhD Cecil Tenorio y la Laboratorista Hanna del Instituto del Mar del Perú quienes me brindaron sus conocimientos para la producción de microalgas, gracias por su apoyo.

A mis queridos amigos, Nixso Casas, Mariana Briones, Juan Tenorio, Jorge Rivas, Raquel Cabrera, Richar Cayo, Yoxmara Vásquez, Claudia Montalvo, Miguel Lujan, Galdys Barrantes, Diego Mamani, July Quiroz, Sayda Araujo, Jessica Araujo, Renato Aquisé, Iván Echabaudes, Andrés López, Sabrina Murrieta, Richar Vásquez, Julio César Yucra, Juan Carlos Yucra que durante la etapa de la universidad y viajes nos conocimos, gracias por compartir su amistad y su motivación constante en el desarrollo de ésta tesis. Asimismo, a todas las personas que mostraron su apoyo incondicional y por siempre, gracias por sus palabras de ánimo y motivación en cada momento.

## ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA .....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE GENERAL.....</b>	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS .....</b>	<b>xiv</b>
<b>SIMBOLOGÍA .....</b>	<b>xvii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xx</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Identificación del Problema .....	1
1.2. Justificación de la Investigación .....	3
1.3. Presuposición filosófica .....	5
1.4. Objetivo General .....	5
1.5. Objetivos Específicos .....	6
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>7</b>
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA .....</b>	<b>7</b>
2.1. Antecedentes .....	7
2.1.1. Internacionales .....	7
2.1.2. Nacionales .....	12
2.2. Metales pesados .....	14
2.3. Plomo.....	17
2.3.1. Origen del plomo .....	17
2.3.2. Vías de exposición al plomo.....	17
2.3.3. Principales impactos del plomo en la salud .....	19
2.3.4. Principales impactos del plomo en el ambiente .....	19

<b>2.4.</b>	<b>Modelo conceptual de exposición al plomo</b>	<b>21</b>
<b>2.5.</b>	<b>Movilización natural de los metales pesados hacia las fuentes hídricas</b>	<b>22</b>
<b>2.6.</b>	<b>Tecnologías para la eliminación de metales pesados</b>	<b>23</b>
2.6.1.	Métodos tradicionales para la remoción de metales pesados en el agua	23
2.6.2.	Métodos biológicos para la remoción de metales pesados en el agua	27
<b>2.7.</b>	<b>Microalgas</b>	<b>28</b>
2.7.1.	Las microalgas y su potencial en la remoción de metales pesados	28
2.7.2.	Aplicación de biomasa muerta versus biomasa viva	29
2.7.3.	Tipos de Microalgas	29
2.7.4.	Mecanismos de eliminación de metales pesados adaptados por microalgas	31
2.7.5.	Bioabsorción por biomasa de microalgas	32
2.7.6.	Importancia de los grupos funcionales en la bioabsorción de metales pesados	33
2.7.7.	Factores que influyen en la remoción de metales pesados por microalgas	34
<b>CAPÍTULO III</b>		<b>39</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>3.1.</b>	<b>Lugar de ejecución</b>	<b>39</b>
<b>3.2.</b>	<b>Características climatológicas</b>	<b>40</b>
<b>3.3.</b>	<b>Materiales, insumos y equipos</b>	<b>41</b>
<b>3.4.</b>	<b>Metodología</b>	<b>42</b>
3.4.1.	Adquisición y producción de Microalgas	43
3.4.2.	Recuperación de la biomasa de microalgas	46
3.4.3.	Preparación de las soluciones de plomo	47
3.4.4.	Ensayos de bioabsorción a escala de laboratorio	48
3.4.5.	Análisis de la concentración final de plomo	50
<b>3.5.</b>	<b>Variables en estudio</b>	<b>50</b>
3.5.1.	Variables independientes	50

3.5.2. Variables dependientes-----	50
<b>3.6. Diseño de la investigación-----</b>	<b>50</b>
<b>3.7. Análisis estadístico -----</b>	<b>54</b>
3.7.1. Anova -----	54
3.7.2. Diagrama de Pareto -----	54
3.7.3. Estimación de efecto y coeficiente de regresión -----	55
<b>CAPITULO IV.....</b>	<b>56</b>
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>4.1. Caracterización inicial del agua-----</b>	<b>56</b>
<b>4.2. Análisis de los resultados obtenidos Post – Tratamiento-----</b>	<b>57</b>
4.2.1. Resultados de la Concentración final de Plomo (CFP) mediante el Diseño Box - Behnken-----	57
4.2.2. Análisis de Varianza para la Concentración Final de Plomo (CFP) -----	58
4.2.3. Análisis de Pareto para la Concentración Final de Plomo (CFP) -----	59
4.2.4. Estimaciones del efecto para la Concentración Final de Plomo (CFP)-----	61
4.2.5. Resultados del coeficiente de regresión para la Concentración Final de Plomo (CFP) -----	61
4.2.6. Interacción de las variables Microalgas (M) y Concentración inicial de plomo (CIP) 63	
4.2.7. Interacción de las variables Potencial de hidrógeno (pH) y Microalgas (M) -	67
4.2.8. Interacción de la Concentración inicial de Plomo (CIP) y el Potencial de hidrógeno (pH) -----	70
<b>4.3. Resultados de la Remoción de Plomo (RPb) mediante el Diseño Box – Behnken-----</b>	<b>72</b>
4.3.1. Resultados de la varianza (ANOVA) para la Remoción de Plomo (RPb) ----	73
4.3.2. Estimaciones del efecto para la Remoción de Plomo (RPb) -----	74
4.3.3. Resultados de regresión para la Remoción de Plomo (RPb) -----	75
4.3.4. Interacción de las variables Concentración inicial de plomo (CIP) y microalgas (M)-----	76



4.3.5.	Interacción de las variables Potencial de Hidrógeno (pH) y Microalgas (M)	79
4.3.6.	Interacción de las variables Concentración Inicial de Plomo (CIP) y Potencial de Hidrógeno (pH)	82
<b>4.4.</b>	<b>Correlación de Bioabsorción</b>	<b>85</b>
<b>4.5.</b>	<b>Con Respecto los ECAs y LMPs</b>	<b>85</b>
<b><i>CAPITULO V</i></b>		<b><i>87</i></b>
<b>5.</b>	<b><i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i></b>	<b><i>87</i></b>
<b>5.1.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>87</b>
<b>5.2.</b>	<b>Recomendaciones</b>	<b>88</b>
<b><i>REFERENCIAS</i></b>		<b><i>89</i></b>
		<b>98</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Los metales pesados clasificados según su densidad, peso atómico y número atómico.....</i>	<i>16</i>
<i>Tabla 2. Ventajas y desventajas de los principales tratamientos para el tratamiento de las aguas contaminadas por metales pesados.....</i>	<i>26</i>
<i>Tabla 3. Materiales utilizados en el desarrollo de la investigación. ....</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 4. Insumos utilizados en la investigación.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 5. Equipos empleados en el desarrollo de la investigación. ....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 6. Factores y niveles del Diseño experimental Box - Behnken.....</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 7. Variables independientes del diseño experimental Box - Behnken .....</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 8. Análisis de caracterización del agua - Concentración Inicial de Plomo (Pb) .....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 9. Resultados de la Concentración final de Plomo (CFP).....</i>	<i>57</i>
<i>Tabla 10. Resultados de la varianza (ANOVA) para la Concentración Final de Plomo (CFP) mediante el diseño Box - Behnken. ....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 11. Resultados de las estimaciones de efecto para la concentración final de Plomo (CFP).....</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 12. Resultados del coeficiente de regresión para la Concentración final de Plomo (CFP).....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 13. Resultados de la remoción de Plomo (RPb).....</i>	<i>72</i>
<i>Tabla 14. Resultados de la varianza (ANOVA) para la Remoción de Plomo (RPb) .....</i>	<i>73</i>
<i>Tabla 15. Resultados de las estimaciones de efecto para la Remoción de Plomo (RPb).....</i>	<i>74</i>

<i>Tabla 16. Resultados del coeficiente de regresión para la Remoción de Plomo (RPb).</i> .....	75
<i>Tabla 17. Resumen de los ensayos de bioabsorción.</i> .....	86

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Vías de exposición a metales pesados. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2. Movilización natural de los metales pesados por acción del agua y el viento.....</i>	<i>22</i>
<i>Figura 3. Representación esquemática de bioabsorción de metales pesados por microalgas. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 4. Mapa de ubicación geográfica del Distrito Lurigancho - Chosica.....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 5. Ubicación del Laboratorio de Monitoreo Ambiental.....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 6. Diagrama de Flujo de la Investigación. ....</i>	<i>43</i>
<i>Figura 7. Nitrato de Plomo utilizado en los ensayos de bioabsorción. ....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 8. Gráfica representativa de la metodología superficie de respuesta (MSR). (Escalante, 2006). ....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 9. Diagrama de Pareto para el Diseño experimental Box - Behnken, donde se muestra la significancia y el efecto de los factores evaluados (componentes de las mezclas para la adsorción de Plomo) considerando un <math>\alpha=0.05</math>. ....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 10. Superficie de respuesta de las variables Concentración inicial de Plomo (CIP) y Microalgas (M) para la Concentración Final de Plomo (CFP). ....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 11. Gráfica de contorno de las variables Concentración inicial de Plomo (CIP) y Microalgas (M) para la Concentración Final de Plomo (CFP). ....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 12. Superficie de respuesta de las variables M y pH para la CFP. ....</i>	<i>67</i>
<i>Figura 13. Gráfica de contorno de las variables M y pH para la CFP.....</i>	<i>68</i>
<i>Figura 14. Superficie de respuesta de las variables pH y CIP para la CFP. ....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 15. Gráfica de contorno de las variables pH y CIP para la CFP.....</i>	<i>71</i>
<i>Figura 16. Superficie de respuesta de las variables M y CIP para la RPb ..... </i>	<i>76</i>
<i>Figura 17. Gráfica de contorno de las variables M y CIP para la RPb. ....</i>	<i>77</i>

<i>Figura 18. Superficie de respuesta de las variables M Y pH para la RPb. ....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 19. Gráfica de contorno de las variables M y pH para las variables RPb..</i>	<i>80</i>
<i>Figura 20. Superficie de respuesta de las variables pH y CIP para la RPb.....</i>	<i>82</i>
<i>Figura 21. Gráfica de contorno de las variables pH Y CIP para la RPb. ....</i>	<i>83</i>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1. Inóculo de Chlorella Vullgaris obtenido del Instituto del Mar del Perú...</i>	98
<i>Anexo 2. Primera siembra de microalgas.....</i>	98
<i>Anexo 3. Preparación de solución de Bay Folan.....</i>	98
<i>Anexo 4. Primera Siembra de microalgas con exposición a luz LED.....</i>	98
<i>Anexo 5. Medio de cultivo Bay Folan e inóculo de microalgas a sembrar.....</i>	99
<i>Anexo 6. Muestra de microalgas después de 7 días de cultivo.....</i>	99
<i>Anexo 7. Inóculo cultivado de tercera siembra en el día 7. ....</i>	99
<i>Anexo 8. Inóculo cultivado de la tercera siembra a mitad de semana.....</i>	99
<i>Anexo 9. Siembra de microalgas en vaso precipitado de un litro. ....</i>	100
<i>Anexo 10. Siembra de microalgas en probetas de un litro. ....</i>	100
<i>Anexo 11. Siembra en dos probetas de Litro después de los siete días de cultivo. .....</i>	100
<i>Anexo 12. Preparación de medio Bay Folan en un vaso precipitado de un litro.</i>	100
<i>Anexo 13. Siembra de microalgas en cinco probetas de dos litros cada una. ...</i>	101
<i>Anexo 14. Bay Folan utilizado como medio para la producción de microalgas..</i>	101
<i>Anexo 15. Siembra de microalgas con luz LED durante la noche.....</i>	101
<i>Anexo 16. Cultivo de microalgas en 5 probetas de 2 litros con luz LED. ....</i>	101
<i>Anexo 17. Preparación de Soluciones de plomo de 22, 46 y 70 mg/L. ....</i>	102
<i>Anexo 18. Nitrato de Plomo.....</i>	102
<i>Anexo 19. Siembra de microalgas con 4 probetas de 2 litros y 4 probetas de un litro. ....</i>	102
<i>Anexo 20. Biomasa de microalga tamizada en la malla 100. ....</i>	103
<i>Anexo 21. Agitación de Nitrato de Plomo en agua destilada 800 RPM.....</i>	103
<i>Anexo 22. Muestras de las soluciones de 22, 46 y 70 mg/L. ....</i>	103

<i>Anexo 23. Una muestra de microalga obtenida para los ensayos de absorción.</i>	104
<i>Anexo 24. Tamiz con malla 100 utilizado para cernir la biomasa seca de microalgas.</i>	104
<i>Anexo 25. Muestras de biomasa que se utilizaron en los ensayos de bioabsorción.</i>	104
<i>Anexo 26. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 2).</i>	105
<i>Anexo 27. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 1).</i>	105
<i>Anexo 28. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 6).</i>	105
<i>Anexo 29. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 3).</i>	105
<i>Anexo 30. Cerámica instalada sobre el matraz kitasato para el proceso de filtrado.</i>	106
<i>Anexo 31. Bomba de succión del Laboratorio de Monitoreo de suelos de Ingeniería Ambiental.</i>	106
<i>Anexo 32. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 16).</i>	106
<i>Anexo 33. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 8).</i>	106
<i>Anexo 34. Añadido de muestras al filtro Whatman en la cerámica.</i>	107
<i>Anexo 35. Control del pH de las soluciones de plomo antes del ensayo de bioabsorción.</i>	107
<i>Anexo 36. Ácido cítrico, Hidróxido de Sodio y Ácido nítrico para amortiguar el pH y preservar las muestras.</i>	107
<i>Anexo 37. Sobrante de biomasa después del filtrado.</i>	108
<i>Anexo 38. Instalación de bomba de vacío para el filtrado de las muestras de agua tratadas.</i>	108
<i>Anexo 39. Ajuste del pH en la solución de plomo antes de la bioabsorción.</i>	108
<i>Anexo 40. Residuo de biomasa contaminada con plomo después del filtrado.</i>	109

<i>Anexo 41. Frascos contenidos con las muestras para llevarse a Delta Lab. ....</i>	<i>109</i>
<i>Anexo 42. Preservación de muestras con Ácido Nítrico y control con pHmetro. ....</i>	<i>109</i>
<i>Anexo 43. Muestras listas para llevarse a analizar. ....</i>	<i>110</i>
<i>Anexo 44 Observación de las microalgas por el método de Microscopia – ejemplo 1. ....</i>	<i>111</i>
<i>Anexo 45 Observación de Microalgas por el método de Microscopía - ejemplo 2. ....</i>	<i>111</i>
<i>Anexo 46. Resultados obtenidos del laboratorio Delta Lab para las soluciones de plomo. ....</i>	<i>112</i>
<i>Anexo 47. Resultados obtenidos del Laboratorio Delta Lab para la concentración final de plomo. ....</i>	<i>113</i>
<i>Anexo 48 Documento de Entrega de Cepa de la microalga Chlorella Vulgaris del IMARPE.....</i>	<i>114</i>



## SIMBOLOGÍA

**CIP:** Concentración inicial de Plomo

**CFP:** Concentración final de Plomo

**pH:** Potencial de Hidrógeno

**M:** Microalgas

**CV:** *Chlorella Vullgaris*

**DL:** DeltaLab S.A.C.

**ECA:** Estándares de Calidad Ambiental

**LMP:** Límites Máximos Permisibles

**Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>:** Nitrato de Plomo

**C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>:** Ácido cítrico

**NaOH:** Hidróxido de Sodio

**HNO<sub>3</sub>:** Ácido Nítrico

**BF:** Bay Folan

**%R:** Porcentaje de remoción

**MP:** Metal Pesado

**Pb:** Plomo

**DEBB:** Diseño Experimental Box Behnken

**ANOVA:** Análisis de Varianza

**Mg/L:** Miligramos por litro

**G/L:** Gramos por litro

**N:** Concentración Normal

**Min:** Minutos

**RPM:** Revoluciones por minuto

**RPb:** Remoción de Plomo o Remociones de Plomo

**1Lby2L:** (1) Microalgas (g/L) (L) con (2) Concentración inicial de Plomo (mg/L) (L)

**2Lby3L:** (2) Concentración inicial de Plomo (mg/L) (L) con (3) Potencial de Hidrógeno (L)

**1Lby3L:** (1) Microalgas (g/L) (L) con (3) Potencial de Hidrógeno (L)

## RESUMEN

La presente investigación se desarrolló con el objetivo de remover iones de plomo total mediante biomasa de la microalga *Chlorella Vullgaris* deshidratada. La obtención de la biomasa deshidratada, se realizó mediante cultivo en soluciones acuosas, utilizando como medio de cultivo Bay Folan a concentración 1 ml/L, a fotoperiodo de 12 horas e inyección de oxígeno durante el horario diurno a temperatura ambiente. Por otro lado, los ensayos de bioabsorción se realizaron colocando en contacto 1.5, 2 y 2.5 mg/L de biomasa seca de *Chlorella Vullgaris* con soluciones de plomo total a concentraciones de 22, 46 y 70 mg/L y ajustando el pH a 3, 5 y 7 durante 20 minutos. Todos los ensayos fueron sometidos a una velocidad de agitación de 200 RPM, a temperatura ambiente de 21°C y el pH ajustado conforme a lo establecido por el diseño estadístico Box Behnken. En cuanto a los ensayos con muestras de agua contaminada con plomo sometidas a agitación, se determinó que la dosis óptima de microalgas, pH, y concentración inicial de plomo para el proceso de bioabsorción, fueron 1.5 g/L, 7 y 50 mg/L, respectivamente; alcanzando reducir la concentración de este metal disuelto en el agua, hasta 1.28 mg/L, valor que representa al 2.83% de la concentración inicial. Finalmente, la biomasa deshidratada de *Chlorella Vullgaris*, presentó una eficiencia entre un 27.6% y 97.2% de bioabsorción de plomo total y los datos experimentales mostraron que el tipo de bioabsorción que predominó fue de tipo pasivo, el cual indica que el proceso de remoción de éste metal es independiente del ciclo metabólico biológico y por ende es un tipo de bioacumulación de metal en microorganismos. Los resultados de la obtención de la biomasa deshidratada de *Chlorella Vullgaris* y su aplicación en el agua contaminada con plomo indicaron que es un microorganismo capaz de remover eficientemente plomo total disuelto en el agua.

**Palabras clave:** bioabsorción, plomo, *Chlorella Vullgaris*, biomasa, microalga.

## ABSTRACT

The present investigation was developed with the objective of removing total lead ions by means of biomass from the dehydrated *Chlorella Vullgaris* microalgae. The dehydrated biomass was obtained by cultivating in aqueous solutions, using Bay Folan at 1 ml/L concentration, 12-hour photoperiod and oxygen injection during the daytime at room temperature. On the other hand, the bioabsorption tests were carried out by contacting 1.5, 2 and 2.5 g/L of dry biomass of *Chlorella Vullgaris* with total lead solutions at concentrations of 22, 46 and 70 mg/L and adjusting the pH to 3, 5 and 7 for 20 minutes. All the tests were subjected to a stirring speed of 200 RPM, at room temperature of 21 ° C and the pH adjusted as established by the Box Behnken statistical design. Regarding the tests with samples of water contaminated with lead subjected to agitation, it was determined that the optimal dose of microalgae, pH, and initial concentration of lead for the bioabsorption process, were 1.5 g/L, 7 and 50 mg/L, respectively; reaching reduce the concentration of this metal dissolved in the water, up to 1.28 mg/L, a value that represents 2.83% of the initial concentration. Finally, the dehydrated biomass of *Chlorella Vullgaris* presented an efficiency between 27.6% and 97.2% of total lead bioabsorption and the experimental data showed that the type of bioabsorption that predominated was a passive type, which indicates that the removal process of this metal is independent of the biological metabolic cycle and therefore is a type of bioaccumulation of metal in microorganisms. The results of obtaining the dehydrated biomass of *Chlorella Vullgaris* and its application in the water contaminated with lead indicated that it is a microorganism capable of efficiently removing total lead dissolved in the water.

**Keywords:** bioabsorption, lead, *Chlorella Vullgaris*, biomass, microalgae.

## **CAPITULO I**

### **1. INTRODUCCIÓN**

#### **1.1. Identificación del Problema**

La liberación de metales pesados en el medio natural, tiene un marcado efecto sobre la salud (Antonio & Lamphar, 2013). Precisamente, el plomo es y siempre ha sido, un componente omnipresente del medio ambiente y está presente universalmente en el hombre y en los alimentos en pequeñas cantidades. Se ha dicho que las reservas explotables de plomo de la tierra suman alrededor de cien millones de toneladas. A través de la erosión de estos depósitos minerales, en los que el plomo está presente principalmente como mineral de sulfuro, galena, y a través de las emisiones de los volcanes activos, se estima que alrededor de 210,000 toneladas de plomo se liberan anualmente al medio ambiente. Entonces, desde antes de que el hombre comenzara a extraer plomo, hace muchos siglos, el plomo ha estado presente en el suelo, ríos, lagos y océanos y en el aire sobre ellos como resultado de estos procesos naturales (Cook, 1977).

Por otro lado existen algunas actividades que conducen al enriquecimiento del plomo y otros metales pesados en el medio ambiente acuático, estos incluyen: meteorización geológica natural, así como el procesamiento industrial humano, la explotación minera, la fundición y la industria metalúrgica, la industria química, la impresión textil y la tinción de zinc, la fabricación de plásticos, pinturas y neumáticos, plantas de energía, combustión de gasolina y combustibles fósiles, vetaría, refinación de petróleo, producción de cemento y cerámica, producción de acero, industrias agroquímicas y de alimentación animal, galvano plastias, papel y pulpa, preparación de aleaciones, hilo de rayón de viscosa y producción de fibra (Freitas, Martins, Matos, & Boaventura, 2008). Entre los datos más alarmantes, el Instituto de

Sanimetría y Evaluación Sanitaria ha estimado que, según datos de 2017, la exposición al plomo causó 1,06 millones de defunciones nivel mundial (OMS, 2019).

En éste sentido, el Perú no es ajeno la presencia del plomo, puesto que es un país con abundante explotación de la industria minera y es considerado el cuarto productor de éste importante mineral, estando expuesto a la contaminación ambiental formal e informal, así como a los residuos generados de ésta actividad, los conocidos relaves mineros (Banco Mundial, 2005).

Es preciso mencionar que, durante la historia de éste país, se han reportado muchos casos de contaminación por plomo, con efectos en la salud pública y el medio ambiente. Castro, Chirinos y Ríos (2013); Espinoza et al. (2003); Ramírez, Paucar y Medina (1997) hallaron la presencia de altos niveles plomo en la sangre de un grupo de personas aleatorias en las ciudades de Lima, la Oroya, Huancayo y Yaupi, confirmando así que los habitantes de estas ciudades guardan relación con la presencia de industrias y la densidad poblacional de cada localidad.

Otros estudios en diversas comunidades de la ciudad minera de Cerro de Pasco (Chaupimarca, Ayapoto y Paragsha) demostraron que el 53% de niños y aproximadamente el 9% de mujeres en edad fértil mostraban intoxicación por metales pesados con niveles de plomo en sangre por encima de 10 ug/dL (Ramos et al., 2009). Igualmente, dos estudios de comparación entre sujetos varones adultos de Lima y Cerro de Pasco muestran mayores niveles de plomo en sangre en varones de la ciudad de Cerro de Pasco, distribuidos entre mineros y no mineros (G Gonzales, Lozano, Gasco, Tapia, & Gonzales, 2012; Gustavo Gonzales, Gasco, Tapia, & Gonzales, 2009).

Cabe resaltar que, hasta la actualidad se han llevado a cabo grandes investigaciones sobre el uso de tecnologías para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados

y entre los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con presencia de metales pesados, se incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membranas y recuperación por evaporación (Cañizares, 2000); sin embargo, estas no son económicas y pueden generar grandes cantidades de lodo químico tóxico, por lo que en los últimos años se ha dado relevancia al uso de técnicas no convencionales como: la fitorremediación, la adsorción, el uso de biopolímeros, la hidrogeles, ceniza volante, entre otros (Caviedes, Muñoz, Perdomo, Rodriguez, & Sandoval, 2015). Respecto a lo antes, es necesario recalcar también que el tratamiento por métodos convencionales carecen de eficiencia, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja; por otro lado las técnicas no convencionales ofrecen la posibilidad de hacerlo mejor y a menor costo (Cañizares, 2000).

La biosorción o absorción por de metales pesados por parte de la biomasa microbiana o vegetal no viva metabólicamente inactiva se considera una tecnología innovadora y alternativa utilizada para extraer estos contaminantes de soluciones acuosas (Depa & Suresha, 2014 y Saravanan, Brindha, & Krishnan, 2011). *Chlorella Vullgaris* es una alga verde unicelular planctónica que se puede cultivar en aguas dulces y marinas, para luego ser utilizada como recurso alimentario o en la industria cosmética, acuicultura, industria farmacéutica, etc., debido a sus numerosos beneficios a la salud y se puede utilizar para eliminar varios iones de metales pesados del agua contaminada en simultáneo (Aung, Hlaing, & Aye, 2008).

En este sentido, el propósito de la presente investigación fue remover iones de Plomo total por bioabsorción mediante la aplicación de biomasa de microalga deshidratada.

## **1.2. Justificación de la Investigación**

El trabajo de investigación será relevante porque se dará a conocer tres niveles de contaminación de plomo en el agua y la importancia de mejorar la calidad del recurso hídrico

para evitar los efectos de estos contaminantes principalmente en la salud pública y el medio ambiente.

Asimismo, el presente estudio es importante a nivel teórico debido a que permitirá reforzar los conocimientos ya existentes, también presentará información actualizada sobre las variables en estudio, puesto que se buscará hallar la asociación entre el pH, la cantidad óptima de microalgas y su influencia sobre los tres diferentes niveles de contaminación de plomo, asimismo el tipo de remoción relacionado a la bioabsorción.

A nivel social, los resultados de la investigación permitirán que autoridades de la gestión hídrica nacional, regional y local, así como las empresas operadoras de plantas de tratamiento de agua prioricen la construcción de plantas con tratamiento biológico, utilizando células de microalgas *Chlorella Vullgaris* u otras similares, sobre todo en zonas con presencia similar de contaminación por plomo en el agua y de ésta manera proveer a la sociedad calidad de agua para fines de consumo humano, recreación, riego y conservación del agua. Asimismo, permitirá ejecutar proyectos de sensibilización sobre la toxicidad del plomo y evitar el consumo de agua subterránea en zonas cercanas a proyectos mineros principalmente.

A nivel cultural, permitirá conocer acerca de la preservación del agua, un recurso que trasciende las épocas y culturas, que en el pasado no solo fue considerado un recurso, sino como un emblema que debe cuidarse en las localidades. Asimismo, se brindará información sobre la utilización de las microalgas como un recurso presente en aguas dulces y a nivel cultural se desconoce aún la presencia de estos organismos, los cuales se pueden obtener en los ríos alto andinos, lagunas y el mar para utilizarse como medio de tratamiento de agua contaminada por metales pesados.

A nivel económico, la masa biológica deshidratada de la microalga *Chlorella Vullgaris*, es un medio de tratamiento de bajo costo, ya que no se requiere grandes inversiones para su obtención, producción y utilización comparado con los tratamientos convencionales.



Finalmente, esta investigación generará apertura a futuros estudios nacionales e internacionales para comparar resultados de acuerdo al lugar donde se realicen éstas, además servirá como base para realizar propuestas de tratamiento de aguas superficiales contaminadas por metales pesados o cuándo se tengan indicios de este tipo de impacto ambiental.

