

Universidad de Antioquia
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ingeniería



EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE MERCURIO EN
AGUAS CONTAMINADAS CON EL METAL EMPLEANDO
LA MICROALGA *Scenedesmus* sp.

Trabajo de Investigación de Maestría

Ingrid Catalina Guauque Díaz
Junio de 2018

**EVALUACIÓN DE LA REMOCIÓN DE MERCURIO EN AGUAS CONTAMINADAS
CON EL METAL EMPLEANDO LA MICROALGA *Scenedesmus* sp.**

Ingrid Catalina Guauque Díaz
Ingeniera química

Trabajo de investigación para optar al título de M.Sc en Ingeniería

Asesora:

Mariana Peñuela Vasquez
Ingeniera Química, PhD.

Co-Asesora:

Adriana Patricia Villegas
Ingeniera Química, PhD.

Maestría en Ingeniería con énfasis en bioprocesos
Grupo de Bioprocesos
Departamento de Ingeniería Química
Facultad de Ingeniería
Universidad de Antioquia
2018

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado 1

Jurado 2

*Puedes despedirte a besos de tus familiares y amigos
Y poner kilómetros entre ellos y tú, pero al mismo tiempo
Los llevas en el corazón, tu mente, tu estómago, porque
No sólo vives en un mundo, sino que también un mundo vive en ti.*

“Frederick Buechner”

Especialmente para ustedes, mi familia!

Agradecimientos

A aquellas personas que de alguna manera me guiaron, apoyaron, acompañaron y permanecieron constantes en este pequeño logro que materializo hoy. A las asesoras Adriana Villegas y Mariana Peñuela, quienes guiaron esta investigación y me brindaron el apoyo para lograr este objetivo. A la Universidad de Antioquia por la beca estudiante instructor que me fue otorgada. Al grupo de investigación Bioprocesos por hacer posible este proyecto, al laboratorio de Procesos Físicoquímicos Aplicados de la Universidad de Antioquia por brindarme el espacio para la realización de los análisis de remoción de mercurio y a la Universidad Cooperativa de Colombia por la financiación del proyecto 1879.

Tabla de contenido

1	Notas introductorias	12
1.1	Introducción	12
1.2	Planteamiento del problema	12
1.3	Objetivos	14
1.3.1	Objetivo general	14
1.3.2	Objetivos específicos	14
1.4	Las microalgas y su estudio en la remoción de metales pesados	14
1.5	Referencias bibliográficas	16
2	Determinación de las condiciones de cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	18
2.1	Introducción	18
2.2	Marco teórico	18
2.2.1	Generalidades de las microalgas	18
2.2.2	Uso de mercurio en Colombia	21
2.3	Materiales y métodos	26
2.4	Resultados y discusión	28
2.4.1	Ensayo fuente de carbono	28
2.4.2	Efecto del pH, tiempo de adición de Hg y fuente de carbono en la remoción de Hg	30
2.5	Conclusiones	32
2.6	Referencias bibliográficas	33
3	Cultivo de Microalga <i>Scenedesmus</i> sp. y su aplicación en procesos de remoción de metales pesados	36
3.1	Introducción	36
3.2	Marco teórico	36
3.2.1	<i>Scenedesmus</i> sp.	36
3.2.2	Tratamientos de remoción de metales pesados	39
3.2.3	Microalgas en la remoción de metales pesados	41
3.3	Estado del arte	42
3.3.1	Procesos de remoción con <i>Scenedesmus</i>	43
3.4	Materiales y métodos	44
3.4.1	Microorganismos y reactivos	44
3.4.2	Crecimiento de biomasa y remoción de mercurio	45
3.4.3	Métodos analíticos	46
3.5	Resultados y discusión	48
3.5.1	Crecimiento de biomasa y remoción de Hg	48
3.6	Conclusiones	60
3.7	Recomendaciones	61
3.8	Referencias bibliográficas	61
4	Modelo de crecimiento para la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. y remoción de mercurio	67
4.1	Introducción	67
4.2	Marco teórico	67
4.2.1	Sistemas Biológicos	67
4.2.2	Modelación de sistemas biológicos	68
4.2.3	Clasificación de modelos	69
4.2.4	Modelos en procesos biotecnológicos	71
4.3	Estado del arte	74
4.4	Materiales y métodos	76
4.5	Modelación	76
4.5.1	Planteamiento del modelo cinético	76
4.6	Estimación de parámetros	80
4.7	Resultados	82
4.7.1	Crecimiento de biomasa	82