### **1.3. Presuposición filosófica**

El desarrollo minero principalmente, en sus variadas formas ha ido incrementándose a nivel mundial generando efectos más negativos que positivos, sin considerar la repercusión que trae verter relaves o residuos líquidos acumulados en su mayor cantidad de metales pesados, que en efecto siempre ha generado problemas a pequeña y grande escala poblacional. Por otro lado, la acumulación de metales pesados ha repercutido también en toda la clasificación de los seres vivos del orden animal. Claramente el hombre hasta la actualidad carece de la capacidad de gestión ambiental eficiente. Dios en su infinita misericordia nos ha otorgado los recursos naturales aún tras la entrada del pecado en éste mundo, siendo estos, los suficientes para nuestra existencia como lo menciona el libro de Filpenses 4:19.

En la actualidad, se conocen muchos ejemplos de contaminación por metales pesados generados por la industria minera, por ello el compromiso del investigador cristiano en materia medioambiental debe ser de mantenerse como un mayordomo fiel, mostrar y ejecutar metodologías de gestión a través del cuidado de la salud y la restauración de la creación de Dios, ya que todo ser vivo lo necesita, como lo afirma el texto de Romanos 8:19.

### **1.4. Objetivo General**

Evaluar la remoción iones de Plomo total por bioabsorción mediante la aplicación de biomasa de microalga deshidratada.

### 1.5. Objetivos Específicos

- Obtener biomasa deshidratada de la microalga *Chlorella Vullgaris* apartir de su producción en soluciones acuosas.
- Determinar las concentraciones óptimas de las variables microalgas, pH y concentración inicial de Plomo en el proceso de absorción de iones de Plomo total presentes en soluciones acuosas.
- Determinar la eficiencia de la microalga *Chlorella Vullgaris* obtenida a partir de su producción a escala de laboratorio en la absorción de iones de Plomo total en soluciones acuosas.

## CAPÍTULO II

### 2. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. Antecedentes

##### 2.1.1. Internacionales

Klimmek, Stan, Wilke, Bunke & Buchholz (2001) examinaron treinta cepas de algas para determinar su capacidad de biosorción en la absorción de cadmio, plomo, níquel y zinc de una solución acuosa. Los cultivos de algas se obtuvieron de la colección de cepas de algas en Göttingen (SAG) y la colección de cepas en el Instituto de Biotecnología, Universidad Técnica de Berlín (ISA). Las células de algas frescas se cosecharon por centrifugación, posteriormente se lavaron con agua destilada y se liofilizaron. La biomasa liofilizada se molió en un mortero y se tamizó hasta un tamaño de partícula de 25<sup>o</sup> µm como máximo. Se prepararon patrones metálicos de absorción atómica (1000 ppm).

Se pudo observar una amplia gama de capacidades de adsorción entre las diferentes cepas de algas y entre los cuatro metales. La *cyanophyceae Lyngbya taylorii* exhibió altas capacidades de absorción para los cuatro metales. Asimismo, las algas mostraron capacidades máximas según el modelo de adsorción de Lagmuir de 1,47 mmol de plomo, 0,37 mmol de cadmio, 0,65 mmol de níquel y 0,49 mmol de zinc por gramo de biomasa seca. El pH óptimo para *L. taylorii* estuvo entre 3 y 7 para plomo, cadmio y zinc y entre 4 y 7 para níquel. Los estudios con las algas indicaron una preferencia por la absorción de plomo sobre cadmio, níquel y zinc en una solución de cuatro metales. Las capacidades de unión a metales de *L. taylorii* podrían mejorarse mediante la fosforilación de la biomasa. El biosorbente modificado demostró capacidades máximas de 2.52 mmol de cadmio, 3.08 mmol de plomo, 2.79 mmol de níquel y 2.60 mmol de zinc por gramo de biomasa seca. Las investigaciones con *L. taylorii* fosfatado indicaron altas capacidades para los cuatro metales también a pH bajo. Finalmente, la selectividad se mantuvo bastante similar a las algas no modificadas.

Aksu & Kutsal (1990) investigaron la cinética de la biosorción de iones de Cu (II), Zn (II), Fe (II), Cr (VI) y Pb (II) existentes en aguas residuales con la microalga *Chlorella Vulgaris* en un reactor por lotes agitado. En los estudios de bioabsorción de dichos iones metálicos, las temperaturas óptimas de adsorción y los valores iniciales de pH para cada ion fueron determinados en 25°C, 35°C, 25-35°C, 35-50°C, 35°C y pH 4.0-4.5, 4.0-4.5, 1.0-2.0, 1.5-2.0, 5.0 respectivamente. Las concentraciones iniciales de iones metálicos de 200 ppm dieron las tasas de adsorción más altas para la mayoría de iones metálicos. Se encontraron constantes de adsorción de Freundlich y grados de adsorción correspondientes a las isothermas de adsorción de Freundlich que se constituyen a 25°C.

Seno et al. (2011) estudiaron la bioabsorción de  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  por biomasa seca de *Arthrospira (Spirulina) platensis* y *Chlorella Vulgaris* en función del tiempo de contacto y la concentración inicial de metales. Las microalgas se cultivaron por lotes en un fotobiorreactor tubular a  $82 \pm 5$  mol fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  bajo control de pH mediante la adición diaria de  $\text{CO}_2$  puro. *C. Vulgaris* se cultivó en el medio basal de Bold a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y  $\text{pH } 7.0 \pm 0.5$ . Al cabo de 20 días de fase estacionaria las células se centrifugaron durante 15 minutos a 3500 rpm. Posteriormente, estas se lavaron hasta alcanzar un pH de 7.0, se secaron a  $40^\circ\text{C}$  durante 24 horas y se molieron para tamizarse en un tamiz de malla 120 (0.125 mm). Se prepararon soluciones de metal de 100 Mm disolviendo  $(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Zn} (\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Pb} (\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua desionizada de alta pureza y se almacenaron en matraces ámbar a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), luego se pusieron en contacto las soluciones (100 ml) de estos con una concentración de metal creciente (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0 Mm) con 2 g/L de cada bisorbente. Durante las pruebas se controló el pH en el rango de 5.0-5.5, mediante la solución de (NaOH) y ácidas ( $\text{HNO}_3$ ). Las isothermas de equilibrio se evaluaron en términos de capacidad máxima de sorción y afinidad de sorción. Se consideró que los modelos cinéticos de pseudo primer y segundo orden interpretan los datos experimentales, y éste último describe mejor el sistema

de adsorción. Se demostró que los modelos de Freundlich y Lagmuir describen bien las isothermas de sorción, lo que sugiere un mecanismo intermedio de sorción mono/multicapa. *C. Vullgaris* se comportó como un mejor biosorbente debido a la mayor capacidad de absorción de equilibrio ( $q_e=0.499, 0.634$  y  $0.664 \text{ mmol g}^{-1}$ , respectivamente). La eficiencia de eliminación disminuyó con el aumento de la concentración de metales, señalando un proceso de adsorción pasiva que involucra los sitios activos en la superficie de las biomásas. La espectroscopia FT-IR evidenció que la eliminación de iones se produjo principalmente por la interacción entre los grupos metálicos y carboxilatos presentes en ambas paredes celulares.

Sandau, Sandau, Pulz & Zimmermann (1996) realizaron experimentos de sorción de metales pesados utilizando *Fucu vesiculosus* no viable, *Ascophyllum nodosum* y subproductos de algas para investigar los factores que influyen y optimizan la biosorción de metales pesados. La biomasa cultivada se lavó en agua desionizada para reducir la conductividad de la solución acuosa circundante a  $50 \mu\text{S/cm}$ . Después de secar ( $40^\circ\text{C}$ ), la biomasa se desintegró a un tamaño de partícula de 2-3 mm. Los metales se agregaron al agua desionizada en forma de nitrato de Cadmio, Cinc, Plomo y cobre. El valor del pH, la concentración de biomasa, la concentración de metales pesados, la especie de metales pesados, los iones competidores, las variedades de algas y el tiempo fueron los parámetros más decisivos. Las isothermas de sorción mostraron capacidades de sorción crecientes y eficiencias de sorción decrecientes con un aumento en la concentración inicial de metales pesados. La concentración de biomasa influyó mucho en las eficiencias de sorción, pero redujo la capacidad de sorción por gramo de biomasa. El valor de pH controló la sorción (pH 3-7) y la desorción (pH 1-2) decisivamente. Además de las aguas modelo contaminadas con metales pesados, los efluentes industriales reales tratados exitosamente por sorbentes de algas en experimentos por lotes y pruebas continuas en columna.

Inthorn, Sidtitoon, Silapanuntakul, & Incharoensakdi (2002), investigaron la eliminación de mercurio (Hg), Cadmio (Cd) y Plomo (Pb) en soluciones acuosas. Cuarenta y seis cepas de microalgas de la Colección de Cultivos BIOTECH(NSTDA), el Centro de Recursos Microbiológicos (TISTR) y el Instituto de Investigación y Desarrollo de Alimentos, 3 cepas recolectadas de áreas naturales e industriales tailandesas y 3 cepas de la colección de cultivos de la Universidad de Göttingen. En algas verdes, la mayor remoción de Hg fue por *Scenedesmus sp.*, *Chlorococcum sp.*, *Chlorella Vullgaris var. Vularis* y *Fischerella sp.*, (97%, 96%, 94% y 92%, respectivamente). En las algas verde azuladas, la mayor remoción de Hg fue por *Lyngbya spiralis*, *Tolypothrix tenuis*, *Stigonema sp.*, *Phormidium molle* (96%, 94%, 94% y 93%, respectivamente). Para la eliminación de Cd en algas verdes, la más alta fue por *Chlorococcum sp.*, T5, *Fischerella sp.*, *Chlorella Vullgaris var. vulgaris* y *Scenedesmus acutus* (94%, 94%, 91%, 89% y 88%, respectivamente). En las algas verde azuladas, la mayor remoción de Cd fue *Lyngbya heironymussi*, *Gloeocapsa sp.*, *Phormidium molle*, *Oscillatoria jasorvensis* y *Nostoc sp.* (97%, 96%, 95%, 94% y 94%, respectivamente). En las algas verdes, la mayor eliminación de Pb fue por *Scenedesmus acutus*, *Chlorella Vullgaris var vulgaris*, *Chlorella Vullgaris*, *Scenedesmus vacuolatus* y *Chlorella Vullgaris*, (89%, 88%, 85%, 85% y 84%, respectivamente). En algas verde azuladas, la mayor eliminación de Pb fue por *Noscoc punciforme*, *Oscillatoria agardhii*, *Gloeocapsa sp.*, *Nostoc piscinale*, *Nostoc commune* y *Nostoc paludosum* (98%, 96%, 96%, 94%, 94% y 92%, respectivamente).

*Scenedesmus acutus* tuvo el mayor factor de concentración (CF) en 3,412, 4,591 y 4,078 para Hg, Cd y Pb, respectivamente. *Tolypothrix tenuis* tuvo la capacidad de adsorción máxima más alta de 27 mg Hg/g de peso seco a una concentración mínima de 1.04 mg/L. *Scenedesmus acutus* tuvo la capacidad de adsorción máxima más alta de 110 mg de Cd/g de peso seco a una concentración mínima de 48 mg/L y *Chlorella Vullgaris* tuvo la capacidad de

absorción máxima más alta de 127 mg de Pb/g de peso seco a una concentración mínima de 130 mg/L.

Motrel (2017) investigó la posibilidad de eliminar minerales tóxicos presentes en el agua, específicamente arsénico y boro, utilizando microalgas. La microalga *Chlamydomonas reinhardtii* fue seleccionada y contactada con estos elementos (arsénico y boro), de forma individual y analizó la capacidad de la biomasa para eliminarlos de una solución acuosa. También se analizaron los principales factores que afectan el proceso de bioadsorción y se estudió la capacidad de biorremediación utilizando tres puntos de la escala de pH (5.5, 7 y 9.5); modificando el estado de la biomasa (viva y muerta) y la concentración de esta (1 g/L y 5 g/L). Además, se estudió la cinética y la capacidad de bioadsorción en 6 tiempos diferentes hasta 3 horas de contacto. Finalmente, se realizó un estudio de caracterización FTIR (espectroscopía transformada infrarroja de Fourier) para analizar los centros activos que intervinieron en el proceso. Los resultados mostraron que el pH con las condiciones más óptimas de remoción, es 7 y el tiempo necesario para alcanzar una concentración de mineral eliminado, fue 30 minutos. Además, se determinó que a 5 g/L se produce una pérdida de la capacidad de adsorción de la biomasa en comparación con 1 g/L. En el caso de los estudios de boro, la remoción de este elemento se asocia en un alto porcentaje al proceso de precipitación en presencia de microalgas y se registra una asociación con el comienzo del proceso de bioacumulación por parte de las microalgas a las 3 horas de contacto con la solución que presenta arsénico. El análisis FTIR confirma la unión del arsénico con la biomasa a través de los grupos carboxílicos y la precipitación del boro al modificar los grupos hidroxilo respecto a la biomasa original.

Valle, G. (2007) realizó una investigación para disminuir el exceso de cadmio y zinc presentes en aguas residuales urbanas, evaluó la capacidad de remoción utilizando tres especies de microalgas *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* y cianobacteria

*Synechococcus sp.* Se encontró que los cultivos de las tres especies crecen a concentraciones usadas de Cd (0.2 mg/L) y Zn (16 mg/L) agregados individualmente y combinados. Los resultados mostraron que manteniendo cultivos de *Synechococcus sp* a concentraciones bajas y altas de Cd (1 y 2 mg/L) y Zn (50 y 75 mg/L), esta especie puede desarrollarse en las dos concentraciones de Cd y bajo Concentraciones de Zn. Sin embargo, con la adición de 75 mg/L de Zn, el cultivo de *Synechococcus sp* mostró mortalidad. Se determinó que la especie *Synechococcus sp.* elimina casi el 100% del Zn agregado, además puede eliminar eficientemente el Cd y el Zn del medio de cultivo, por lo que esta cianobacteria tiene el potencial de ser utilizada en técnicas de biorremediación para la eliminación de metales en efluentes provenientes de aguas residuales.

### **2.1.2. Nacionales**

Tantte (2018) evaluó la capacidad de depurar el nitrógeno fósforo y plomo de aguas residuales domésticas de la ciudad de Huaura, mediante la aplicación de la microalga *Chlorella vulgaris* *Beyerinck* inmovilizada en esferas de alginato. Replicó la cepa de *Chlorella vulgaris* haciendo conteos diarios mediante la cámara de Neubauer hasta llegar a una concentración de  $1,4 \times 10^7$  cel/ml, para posteriormente inmovilizarla en alginato de sodio. Empleó fotobiorreactores de luz interna con aireación constante. La capacidad de remoción se evaluó durante 30 días, tomando muestras cada semana y analizando los niveles de nutrientes (fósforo y nitrógeno), así como los niveles de plomo mediante espectrofotometría. El experimento contó con 15 unidades experimentales para un control y cuatro tratamientos con distintas concentraciones de nutrientes y plomo. El tratamiento 2 fue el que tuvo mayor porcentaje de remoción de plomo y fósforo, con un 66 y 75 por ciento respectivamente, en cuanto al nitrógeno, todos los tratamientos removieron el nitrógeno dejándolo en una concentración menor a 0,5 mg / L. El mayor porcentaje de depuración se dio entre la primera y segunda semana.



Galvan & Rozas (2013) evaluaron la remoción de Arsénico de efluentes del Parque Industrial de Río Seco (PIRS), mediante bioabsorción con *Chlorella vulgaris* a escala de laboratorio, para ello mediante diluciones sucesivas se obtuvo el cultivo puro de la microalga de efluentes de la planta de tratamiento de Chilpina, se evaluó la resistencia mediante el crecimiento de *Chlorella vulgaris*, en matraces de 250 mL con la aplicación de 1.6, 3.2 y 6.4 mg/L de Arsénico III en forma de  $\text{Na}_2 \text{HAsO}_3$ .

La capacidad de bioabsorción de Arsénico de efluentes del PIRS, se evaluó mediante la concentración de Clorofila A y la concentración residual de Arsénico después de someter a los efluentes a las velocidades de flujo de 20, 40 y 80 mL/min en un sistema de flujo por gravedad, construido mediante contenedores interconectados empacados con 1.5L cultivo puro de *Chlorella vulgaris*.

La evaluación de la toxicidad se realizó para el efluente que presentó la menor concentración residual de Arsénico en el sistema de flujo por gravedad mediante un bioensayo, donde se evaluó la mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* “pulga de agua” así como la determinación de la concentración letal media  $\text{CL}_{50}$ . Los resultados demostraron una efectivaremovición de Arsénico por *Chlorella vulgaris*, evidenciada por un mayor crecimiento en presencia de diferentes concentraciones de Arsénico III en comparación con el cultivo puro de *Chlorella vulgaris*. La capacidad de remoción de Arsénico en efluentes del PIRS, mediante el sistema de flujo por gravedad fue mayor a la velocidad de flujo de 20 mL / min con una remoción del 60.05%, mostrando una reducción leve de biomasa evidenciada por la disminución en la concentración de clorofila A, presentando un 50% de mortalidad de neonatos de *Daphnia magna* a 48 hrs. con 3.25mg/L, concentración menos tóxica en comparación a las reportadas por presentarse una transformación del Arsénico en formas orgánicas menos tóxicas.

Bartra (2016) evaluó la remoción de arsénico utilizando la microalga *Chlorella vulgaris* en aguas superficiales del río Uchusuma en Tacna, utilizando una serie de tratamientos en matraces de 500 ml con cultivos de 5 mL de microalga y con concentraciones de arsénico de 20, 40, 60, 80 y 100% respectivamente, los mismos que complementaron la composición con el nutriente (Bayfoland). El diseño fue Experimental y se tuvo como un valor inicial de 0,119 mg / L de As Total el cual se instaló en el Laboratorio de Calidad de aguas de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental (EPIAM).

La evaluación de la densidad celular y/o crecimiento de la microalga *Chlorella vulgaris* se realizó mediante la cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y para medir el nivel del arsénico se utilizó el test kit de HACH.

En los resultados, se pudo observar que la microalga *Chlorella vulgaris* presentó una tolerancia, alta tasa, rapidez de crecimiento y absorción del metaloide a la exposición continua y en distintas concentraciones de arsénico, además que el crecimiento celular se triplicó en el día 7 y 8 favorecido por los nutrientes añadidos y por los componentes inorgánicos presentes en el agua; Asimismo, no se observó diferencias estadística significativas entre los 05 (cinco) tratamientos teniendo un porcentaje de remoción superior al 60%. Se recomienda profundizar estudios de aplicación de microalgas para la remoción de metales y metaloides.

## **2.2. Metales pesados**

Se considera como componentes de la corteza terrestre, sin embargo, otros pueden ser generados antropogénicamente, como las actividades ganaderas, agrícolas, industriales, minerales (Ouyang et al., 2006). Mejía (2006) explica que el cobre, zinc o el manganeso participan en las funciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos vivos; entre tanto los metales como el cadmio, plomo y mercurio son no fundamentales (no cumplen una función biológica conocida) y son distinguidos por causar numerosos daños en organismos a mínimas

concentraciones, las mismas que dependerá según las vías de exposición y la naturaleza química del metal y otros. También pueden actuar como eficaces tóxicos, tanto para los ecosistemas y los seres humanos, según las vías de exposición, la dosis absorbida y la naturaleza química del metal (Llobet, Schuhmacher, & Domingo, 2000).

Según Duffus (2002), para la definición de los metales en particular se usa la densidad, numero atómico y peso atómico. Además, son clasificados en tres grupos: metales preciosos Pt, Pd, Ag, Au, Ru; radionucleótidos: U, Th, Ra, Am y metales tóxicos Cr, Hg, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co Sn. Wang y Chen (2009).

A continuación, la Tabla 1 muestra algunas definiciones de los metales según sus propiedades.

*Tabla 1.* Los metales pesados clasificados según su densidad, peso atómico y número atómico.

Propiedades	Definición	Referencia
Densidad	Metales con densidad > a 4 g/cm <sup>3</sup>	Enciclopedia Internacional de Ciencia Química (1964)
		Diccionario Químico (1987)
		3° Nuevo Diccionario Internacional (1976)
		Enciclopedia de la conciso de bioquímica (1983)
	Metales con densidad > a 5 g/cm <sup>3</sup>	El diccionario de la casa del azar de la lengua inglesa (1987)
		Diccionario McGraw-Hill de términos científicos y técnicos (1989)
		Mathie y Lozet (1991)
		Diccionario de Prensa Académico Ciencia y Tecnología (1992)
	Metales con densidad > a 6 g/cm <sup>3</sup> .	Thornton (1995)
		Davies (1987)
Peso atómico	Metales con densidad > a 7 g/cm <sup>3</sup> .	Bjerrum (1936)
	Metales con mayor peso atómico.	El medio ambiente: Un diccionario del mundo que nos rodea (1976)
		Diccionario de Ciencia de Oxford (1999)
	Metales con mayor peso atómico que el del sodio (23)	Diccionario Químico técnico concisa (1986)
	Metales con mayor peso atómico que el del sodio (23).	Diccionario Químico Condensado (1993)
	Metales con mayor peso atómico, tales como Cadmio, estaño, mercurio y plomo.	Kemp (1998)
		Hunt (1999)
	Metales con elevado peso atómico, que pueden dañar a los seres vivos y se extienden al acumularse en la cadena alimentaria, tales como cadmio, mercurio y plomo.	Longman Diccionario de ciencia ambiente (1998)
	Metal con número atómico mayor que el del calcio (35)	Luckey y Venugopal (1975)
	Elemento con > número atómico entre 21 y 92	Lyman (1995)
Número atómico	Metal con un número atómico > que 20.	Phipps (1981)
		Diccionario Collins de Biología (1988)

## **2.3. Plomo**

Es un metal blando, gris, naturalmente presente en los suelos, componente traza de minerales comunes formadores de roca y fácilmente resistentes a la intemperie, y un componente principal de varios minerales de sulfuro, sulfato, óxido, carbonato y silicato. También puede existir en diferentes estados de oxidación (Pb, Pb<sup>2+</sup>, Pb<sup>4+</sup>). El catión Pb<sup>2+</sup> es un ácido en el sentido de Lewis, puede unirse a varios iones en el medio. Está en el Grupo XIV b de la Tabla periódica y tiene un peso atómico de 207.2 y se encuentra entre los 23 metales que son de gran preocupación para el medio ambiente y la salud humana. (Amari, Ghnaya, & Abdelly, 2017).

### **2.3.1. Origen del plomo**

Las fuentes importantes de contaminación ambiental incluyen actividades de minería, fundición, fabricación y reciclaje y, en algunos países, el uso continuo de pintura con plomo, gasolina con plomo y combustible de aviación con plomo. Más de las tres cuartas partes del consumo mundial de plomo es para la fabricación de baterías de plomo-ácido para vehículos automotores. Sin embargo, el plomo también se usa en muchos otros productos, por ejemplo, pigmentos, pinturas, soldaduras, vidrieras, cristalería de plomo, municiones, esmaltes cerámicos, joyas, juguetes y en algunos cosméticos y medicinas tradicionales. El agua potable suministrada a través de tuberías de plomo o tuberías unidas con soldadura de plomo puede contener plomo. Gran parte del liderazgo en el comercio mundial ahora se obtiene del reciclaje.

### **2.3.2. Vías de exposición al plomo**

Según la OMS (2018), las personas pueden quedar expuestas al plomo a través de fuentes ocupacionales y ambientales. Esto se debe principalmente a:

- inhalación de partículas de plomo generadas por la quema de materiales que contienen plomo, por ejemplo, durante la fundición, el reciclaje, la eliminación de pintura con plomo y el uso de gasolina con plomo o combustible de aviación con plomo; y
- ingestión de polvo, agua (de tuberías con plomo) y alimentos contaminados con plomo (de recipientes con plomo o con soldadura de plomo).

Una fuente adicional de exposición es el uso de ciertos tipos de cosméticos y medicamentos no regulados. Se han reportado altos niveles de plomo, por ejemplo, en ciertos tipos de kohl, así como en algunos medicamentos tradicionales utilizados en países como India, México y Vietnam. Por lo tanto, los consumidores deben tener cuidado solo para comprar y usar productos regulados.

Los niños pequeños son particularmente vulnerables a la intoxicación por plomo porque absorben de 4 a 5 veces más plomo ingerido que los adultos de una fuente determinada. Además, la curiosidad innata de los niños y su comportamiento de boca a boca apropiado para su edad provocan que traguen y traguen objetos que contienen plomo o recubiertos de plomo, como tierra contaminada o polvo y escamas de pintura que contiene plomo en descomposición. Esta ruta de exposición se magnifica en niños con un trastorno psicológico llamado pica (antojos persistentes y compulsivos de comer artículos no alimentarios), que pueden, por ejemplo, recoger y comer pintura con plomo de paredes, marcos de puertas y muebles. La exposición al suelo y al polvo contaminados con plomo como resultado del reciclaje de baterías y la minería ha causado envenenamiento masivo con plomo y múltiples muertes en niños pequeños en Nigeria, Senegal y otros países.

Una vez que el plomo ingresa al cuerpo, se distribuye a órganos como el cerebro, los riñones, el hígado y los huesos. El cuerpo almacena plomo en los dientes y huesos donde se acumula con el tiempo. El plomo almacenado en el hueso puede volver a movilizarse en la

sangre durante el embarazo, exponiendo así al feto. Los niños desnutridos son más susceptibles al plomo porque sus cuerpos absorben más plomo si faltan otros nutrientes, como el calcio o el hierro. Los niños con mayor riesgo son los muy pequeños (incluido el feto en desarrollo) y los económicamente desfavorecidos.

### **2.3.3. Principales impactos del plomo en la salud**

El centro de Investigación de Sustancias Peligrosas (EE. UU.) Claramente clasificó a los metales pesados compuestos metálicos individuales que pueden afectar la salud humana. Son elementos estables (es decir, no pueden ser metabolizados por el cuerpo), que podrían ser bioacumulados (transmitidos por la cadena alimentaria a los humanos). Aunque se conocen los efectos adversos para la salud.

Desde hace mucho tiempo, la exposición a metales pesados continúa e incluso aumenta en algunas regiones. Estos son contaminantes ambientales clave en regiones con alta presión antropogénica; y su presencia, incluso en trazas, puede causar serios problemas a varios organismos y humanos.

### **2.3.4. Principales impactos del plomo en el ambiente**

La eliminación arbitraria de desechos industriales y domésticos (que contienen metales pesados) en los ecosistemas acuáticos, amenaza los organismos acuáticos que habitan. Los organismos responden activamente para protegerse del envenenamiento por metales en sitios contaminados.

Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos y su toxicidad para formas de vida superiores, los metales pesados en los suministros de agua subterránea y superficial se han priorizado como los principales contaminantes inorgánicos en el medio ambiente. Incluso si están presentes en cantidades diluidas indetectables, su recalcitrancia y consecuente persistencia en los cuerpos de agua implica que, a través de procesos naturales como la

biomagnificación, las concentraciones pueden elevarse hasta tal punto que comienzan a exhibir características tóxicas. En este contexto, Khan et al. (2008) declararon que los HM más allá de los límites permisibles en el medio ambiente acuático causan toxicidad directa para los humanos y otras formas de vida. El agua comprende uno de los principales portales de entrada de estos elementos desagradables en el cuerpo humano; por lo tanto, incluso la EPA (2009) ha definido el nivel máximo de contaminantes para ciertos metales (es decir, las concentraciones de Hg, Pb, Cr, Cu, Cd, Zn y Ni en el agua potable no deben exceder 0.002, 0.015, 0.1, 1.3, 0.005, 5, y 0.04 mg/1, respectivamente).



## 2.4. Modelo conceptual de exposición al plomo

A continuación, se muestra en la Figura 1 el modelo conceptual para las vías de exposición a la salud pública en poblaciones cercanas a actividades mineras.

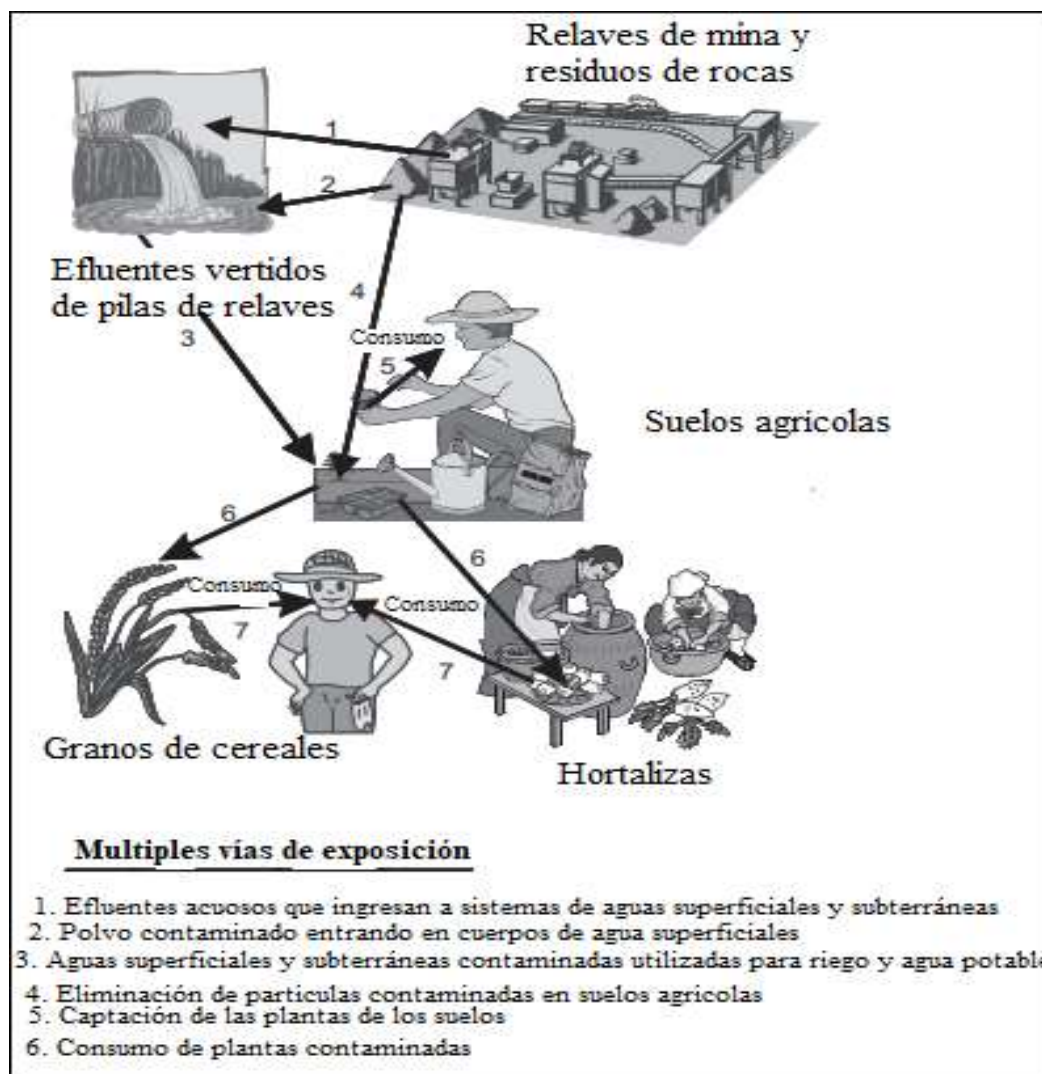


Figura 1. Vías de exposición a metales pesados.

## 2.5. Movilización natural de los metales pesados hacia las fuentes hídricas

La movilidad de los metales en estudio es consecuencia de las interacciones sólidos – líquidos y la acción del agua. De acuerdo Solano, M (2006), la procedencia de estos metales de la hidrometalurgia, el transporte hacia una fuente hídrica puede ser mediante la acción del agua, en forma soluble, particulada y por la acción del viento, tal como se muestra en la Figura 2.

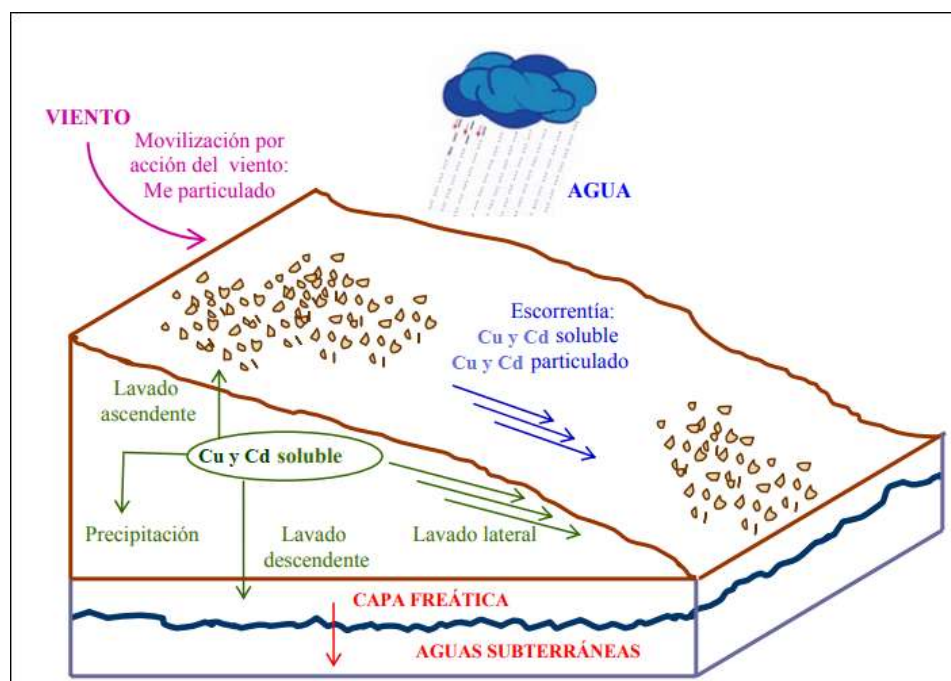


Figura 2. Movilización natural de los metales pesados por acción del agua y el viento.

Además, Solano (2006) afirma que existen agentes causantes de la movilización de estos metales en el agua, estos pueden someterse a diferentes procesos migratorios en forma soluble o lavada, y en particulado:

- Lavado ascendente, incluso precipitando en la superficie del suelo formando, generalmente y sales hidratadas.
- Lavado descendente, pudiendo perderse del perfil, alcanzando la capa freática, y llegar a las aguas subterráneas.

- Lavado lateral desde zonas topográficamente más altas hacia aguas superficiales abajo.
- Arrastre disuelto por las aguas de escorrentía, por la superficie del suelo.
- Arrastre particulado desde zonas topográficamente más altas hacia aguas abajo

## **2.6. Tecnologías para la eliminación de metales pesados**

Actualmente existen numerosos métodos que permiten tratar la contaminación producto de efluentes industriales, con el fin de reducir el daño que provocan en el medio ambiente.

### **2.6.1. Métodos tradicionales para la remoción de metales pesados en el agua**

#### **2.6.1.1. *Precipitación química***

La precipitación química, es la técnica más usada en el tratamiento de los metales (Edzwald, 2011). Consiste en la eliminación del ion metálico indeseable disperso, por adición de un reactivo. Normalmente, las especies metálicas en disolución precipitan al aumentar el pH. El proceso tiene lugar al desolubilizarse el metal y formarse el precipitado. Este método de precipitación con hidróxido no es efectivo cuando en el efluente hay materia orgánica, pues los compuestos orgánicos de plomo no precipitan y su mantenimiento es costoso debido a la alta generación de lodos precipitados (Lankford & Eckenfelder, 1990).

#### **2.6.1.2. *Intercambio iónico***

El intercambio iónico es el proceso a través del cual los iones en solución se transfieren a una matriz sólida que, a su vez, libera iones de un tipo diferente, pero de la misma carga y las principales ventajas de este tipo de tratamiento son la recuperación del valor del metal, la selectividad, el menor volumen de lodo producido y el cumplimiento de estrictas especificaciones de descarga. (Zewail & Yousef, 2015).

#### **2.6.1.3. Adsorción**

Es un proceso que facilita la obtención activa o pasiva de iones metálicos, debido a la propiedad que diversas biomasas vivas o muertas poseen para secuestrar y acumular diferentes contaminantes biodegradables y no biodegradables de las aguas residuales (Bankole et al., 2019) y (Tejada-tovar & Villabona-ortiz, 2015), además presenta remoción de una amplia variedad de contaminantes de una fase fluida y probablemente selectiva dependiendo del adsorbente del cual depende también su rendimiento, básicamente, por la estructura física del contaminante (Huang et al., 2014).

#### **2.6.1.4. Tecnología de membranas**

En principio, una tecnología de membrana actúa como una barrera que inhibe el paso de ciertos constituyentes al tiempo que permite que otros constituyentes pasen a través de ellos. Las corrientes tratadas y recogidas se denominan permeado, mientras que el componente rechazado se denomina retenido (Abdullah, Yusof, Lau, Jaafar, & Ismail, 2019), y en síntesis existen cuatro categorías amplias de membranas: Microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y osmosis inversa (RO) (Liu, Edraki, Malekizadeh, Schenk, & Berry, 2019) y (McGraw-Hill, 2002).

Además, presenta altas eficiencias, es de fácil portabilidad, requiere poco espacio y no es selectiva, pero genera una gran cantidad de lodos que contienen metales. Las membranas pueden clasificarse de acuerdo a diferentes características, como su peso molecular de corte, material de la membrana, permeabilidad y solubilidad del soluto y el solvente en la película, superficie y espesor activo de la película, así como la carga de su superficie.

#### **2.6.1.5.    *Procesos electroquímicos***

Se maneja las técnicas electroquímicas, haciendo pasar una corriente eléctrica a través del agua (un electrolito) e incitando reacciones de oxidación-reducción tanto en el polo negativo como en el polo positivo, se usa mayormente para la desalinización de agua de mar, pero también esta metodología se aplica en la recuperación de metales pesados (G. Chen, 2004). De manera que, se utiliza energía eléctrica como línea de descontaminación ambiental, las principales desventajas de este proceso es el coste económico. Las desventajas nacen de la multiplicidad de los equipos, la utilización de reactivos como de la presencia de fangos y la selectividad (Baker, 2004).

#### **2.6.1.6.    *Extracciones orgánicas***

Según McEldowney (1990), las extracciones orgánicas son técnicas de separación bien determinadas y de extenso uso en la eliminación de metales contaminantes de efluentes industriales. Esta técnica se emplea fundamentalmente en procesos industriales a gran escala donde las concentraciones de contaminantes son elevadas.

En la Tabla 2, se muestra los métodos más utilizados que se fundamentan en sus propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes, asimismo las ventajas y desventajas que presentan.

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los principales tratamientos para el tratamiento de las aguas contaminadas por metales pesados.

Métodos		Ventajas	Desventajas
Por su naturaleza física	Adsorción	Alta capacidad de tratamiento. Cinética rápida. Posible de seleccionar.	Su rendimiento depende del adsorbente.
	Osmosis inversa	Genera efluentes puros.	Requiere elevada presión. Elevado coste.
	Intercambio iónico	Posibilidad de recuperación de metales. Alta regeneración.	Sensibilidad a la presencia de las partículas. Elevado coste.
	Tecnología por membrana	Requiere poco espacio. Baja generación de residuos sólidos.	Colmatación de la membrana. Elevado coste.
	Precipitación química	Sin selectividad de minerales.	Separación ineficiente a elevadas concentraciones
Por su naturaleza química	Floculación	Capacidad de inactivación bacteriana	Generación de lodos. Consumo del solvente.
	Tratamiento electroquímico	Tolerancia a sólidos suspendidos. Selectividad del mineral moderado.	Concentraciones de tratamiento. Caro para elevadas concentraciones.
	Evaporación	Generación de efluentes puros.	Generación de grandes cantidades de lodo. Energía intensa.

Estos métodos mencionados presentan desventajas al ocasionar grandes cantidades de lodos y resultan ineficaces a la hora de reducir las concentración de metales dentro del rango 0-100 mg/l (Motrel, 2017).

Por lo tanto, permiten buscar nuevas alternativas más eficientes, de bajo costo y amigables al medio ambiente. Por tal motivo nace la idea de emplear materiales biológicos con el fin de tratar estos minerales como una alternativa al tratamiento de las aguas contaminadas, por el hecho simple que estos materiales no generan contaminantes (Monteiro, Castro, & Malcata, 2012).

### **2.6.2. Métodos biológicos para la remoción de metales pesados en el agua**

Marivela y otros (2002) mencionan que este proceso puede clasificarse conforme al medio biológico que ejecute la degradación del compuesto xenobiótico, en los siguientes:

#### **2.6.2.1. Fitorremediación**

Consiste en usar plantas verdes para remover o neutralizar metales pesados o radionucleidos. Prototipo de ello es el uso de la “especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados” con Zn y Cd. Lombi et al. (2001) determinaron que ésta especie disminuye mayor de 7 mg/Kg de Cd y > 1099 mg/Kg de Zn, es decir el 43 y 7 % de estos metales respectivamente en suelos agrícolas (Tirado, 2014).

#### **2.6.2.2. Biorremediación animal**

Consiste en usar animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados (Ahluwalia & Goyal, 2007).

#### **2.6.2.3. Biorremediación microbiana**

Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. Según Sanchez (1999) la biorremediación no es más que el empleo de sistemas biológicos (algas, bacterias, levaduras, hongos y plantas superiores) para eliminar los contaminantes del suelo, agua o gases.

## **2.7. Microalgas**

Las microalgas se definen como organismos microscópicos, eucariotas, capaces de obtener la energía necesaria para llevar a cabo sus actividades biológicas mediante la fotosíntesis. Se desarrollan en medios acuáticos y son de tamaños variables. Además, son especies naturales e inoñas, que presentan contenidos de compuestos orgánicos en sus procesos metabólicos. Esta característica les permite ser aceptados como material capaz de remediar la contaminación hídrica por ser amigables al medio ambiente (Plaza, 2012). En términos de biomasa, forman el grupo más grande del mundo de productores primarios, responsables de al menos el 32% de la fotosíntesis global (Priyadarshani, Sahu, & Rath, 2012).

### **2.7.1. Las microalgas y su potencial en la remoción de metales pesados**

Las microalgas son organismos acuáticos que poseen mecanismos moleculares que les permiten discriminar metales pesados no esenciales de los esenciales para su crecimiento (Perales, Peña, & Cañizares, 2006). Los beneficios que incluyen, son: capacidad rápida de absorción de metal, ahorro de tiempo y energía, ecológico, fácil de usar, ocurrencia durante todo el año, facilidad de manejo, reciclable / reutilizable, bajo costo, tasa de crecimiento más rápida (en comparación con plantas superiores), alta eficiencia, gran relación superficie / volumen, capacidad para unir hasta el 10% de su biomasa, con alta selectividad (que mejora su rendimiento), no genera residuos tóxicos, no requiere síntesis, es útil tanto en sistemas discontinuos como continuos, y aplicabilidad a aguas que contienen concentraciones de metales o niveles relativamente bajos de contaminantes (Monteiro et al., 2012).

Asimismo, diversos estudios consideran importantes a los siguientes factores, el alga y microalga empleada, el pH, la concentración del metal, los componentes o las formas químicas del metal, la temperatura y la presencia de oxígeno en el medio (Lara, 2008).



### **2.7.2. Aplicación de biomasa muerta versus biomasa viva**

La biomasa de algas vivas necesita mínimos nutrientes y condiciones ambientales, mientras que la biomasa muerta no requiere nutrientes u oxígeno específico; Además, también podrían eliminar los HM de las soluciones multimetales (Rajamani et al., 2007).

### **2.7.3. Tipos de Microalgas**

#### **2.7.3.1. Algas verdes**

Son organismos eucariotas clasificados como el *phylum Chlorophyta*. Este tipo de algas se caracteriza por contener clorofila a y b y por sus cuatro flagelos, siendo éstos últimos muy importantes en la motilidad. Por otro lado, su capacidad de producción de almidón y aceite para almacenarse dentro de la célula, está condicionado por la disponibilidad de nutrientes. Este tipo de organismos es frecuentemente explotado para fines comerciales. La *Chlorella* es un claro ejemplo de las *Chlorophyta* utilizada para este fin (Ayala, 2015).

#### **2.7.3.2. Algas rojas**

También llamados rodofitas, se diferencian de las demás por la carencia de flagelos y centriolos en su estructura celular, así también, por la falta de generación de pigmentos (ficocianina, ficobilisomas y ficoeritina). Por otro lado, ecológicamente cumple una función importante al ser un organismo que permite el mantenimiento de arrecifes de coral, asimismo comercialmente, al servir como fuente de materia prima para la elaboración de productos comestibles y diversos geles a nivel mundial. (Ayala, 2015).

#### **2.7.3.3. Algas pardas**

Organismos pluricelulares, que se caracterizan por contener en su estructura celular las clorofilas a y c, además por su gran tamaño y ser comúnmente encontradas en aguas de mar o saladas. Tales ejemplos son *Macrocystis pyrifera*, *Ascophyllum nodosum* y *Laminaria hyperborea* (Ayala, 2015).

#### **2.7.3.4. *Algas doradas***

Son organismos que comúnmente habitan en agua dulce, aunque, también se puede encontrar unos pocos ejemplares en aguas saladas. En condiciones ambientales no favorables y a falta de micronutrientes algunos ejemplares de este tipo de algas son considerados heterotróficos facultativos, por ello su utilización se ha visto reducida a escala industrial. Cabe resaltar, que para determinar este tipo de algas se requiere de técnicas moleculares, ya que hasta la actualidad aún existe la incertidumbre en cuanto a su diferencia de otros grupos de algas (Ayala, 2015).

#### **2.7.3.5. *Diatomeas***

En la actualidad se conocen más de 100 000 especies de este tipo de algas unicelulares, además pueden generar aceite para almacenarla y utilizarlas como reservas energéticas. A la vez, están clasificados como productores primarios y están considerados como la mayor fracción de biomasa en la corteza terrestre. Entre sus características físicas, en cuánto al tamaño varían entre 10 a 200 micrómetros, a su vez, ciertos pigmentos como la fucoxantina, hacen que su coloración sea dorada-parda. Adicionalmente, contienen clorofilas a y c (Ayala, 2015).

#### **2.7.3.6. *Algas azules o cianobacterias***

Son organismos que se encuentran en grandes cantidades en ecosistemas hídricos, capaces de producir toxinas altamente tóxicas para los seres humanos. La proliferación de éste tipo de microorganismos es posible si hay alta presencia de materia orgánica, en especial de compuestos orgánicos disueltos, quienes al favorecer el incremento de las cianobacterias, permiten que éstos agoten el oxígeno disuelto del agua. Al no tener la disponibilidad de oxígeno en el agua, la diversidad marina y microbiana se ve afectada a través de la reducción.

Sin embargo, estos organismos tienen un importante valor benéfico a nivel comercial, puesto que tienen la capacidad de generar almidón como reserva celular y presentan altas concentraciones de proteína en su estructura, de ahí que su utilización sea una prioridad para la producción de suplementos dietarios de origen vegetal, que muchas veces reemplazan a los llamados suplementos, un ejemplo claro y el más utilizado es la especie *Spirulina* (Ayala, 2015).

#### **2.7.3.7. Algas verde – amarillas**

Son organismos que se producen para la obtención de biodisel en reactores de gran tamaño, sin embargo también se pueden encontrar en ecosistemas de agua dulce, con excepción de la especie *Nannochloropsis*, puesto que ésta habita en ecosistemas de agua salada (organismo halófico), adicionalmente una de las ventajas que presenta éste organismo es su tiempo de replicación corto, lo que permite su rápida producción (Ayala, 2015).

#### **2.7.4. Mecanismos de eliminación de metales pesados adaptados por microalgas**

La bioabsorción implica una combinación de varios mecanismos, tales como atracción electrostática, complejación, intercambio iónico, fuerzas covalentes, fuerzas de van der Waals, adsorción de superficie y secuestro de microestructura (Beni & Esmaeili, 2020)

La absorción de metal por los modos activo y pasivo puede denominarse "bioacumulación o bioabsorción" (Malik, 2004).

Asimismo, el fenómeno de remediación por microalgas también podría clasificarse en dos categorías: (i) bioacumulación por células vivas, y (ii) biosorción por biomasa no viva, no en crecimiento o productos de biomasa (Aksu, 1998).

##### **2.7.4.1. Bioabsorción activa**

Proceso en el cual los iones metálicos pueden pasar a la célula, a través de la membrana celular a través del ciclo metabólico celular; este modo de captación de metal se denomina "captación activa". A continuación, se definen los tipos de bioabsorción.

#### **2.7.4.2. *Biabsorción pasiva***

Proceso en el cual los iones de metales pesados quedan atrapados en la estructura celular y, posteriormente, se biosorben en los sitios de unión presentes en la estructura celular. Este método de captación es independiente del ciclo metabólico biológico y se conoce como "biosorción" o "captación pasiva".

#### **2.7.5. *Bioabsorción por biomasa de microalgas***

Varios complejos de aniones metálicos y oxoaniones se unen electrostáticamente a las células de algas, aunque la unión covalente es ciertamente posible. Ciertos informes sugieren que la biosorción de algas de iones metálicos como aluminio (III), cobre (II), plomo (II) y cobalto (II) se produce a través de un proceso de intercambio iónico con cationes metálicos que compiten con protones por sitios de unión cargados negativamente en la pared celular. Los sitios de unión podrían ser grupos carboxilo o sulfatos asociados con polisacáridos y proteínas (Kumar, Dahms, Won, Lee, & Shin, 2015).

Por otro lado Lau et al. (1999), mencionan que la bioabsorción por biomasa muerta o metabólicamente inactiva para la remoción de los iones de metales pesados está relacionado con la naturaleza aniónica de la pared celular de la microalga. Los aniónicos como el carboxilo, fosfato, piruvato, amida, así como los polisacáridos extracelulares, aminofosfatos y lipoproteínas pueden unir iones metálicos por fuerzas electrostáticas.

En comparación a las tecnologías tradicionales de eliminación de metales pesados, la absorción por microalgas es mejor que el intercambio iónico y la ósmosis inversa en términos de sensibilidad a la presencia de sólidos suspendidos, compuestos orgánicos y la presencia

de otros metales pesados (Lau et al., 1999). Y si se considerase sólo para la remoción de metales pesados las microalgas no vivas tienen las siguientes ventajas: capacidad para tratar grandes volúmenes rápidamente, alta selectividad y especificidad para la capacidad de metales pesados particulares para la eliminación de múltiples metales, así como la limpieza de desechos mixtos que comprenden metales pesados de alta afinidad y alta eficiencia, se requieren menos reactivos costosos suplementarios (estos reactivos causan problemas de eliminación y espacio), no requiere medios de crecimiento y nutrientes activos en una amplia gama de condiciones fisicoquímicas, incluyendo temperatura, pH y presencia de otros iones como inversión moderada de capital de calcio y magnesio y los bajos costos operativos implican el uso de recursos biológicos renovables de forma natural que se producen económicamente de manera respetuosa con el medio ambiente (no solo reduce el nivel de riesgo de desechos peligrosos, sino que también evade el uso de tecnologías químicas nocivas que podrían causar contaminación secundaria) (Kumar et al., 2015).

#### **2.7.6. Importancia de los grupos funcionales en la bioabsorción de metales pesados**

Para cualquier tecnología comercialmente viable de recuperación o remediación de metales, es esencial que se identifiquen los grupos funcionales de biomateriales responsables de la absorción de metales y se cuantifique su contribución a la capacidad general de unión de metales (Rayson & Williams, 2011).

En los sistemas biológicos, los iones duros forman enlaces estables con  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2+}$ ,  $\text{R-COO}^-$  y  $\text{=C=O}$  (todos estos grupos incluyen átomos de oxígeno); mientras que los iones blandos forman enlaces muy fuertes con  $\text{CN}^-$ ,  $\text{R-S}^-$ ,  $\text{-SH}^-$ ,  $\text{-NH}_2^-$  e imidazol (es decir, grupos que contienen átomos de nitrógeno y azufre). Esto implica que los iones duros (de menor tamaño) como Fe, Zn, Mn preferirían unirse con  $\text{OH}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{CO}_3^{2+}$ ,  $\text{R-COO}^-$  y  $\text{=C=O}$ , mientras que los iones blandos (con un diámetro mayor) como Cu, Pb y Cd se uniría a  $\text{CN}^-$ ,  $\text{R-S}^-$ ,  $\text{-SH}^-$ ,  $\text{-NH}_2^-$  e imidazol (Baldrian & Gabriel, 2003).

Los informes sugieren que la biosorción, o unión, de iones metálicos por biomasa de algas surge de la coordinación de los iones a diferentes grupos funcionales en o sobre la célula de algas. Estos grupos de coordinación (proporcionados por proteínas, lípidos y carbohidratos) incluyen restos amino, tioéter, sulfhidrilo, carboxilo, carbonilo, imidazol, fosfato, fenólico, hidroxilo y amida (Lee, Shon, Chung, Lee, & Yang, 1999).

En general, los informes sugieren indiscutiblemente la participación de grupos  $\text{-COOH}$  en la unión de metales como Pb, Cu, Zn, Ni, Cd, Cr, Co, Fe, Au y U; mientras que el grupo  $\text{-OH}$  podría unirse con Pb, Cr, Cd y Cu (Flouty & Estephane, 2012).

Nurchi & Villaescusa (2011) propusieron la clasificación de mayor a menor afinidad de los grupos de la siguiente manera: carboxilato> anillo aromático> hidroxilo> amina> fosfato> carbonilo> tiol> amida> sulfonato.

#### **2.7.7. Factores que influyen en la remoción de metales pesados por microalgas**

Aunque las células de microalgales tienen varios mecanismos de autodefensa para sobrevivir en medios que contienen metales pasados, sin embargo, varios factores influyen en la eliminación de metales. Los organismos acuáticos pueden verse afectados por varios efectos bióticos (tolerancia, tamaño y etapas de la vida, especies, área de superficie, dependiendo de la división de algas, y nutrición relacionada con los organismos de prueba) y abióticos (peso atómico o potencial de reducción del metal, sustancias orgánicas, pH, temperatura, salinidad y dureza y otros) (Dönmez, Aksu, Öztürk, & Kutsal, 1999).

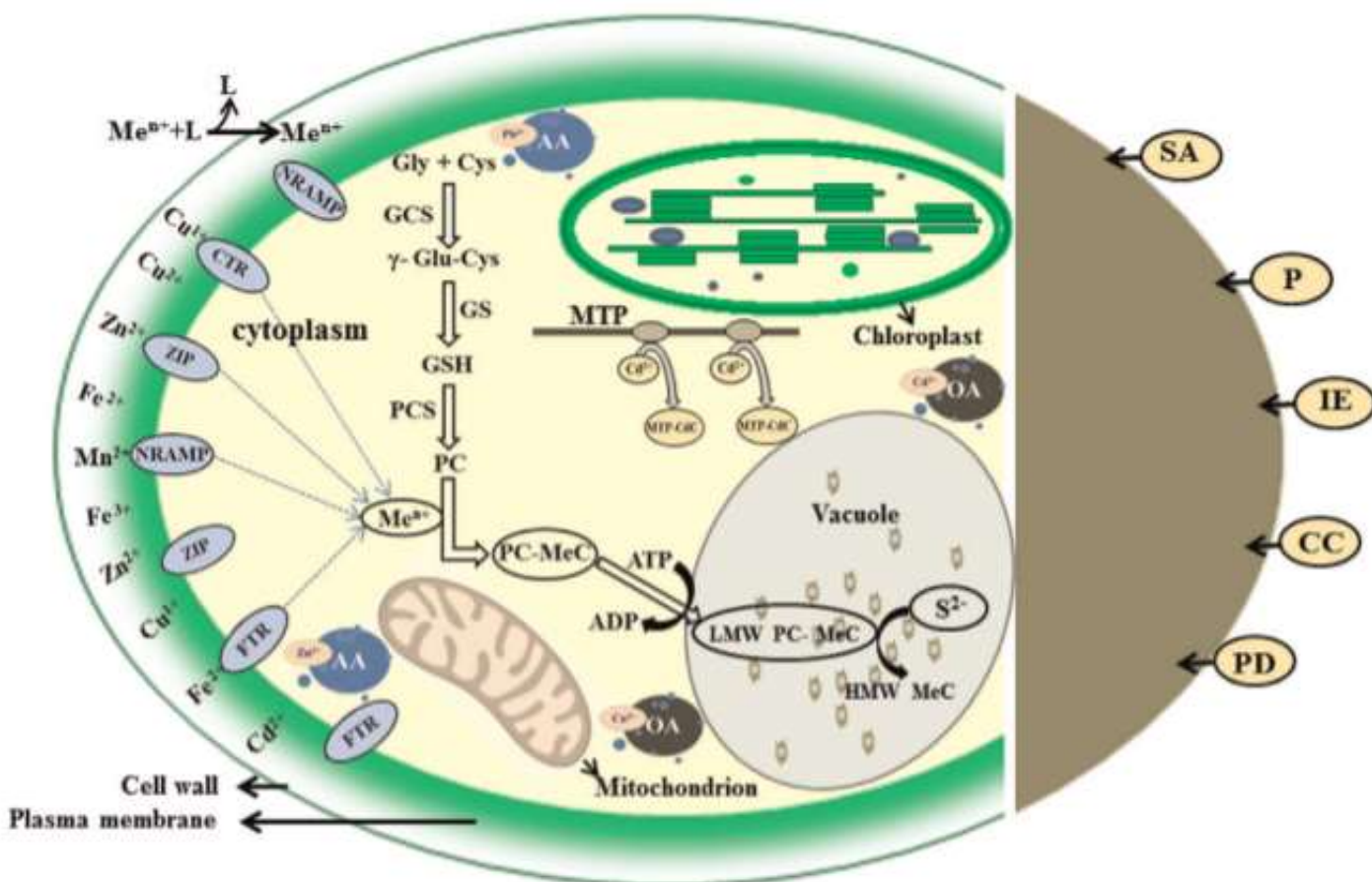


Figura 3. Representación esquemática de bioabsorción de metales pesados por microalgas.

Representación esquemática de varios mecanismos de translocación de metales pesados, secuestro y absorción en microalgas vivas (izquierda), así como no vivas (derecha, de color marrón); incluyendo  $Me^{n+}$  - iones metálicos , L-líquido ( $Me^{n+}+L$  representa al ión metálico en líquido); Transportadores de iones metálicos (como NRAMP, CTR, ZIP y FTR); Vía de biosíntesis de fitoquelatina, complejos de PC y enzimas involucradas en la síntesis de PC (GCS-glutamyl-cisteinil sintasa, GS-glutación sintasa, PCS-fitoquelatina sintasa); AA-Aminoácidos; OA-ácidos orgánicos; LMW PC-MeC- complejos de iones metálicos de fitoquelatina de bajo peso molecular; HMW PC-MeC: complejos de iones metálicos de fitoquelatina de alto peso molecular; MTP - Proteína de metalotioneína; Absorción de

superficie-SA; P- Precipitación; IE- Intercambio de iones; CC- Complejación and quelación y PD- Difusión pasiva (modificado de Perales-Vela et al., 2006; Toress et al., 2008; Monteiro et al., 2012 y Blaby-Haas y Merchant, 2012).

#### **2.7.7.1. Luz**

La fotosíntesis como actividad primordial de las algas se incrementa cuando éstas carecen de nutrientes, a su vez al alcanzar condiciones de saturación de luz se llega a la máxima tasa de crecimiento microalgal. Estas condiciones extremas de luz, puede provocar fotooxidación (también conocida como fotoinhibición), dañar los pigmentos en las células de clorofila disponibles para absorber luz y disminuir la tasa y productividad fotosintética (Park & Craggs, 2011).

#### **2.7.7.2. Temperatura**

El rendimiento algal aumenta al incrementarse la temperatura del sistema de tratamiento hasta obtener una temperatura ideal. Por encima de la temperatura ideal, se produce el aumento de la respiración de las algas y ésta reduce el rendimiento general. La temperatura óptima medida en condiciones de tasa máxima de crecimiento de algas (condiciones suficientes de nutrientes y luz) varía entre las especies de algas, pero a menudo se encuentra entre 28° y 35° C. Sin embargo, ésta también varía cuando las condiciones de luz o nutrientes son limitantes, y el crecimiento a menudo disminuye cuando las algas se ven sometidas a un cambio repentino de temperatura. Por otro lado, la temperatura también puede alterar los equilibrios iónicos del agua del estanque, el pH y la solubilidad del gas (oxígeno y CO<sub>2</sub>), aunque diferentes especies de algas están influenciadas en diferentes grados por este efecto (Park & Craggs, 2011).

#### **2.7.7.3. Potencial de Hidrógeno (pH)**



Cabe resaltar que, en comparación con otros métodos de remoción de metales pesados, la biorremediación tiene ventajas adicionales en términos de ajustarse en particular a distintas variaciones del pH y la cantidad de metales presentes en las aguas a tratarse (Nigro, Stirk, & Van Staden, 2002).

#### **2.7.7.4. Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>)**

Factor fundamental que está condicionado por el pH en el sistema de tratamiento. El pH afecta la disponibilidad biológica de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis. Asimismo, este proceso incrementa el pH por el consumo de CO<sub>2</sub> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, a menudo con pH > 11.

Por otro lado, se ha demostrado que la adición de CO<sub>2</sub> mejora la productividad de algas en los sistemas de tratamiento de aguas residuales a escala experimental (Park & Craggs, 2011).

#### **2.7.7.5. Factores bióticos**

Las capacidades de sensibilidad, captación y remediación del metal varían con cada alga, es decir, difiere con el género y la especie. Por ejemplo, efectos de Cd sobre el crecimiento de *S.oblicuo* y *Desmodesmus pleiomorphus*, y sus correspondientes, los valores de la concentración efectiva media máxima EC50 fue de 0.058 y 1.92 mg/l respectivamente para Cd. En contraste, incluso las algas que pertenecen al mismo grupo pueden tener una capacidad de adsorción diferente. De hecho, las algas pertenecientes al mismo género, pero variando en su especie, responden de manera diferente a los hidruros metales (Holan Z. R. & B., 1994).

#### **2.7.7.6. Factores abióticos**

El pH puede afectar la solubilidad y toxicidad de los metales pesados en el agua; quizás es el parámetro más importante que influye en la adsorción de metales por biomasa microalgal.

Influye en la exposición de metales en solución y tolerancia a algas; particularmente, influye tanto en la unión del metal de la superficie celular química del metal en el agua

Las microalgas remueven los metales pesados debido a la capacidades de adsorción de su pared celular, es la primera barrera para la capacidad de iones minerales; consta especialmente de polisacáridos, proteínas y lípidos, ofreciendo grupos funcionales (COOH, hidroxilos, -OH, fosfatos, -PO<sub>3</sub>, Amoniaco, -NH<sub>2</sub> y sulfhídrico, -SH) (Tejada, Ortiz, & Jaraba, 2015). Estos grupos otorgan una carga negativa a la superficie celular y por tal motivo, una gran afinidad por los iones de Cu y Cd a través de diferentes interacciones (Can & Jianlong, 2010).

## CAPÍTULO III

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

Los ensayos de bioabsorción de plomo mediante biomasa deshidratada de *Chlorella Vullgaris* se desarrollaron en las instalaciones del laboratorio de monitoreo ambiental de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Universidad Peruana Unión (UPeU) con sede en la ciudad de Lima, ubicado en el km 19.5 de la carretera central, Ñaña, Lurigancho - Chosica.



Figura 4. Mapa de ubicación geográfica del Distrito Lurigancho - Chosica.

En coordenadas UTM 18L, Este: 299473 y norte: 8674060, al este de la ciudad de Lima a una altura de 647 msnm.



*Figura 5.* Ubicación del Laboratorio de Monitoreo Ambiental.

Por otro lado, los análisis de concentración inicial (CIP) y final de plomo (CFP) fueron realizados en el Laboratorio DELTA LAB S.A.C.

### **3.2. Características climatológicas**

La zona dónde se realizó el estudio, presenta un clima variado seco, presentando una temperatura máxima de 26.1°C y mínima de 14.04°C (SENAMHI, 2018).

### 3.3. Materiales, insumos y equipos

Los materiales, insumos químicos y equipos que se utilizaron en los ensayos de bioabsorción y la producción de microalgas fueron:

*Tabla 3.* Materiales utilizados en el desarrollo de la investigación.

Materiales	Unidad	Cantidad
Matrazes Erlenmeyer de 150 ml	Unidad	2
Matrazes Erlenmeyer de 250 ml	Unidad	2
Matrazes Erlenmeyer de 2000 ml	Unidad	4
Vaso precipitado de 500 ml	Unidad	4
Vaso precipitado de 1000 ml	Unidad	4
Vaso Precipitado de 2000 ml	Unidad	6
Probetas de 1000 ml	Unidad	4
Probetas de 2000 ml	Unidad	6
Pipetas volumétricas de 10 ml	Unidad	3
Pisetas de 500 ml	Unidad	3
Cucharillas	Unidad	2
Fiola de 500 ml	Unidad	1
Frascos de Polietileno de 90 ml	Unidad	16
Frascos de vidrio de 100 ml	Unidad	4
Cronómetro	Unidad	1
Papel Filtro N° 42	Unidad	17
Varillas de vidrio	Unidad	4
Tubo de fondo cónico de 15 ml	Unidad	1
Papel aluminio	Paquete	1
Malla Tyler N° 100	Unidad	1
Fuentes de metal	Unidad	4
Foco LED	unidad	3
Listón de madera	Unidad	1
Cable eléctrico	metros	2
Cinta aislante	Unidad	1
Manguera de Pvc de 1 pulgada	metros	5
Llave de plástico para agua	Unidad	3
Esponja de aire	Unidad	12
Frascos ámbar de 50 ml	Unidad	5
Pipetas volumétricas de 10 ml	Unidad	6
Extensión eléctrica	Unidad	1

*Tabla 4.* Insumos utilizados en la investigación.

Insumos	Unidad	Cantidad
Agua destilada	L	46
Ácido Nítrico	MI	40
Ácido Cítrico	MI	100
Nitrato de Plomo	Gr	2
Hidróxido de Sodio	MI	100
Bay Folan	MI	20

*Tabla 5.* Equipos empleados en el desarrollo de la investigación.

Equipos	Marca	Serie	Cantidad
Estufa	ECOCEL	D 160041	2
Potenciómetro	HANNA		1
Agitador magnético	TOPSCIEN INSTRUMENT	8011786	1
Balanza Analítica	AyD COMPANY, LIMITED	6A7703497	1
Espectrofotómetro	THERMO SCIENTIFIC	ICE 3000	1
Generador de Hidruros	THERMO SCIENTIFIC	VP 100	1
Bomba de aire	HAGEN	15561111164	12
Bomba de vacío	PALL	13158	1

### **3.4. Metodología**

El desarrollo de la investigación se realizó en cinco etapas: Adquisición y producción de microalgas; recuperación de la biomasa de microalgas; preparación de las soluciones de plomo; ensayos de bioabsorción a escala de laboratorio y análisis de la concentración final de plomo mediante espectrofotometría de absorción atómica por llama de acetileno.



Figura 6. Diagrama de Flujo de la Investigación.

### 3.4.1. Adquisición y producción de Microalgas

#### 3.4.1.1. Adquisición de microalgas

Las microalga empleada para la presente investigación fue *Chlorella Vullagaris*; se obtuvieron del Instituto del mar del Perú (IMARPE), el Callao, Lima. Ubicado en el Callao, Avenida General Valle, La Punta 07021, con coordenadas UTM 18 L 265101.18 m Este, 8665109.75 m Norte.

El IMARPE cuenta con un Banco de Germoplasma donde se conservan diversos organismos acuáticos con fines de investigación. Asimismo, las microalgas empleadas en esta investigación, fueron inicialmente cultivadas y obtenidas de este lugar. Fueron 15 ml de inóculo de microalgas.

#### 3.4.1.2. Producción de Microalgas

El microorganismo utilizado en la presente investigación fue la microalga verde *Chlorella Vullagaris*. Estaba aislada en el Banco de Germoplasma del Instituto del mar del Perú.

El aislamiento y la producción se lograron por dilución y la técnica de plantación o siembra. El cultivo de las microalgas se realizó en ocho siembras:

#### *3.4.1.2.1. Primera siembra*

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 150 ml que contenía 50 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1ml/L y 15 ml de inóculo de microalgas obtenidas del IMARPE. El matraz se dejó cubierto con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y se agitó manualmente cada 3 horas durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

#### *3.4.1.2.2. Segunda siembra*

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 150 ml que contenía 100 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L y 50 ml de inóculo de microalgas de la primera siembra. El matraz se dejó cubierto con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y se agitó manualmente cada 3 horas durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

#### *3.4.1.2.3. Tercera siembra*

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 500 ml que contenía 250 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L y 150 ml de inóculo de microalgas de la segunda siembra. El matraz se dejó cubierto con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad y se agitó manualmente cada 3 horas durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.



#### 3.4.1.2.4. *Cuarta siembra*

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en una probeta con capacidad de 2000 ml que contenía 1000 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L proyectado para 1400 ml y 400 ml de inóculo de microalgas de la tercera siembra. La probeta se dejó cubierto con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, aireación con un inyector de aire marca Hagen modelo n° 200, durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

#### 3.4.1.2.5. *Quinta siembra*

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en dos probetas con capacidad de 2000 ml que contenía 1300 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L proyectado para 2000 ml y 700 ml de inóculo de microalgas de la cuarta siembra (las proyecciones de Bay Folan fueron calculadas para cada probeta). Las probetas se dejaron cubiertas con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, aireación con un inyector de aire marca Hagen modelo n° 200, durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

#### 3.4.1.2.6. *Sexta siembra*

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en cuatro probetas con capacidad de 2000 ml que contenía 1000 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L proyectado para 2000 ml y 1000 ml de inóculo de microalgas de la quinta siembra (las proyecciones de Bay Folan fueron calculadas para cada probeta). Las probetas se dejaron cubiertas con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, aireación con un inyector de aire marca Hagen modelo n° 200 durante

7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

#### **3.4.1.2.7. Séptima siembra**

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en ocho probetas con capacidad de 2000 ml que contenía 1000 ml de agua destilada, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L proyectado para 2000 ml y 1000 ml de inóculo de microalgas de la sexta siembra (las proyecciones de Bay Folan fueron calculadas para cada probeta). Las probetas se dejaron cubiertas con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, aireación con un inyector de aire marca Hagen modelo n° 200, durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

#### **3.4.1.2.8. Octava siembra**

Las microalgas se cultivaron en condiciones estériles en ocho probetas con capacidad de 2000 ml y cuatro de 1000ml que contenía 1000 ml y 500 ml de agua destilada respectivamente, medio de cultivo Bay Folan diluido en el agua destilada a concentración de 1 ml/L proyectado para 2000 ml y 1000 ml respectivamente, 1000 ml y 500 ml de inóculo de microalgas de la sexta siembra respectivamente (las proyecciones de Bay Folan fueron calculadas para cada probeta). Las probetas se dejaron cubiertas con papel aluminio, a fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, aireación con un inyector de aire marca Hagen modelo n° 200, durante 7 días bajo iluminación proporcionada por un foco LED con intensidad de fotón  $80 \text{ umol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a pH 7.

### **3.4.2. Recuperación de la biomasa de microalgas**

Al final del periodo de producción de microalgas, el cultivo se colocó en envases de plástico con un volumen máximo de 500 ml y se separó con ayuda de una centrifuga Hettich

Zentrifugen a una velocidad de 4000 rpm durante 15 minutos. La biomasa recuperada en medio acuoso se lavó una vez con agua desionizada y separada nuevamente por centrifugación. Luego la biomasa en medio acuoso, fue colocada en fuentes metálicas y secadas en una estufa ECOCEL D 160041, durante 48 horas a 105°C. Todo esto se llevó a cabo en el Laboratorio de Química de la Escuela Profesional de Industrias Alimentarias. Después de las 48 horas se retiró la biomasa deshidratada con un 3% de humedad aproximado. La determinación de la humedad de la biomasa se realizó con una balanza electrónica marca AND HR-250AZ en el Laboratorio de Química de la Escuela Profesional de Industrias Alimentarias. Posteriormente, la biomasa seca fue macerada manualmente con un mortero de cerámica y separada mediante un tamiz Tyler malla 100. La biomasa que pasó el tamiz con la malla 100 se utilizó para los ensayos de bioabsorción. Cabe resaltar que esta biomasa bajo este procedimiento ya no se encuentra viva, por lo tanto, el proceso evaluado de la bioabsorción.

### **3.4.3. Preparación de las soluciones de plomo**

Para el desarrollo de los ensayos de bioabsorción, se preparó tres soluciones en un vaso de 2 litros para cada uno: a concentraciones de 22, 46 y 70 mg/L Pb total.

Para la preparación de las soluciones de 22, 46 y 70 mg/L de Pb se empleó 0.08, 0.16 y 0.22 gramos de Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> “Nitrato de Plomo” en 2 litros de agua destilada y cada solución se sometió al agitador a 800 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se procedió a extraer una muestra de 60 ml de cada vaso, que fueron enviados al Laboratorio Delta Lab S.A.C. preservados con ácido nítrico a pH menor a 2. Los cálculos empleados en la preparación de las tres soluciones se muestran a continuación:

Cantidad aproximada en gr para alcanzar 22 mg/L en 2L =

Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> peso atómico = 331.2 .....(Ecuación 1)

Pb (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 331.2 → (Pb) 207.3 .....(Ecuación 2)

La última ecuación nos dice que el 62.6% en 1 gr de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  es Pb puro.

Entonces:

- Cantidad utilizada de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  en gr para alcanzar 22 mg/L de Pb en 2L = 0.08 gr.
- Cantidad utilizada de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  en gr para alcanzar 46 mg/L de Pb en 2L = 0.16 gr.
- Cantidad utilizada de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  en gr para alcanzar 70 mg/L de Pb en 2L = 0.22 gr.



*Figura 7. Nitrato de Plomo utilizado en los ensayos de bioabsorción.*

#### **3.4.4. Ensayos de bioabsorción a escala de laboratorio**

Los ensayos de optimización de parámetros para la bioabsorción de plomo se llevaron a cabo en vasos precipitados de 250 ml con un volumen de 150 ml de solución cada uno, por un tiempo de 20 minutos y agitación de 200 revoluciones por minuto (RPM) mediante el uso

del agitador magnético TOPSCIEN INSTRUMENT del Laboratorio de Monitoreo Ambiental. El ajuste de los diferentes niveles de los factores se realizó según las siguientes consideraciones:

- Temperatura: Se usó el agitador magnético TOPSCIEN INSTRUMENT, configurado a temperatura ambiental del Laboratorio de Monitoreo Ambiental.
- pH: A pesar del lavado de las microalgas, estas pueden conservar trazas de sales del medio nutritivo que son de carácter básico, por lo que las microalgas aumentan el pH de la solución, lo que favorece la precipitación en lugar de la bioabsorción. Para mantener el valor del pH en los valores deseados acorde al Diseño Box – Behnken (pH:3, 5 y 7), se usó las soluciones amortiguadoras, ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ) – hidróxido de sodio (NaOH) a concentración 1N y 6N para ambos.
- Velocidad de agitación: Todas las pruebas se realizaron a una velocidad de 200 rpm, conforme a los estudios de Goher et al. (2016).
- Concentración inicial de plomo: Se calculó la cantidad de nitrato de plomo que debía ser adicionado a 2 litros de agua destilada y posteriormente a su preparación, se extrajeron muestras de 150 ml de acuerdo a la concentración requerida por cada tratamiento. Las adiciones de los volúmenes se realizaron con pipetas aforadas de 10 ml.
- Concentración de microalga: Se calculó la cantidad de microalga que debía ser adicionada a la solución de 150 ml en cada vaso precipitado para cumplir con la concentración predefinida en el diseño experimental Box – Behnken. El peso de la microalga seca y tamizada se determinó mediante una balanza electrónica Henkel de cuatro cifras decimales del Laboratorio de Monitoreo Ambiental.

Luego de cada ensayo de absorción en el agitador magnético, las muestras fueron filtradas con papel de filtro Whatman. Estos se colocaron en un embudo de cerámica y éste

último se colocó en el orificio superior de un matraz kitasato con capacidad de 500 ml. Asimismo, el matraz se conectó a una manguera que provenía de la bomba succión marca PALL con capacidad de voltaje 220/240V y frecuencia de 50 Hz, permitiendo así la succión por vacío. Por cada tratamiento se utilizó un aproximado de 80 ml de muestra final.

#### **3.4.5. Análisis de la concentración final de plomo**

Posteriormente a cada ensayo de absorción y filtrado, se obtuvieron 17 muestras de todos los tratamientos. Estas muestras fueron preservadas con ácido nítrico  $\text{HNO}_3$  y posteriormente fueron llevadas al Laboratorio Delta Lab S.A.C. para determinar la concentración final de plomo total mediante el método SMEWW – APHA-AWWA-WEF Part. 3030E y 3111B, 23rd Ed. 2017, Nitric Acid Digestion / Direct Air-Acetylene Flame Method.

### **3.5. Variables en estudio**

#### **3.5.1. Variables independientes**

- Concentración inicial de plomo (CIP)
- Concentración de microalgas (M)
- Potencial de Hidrógeno (pH)

#### **3.5.2. Variables dependientes**

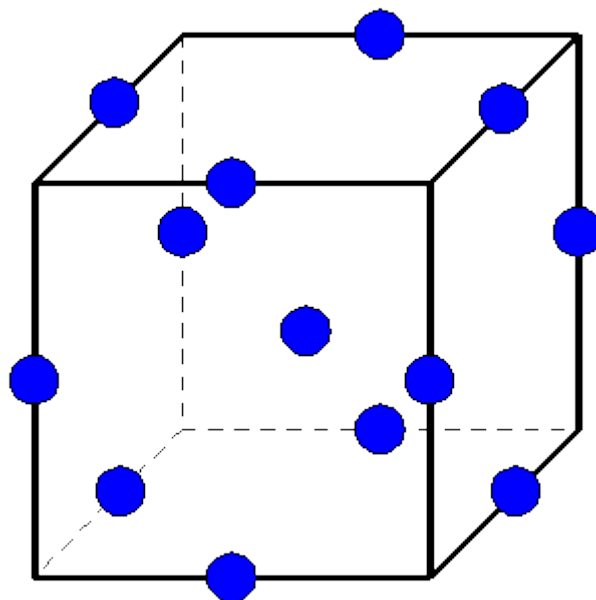
- % de bioabsorción de plomo (Rpb)
- Concentración final de Plomo (CFP)

### **3.6. Diseño de la investigación**

En ésta investigación se utilizó un diseño de tipo experimental, el cuál según Escalante (2014), menciona que es una prueba o serie de pruebas para observar algún fenómeno.

Asimismo Hernández (2018) hace referencia a una investigación en la que se manipulan deliberadamente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes) para analizar las consecuencias que tal manipulación tiene sobre una más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes) dentro de una situación de control para el investigador. Los requisitos, condiciones necesarias o características de los experimentos son fundamentalmente manipulación intencional de una o más variables independientes, medición de las variables dependientes y control sobre la situación experimental.

Precisamente, se empleó la metodología de superficie de respuestas (MSR), ésta constituye una herramienta muy poderosa para la obtención de las condiciones óptimas de operación de un proceso, a través de la modelación empírica del comportamiento del mismo. Es un método secuencial de optimización dinámica que busca una región de operación más cercana al óptimo (Escalante, 2006).



*Figura 8.* Gráfica representativa de la metodología superficie de respuesta (MSR).  
(Escalante, 2006).

Dentro de la metodología de superficie respuesta, se encuentra el diseño experimental de tipo Box – Behnken. El cuál se empleó para analizar los efectos principales y términos

cuadráticos y de interacción entre los parámetros concentración inicial de plomo, concentración de microalgas y pH. Cabe resaltar que éste diseño es de segundo orden, debido a que, en éste tipo de orden, se requieren que los niveles de los factores involucrados sean al menos tres. Sin embargo, puede usarse de manera directa e independiente si se quieren evaluar no solamente los efectos principales en una situación experimental específica. Además, los modelos ajustados a partir de estos diseños permiten plantear diferentes escenarios de optimización (Dominguez & Castaño, 2016).

Por otro lado, la influencia de las concentraciones de la microalga, de la concentración inicial de plomo y los niveles de pH fueron analizados por ANOVA al 95% de confianza empleando Statistica 13.3. Los rangos y niveles de las variables independientes utilizados en la forma codificada y no codificada se muestran en las Tablas 6 y 7:

*Tabla 6.* Factores y niveles del Diseño experimental Box - Behnken

<b>Parámetros</b>	<b>Niveles</b>		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> : Dosis microalgas (g/L)	1.5	2	2.5
X <sub>2</sub> : Concentración de Pb (mg/L)	22	46	70
X <sub>3</sub> : pH	3	5	7



Tabla 7. Variables independientes del diseño experimental Box - Behnken

Tratamientos	Variables independientes					
	Codificados			No codificados		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Microalgas (g/L)	Plomo inicial (mg/L)	pH
1	-1	-1	0	1.5	22	5
2	1	-1	0	2.5	22	5
3	-1	1	0	1.5	70	5
4	1	1	0	2.5	70	5
5	-1	0	-1	1.5	46	3
6	1	0	-1	2.5	46	3
7	-1	0	1	1.5	46	7
8	1	0	1	2.5	46	7
9	0	-1	-1	2.0	22	3
10	0	1	-1	2.0	70	3
11	0	-1	1	2.0	22	7
12	0	1	1	2.0	70	7
13	0	0	0	2.0	46	5
14	0	0	0	2.0	46	5
15	0	0	0	2.0	46	5
16	0	0	0	2.0	46	5
17	0	0	0	2.0	46	5

Los experimentos fueron realizados en el orden establecido y el tratamiento de los datos fueron realizados para comparar el efecto de los tratamientos. La variable dependiente (Y) fue obtenida en modelos de función lineal, cuadrática e interacción y los datos experimentales fueron ajustados al modelo polinomial de segundo orden como se muestra en la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^2 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^2 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^2 \beta_{ij} X_i X_j \dots \dots \dots \text{Ecuación 3}$$

Dónde:

Y es la variable dependiente predicha (Concentración final de plomo y Remoción de plomo)

$\beta_0$ : Coeficiente intercepto

$\beta_i, \beta_{ii}, \beta_{ij}$ : Coeficientes del modelo lineal, cuadrático e interacción, respectivamente.

$X_i$  y  $X_j$ : Valores codificado de las variables independientes (Microalgas, Concentración inicial de plomo y  $pH$ ).

### 3.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de las variables independientes ( $pH$ , concentración inicial de plomo y microalgas) para la variable dependiente (concentración final de plomo y remoción de plomo) en el diseño con la MSR, fueron realizados utilizando el programa Statistica 13.1 con un intervalo de confianza de 95 % ( $p \leq 0.05$ ).

La función de la metodología superficie de respuesta fue generar un modelo polinomial, por ello se analizaron las siguientes pruebas:

#### 3.7.1. Anova

La prueba ANOVA para hallar el coeficiente de determinación del modelo ( $R^2$  y  $R^2_{adj}$ ). Conforme a Barros, Scarmio y Bruns (2001) y Khru y Cornell (1996), el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) mide la proporción de variación total de la respuesta que es explicada por el modelo, de modo cuanto mayor sea  $R^2$  y esté más cercano a 1, menor será el error y mejor será el ajuste del modelo a la respuesta observada (Barros et al., 2003).

#### 3.7.2. Diagrama de Pareto

El diagrama de Pareto es una gráfica que representa en forma ordenada a los factores o variables en cuanto a importancia o magnitud, la frecuencia de la ocurrencia del resultado en factores o variables respuestas (Gándara, 2014).

Otra definición nos dice que es un diagrama que se utiliza para determinar el impacto, influencia o efecto que tienen determinados elementos sobre un aspecto. Asimismo, consiste en un gráfico de barras similar al histograma que se conjuga con una ojiva o curva de tipo creciente y que representa en forma descendente el grado de importancia o peso que tienen los diferentes factores que afectan a un proceso, operación o resultado (Cusiyupanqui, 2013).

### 3.7.3. Estimación de efecto y coeficiente de regresión

Seguidamente se analizó el ajuste del modelo, si fue representativo y predictivo en la regresión y en el residuo a través de la falta de ajuste y error puro conforme a la siguiente ecuación:

$$SS_{Residual} = SS_{Error\ puro} + SS_{Falta\ de\ ajuste} \dots\dots\dots Ecuación\ 4$$

Dónde:

$SS_{Residual}$  es la suma de cuadrados del error residual.

$SS_{Error\ puro}$  es la suma de cuadrado del error puro

$SS_{Falta\ de\ ajuste}$  es la suma de cuadrado de la falta de ajuste

Para que el modelo polinomial sea considerado representativo y predictivo en la regresión del modelo polinomial, el  $F_{calculado}$  debe ser mayor que el  $F_{tabulado}$  (Garcia, 2012).

Según Bruns et al. (2003) y Araujo (2008) indican que un modelo representativo es cuando el  $F_{calculado}$  de la regresión en relación a los residuos sea al menos 3 veces mayor que el  $F_{tabulado}$ , indicando que la variación es explicada por la regresión del modelo y no por los residuos. Por otro lado, Khuri y Cornell (1996) afirman que para que la regresión de un modelo sea significativo y predictivo, la fracción  $F_{calculado}/F_{tabulado}$  ( $F^*$ ) debe ser mayor que 10. Para analizar el modelo del ajuste polinomial, se verificó por la significancia de la falta de ajuste en el error puro y para que se predictivo el ajuste del modelo polinomial el valor del  $F_{calculado}$  debe ser menor al valor del  $F_{tabulado}$  (Barros, Scarminio y Bruns, 2001).

## CAPITULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Caracterización inicial del agua

En la Tabla 8 se muestran los resultados de las tres soluciones de nitrato de plomo preparadas, obtenidos durante el análisis de metales por espectrometría de absorción atómica por llama de acetileno en el laboratorio de agua de DeltaLab S.A.C.

*Tabla 8.* Análisis de caracterización del agua -

Concentración Inicial de Plomo (Pb)

Muestras	Concentración inicial de Plomo	Unidad
1	22	mg/L
2	46	mg/L
3	70	mg/L

## 4.2. Análisis de los resultados obtenidos Post – Tratamiento

### 4.2.1. Resultados de la Concentración final de Plomo (CFP) mediante el Diseño Box - Behnken

Tabla 9. Resultados de la Concentración final de Plomo (CFP).

Tratamientos	Variables independientes						Variable dependiente
	Codificados			No codificados			Concentración final de Plomo (CFP) (mg/L)
	X1	X2	X3	Microalgas (g/L)	Plomo inicial (mg/L)	pH	
1	-1	-1	0	0.23	22	5	16.01
2	1	-1	0	0.38	22	5	11.72
3	-1	1	0	0.23	70	5	30.11
4	1	1	0	0.38	70	5	14.33
5	-1	0	-1	0.23	46	3	2.89
6	1	0	-1	0.38	46	3	2.3
7	-1	0	1	0.23	46	7	1.28
8	1	0	1	0.38	46	7	2.36
9	0	-1	-1	0.3	22	3	7.51
10	0	1	-1	0.3	70	3	12.21
11	0	-1	1	0.3	22	7	5.94
12	0	1	1	0.3	70	7	8
13	0	0	0	0.3	46	5	2.09
14	0	0	0	0.3	46	5	2.4
15	0	0	0	0.3	46	5	2.44
16	0	0	0	0.3	46	5	1.61
17	0	0	0	0.3	46	5	2.19

La Tabla 9 muestra los resultados de la Concentración final de Plomo (mg/L) utilizando tres escalas de concentración para las variables independientes; en las repeticiones de las pruebas se logró obtener una concentración final de Plomo de 1.28 mg/L de acuerdo a las siguientes condiciones en las variables independientes, pH 7, concentración inicial de Plomo 46 mg/L y microalgas 1.5 g/L, considerándose de acuerdo a

dichas condiciones el mejor resultado obtenido, representando el 97.2 % de remoción de Plomo.

#### 4.2.2. Análisis de Varianza para la Concentración Final de Plomo (CFP)

Tabla 10. Resultados de la varianza (ANOVA) para la Concentración Final de Plomo (CFP) mediante el diseño Box - Behnken.

Factor	SM	GL	CM	F-valor	p-valor
(1) Microalgas (g/L)(L)	47,9220	1	47,9220	432,392	0,000032
Microalgas (g/L)(Q)	98,8176	1	98,8176	891,614	0,000007
(2)Concentración inicial de Plomo (mg/L)(L)	68,8551	1	68,8551	621,268	0,000015
Concentración inicial de Plomo (mg/L)(Q)	514,3019	1	514,3019	4640,458	0,000000
(3)Potencial de hidrógeno (pH)(L)	6,7161	1	6,7161	60,598	0,001469
Potencial de hidrógeno (pH)(Q)	96,3246	1	96,3246	869,120	0,000008
1L by 2L	33,0050	1	33,0050	297,799	0,000066
1L by 3L	0,6972	1	0,6972	6,291	0,066186
2L by 3L	1,7424	1	1,7424	15,721	0,016608
Lack of Fit	67,4511	3	22,4837	202,867	0,000080
Pure Error	0,4433	4	0,1108		
Total SS	929,8654	16			

$R^2=0.92698$ ,  $R^2_{\text{ajustado}}=0.833311$ , donde: SM: Suma de cuadrados, GL: Grados de Libertad,

CM: cuadrados medios.

El análisis de la varianza (ANOVA) para la Concentración final de Plomo (CFP), el cual se observa en la Tabla 10, muestra que los efectos principales del absorbente Microalgas (L y Q), la Concentración inicial de Plomo (L y Q), el Potencial de Hidrógeno (L y Q) y las interacciones entre los factores Microalgas (L) con la Concentración inicial de Plomo (L), la Concentración Inicial de Plomo (L) con el Potencial de hidrógeno (L) son significativos ( $p<0.05$ ). Pero la interacción Microalgas (L) con Potencial de hidrógeno (L) no fue significativa ( $p=0.07$ ). Asimismo, puede observarse que la suma de cuadrados del error puro (0,4433) presenta un valor pequeño en comparación a la suma de cuadrados total, lo cual indica el

correcto funcionamiento del punto central evaluado (2 g/L de CV). Con respecto al coeficiente de determinación ( $R^2$ ), se pudo establecer un 92.7%, mostrando la adecuación del modelo en predecir el efecto de las Microalgas, la concentración inicial de Plomo y el Potencial de Hidrógeno en la adsorción de Plomo por la microalga *Chlorella Vulgaris*. Además, se observa que el ajuste del modelo en el p valor no es significativa ( $p=0.0001$ ), es decir, que el ajuste general del modelo para la remoción de Pb es estadísticamente no significativo en error residual en los puntos centrales.

#### **4.2.3. Análisis de Pareto para la Concentración Final de Plomo (CFP)**

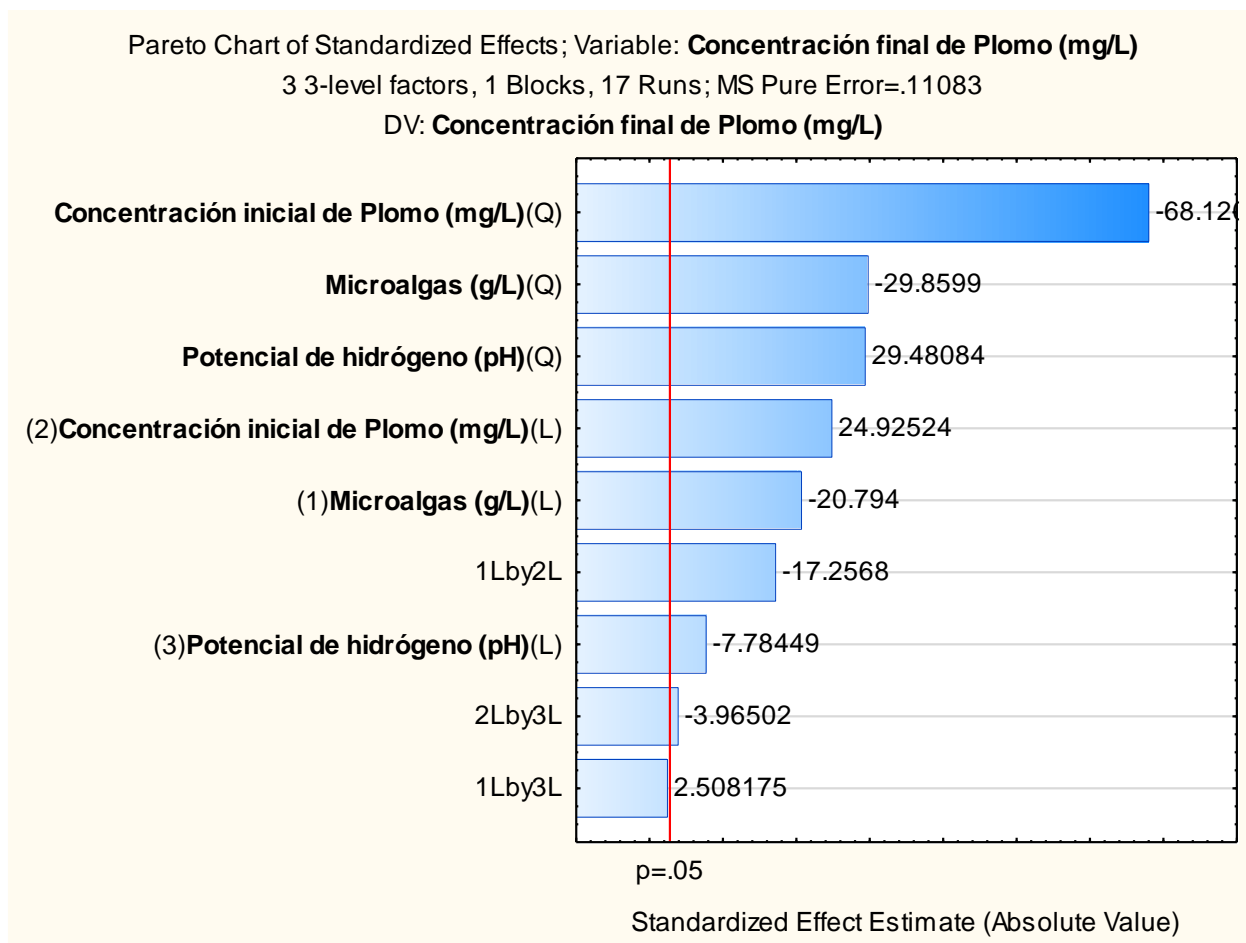


Figura 9. Diagrama de Pareto para el Diseño experimental Box - Behnken, donde se muestra la significancia y el efecto de los factores evaluados (componentes de las mezclas para la adsorción de Plomo) considerando un  $\alpha=0.05$ .

En la Figura 9, el diagrama de Pareto para la adsorción de Pb, muestra que las variables determinantes o estadísticamente significativas ( $\alpha<0.05$ ) para la remoción de Pb, fueron la CIP (L y Q), la M (L y Q), el pH (L y Q) y las combinaciones de M (L) con CIP (L) y CIP (L) con pH (L), pero la variable que mostró mayor influencia fue la Concentración inicial de Plomo (Q), seguidas de las Microalgas (Q), el Potencial de Hidrógeno (Q), la Concentración inicial de Plomo (L), las Microalgas (L) y el Potencial de Hidrógeno (L).



#### 4.2.4. Estimaciones del efecto para la Concentración Final de Plomo (CFP)

Tabla 11. Resultados de las estimaciones de efecto para la concentración final de Plomo (CFP)

Factor	Effect	Std. Err. Pure Err	t(4)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Interc.	9,5550	0,096103	99,4243	0,000000	9,2882	9,8218
(1)Microalgas (g/L)(L)	-4,8950	0,235404	-20,7940	0,000032	-5,5486	-4,2414
Microalgas (g/L)(Q)	-4,8445	0,162241	-29,8599	0,000007	-5,2950	-4,3940
(2)Concentración inicial de Plomo (mg/L)(L)	5,8675	0,235404	24,9252	0,000015	5,2139	6,5211
Concentración inicial de Plomo (mg/L)(Q)	-11,0520	0,162241	-68,1209	0,000000	-11,5025	-10,6015
(3)Potencial de hidrógeno (pH)(L)	-1,8325	0,235404	-7,7845	0,001469	-2,4861	-1,1789
Potencial de hidrógeno (pH)(Q)	4,7830	0,162241	29,4808	0,000008	4,3325	5,2335
1L by 2L	-5,7450	0,332911	-17,2568	0,000066	-6,6693	-4,8207
1L by 3L	0,8350	0,332911	2,5082	0,066186	-0,0893	1,7593
2L by 3L	-1,3200	0,332911	-3,9650	0,016608	-2,2443	-0,3957

En la Tabla 11 se observan los resultados de las estimaciones de efecto, dónde la primera columna muestra los valores de los efectos, la segunda los valores de la desviación estándar representadas a través del error puro. También el valor p visualizado en la cuarta columna para todos sus valores menores que el nivel de significancia, nos afirman que los efectos son significativos a 95% de nivel de confianza, el único que no mostró un valor estadísticamente significativo ( $p=0.07$ ) fue la interacción M (L) con pH (L).

#### 4.2.5. Resultados del coeficiente de regresión para la Concentración Final de Plomo (CFP)

Tabla 12. Resultados del coeficiente de regresión para la Concentración final de Plomo (CFP).

Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	T (4)	p	-95% Cnf.Limt	95% Cnf.mt
Mean/Interc.	75,8126	3,529948	21,4770	0,000028	66,0119	85,6133
(1)Microalgas (g/L)(L)	-73,4833	2,809575	-26,1546	0,000013	-81,2839	-65,6826
Microalgas (g/L)(Q)	19,3780	0,648964	29,8599	0,000007	17,5762	21,1798
(2)Concentración inicial de Plomo (mg/L)(L)	-1,0955	0,042022	-26,0699	0,000013	-1,2122	-0,9788
Concentración inicial de Plomo (mg/L)(Q)	0,0192	0,000282	68,1209	0,000000	0,0184	0,0200
(3)Potencial de hidrógeno (pH)(L)	11,2969	0,551592	20,4805	0,000034	9,7654	12,8283
Potencial de hidrógeno (pH)(Q)	-1,1957	0,040560	-29,4808	0,000008	-1,3084	-1,0831
1L by 2L	-0,2394	0,013871	-172,568	0,000066	-0,2779	-0,2009
1L by 3L	0,4175	0,166456	2,5082	0,066186	-0,0447	0,8797
2L by 3L	-0,0137	0,003468	-3,9650	0,016608	-0,0234	-0,0041

$R^2=0.92698$ ,  $R^2=0.83311$ , donde Regressn Coeff: Coeficiente de regresión, Std Err

$$CFP = 75,8126 - 73,4833 M + 19,3780 M^2 - 1,0955 CIP + 0,0192 CIP^2 - 0,2394 MCIP$$

$$CFP = 75,8126 - 73,4833 M + 19,3780 M^2 - 1,0955 CIP + 0,0192 CIP^2 - 0,2394 M(CIP)$$

Pure Err: Desviación estándar representado por el error puro.

Los resultados del coeficiente de regresión para la CFP (Tabla 12), muestran que los factores M (L y Q), CIP (L y Q), pH (L y Q), las interacciones M (L) con CIP (L) y CIP (L) con pH (L) fueron estadísticamente significativos a un 95% de nivel de confianza, pero la interacción M (L) con pH (L) no fue estadísticamente significativa ( $p=0.07$ ).

#### 4.2.6. Interacción de las variables Microalgas (M) y Concentración inicial de plomo (CIP)

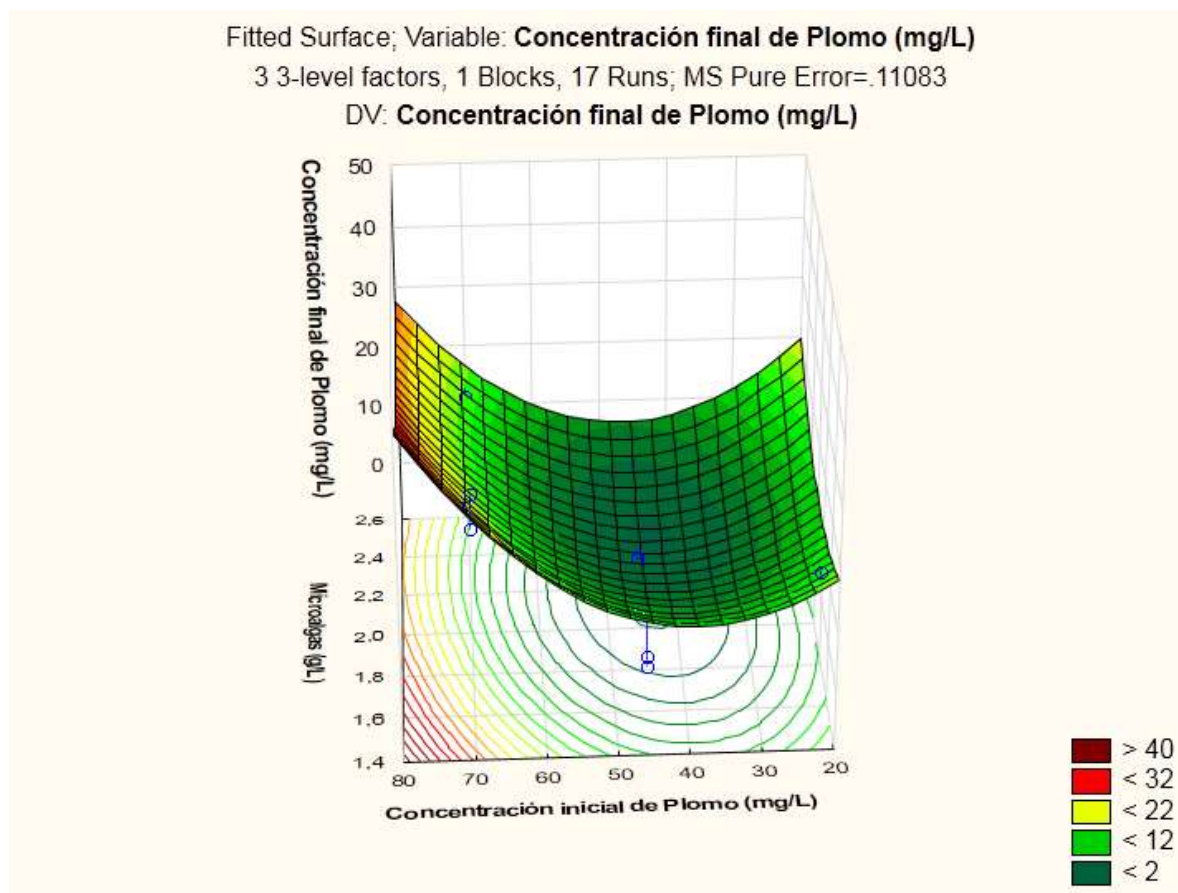


Figura 10. Superficie de respuesta de las variables Concentración inicial de Plomo (CIP) y Microalgas (M) para la Concentración Final de Plomo (CFP).

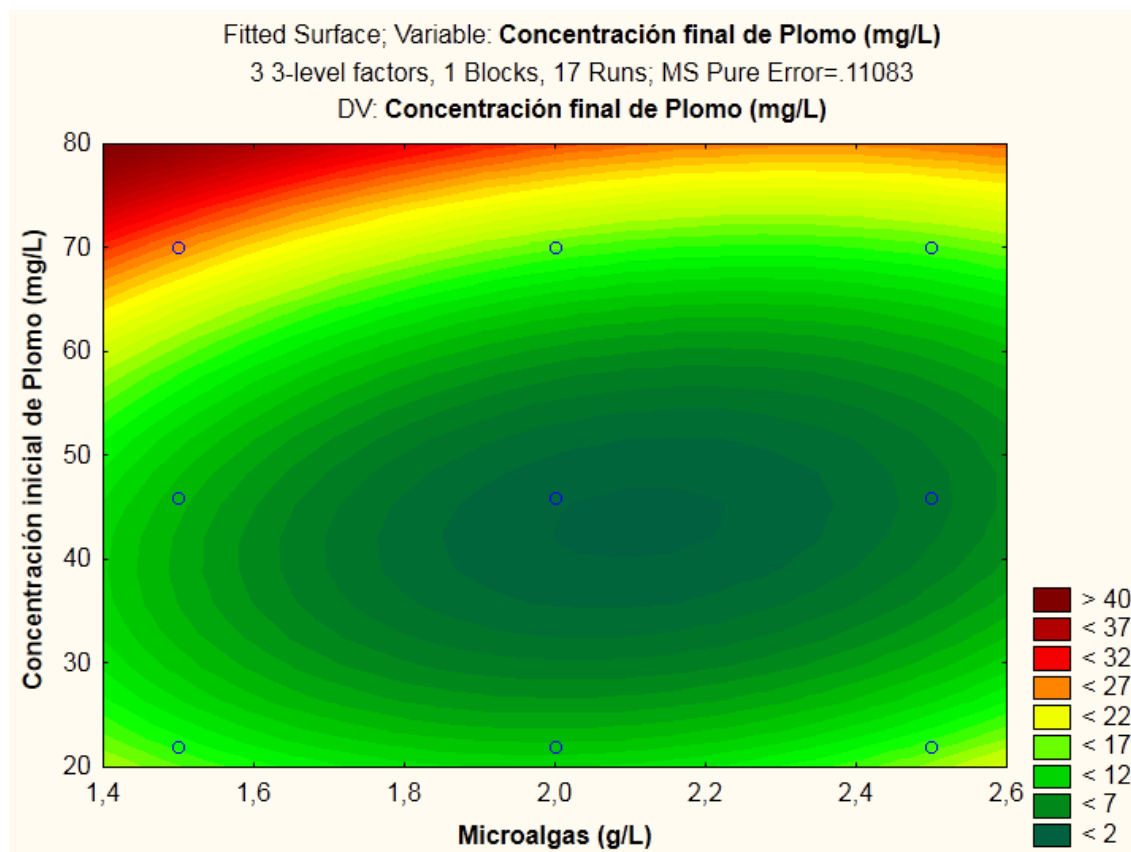


Figura 11. Gráfica de contorno de las variables Concentración inicial de Plomo (CIP) y Microalgas (M) para la Concentración Final de Plomo (CFP).

En las Figuras (10 y 11) se observa la superficie de respuesta y las curvas de contorno en la Concentración final de Plomo (CFP), con la interacción de las variables Microalgas (M) y Concentración inicial de Plomo (CIP). Estas indican que cuando se trabajó a concentraciones de 2 a 2.2 g/L de M y una CIP entre 35 y 55 mg/L, se obtuvieron Concentraciones finales de Plomo (CFP) menores a 2 mg/L (región verde oscura).

La siguiente ecuación de las regresiones significativas es el modelo generado por las variables M y CIP para la CFP:

$$CFP = 75,8126 - 73,4833 M + 19,3780 M^2 - 1,0955 CIP + 0,0192 CIP^2 - 0,2394 MCIP$$

Ecuación 5

Donde:

**CFP:** Concentración final de Plomo (mg/L)

**M:** Microalgas (g/L)

**CIP:** Concentración inicial de Plomo (mg/L)

Cossich (2002) menciona que los microorganismos son óptimos absorbentes de metales pesados por los siguientes mecanismos: (i) A través de la facilitación, usando microorganismos viables (acumulación/ precipitación extracelular), (ii) utilizando microorganismos vivos o muertos (sorción o complejación de la superficie celular) y (iii) actividad microbiana (acumulación intracelular).

Los mecanismos involucrados para acumular metales difieren tanto para células vivas, como para las muertas; Suresh Kumar, Dahms, Won, Lee, & Shin (2015) indican que la bioacumulación comprende un modo activo y pasivo. Los metales pesados en forma de iones pueden quedar atrapados en la estructura celular y posteriormente ser biosorbidos en los sitios de unión presentes en la estructura celular. Este método de captación es independiente del ciclo metabólico biológico y comprende la “biosorción” o “captación pasiva”(Malik, 2004). Los metales pesados también podrían pasar a la célula, a través de la membrana celular en el ciclo metabólico celular. La absorción de metal por los modos activo y pasivo puede denominarse “bioacumulación” (Kumar et al., 2015). De igual modo en las microalgas, la bioacumulación de metal podría clasificarse en dos: (i) absorción biosorptiva por biomasa no viva, no en crecimiento o productos de biomasa, y (ii) bioacumulación por células vivas (Aksu, 1998).

En la actividad de eliminación de metales pesados utilizando microalgas, existen una variedad de factores que influyen en el proceso; exactamente el nivel de toxicidad de los iones metálicos da lugar a factores bióticos y abióticos: El primero incluye: tolerancia, tamaño y etapas de la vida, especies, área de superficie, dependiendo de la división de algas y nutrición relacionada con los microorganismos utilizados para las pruebas. El segundo incluye: el

tamaño iónico, peso atómico o reducción potencial del metal, sustancias orgánicas, pH, temperatura, concentración de metal y la especiación, la presencia de otros metales como factores extrínsecos, concentración de biomasa (en estado vivo o muerto), regeneración (y posibilidad de reutilización) y pretratamiento como factores intrínsecos, salinidad y dureza, ligandos inorgánicos e interacciones (Dönmez, Aksu, Öztürk, & Kutsal, 1999; Monteiro, Castro, & Malcata, 2012; Kumar et al., 2015).

Los estudios que emplean células muertas (matadas por calor, secas, ácidas y/o tratadas químicamente), indican que el metal no se absorbe en las células; más bien, solo se adsorbe en la superficie celular y, por lo tanto, solo se explota una pequeña fracción de la capacidad de bioacumulación. En cuanto a la acumulación de iones de metales pesados por células muertas, estas pueden remover en la misma o mayor proporción que las células en desarrollo o en reposo. La principal razón de ello es la eliminación del desarrollo microbiano cuando la concentración de metales pesados es exorbitante o cuando los microorganismos adsorben grandes cantidades de iones metálicos. El uso de biomasa muerta para la remoción de metales pesados en el agua resulta más beneficioso, ya que los microorganismos muertos no se ven dañados por los residuos tóxicos, no requieren nutrientes u oxígeno específicos a diferencia de las vivas, puede utilizarse para muchos ciclos de absorción, permiten su almacenamiento y utilización durante ciclos prolongados a temperatura ambiental sin efectos de putrefacción, a este proceso también se le puede denominar biosorción (Aksu, 1998; Malik, 2004). Además, es fundamental tener en cuenta que la presencia de aminoácidos, materia orgánica, ácidos húmicos, ácido fúlvico, ácido etildiaminotetraacético (EDTA) y ácido nitrilotriacético (NTA) puede formar complejos con los iones de metales pesados y hacer que no estén disponibles. También diversas investigaciones indican que las aguas duras disminuyen la toxicidad de los metales; en contraste, la presencia de ciertos iones como calcio, magnesio y fósforo puede

aliviar la toxicidad de los metales, con el fin de permitir una mejor absorción de los iones metálicos (Kumar et al., 2015).

En síntesis, durante los últimos años la biosorción por microalgas ha recibido una importante atención, mostrando su efectividad en la remoción de Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Ni Pb y Zn en sus variadas formas de iones metálicos presentes en el agua. A su vez *Chlorella Vullgaris* en forma de biomasa muerta ha destacado entre todas por su alta capacidad de remoción de Pb solo y en soluciones multimetales (Kumar et al., 2015).

#### 4.2.7. Interacción de las variables Potencial de hidrógeno (pH) y Microalgas (M)

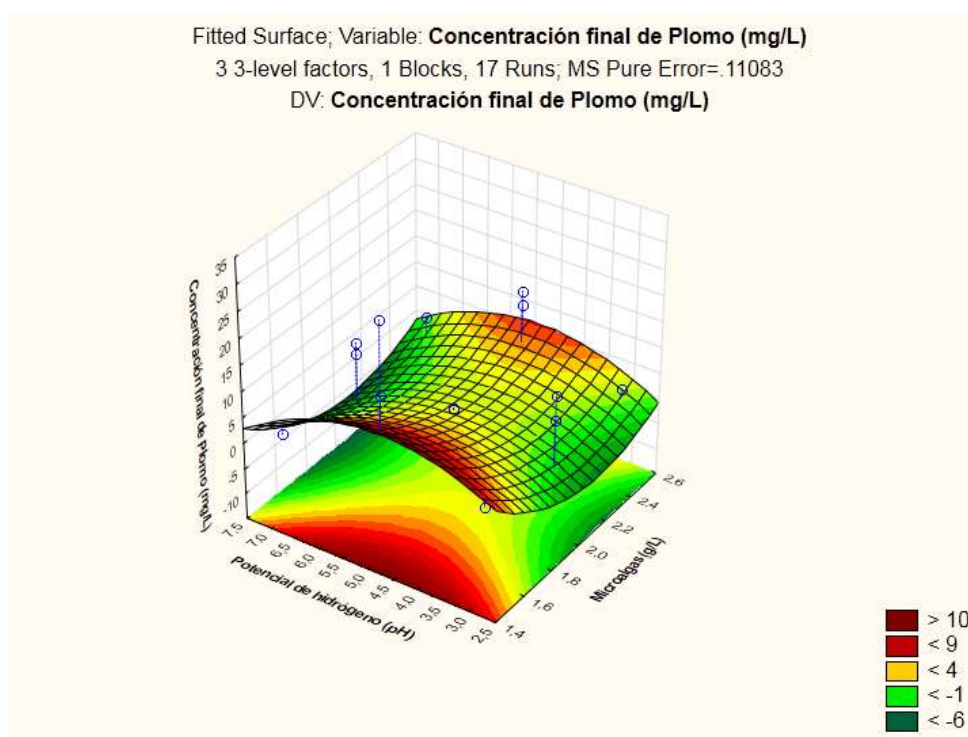


Figura 12. Superficie de respuesta de las variables M y pH para la CFP.

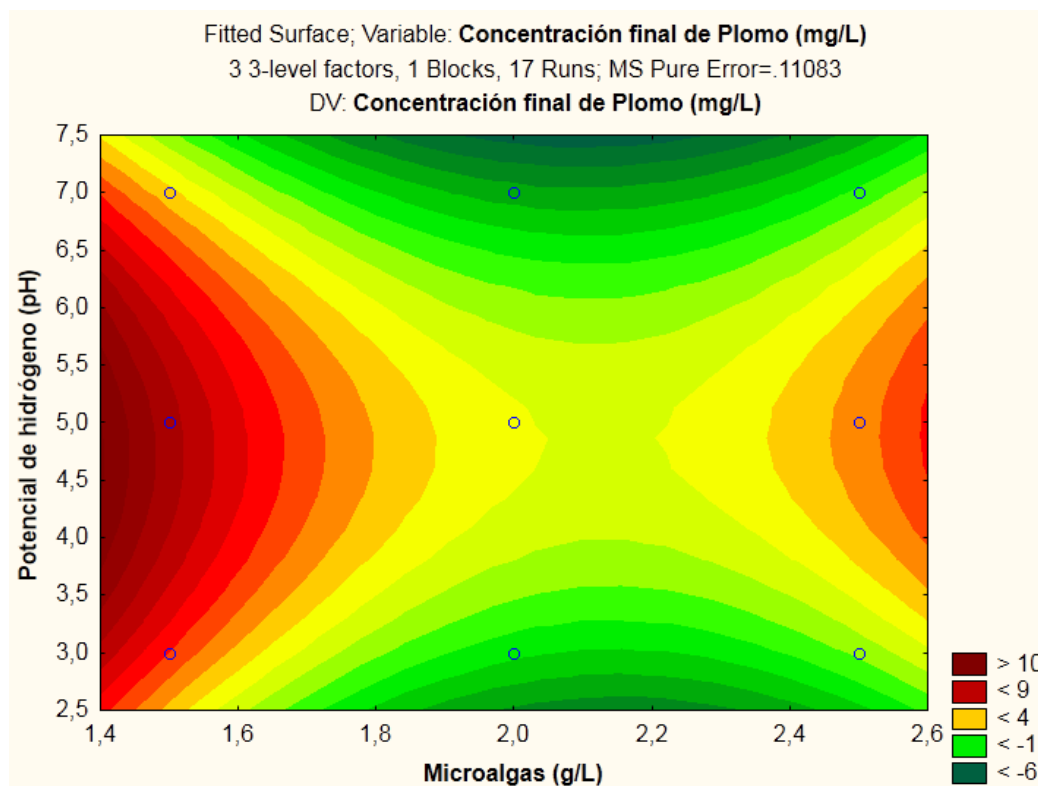


Figura 13. Gráfica de contorno de las variables M y pH para la CFP.

Las Figuras 12 y 13, muestran la superficie de respuesta y las curvas de contorno para la Concentración final de Plomo (CFP), con la interacción de las variables M y pH. Estas muestran que cuando se trabajó a un nivel medio de M (1.8 a 2 g/L) y pH (de 4.5 a 5.5) se alcanzaron las mejores CFP (CFP>4 mg/L).

La siguiente ecuación de las regresiones significativas es el modelo generado por las variables M y pH para la CFP:

$$CFP = 75,8126 - 73,4833 M + 19,3780 M^2 + 11,2969 pH - 1,1957 pH^2$$

Ecuación 6

Donde:

**CFP:** Concentración final de Plomo (mg/L)

**M:** Microalgas (g/L)

**pH:** Potencial de Hidrógeno



La bioacumulación de Plomo a través de microalgas está condicionado por el pH, éste puede condicionar la capacidad de disolución del metal en el agua, así como su toxicidad. Muchos estudios e investigaciones confirman que es uno de los parámetros que más influencia tiene en la bioacumulación de iones metálicos por biomasa de microalgas. Específicamente, interviene en la química del o los metales disueltos, y los sitios de unión independientes entre el metal y la superficie celular. Las características ácidas o básicas y la química del metal en solución, están ajustados a la influencia del pH en las pruebas de absorción (Indhumathi, Shabudeen, Shoba, & Saraswathy, 2014; Kumar et al., 2015; Monteiro et al., 2012).

Cuando los iones metálicos ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ ) están presentes en el agua, se liberan los protones y metales previamente unidos y los iones metálicos posteriores ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$ ) se sorben en las algas. A pH bajo los iones hidronio (un tipo de protón hidratado) que se liberan, podrían estar estrechamente unidos a los ligandos de la pared celular de la biomasa, impidiendo así la absorción de los iones metálicos como resultado de la fuerza repulsiva. Sin embargo, en la medida que el pH se incrementa, más ligandos como los grupos carboxilo, fosfato, imidazol y amino (todos con carga negativa) quedarán libres (para unirse con los iones metálicos), y posteriormente se hará efectiva la atracción de iones metálicos con carga positiva a través de la biosorción en la superficie celular. Monteiro y otros (2012), también mencionan que, a pH bajo los grupos funcionalmente activos están asociados con  $\text{H}^+$  (ion hidrón), lo que imposibilita que los metales pesados cargados positivamente en forma iones se unan (debido a las fuerzas repulsivas). A su vez, afirman que, al aumentar el pH, los sitios funcionales (de la microalgas) se desprotonan (quedando libres), favoreciendo el incremento de las cargas negativas, y esto facilita la unión a los iones metálicos en mayor medida. Es decir, a medida que el pH disminuye, la superficie celular de la biomasa (viva o muerta) se vuelve más positiva (por la presencia de los protones), reduciendo la atracción entre la biomasa y los iones metálicos (intercambio iónico). De manera

que, la aplicación de un pH más alto facilitará la absorción del metal debido a que la superficie celular de la biomasa está más cargada negativamente (atracción de iones metálicos).

Por otro lado, a niveles extremadamente altos, es posible la precipitación de la mayoría de iones metálicos, lo que provocaría una disminución en la absorción, por lo tanto, surge la necesidad de determinar el pH óptimo para las interacciones entre algas y metales.

En éste estudio se determinó que a un pH 5 se dieron las mejores concentraciones finales de Plomo (menores a 4 mg/L), asimismo a pH 7, uno de los tratamientos mostró una concentración final entre 4 y 9 mg/L. En este sentido, el pH óptimo fue de 5.

#### 4.2.8. Interacción de la Concentración inicial de Plomo (CIP) y el Potencial de hidrógeno (pH)

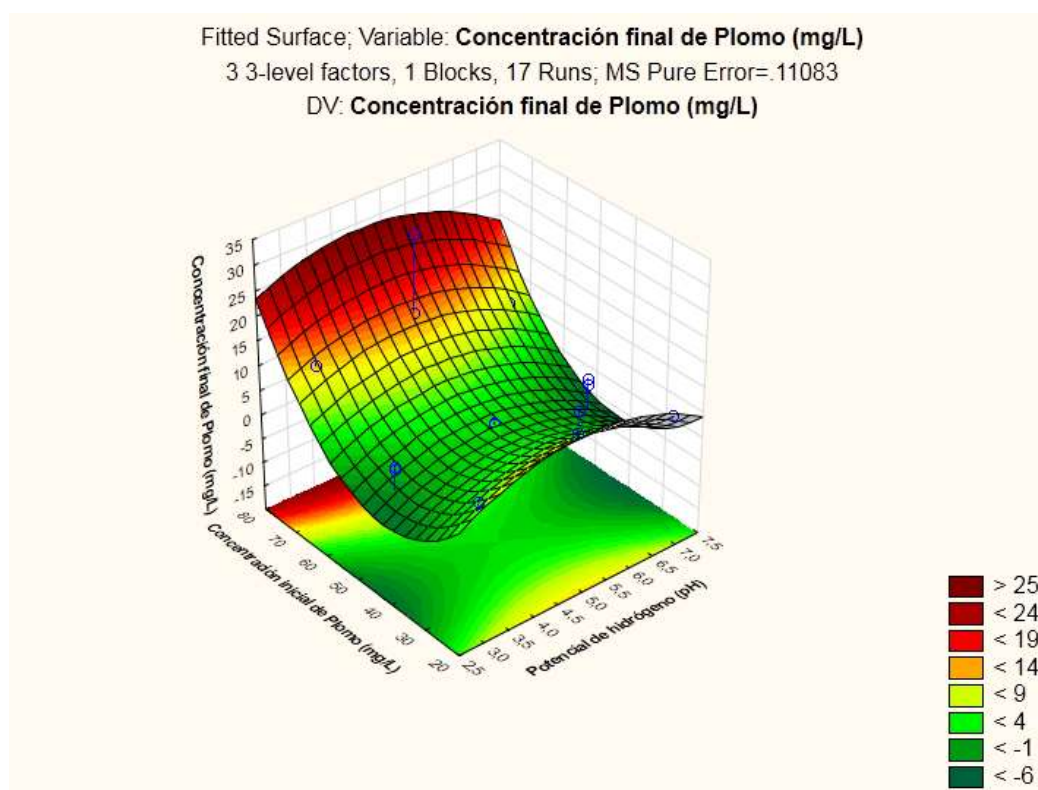


Figura 14. Superficie de respuesta de las variables pH y CIP para la CFP.

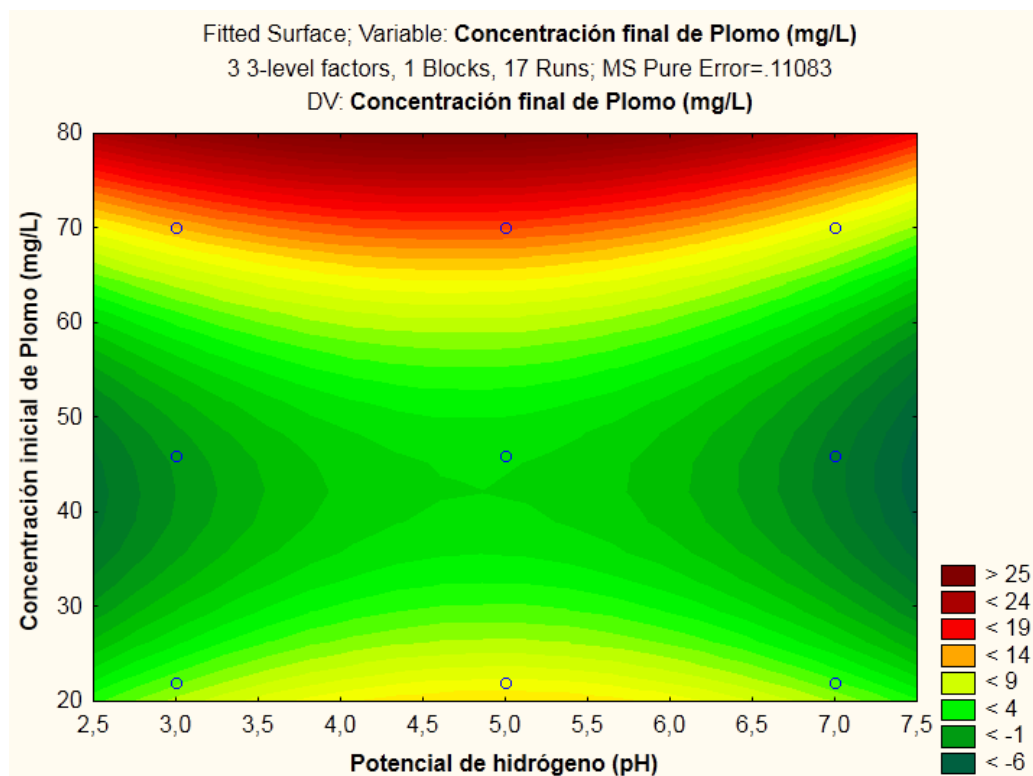


Figura 15. Gráfica de contorno de las variables pH y CIP para la CFP.

Las Figuras 14 y 15, muestran la superficie de respuesta y las curvas de contorno para la CFP, con la interacción de las variables pH y CIP. Estas determinaron que cuando se trabajó a un nivel medio de pH (4.5 a 5.5) y una CIP media (de 35 a 55 mg/L) se obtuvieron las mejores CFP (CFP>4 mg/L).

La siguiente ecuación de las regresiones significativas es el modelo generado por las variables pH Y CIP para la CFP:

$$CFP = 75,8126 + 11,2969 \text{ pH} - 1,1957 \text{ pH}^2 - 1,0955 \text{ CIP} + 0,0192 \text{ CIP}^2 - 0,0137 \text{ pH CIP}$$

Ecuación 7

Donde:

**CFP:** Concentración final de Plomo (mg/L)

**pH:** Potencial de Hidrógeno.

**CIP:** Concentración inicial de Plomo (mg/L)

En la actualidad existe poca información sobre absorción de Plomo utilizando *Chlorella Vullgaris*, sin embargo, en cuanto a la concentración inicial no se ha observado ninguna dificultad para su remoción total. Diversos investigadores (Aksu & Kutsal, 1991; Aung et al., 2008; Goher et al., 2016; Kumar et al., 2015; Molazadeh, Khanjani, Rahimi, & Nasiri, 2015) mencionan que concentraciones bajas o altas de Plomo, no son un problema para la remoción, evidenciando así que la cantidad disuelta de éste contaminante tóxico no representa dificultad para la absorción por la biomasa de la microlagas *Chlorella Vullgaris*.

#### 4.3. Resultados de la Remoción de Plomo (RPb) mediante el Diseño Box – Behnken

Tabla 13. Resultados de la remoción de Plomo (RPb).

Tratamientos	Variables independientes						Variable dependiente
	Codificados			No codificados			Remoción de Plomo (CFP) (%)
	X1	X2	X3	Microalgas (g/L)	Plomo inicial (mg/L)	pH	
1	-1	-1	0	0.23	22	5	27.6
2	1	-1	0	0.38	22	5	47.0
3	-1	1	0	0.23	70	5	56.9
4	1	1	0	0.38	70	5	79.5
5	-1	0	-1	0.23	46	3	93.6
6	1	0	-1	0.38	46	3	94.9
7	-1	0	1	0.23	46	7	97.2
8	1	0	1	0.38	46	7	94.8
9	0	-1	-1	0.3	22	3	66.0
10	0	1	-1	0.3	70	3	82.5
11	0	-1	1	0.3	22	7	73.1
12	0	1	1	0.3	70	7	88.5
13	0	0	0	0.3	46	5	95.4
14	0	0	0	0.3	46	5	94.7
15	0	0	0	0.3	46	5	94.6
16	0	0	0	0.3	46	5	96.4
17	0	0	0	0.3	46	5	95.2

La Tabla 13 muestra los resultados de la remoción de Plomo (%) utilizando diferentes concentraciones para las variables independientes en las pruebas. Estos muestran que la mayor remoción fue a un nivel de 97.2%, de acuerdo a las siguientes condiciones, pH 7, concentración inicial de Plomo (CIP) 46 mg/L y microalgas 1.5 g/L. Asimismo se observa que las mayores remociones se dieron en el punto central evaluado (tratamientos 13-17), evidenciando así la optimización de las variables utilizadas. Sin embargo, la mayor remoción se notó en el tratamiento 7 (97.2%).

#### 4.3.1. Resultados de la varianza (ANOVA) para la Remoción de Plomo (RPb)

Resultados de la varianza (ANOVA) para la Concentración Final de Plomo (CFP) mediante el diseño Box - Behnken.

*Tabla 14.* Resultados de la varianza (ANOVA) para la Remoción de Plomo (RPb)

<b>Factor</b>	<b>SM</b>	<b>GL</b>	<b>CM</b>	<b>F-Valor</b>	<b>p-Valor</b>
(1)Microalgas (g/L)(L)	209,896	1	209,896	400,740	0,000037
Microalgas (g/L)(Q)	658,660	1	658,660	1257,534	0,000004
(2)Concentración inicial de Plomo (mg/L)(L)	1123,965	1	1123,965	2145,908	0,000001
Concentración inicial de Plomo (mg/L)(Q)	3842,790	1	3842,790	7336,770	0,000000
(3)Potencial de hidrógeno (pH)(L)	34,115	1	34,115	65,133	0,001280
Potencial de hidrógeno (pH)(Q)	644,654	1	644,654	1230,793	0,000004
1L by 2L	2,315	1	2,315	4,419	0,103392
1L by 3L	3,295	1	3,295	6,291	0,066186
2L by 3L	0,315	1	0,315	0,601	0,481490
Lack of Fit	358,969	3	119,656	228,451	0,000063
Pure Error	2,095	4	0,524		
Total SS	6840,412	16			

$R^2=0.94722$ ,  $R^2_{\text{ajustado}}=0.87935$ , donde SM: Suma de Cuadrados, GL: Grados de

Libertad, CM: Cuadrados Medios.

El análisis de la varianza para la RPb, el cual se observa en la Tabla 14, muestra que los efectos principales del adsorbente M (L y Q), la CIP (L y Q) y el pH (L y Q), son significativos para la RPb. Pero las interacciones M (L) con CIP (L), M (L) con pH (L) y CIP (L) con el pH (L) no fueron significativos ( $p=0.10$ ,  $p=0.07$  y  $p=0.48$ ).

#### 4.3.2. Estimaciones del efecto para la Remoción de Plomo (RPb)

Tabla 15. Resultados de las estimaciones de efecto para la Remoción de Plomo (RPb)

Factor	Effect	Std. Err. Pure Err	t(4)	p	-95.% Cnf.Limt	+95.% Cnf.Limt
Mean/Inter.	75,1054	0,208920	359,4937	0,000000	74,5254	75,6855
(1)Microalgas (g/L)(L)	10,2444	0,511748	20,0185	0,000037	8,8236	11,6652
Microalgas (g/L)(Q)	12,5073	0,352698	35,4617	0,000004	11,5280	13,4865
(2)Concentración inicial de Plomo (mg/L)(L)	23,7062	0,511748	46,3239	0,000001	22,2853	25,1270
Concentración inicial de Plomo (mg/L)(Q)	30,2103	0,352698	85,6550	0,000000	29,2311	31,1896
(3)Potencial de hidrógeno (pH)(L)	4,1301	0,511748	8,0705	0,001280	2,7092	5,5509
Potencial de hidrógeno (pH)(Q)	-12,3736	0,352698	-35,0827	0,000004	-13,3528	-11,3943
1L by 2L	15,214	0,723720	21,022	0,103392	-0,4879	3,5308
1L by 3L	-18,152	0,723720	-25,082	0,066186	-3,8246	0,1942
2L by 3L	-0,5610	0,723720	-0,7752	0,481490	-2,5704	1,4483

En la Tabla 15 se observan los resultados de las estimaciones de efecto, dónde la primera columna muestra los valores de los efectos, la segunda los valores de la desviación estándar representadas a través del error puro. Además, el valor p visualizado en la cuarta columna muestra que los factores M (L y Q), CIP (L y Q), pH (L y Q), fueron estadísticamente significativos a un 95% del nivel de confianza, excepto las interacciones M(L) con la CIP (L), la M (L) con el pH (L) y la CIP (L) con el pH (L), que mostraron un p-valor menor a 0.05 ( $p=0.10$ ,  $p=0.07$  y  $p=0.48$ ).

### 4.3.3. Resultados de regresión para la Remoción de Plomo (RPb)

Tabla 16. Resultados del coeficiente de regresión para la Remoción de Plomo (RPb).

Factor	Regressn Coeff.	Std.Err. Pure Err	T (4)	p	-95% Cnf.Limt	95% Cnf.mt
Mean/Interc.	-191,386	7,673800	-24,9401	0,000015	-212,691	-170,080
(1)Microalgas (g/L)(L)	211,983	6,107772	34,7070	0,000004	195,025	228,941
Microalgas (g/L)(Q)	-50,029	1,410791	-35,4617	0,000004	-53,946	-46,112
(2)Concentración inicial de Plomo (mg/L)(L)	5,222	0,091352	57,1585	0,000001	4,968	5,475
Concentración inicial de Plomo (mg/L)(Q)	-0,052	0,000612	-85,6550	0,000000	-0,054	-0,051
(3)Potencial de hidrógeno (pH)(L)	-27,817	1,199112	-23,1983	0,000020	-31,147	-24,488
Potencial de hidrógeno (pH)(Q)	3,093	0,088174	35,0827	0,000004	2,849	3,338
1L by 2L	0,063	0,030155	2,1022	0,103392	-0,020	0,147
1L by 3L	-0,908	0,361860	-2,5082	0,066186	-1,912	0,097
2L by 3L	-0,006	0,007539	-0,7752	0,481490	-0,027	0,015

$R^2=0.94722$ ,  $R^2_{\text{ajustado}}=0.87935$ , donde: SM: Suma de Cuadrados, GL: Grados de Libertad,

CM: Cuadrados medios.

Los resultados del coeficiente de regresión para la RPb (Tabla 16), muestran que los factores M (L y Q), CIP (L y Q), pH (L y Q), fueron estadísticamente significativos a un 95% del nivel de confianza, pero las interacciones M(L) con la CIP (L), la M (L) con el pH (L) y la CIP (L) con el pH (L) no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.10$ ,  $p=0.07$  y  $p=0.48$ ).

#### 4.3.4. Interacción de las variables Concentración inicial de plomo (CIP) y microalgas (M)

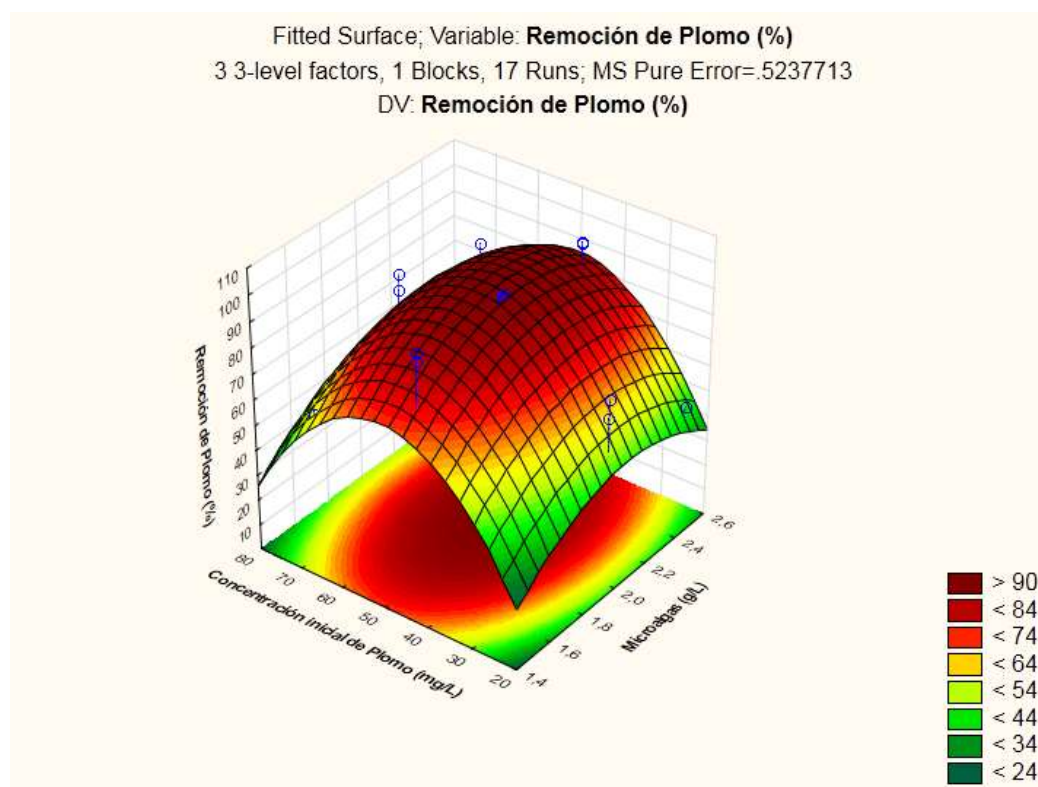


Figura 16. Superficie de respuesta de las variables M y CIP para la RPb



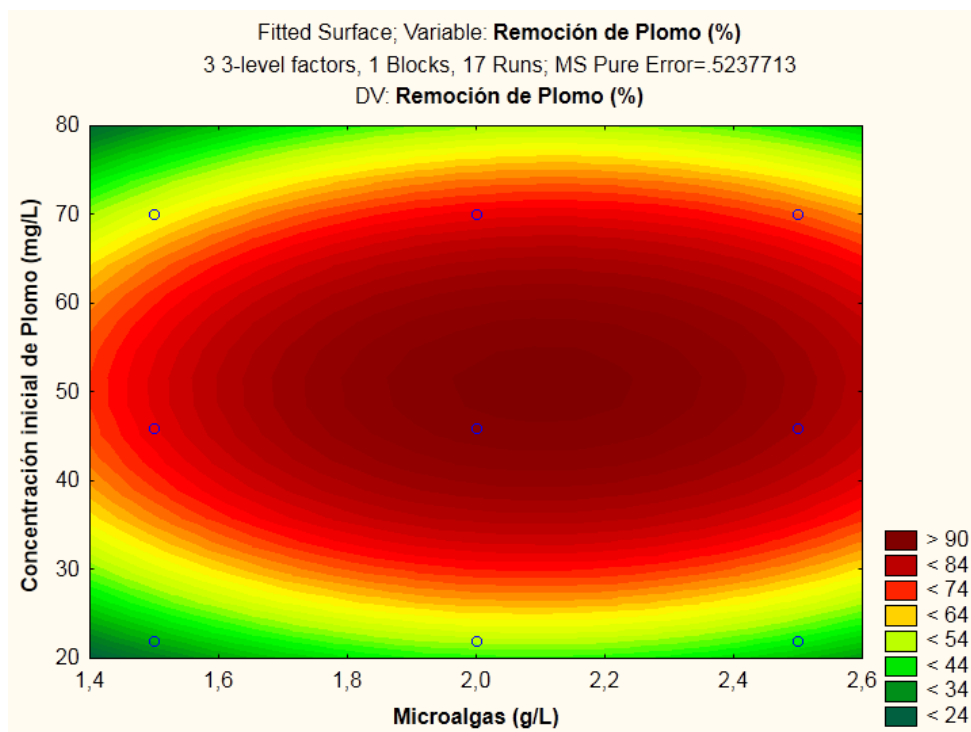


Figura 17. Gráfica de contorno de las variables M y CIP para la RPb.

En las Figuras (16 y 17) se observa la superficie de respuesta y las curvas de contorno en la RPb con la interacción de las variables M y la CIP. Las microalgas son microorganismos con mecanismos moleculares que les permiten absorber los metales pesados esenciales y no esenciales para su crecimiento. Tienen rápida capacidad de absorción y gran relación superficie/volumen que no generan residuos tóxicos y es útil en sistemas continuos como discontinuos (Kumar et al., 2015). Asimismo, se observa que la eficiencia en la absorción de iones metálicos aumentó de 27.6% a 97.2 %, cuando la CIP fue 22 a 46 mg/L, mientras que las M se mantuvieron a 1.5. Con respecto a ello Edris, Alhamed & Alzahrani (2012), indican que este aumento en la remoción ocurrió al incrementar la CIP. De manera que, un aumento en la concentración inicial de iones proporciona una mayor fuerza impulsora para superar toda la resistencia de intercambio de masa entre la fase sólida y acuosa, lo que resulta en una mayor absorción de metales pesados. En relación a lo anterior, resultados similares fueron reportados por Chen, Ma, & Han (2008); y Riaz, Nadeem, Asif, Mehmood & Rehman (2009).

Por otro lado, la concentración óptima de M fue 2 g/L cuando la eficiencia de la absorción aumentó de 94.6% a 96.4%, la CIP fue de 46 mg/L y las M se mantuvieron a 2 g/L. En relación a lo anterior, resultados similares fueron reportados por: Goher et al., (2016) quienes utilizando M *Chlorella Vullgaris* a concentración de 2 mg/L y CIP de 50 mg/L alcanzaron una máxima remoción de 99.4%. A su vez, Konig-peter et al. (2015) en un estudio de absorción utilizando *Chlorella Vullgaris* a concentración de 2 g/L, obtuvieron remociones de hasta un 90%, notificando que la capacidad de absorción aumentó al disminuir la dosis del biosorbente, debido a la interferencia entre los sitios de unión del biosorbente.

Por otro lado Goher et al., (2016), proporcionan que algunas capacidades de adsorción podrían disminuir junto con el aumento de la masa / dosis adsorbente. Esto podría deberse a la presencia de una mayor densidad de sólidos que podría dar lugar a menos oportunidades para contactar todos los sitios de adsorción.

La siguiente ecuación de las regresiones significativas es el modelo generado por las variables M y CIP para la RPb:

$$RPb = -191,386 + 211,983 M - 50,029 M^2 + 5,222 CIP - 0.052 CIP^2 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde:

**RPb:** Remoción de Plomo (mg/L)

**M:** Microalgas (g/L)

**CIP:** Concentración inicial de Plomo (mg/L)

#### 4.3.5. Interacción de las variables Potencial de Hidrógeno (pH) y Microalgas (M)

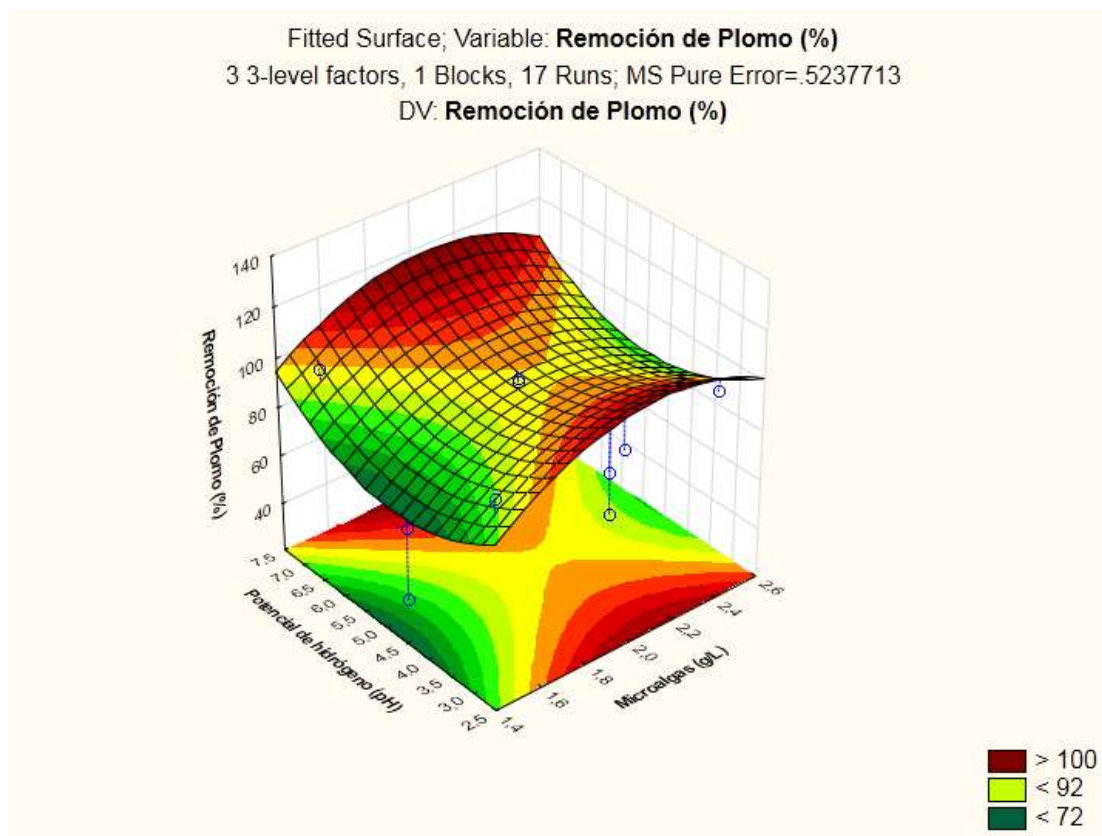


Figura 18. Superficie de respuesta de las variables M Y pH para la RPb.

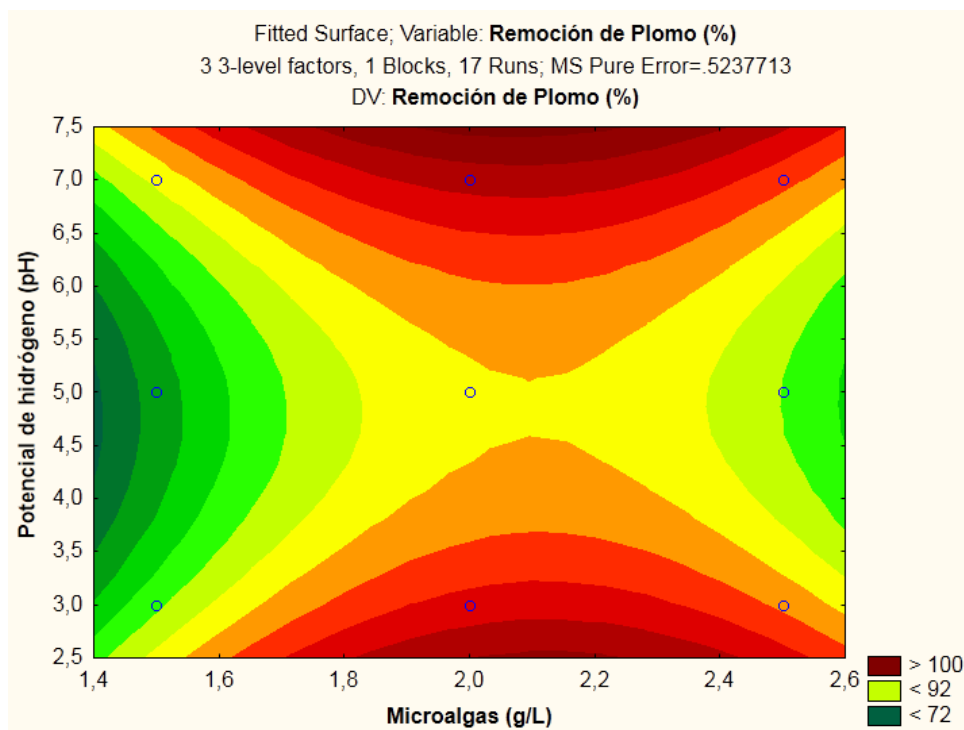


Figura 19. Gráfica de contorno de las variables M y pH para las variables RPb.

En las Figuras (18 y 19) se observa la superficie de respuesta y las curvas de contorno en la RPb con la interacción de las variables M y pH. Estas señalan que cuando se trabaja a concentración de 2 g/L de M y pH de 5 se obtendrán RPb mayores al 92% (región amarilla).

El pH es uno de los factores más importantes en la remoción de metales pesados y otros parámetros (Kumar et al., 2015). En las Figuras 17 y 18 se observa que la eficiencia de eliminación de iones de metales aumentó de 93.6% a 97.2%, mientras que el pH aumentó de 3 a 7; debido a la confirmación de las réplicas, el pH óptimo fue de 5 con una concentración de 2g/L de M, estas remociones oscilaron entre 94.6% y 96.4%. Con respecto a ello, Aksu & Kutsal, (1991); Goher et al., (2016) y König-peter, Kilar, & Felinger (2015) encontraron resultados idénticos en la remoción, notificando que a un pH entre 5.0 y 6.0 y 2 g/L de M los grupos carboxílicos (- COOH) están desprotonados y con carga negativa; es decir, el aumento del pH, favoreció la unión con los metales pesados en mayor medida. En un estudio de absorción se registró que el papel más dominante en la unión de Plomo con *Chlorella Vullgaris*

se desempeñaron los grupos carboxilo de proteínas y polisacáridos carboxilados. Estos grupos funcionales tuvieron mayor capacidad para interactuar con los iones metálicos porque estuvieron desprotonados al mismo pH (5-6) de manera constante en varias pruebas (Konig-peter et al., 2015).

Con respecto a las pruebas con pH 3, se obtuvieron remociones entre 66% y 94.9. Monteiro et al., (2012), confirman que a niveles bajos de pH, los grupos funcionales están asociados con el ion H<sup>+</sup>, limitando que los iones metálicos se unan (debido a las fuerzas repulsivas).

A su vez la mayor remoción (97.2%) se dio a un pH 7, Ho (2005) registró que un pH 7, es adecuado para unir Plomo. König-peter et al., (2015), indican que esto se debe a la presencia de otros grupos funcionales, como fosfato, hidroxilo y amino, presentes en las superficies de las células de las microalgas, puesto que su capacidad de desprotonación es posible solo a valores de pH más altos. En síntesis, el proceso de absorción disminuyó conforme se redujo el nivel de pH.

La siguiente ecuación de las regresiones significativas es el modelo generado por las variables M y pH para la RPb:

$$RPb = -191,386 + 211,983 M - 50,029 M^2 - 27.817pH + 3,093 pH^2 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

**RPb:** Remoción de Plomo (mg/L)

**M:** Microalgas (g/L)

**pH:** Potencial de Hidrógeno.

#### 4.3.6. Interacción de las variables Concentración Inicial de Plomo (CIP) y Potencial de Hidrógeno (pH)

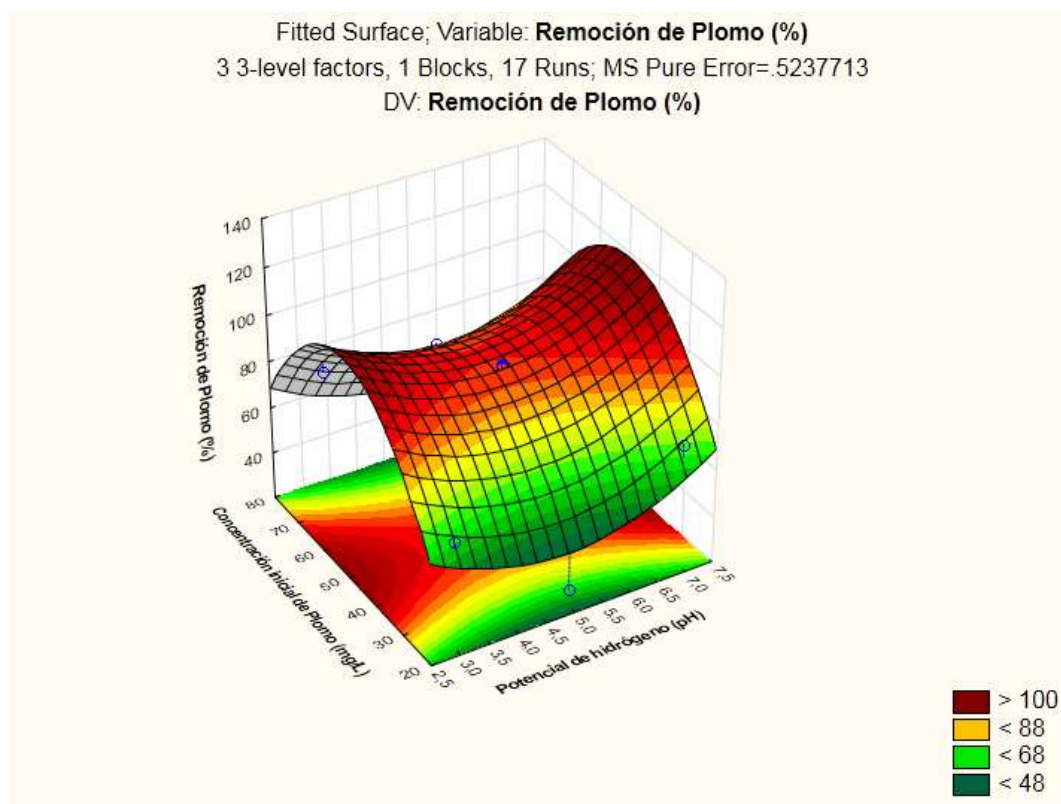


Figura 20. Superficie de respuesta de las variables pH y CIP para la RPb.

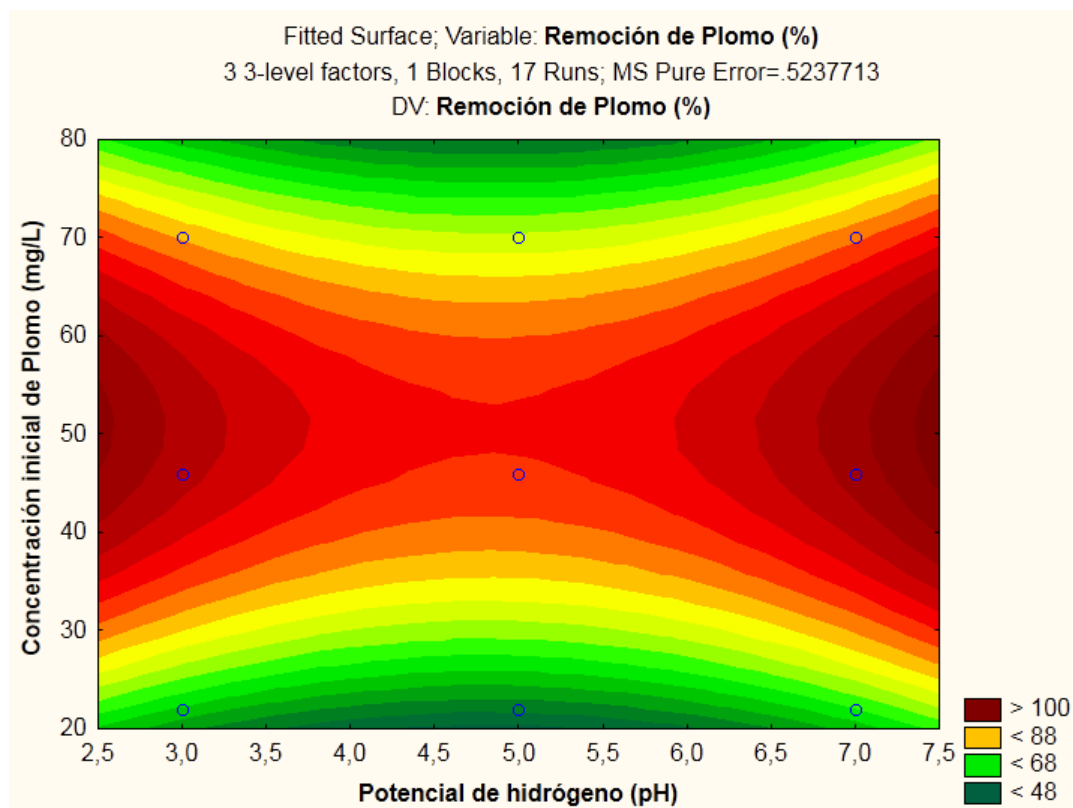


Figura 21. Gráfica de contorno de las variables pH Y CIP para la RPb.

En las Figuras (20 y 21) se observa la superficie de respuesta y las curvas de contorno en la RPb con la interacción de las variables pH y CIP. Estas sugieren que cuando se trabaja a un pH 3, 5 Y 7 y 46 mg/ L de CIP, se obtendrán RPb de hasta 94, 96.4 y 97.2% (región roja). En relación a lo anterior, Aksu & Kutsal, (1990) y Klimmek, Stan, Wilke, Bunke & Buchholz (2001) registraron remociones de hasta un 80% a pH 4 y 5. Con respecto al pH 5, Goher et al., (2016) y Konig-peter et al., (2015) obtuvieron remociones máximas de 99.4% al mismo pH (5), CIP de 50 mg/L y una concentración de M de 2 g/L. Esto debido a la presencia de los grupos funcionales carboxilo de proteínas y polisacáridos carboxilados, los cuales favorecen la atracción de iones de metales pesados a la superficie celular de la biomasa seca.

Por otro lado a un pH 7 se obtuvieron remociones de hasta un 97.2%, Konig-peter et al., (2015) menciona que esto se debe a la presencia de los grupos funcionales fosfato, hidroxilo

y amino, presentes en las superficies de las células de las microalgas, los cuales alcanzan la desprotonación a niveles más altos de pH, favoreciendo así en mayor medida el proceso de absorción.

En cuanto a la CIP, se pudo registrar que la concentración óptima fue de 46 mg/ L. Kumar et al., (2015) menciona que la eficiencia de los organismos de biomasa muerta pueden tener diferentes porcentajes de remoción dependiendo del metal a remover, esto debido a que su capacidad de remoción varía por tener diferentes condiciones ambientales óptimas.

La siguiente ecuación de las regresiones significativas es el modelo generado por las variables pH y CIP para la RPb:

$$RPb = -191,386 - 27.817 pH + 3.093 pH^2 + 5,222 CIP - 0.052 CIP^2 \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

**RPb:** Remoción de Plomo (mg/L)

**M:** Microalgas (g/L)

**pH:** Potencial de Hidrógeno.



#### **4.4. Correlación de Bioabsorción**

La Tabla 17 muestra el resumen de los ensayos de absorción, dónde se visualizan las variables microalgas, concentración inicial de plomo y pH como dependientes y concentración final de plomo y remoción de plomo como variables dependientes respectivamente.

#### **4.5. Con Respecto los ECAs y LMPs**

De acuerdo a los resultados obtenidos de los ensayos de bioabsorción, en contraste con los estándares de calidad ambiental (ECA) para agua se puede observar que se el 1.28 mg/L (el mejor resultado) no cumple con el estándar requerido para todas las categorías establecidas.

Asimismo, en cuanto a los Límites Máximos Permisibles (LMP) para los efluentes de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales Domésticas o Municipales el plomo no es parámetro evaluable para ser comparado con ésta normativa nacional.

Por lo tanto, el efluente no se debe utilizar en alguna actividad, puesto que la concentración del remanente del plomo total no cumple con los ECA para agua y los máximos niveles de los LMPs. Esto debido, a que, en las pruebas de laboratorio, las concentraciones iniciales de plomo total a remover fueron altas en comparación a un posible escenario de un cuerpo de agua superficial como una laguna, río, quebrada, manantial, entre otros.

Tabla 17. Resumen de los ensayos de bioabsorción.

Tratamientos	Variables independientes						Variables dependientes	
	Codificados			No codificados		pH	Concentración final de Plomo (CFP) (mg/L)	Remoción de Plomo (CFP) (%)
	X1	X2	X3	Microalgas (g/L)	Plomo inicial (mg/L)			
1	-1	-1	0	1.5	22	5	16.01	27.6
2	1	-1	0	2.5	22	5	11.72	47.0
3	-1	1	0	1.5	70	5	30.11	56.9
4	1	1	0	2.5	70	5	14.33	79.5
5	-1	0	-1	1.5	46	3	2.89	93.6
6	1	0	-1	2.5	46	3	2.3	94.9
7	-1	0	1	1.5	46	7	1.28	97.2
8	1	0	1	2.5	46	7	2.36	94.8
9	0	-1	-1	2	22	3	7.51	66.0
10	0	1	-1	2	70	3	12.21	82.5
11	0	-1	1	2	22	7	5.94	73.1
12	0	1	1	2	70	7	8	88.5
13	0	0	0	2	46	5	2.09	95.4
14	0	0	0	2	46	5	2.4	94.7
15	0	0	0	2	46	5	2.44	94.6
16	0	0	0	2	46	5	1.61	96.4
17	0	0	0	2	46	5	2.19	95.2

## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones

- Se evaluó la remoción iones de Plomo total por bioabsorción mediante la aplicación de biomasa de la microalga *Chlorella Vulgaris* deshidratada, la cual mostró ser determinante para remover iones de plomo total presentes en agua contaminada y el proceso determinante de los ensayos fue la bioabsorción pasiva.
- Se obtuvo la biomasa deshidratada de la microalga *Chlorella Vulgaris* a partir de su producción en soluciones acuosas con el medio de cultivo Bay Folan, la cantidad utilizada para los ensayos de bioabsorción fue de 5.1 gramos respectivamente.
- Se determinó las concentraciones óptimas de las variables microalgas, pH y concentración inicial de Plomo en el proceso de absorción de iones de Plomo total presentes en soluciones acuosas, las cuales mediante los ensayos y el diseño estadístico Box – Behnken fueron 1.5 g/L, 7 y 50 mg/L, respectivamente.
- Se determinó la eficiencia de la microalga *Chlorella Vulgaris* obtenida a partir de su producción a escala de laboratorio en la bioabsorción de iones de plomo total en soluciones acuosas, la cual posteriormente a los procesos de centrifugación durante 15 min a 4000 RPM, deshidratación por 48h a 105°C, agitación a 200 RPM durante 20 min a 21°C y posterior filtrado, presentó una eficiencia máxima del 97.2%, logrando reducir la cantidad disuelta de este metal desde 50 mg/L hasta 1.28 mg/L presentes en el agua.

## 5.2. Recomendaciones

- Estudiar la capacidad de bioabsorción de Pb total con la microalga *Chlorella Vullgaris* a diferentes temperaturas en el proceso de agitación.
- Estudiar la influencia de las sales presentes en *Chlorella Vullgaris* en el proceso de producción y como éstas influyen en el proceso de bioabsorción de Pb total en agua.
- Estudiar la influencia e interacción del pH y el tamaño de las partículas a niveles nano (análisis de microscopía electrónica de barrido y espectroscopia infrarroja con transformadas de Fourier, entre otros) de la biomasa deshidratada de *Chlorella Vullgaris* para la bioabsorción de Pb total, siendo estos factores determinantes para su remoción.
- Estudiar la desorción de Pb total posteriormente al proceso de biosorción utilizando biomasa deshidratada de *Chlorella Vullgaris* y de esta manera determinar el número de veces que se puede volver a utilizarla.

## REFERENCIAS

- Ahluwalia, S., & Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12), 2243–2257. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.006>
- Aksu, Z. (1998). Biosorption of Heavy Metals by Microalgae in Batch and Continuous Systems. *Wastewater Treatment with Algae*, (II), 37–53. Recuperado de: [https://doi.org/10.1007/978-3-662-10863-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-10863-5_3)
- Aksu, Z., & Kutsal, T. (1990). A comparative study for biosorption characteristics of heavy metal ions with *C. vulgaris*. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 11(10), 979–987. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/09593339009384950>
- Aksu, Z., & Kutsal, T. (1991). A bioseparation process for removing lead(II) ions from waste water by using *C. vulgaris*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 52(1), 109–118. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/jctb.280520108>
- Amari, T., Ghnaya, T., & Abdelly, C. (2017). Nickel, cadmium and lead phytotoxicity and potential of halophytic plants in heavy metal extraction. *South African Journal of Botany*, 111, 99–110. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.03.011>
- Astete, J., del Carmen, M., Fiestas, V., Oblitas, T., Sabastizagal, I., Lucero, M., ... Suarez, M. (2010). Enfermedades transmisibles, salud mental y exposición a contaminantes ambientales en población aledaña al proyecto minero las bambas antes de la fase de explotación, Perú 2006. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 27(4), 512–519. Recuperado de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v27n4/a04v27n4>
- Astete, J., Del Carmen, M., & Pérez, D. (2014). Niveles de metales pesados en el ambiente y su exposición en la población luego de cinco años de exploración minera en Las Bambas,

- Perú 2010. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*, 31(4), 695–701. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342014000400012&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1726-46342014000400012&script=sci_arttext)
- Aung, W. L., Hlaing, N. N., & Aye, K. N. (2008). *Biosorption of Lead (Pb<sup>2+</sup>) by using Chlorella vulgaris*. 4(2), 1–10.
- Ayala, S. (2015). *Microalgas: aplicaciones e innovaciones en el tratamiento de aguas contaminadas y la producción de biocombustibles*. (June). Recuperado de: <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2672.1441>
- Baker, R. W. (Richard W. (2004). *Membrane technology and applications*. J. Wiley.
- Banco Mundial. (2005). *Riqueza y Sostenibilidad: Dimensiones Sociales y Ambientales de la Minería en el Perú Unidad de Gestión del País-Perú Desarrollo Ambiental y Social Sostenible Región Latinoamérica y El Caribe*. 1–16. Recuperado de: [https://scholar.google.com.pe/scholar?hl=es&as\\_sdt=0%2C5&q=drenaje+acido+de+mina+peru&btnG=](https://scholar.google.com.pe/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=drenaje+acido+de+mina+peru&btnG=)
- Bankole, M. T., Abdulkareem, A. S., Mohammed, I. A., Ochigbo, S. S., Tijani, J. O., Abubakre, O. K., & Roos, W. D. (2019). Selected Heavy Metals Removal From Electroplating Wastewater by Purified and Polyhydroxylbutyrate Functionalized Carbon Nanotubes Adsorbents. *Scientific Reports*, 9(1), 1–19. Recuperado de: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37899-4>
- Can, C., & Jianlong, W. (2010). Removal of Heavy Metal Ions by Waste Biomass of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Environmental Engineering*, 136(1), 95–102. Recuperado de: [https://doi.org/10.1061/\(ASCE\)EE.1943-7870.0000128](https://doi.org/10.1061/(ASCE)EE.1943-7870.0000128)
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143. Recuperado de:

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.024>

Castro, J., Chirinos, D., & Ríos, E. (2013). Lead levels in pregnant women and newborns in La Oroya city, Peru. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 30(3), 393–398.

Caviedes, D., Muñoz, R., Perdomo, A., Rodriguez, D., & Sandoval, I. (2015). Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Revista Ingeniería y Región*, 13(1), 73–90. Recuperado de: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5432290>

Çetinkaya Dönmez, G., Aksu, Z., Öztürk, A., & Kutsal, T. (1999). A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, 34(9), 885–892. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00005-9)

Chen, G. (2004). Electrochemical technologies in wastewater treatment. *Separation and Purification Technology*, 38(1), 11–41. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/J.SEPPUR.2003.10.006>

Chen, Z., Ma, W., & Han, M. (2008). *Biosorption of nickel and copper onto treated alga ( Undaria pinnatifida ): Application of isotherm and kinetic models*. 155, 327–333. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.064>

Cossich, E. S. (2002). Biosorption of chromium(III) by. *EJB Electronical Journal of Biotechnology*, 5(2).

Cusiyupanqui, C. (2013). 4. *Herramientas Estadísticas* 4.1. Recuperado de: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Ingenie/cusiyupanqui\\_cc/cap4.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Ingenie/cusiyupanqui_cc/cap4.pdf)

Depa, C., & Suresha, S. (2014). Biosorption of Lead (II) from aqueous solution and Industrial Effluent by using leaves of *Araucaria cookii*: Application of Response Surface

- Methodology. *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology*, 8(7), 67–79. Recuperado de: <https://doi.org/10.9790/2402-08716779>
- Dönmez, G., Aksu, Z., Öztürk, A., & Kutsal, T. (1999). A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry*, 34(9), 885–892. Recuperado de: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00005-9)
- Edris, G., Alhamed, Y., & Alzahrani, A. (2012). 2 . *MATERIALS AND METHODS*. (li), 1–12.
- Edzwald, J. (2011). *Water quality & treatment: a handbook on drinking water*. McGraw-Hill.
- Espinoza, R., Hernández-Avila, M., Narciso, J., Castañaga, C., Moscoso, S., Ortiz, G., ... Noonan, G. (2003). Determinants of blood-lead levels in children in Callao and Lima metropolitan area. *Salud Publica de Mexico*, 45(SUPPL. 2). Recuperado de: <https://doi.org/10.1590/s0036-36342003000800007>
- Freitas, O., Martins, R., Matos, C., & Boaventura, R. (2008). Removal of Cd(II), Zn(II) and Pb(II) from aqueous solutions by brown marine macro algae: Kinetic modelling. *Journal of Hazardous Materials*, 153(1–2), 493–501. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.08.081>
- Gándara, F. (2014). *Disponible en: http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=94432996003*.
- Goher, M. E., El-Monem, A. M. A., Abdel-Satar, A. M., Ali, M. H., Hussian, A. E. M., & Napiórkowska-Krzebietke, A. (2016). Biosorption of some toxic metals from aqueous solution using non-living algal cells of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Elementology*, 21(3), 703–714. Recuperado de: <https://doi.org/10.5601/jelem.2015.20.4.1037>
- Gonzales, G, Lozano, R., Gasco, M., Tapia, V., & Gonzales, C. (2012). *Resistance of Sperm Motility to Serum Testosterone in Men with Excessive Erythrocytosis at High Altitude*. 987–



- Gonzales, Gustavo, Gasco, M., Tapia, V., & Gonzales, C. (2009). *High serum testosterone levels are associated with excessive erythrocytosis of chronic mountain sickness in men*. Recuperado de: 1319–1325. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90940.2008>.
- Hawkes, S. (1997). What Is a “Heavy Metal”? *Journal of Chemical Education*, 74(11), 1374. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/ed074p1374>
- Ho, Y. (2005). *Effect of pH on lead removal from water using tree fern as the sorbent*. 96, 1292–1296. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.011>
- Holan Z. R., & B., V. (1994). Biosorption of lead and nickel by biomass of marine algae. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 1001–1009.
- Huang, J., Peng, L., Zeng, G., Li, X., Zhao, Y., Liu, L., ... Chai, Q. (2014). Evaluation of micellar enhanced ultrafiltration for removing methylene blue and cadmium ion simultaneously with mixed surfactants. *Separation and Purification Technology*, 125(125), 83–89. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.01.020>
- Indhumathi, P., Shabudeen, P. S., Shoba, U. S., & Saraswathy, C. P. (2014). The removal of chromium from aqueous solution by using green micro algae. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(6), 799–808.
- Inthorn, D., Sidtitoon, N., Silapanuntakul, S., & Incharoensakdi, A. (2002). Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae. *ScienceAsia*, 28(3), 253. Recuperado de: <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.253>
- Klimmek, S., Stan, H. J., Wilke, A., Bunke, G., & Buchholz, R. (2001). Comparative analysis of the biosorption of cadmium, lead, nickel, and zinc by algae. *Environmental Science and Technology*, 35(21), 4283–4288. Recuperado de: <https://doi.org/10.1021/es010063x>

- König-peter, A., Kilar, F., & Felinger, A. (2015). *Biosorption characteristics of Spirulina and Chlorella cells to accumulate heavy metals* *Biosorption characteristics of Spirulina and Chlorella cells for the accumulation of heavy metals*. (July). Recuperado de: <https://doi.org/10.2298/JSC140321060P>
- Kumar, K., Dahms, H. U., Won, E. J., Lee, J. S., & Shin, K. H. (2015). Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113, 329–352. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Lankford, P. W., & Eckenfelder, W. W. (1990). *Toxicity reduction in industrial effluents*. Van Nostrand Reinhold.
- Lara, M. (2008). *Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados* (Editorial). Universidad de Granada, Granada, España.
- Lavalin, S. (2016). *Resumen ejecutivo de la Tercera Modificatoria del Estudio de Impacto Ambiental del Proyecto Minero Las Bambas*. Recuperado de: [http://extranet.minem.gob.pe/EIA/ESTUDIO/ArchivosAdjuntos/DMET\\_ViewFile?li\\_idarchivo=1&ln\\_idmaestra=7409&ln\\_idseccion=1&ls\\_idmenu=0001&](http://extranet.minem.gob.pe/EIA/ESTUDIO/ArchivosAdjuntos/DMET_ViewFile?li_idarchivo=1&ln_idmaestra=7409&ln_idseccion=1&ls_idmenu=0001&)
- Lezcano, J. M., González, F., Ballester, A., Blázquez, M. L., Muñoz, J. A., & García-Balboa, C. (2011). Sorption and desorption of Cd, Cu and Pb using biomass from an eutrophized habitat in monometallic and bimetallic systems. *Journal of Environmental Management*, 92(10), 2666–2674. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.004>
- Liu, D., Edraki, M., Malekizadeh, A., Schenk, P. M., & Berry, L. (2019). Introducing the hydrate gel membrane technology for filtration of mine tailings. *Minerals Engineering*, 135(May 2018), 1–8. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2019.02.030>
- Llobet, J., Schuhmacher, M., & Domingo, J. (2000). Observations on metal trends in soil and

- vegetation samples collected in the vicinity of a hazardous waste incinerator under construction (1996–1998). *Toxicological & Environmental Chemistry*, 77(1–2), 119–129. Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/02772240009358942>
- Malik, A. (2004). Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*, 30(2), 261–278. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.08.001>
- McEldowney, S. (1990). Toxicity reduction in industrial effluents. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 53(1), 117–118. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/jctb.280530117>
- McGraw-Hill. (2002). *Calidad y tratamiento del agua: manual de suministros de agua comunitaria* (McGraw-Hill Interamericana de España, Ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.
- Mejía, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos Theoretical approximation to the biosorption of heavy metals using microorganisms. *Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77–99.
- Molazadeh, P., Khanjani, N., Rahimi, M. R., & Nasiri, A. (2015). *Original Article Adsorption of lead by Microalgae Chaetoceros Sp. and Chlorella Sp. from Aqueous Solution*. 4(2), 114–127.
- Monteiro, C. M., Castro, P. M. L., & Malcata, F. X. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28(2), 299–311. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Motrel, L. I. N. (2017). *Eliminación de Boro y Arsénico de Aguas Contaminadas Mediante el Empleo de Biomasa Microalgal*. Universidad de Valladolid.
- Nigro, S. A., Stirk, W. A., & Van Staden, J. (2002). Optimising heavy metal adsorbance by dried seaweeds. *South African Journal of Botany*, 68(3), 333–341. Recuperado de:

[https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30395-1](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30395-1)

- Ouyang, T., Zhu, Z., Kuang, Y., Huang, N., Tan, J., Guo, G., ... Sun, B. (2006). Dissolved trace elements in river water: Spatial distribution and the influencing factor, a study for the Pearl River Delta Economic Zone, China. *Environmental Geology*, 49(5), 733–742. Recuperado de: <https://doi.org/10.1007/s00254-005-0118-8>
- Park, J. B. K., & Craggs, R. J. (2011). Algal production in wastewater treatment high rate algal ponds for potential biofuel use. *Water Science and Technology*, 63(10), 2403–2410. Recuperado de: <https://doi.org/10.2166/wst.2011.200>
- Plaza, C. J. (2012). *Remoción de metales pesados empleando algas marinas*. UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA.
- Ramírez, A. V., Paucar, J. C., & Medina, J. M. (1997). Blood lead levels in the inhabitants of four Peruvian localities. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 1(5), 344–348. Recuperado de: <https://doi.org/10.1590/S1020-49891997000500002>
- Ramos, W., Munive, L., Alfaro, M., Calderón, M., Gonzáles, I., & Núñez, Y. (2009). *Intoxicación plúmbica crónica : una revisión de la problemática ambiental en el Perú Chronic lead poisoning : a review of the environmental peruvian problem*. 13, 1–8.
- Riaz, M., Nadeem, R., Asif, M., Mehmood, T., & Rehman, K.-. (2009). *Pb ( II ) biosorption from hazardous aqueous streams using Gossypium hirsutum ( Cotton ) waste biomass*. 161(3), 88–94. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.096>
- Sandau, E., Sandau, P., Pulz, O., & Zimmermann, M. (1996). Heavy metal sorption by marine algae and algal by-products. *Acta Biotechnologica*, 16(2–3), 103–119. Recuperado de: <https://doi.org/10.1002/abio.370160203>

- Saravanan, A., Brindha, V., & Krishnan, S. (2011). Studies on the structural changes of the biomass *Sargassum* sp. on metal adsorption. *J. Adv. Bioinf*, 2(3), 193–196.
- Seno, L., Santos, M., Carlos, J., Carvalho, M. De, Lodi, A., Finocchio, E., ... Converti, A. (2011). Adsorption of  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  onto dry biomass of *Arthrospira* ( *Spirulina* ) *platensis* and *Chlorella vulgaris* . I . Single metal systems. *Chemical Engineering Journal*, 173(2), 326–333. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.039>
- Tejada-tovar, C., & Villabona-ortiz, Á. (2015). 209-Manuscript-369-1-10-20170214. 18(34), 109–123.
- Tejada, C., Ortiz, A., & Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico Adsorption of heavy metals in waste water. *Tecnología y Ciencias*, 18, 109–123. Recuperado de: <https://doi.org/344234336010>
- Tirado, M. R. H. (2014). *Absorción de macro y micronutrientes en ají de escabeche (Capsicum baccatum var. pendulum) bajo condiciones del valle de Cañete*. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Valle, G. (2007). *Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zinc de efluentes de aguas residuales urbanas*. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada.
- Wang, J., & Chen, C. (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2), 195–226. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.11.002>
- Zewail, T. M., & Yousef, N. S. (2015). Kinetic study of heavy metal ions removal by ion exchange in batch conical air spouted bed. *Alexandria Engineering Journal*, 54(1), 83–90. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.aej.2014.11.008>

## ANEXOS

*Anexo 1. Inóculo de *Chlorella Vulgaris* obtenido del Instituto del Mar del Perú.*



*Anexo 2. Primera siembra de microalgas.*



*Anexo 3. Preparación de solución de Bay Folan.*



*Anexo 4. Primera Siembra de microalgas con exposición a luz LED.*



Anexo 6. Muestra de microalgas después de 7 días de cultivo.



Anexo 5. Medio de cultivo Bay Folan e inóculo de microalgas a sembrar.



Anexo 8. Inóculo cultivado de la tercera siembra a mitad de semana.



Anexo 7. Inóculo cultivado de tercera siembra en el día 7.



*Anexo 10. Siembra de microalgas en probetas de un litro.*



*Anexo 9. Siembra de microalgas en vaso precipitado de un litro.*



*Anexo 11. Siembra en dos probetas de Litro después de los siete días de cultivo.*



*Anexo 12. Preparación de medio Bay Folan en un vaso precipitado de un litro.*





Anexo 14. Bay Folan utilizado como medio para la producción de microalgas.



Anexo 13. Siembra de microalgas en cinco probetas de dos litros cada una.



Anexo 16. Cultivo de microalgas en 5 probetas de 2 litros con luz LED.



Anexo 15. Siembra de microalgas con luz LED durante la noche.



Anexo 19. Siembra de microalgas con 4 probetas de 2 litros y 4 probetas de un litro.



Anexo 18. Nitrato de Plomo.



Anexo 17. Preparación de Soluciones de plomo de 22, 46 y 70 mg/L.



Anexo 22. Muestras de las soluciones de 22, 46 y 70 mg/L.



Anexo 21. Agitación de Nitrato de Plomo en agua destilada 800 RPM.



Anexo 20. Biomasa de microalga tamizada en la malla 100.



Anexo 24. Tamiz con malla 100 utilizado para cernir la biomasa seca de microalgas.



Anexo 23. Una muestra de microalga obtenida para los ensayos de absorción.



Anexo 25. Muestras de biomasa que se utilizaron en los ensayos de bioabsorción.





Anexo 27. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 1).



Anexo 26. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 2).



Anexo 29. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 3).



Anexo 28. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 6).



Anexo 33. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 8).



Anexo 32. Agitación de solución de plomo con microalgas (tratamiento 16).



Anexo 31. Bomba de succión del Laboratorio de Monitoreo de suelos de Ingeniería Ambiental.



Anexo 30. Cerámica instalada sobre el matraz kitasato para el proceso de filtrado.



Anexo 36. Ácido cítrico, Hidróxido de Sodio y Ácido nítrico para amortiguar el pH y preservar las muestras.



Anexo 35. Control del pH de las soluciones de plomo antes del ensayo de bioabsorción.



Anexo 34. Añadido de muestras al filtro Whatman en la cerámica.





Anexo 39. Ajuste del pH en la solución de plomo antes de la bioabsorción.



Anexo 38. Instalación de bomba de vacío para el filtrado de las muestras de agua tratadas.



Anexo 37. Sobrante de biomasa después del filtrado.





Anexo 40. Residuo de biomasa contaminada con plomo después del filtrado.



Anexo 42. Preservación de muestras con Ácido Nítrico y control con pHmetro.



Anexo 41. Frascos contenidos con las muestras para llevarse a Delta Lab.



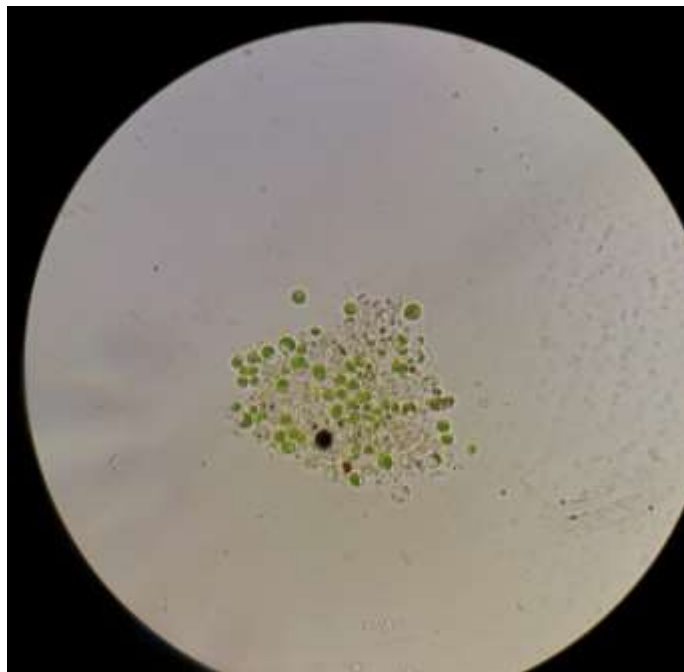
*Anexo 43. Muestras listas para llevarse a analizar.*



*Anexo 44 Observación de las microalgas por el método de Microscopía – ejemplo 1.*



*Anexo 45 Observación de Microalgas por el método de Microscopía - ejemplo 2.*



Anexo 46. Resultados obtenidos del laboratorio Delta Lab para las soluciones de plomo.

**INFORME DE ENSAYO N° 1909008**

<b>Cliente:</b>	<b>JHONATAN LEIVA COLOS</b>
<b>Domicilio legal:</b>	Urb. Alameda de Santa Mz. C Lote 3, Larigacheño - Lima - Lima.
<b>Producto:</b>	Agua Residual
<b>Referencia del cliente:</b>	No Indica
<b>Procedencia de las muestras:</b>	Muestras provistas por el cliente indicando lugar de muestreo: Universidad Peruana Unión Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Larigacheño Chonica - Lima - Lima
<b>Referencia del plan de muestreo:</b>	No Aplica
<b>Procedimiento de muestreo:</b>	No Aplica
<b>Fecha de recepción de las muestras:</b>	2019/09/06
<b>Fecha de inicio del ensayo:</b>	2019/09/06
<b>Fecha de término del ensayo:</b>	2019/09/11

---

<b>Método:</b> APHA 3111 B	<b>Ensayo:</b> Plomo (Pb)	<b>Tipo de muestra:</b> Agua Residual
----------------------------	---------------------------	---------------------------------------

Código de Laboratorio	Estación de Muestreo	Fecha de Muestreo	Hora de Muestreo	Límite de Detección del Método	Límite de Cuantificación del Método	Resultado	Unidad
1909008-1	Solución 25 mg/L	2019/09/06	10:00	0.01	0.03	22.12	mg/L
1909008-2	Solución 10 mg/L	2019/09/06	10:05	0.01	0.03	45.16	mg/L
1909008-3	Solución 75 mg/L	2019/09/06	10:10	0.01	0.03	65.86	mg/L

**Ensayo:** Descripción del Método de Referencia:  
**Prueba:** SMELWW - APHA-AWWA-WEF Part. 303E y 311B, 23rd Ed. 2017 Nitric Acid Digestion - Direct Air-Acetylene Flame Method

**Notas:**

- Condición y estado de la muestra ensayada: Las muestras llegaron refrigeradas y preservadas
- Las muestras llegaron en frascos de polietileno
- Las muestras se mantendrán por un periodo de 10 días luego entregado el informe de ensayo a excepción de las muestras perecibles
- Toda corrección o demanda fuera al presente informe de ensayo será atendido con la Destacación "Suplemento al informe de Ensayo"
- Estos resultados no deben ser utilizados como certificación de conformidad con normas del producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce
- Resultado por debajo del límite de cuantificación del método son referendos
- El informe de control de calidad le será proporcionado a su solicitud

Lima, 11 de septiembre del 2019,

**DELTA LAB S.A.C.**  
**RAÚL J. ROSALES TORRES**  
 SER JEFE DE LA CALIDAD  
 CIP N° 209642

Este informe no podrá ser reproducido total o parcialmente sin la autorización de DELTA LAB S.A.C.  
 Los resultados presentados corresponden solo a la muestra indicada

Av. Carretera Central Km. 9.3 Mz. "A" Lt. 6 As. Ntra. Sra. de La Merced - Ate - Lima 03 - PERU  
 Telefax: (511) 3560230 Celular: 947148233 Email: servicioalcliente@deltalabsac.com www.deltalabsac.com



**Anexo 47. Resultados obtenidos del Laboratorio Delta Lab para la concentración final de plomo.**

INFORME DE ENSAYO N° 1909035							
Cliente	JHONATAN LEIVA COLOS						
Domicilio legal	Urb. Alameda de Nafia Mz. C° Lote 3, Lurigancho - Lima - Lima						
Producto	Agua Residual						
Referencia del cliente	No Indica						
Procedencia de las muestras	Muestras enviadas por el cliente indicando lugar de muestreo: Universidad Peruana Uniope						
Referencia del plan de muestreo	No Aplica						
Procedimiento de muestreo	No Aplica						
Fecha de recepción de las muestras	2019/09/12						
Fecha de inicio del ensayo	2019/09/12						
Fecha de término del ensayo	2019/09/12						
Método: APHA 3111-B		Ensayo: Plomo (Pb)			Tipo de muestra: Agua Residual		
Código de Laboratorio	Estación de Muestras	Fecha de Muestras	Hora de Muestras	Límite de Detección del Método	Límite de Cuantificación del Método	Resultado	Unidad
1909035-1	Tratamiento # 1	2019/09/05	10:30	0.01	0.03	16.01	mg/l
1909035-2	Tratamiento # 2	2019/09/05	10:30	0.01	0.03	11.72	mg/l
1909035-3	Tratamiento # 3	2019/09/05	11:10	0.01	0.03	30.11	mg/l
1909035-4	Tratamiento # 4	2019/09/05	11:30	0.01	0.03	14.33	mg/l
1909035-5	Tratamiento # 5	2019/09/05	11:50	0.01	0.03	2.89	mg/l
1909035-6	Tratamiento # 6	2019/09/05	12:10	0.01	0.03	2.30	mg/l
1909035-7	Tratamiento # 7	2019/09/05	12:30	0.01	0.03	1.28	mg/l
1909035-8	Tratamiento # 8	2019/09/05	12:50	0.01	0.03	2.36	mg/l
1909035-9	Tratamiento # 9	2019/09/05	13:10	0.01	0.03	7.51	mg/l
1909035-10	Tratamiento # 10	2019/09/05	13:30	0.01	0.03	12.21	mg/l
1909035-11	Tratamiento # 11	2019/09/05	13:50	0.01	0.03	5.94	mg/l
1909035-12	Tratamiento # 12	2019/09/05	14:10	0.01	0.03	8.00	mg/l
1909035-13	Tratamiento # 13	2019/09/05	14:30	0.01	0.03	2.09	mg/l
1909035-14	Tratamiento # 14	2019/09/05	14:50	0.01	0.03	2.40	mg/l
1909035-15	Tratamiento # 15	2019/09/05	15:10	0.01	0.03	2.44	mg/l
1909035-16	Tratamiento # 16	2019/09/05	15:30	0.01	0.03	1.61	mg/l
1909035-17	Tratamiento # 17	2019/09/05	15:50	0.01	0.03	2.19	mg/l
<b>Ensayo:</b> Descripción del Método de Referencia: Plomo: SMWW - APHA-AWWA-WEF Part. 3030 y 3111B, 22nd Ed. 2017 Nitric Acid Digestion / Direct Air-Acetylene Flame Method							
<b>Notas:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Condiciones y estado de la muestra ensayada. Las muestras llegaron refrigeradas y preservadas.</li> <li>• Las muestras llegaron en frascos de polietileno.</li> <li>• Las muestras se mantendrán por un periodo de 10 días luego entregado el informe de ensayo a excepción de las muestras perecibles.</li> <li>• Toda corrección o enmienda física al presente informe de ensayo será emitido con la Declaración "Suplemento al informe de Ensayo".</li> <li>• Estos resultados no deben ser utilizados como certificación de conformidad con normas del producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.</li> <li>• Resultados por debajo del límite de cuantificación del método sin referencias.</li> <li>• El informe de control de calidad le será proporcionado a su solicitud.</li> </ul>							
 <b>RAQUEL ROSALES TORRES</b> SUB GERENTE DE LA CALIDAD CIP N° 209812				Lima, 17 de setiembre del 2019.			
Este informe no podrá ser reproducido total o parcialmente sin la autorización de DELTA LAB S.A.C. Los resultados presentados corresponden solo a la muestra indicada							
Av. Carretera Central Km. 9.3 Mz. "A" Lt. 6 As. Ntra. Sra. de La Merced - Ate - Lima 03 - PERÚ Telefax: (511) 3560230 Celular: 947148233 Email: servicioalcliente@delta-lab.com www.delta-lab.com							

Anexo 48 Documento de Entrega de Cepa de la microalga *Chlorella Vulgaris* del IMARPE.

 <div style="display: inline-block; background-color: black; color: white; padding: 2px 5px; text-align: left;"><div style="display: inline-block; width: 20px; height: 10px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div>PERÚ</div> <div style="display: inline-block; background-color: black; color: white; padding: 2px 5px; text-align: left;"><div style="display: inline-block; width: 20px; height: 10px; background-color: white; margin-right: 5px;"></div>Ministerio de la Producción</div>	 <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"><b>IMARPE</b> <small>INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ</small></div>
<p>"Decenio de la Igualdad de oportunidades para mujeres y hombres"</p> <p>"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"</p>	
<p><b><u>FICHA DE ENTREGA DE CEPAS N° 008-2019</u></b></p>	
<p>Mediante la RDEC N° 197- 2017 IMARPE/DEC, se aprueba la modificación del texto Único de Servicios No Exclusivos TUSNE del IMARPE, el cual aprueba, entre otros, la venta de cepas del Banco de Germoplasma de Organismos Acuáticos.</p>	
<p>En consecuencia, se entrega en calidad de venta al Bachiller Jhonatan Leiva Colos, con el objetivo de realizar la tesis: «Remoción de plomo mediante el uso de microalgas en agua contaminada a escala de laboratorio» de la Universidad Peruana La Unión, para obtener el grado de Ingeniero Ambiental.</p>	
<p>El uso de esta cepa solo está autorizado para el objetivo el cual fue solicitado y para ser empleada como recurso biológico.</p>	
<p>Nombre de la cepa: <i>Chlorella</i> sp. Código de la cepa: IMP-BG-020 Medio de cultivo: Chu medio Temperatura de mantenimiento: 17 °C Cantidad: 10 mL</p>	
<p>Nombre : DNI : Institución/ Universidad: Área/ Laboratorio : Fecha :</p>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block;"><b>EL PERÚ PRIMERO</b></div>	
<small>Instituto del Mar del Perú   Esquina Gamara y General Valle s/n, Chucuito - Callao   T. (051) 208 8650   <a href="http://www.imarpe.gob.pe">www.imarpe.gob.pe</a></small>	