4.7.2	Consumo de sustratos	82
4.7.3	Remoción de mercurio	84
4.7.4	Validación del modelo	85
4.8	Conclusiones	88
4.9	Recomendaciones	88
4.10	Referencias bibliográficas	89
1	Microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	93
1.1	Protocolo mantenimiento y conservación	93
1.1.1	Preparación de células	93
1.1.2	Reactivación de células	93
2	Determinación de biomasa microalgal por método de peso seco indirecto	96
2.1	Preparación de la curva estándar	96
2.1.1	Protocolo	96
3	Determinación de fosfatos por espectrofotometría UV	99
3.1	Preparación de la curva de calibración	99
3.1.1	Curva de calibración	99
3.2	Protocolo método analítico determinación de fosfatos por el método del ácido ascórbico	99
3.2.1	Preparación de soluciones	99
3.2.2	Tratamiento de las muestras	100
4	Determinación de nitratos por espectrofotometría UV	101
4.1	Curva de calibración	101
4.2	Protocolo	101
4.2.1	Preparación de soluciones	101
4.2.2	Tratamiento de las muestras	101
5	Diseño experimental	102
5.1	Evaluación del efecto de la concentración inicial de biomasa y el inóculo sobre el crecimiento de biomasa	102
5.1.1	Exploración gráfica de los datos	102
5.1.2	Modelo de efectos fijos	104
5.1.3	ANOVA	105
5.1.4	Validación del modelo	105
5.1.5	Prueba de homocedasticidad	106
5.1.6	Prueba de independencia	107
5.2	Evaluación del efecto de la concentración inicial de biomasa sobre la remoción de mercurio	107
5.2.1	Exploración gráfica de los datos	107
5.2.2	Modelos de efectos fijos	110
5.2.3	ANOVA	110
5.2.4	Validación del modelo	111

Lista de figuras

1.1	Número de publicaciones acerca de remoción de metales. Gráfica obtenida usando la base de datos Scopus	15
1.2	Distribución de temas de investigación sobre remoción de metales pesados. Gráfica obtenida usando la base de datos Scopus	15
2.1	Esquema de una célula procariota [3]	19
2.2	Esquema de una célula eucariota [3]	19
2.3	Producción de oro por departamentos [16]	22
2.4	Esquema inoculación y cultivo de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp.	26
2.5	Esquema medición biomasa, fosfatos y nitratos. a) toma de muestras b) lectura de biomasa, c) centrifugación de las muestras, d) protocolo análisis para cuantificación de fosfatos y nitratos.	27
2.6	Esquema del cultivo microalgal con las diferentes fuentes de carbono. a) Fuente de Carbono de $NaHCO_3$. b) Fuente de carbono de CO_2	27
2.7	Cinéticas de crecimiento de biomasa del ensayo de la fuente de carbono	29
2.8	Consumo de la fuente de fosfato a diferentes concentraciones de la fuente de carbono	29
2.9	Consumo de la fuente de nitratos a diferentes concentraciones de la fuente de carbono	30
2.10	Cinéticas de crecimiento de la microalga con adición de Hg en $t=0$	31
2.11	Cinéticas de crecimiento de la microalga con adición de Hg en $t=0$	32
3.1	<i>Scenedesmus</i> sp, imagen tomada en microscopio óptico con magnificación de 100X.	37
3.2	Estructura externa de <i>Scenedesmus</i> sp, imagen tomada en microscopio óptico con magnificación de 100X.	38
3.3	Cinéticas de crecimiento de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. a. Muestra control 35, 70, 145, 225 mg/l y 0 mg/l de Hg. b. curvas a 35, 70, 145, 225 mg/l y 2,5 mg/l de Hg. c. 35, 70, 145, 225 mg/l y 5 mg/l de Hg. d. 35, 70, 145, 225 g/l y 7,5 mg/l de Hg.	49
3.4	Boxplot y análisis de comparaciones múltiples dentro de cada concentración de inóculo. Las concentraciones de Hg que no compartan la misma letra tuvieron medias significativamente diferentes.	51
3.5	Cinéticas de consumo de fosfatos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. a. Muestra control b. curvas a 2,5mg/l de Hg. c. 5mg/l de Hg. d. 7,5mg/l de Hg.	52
3.6	Cinéticas de consumo de nitratos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. a. Muestra control 0mg/l de Hg. b. curvas a 2,5g/l de Hg. c. 5mg/l de Hg. d. 7,5g/l de Hg.	55
3.7	Porcentaje de remoción de Hg	56
3.8	Cinéticas de consumo de fosfatos de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. a. Muestra control a 0 mg/l de Hg. Curvas a b. 2,5 mg/l de Hg. c. 5 mg/l de Hg. d. 7,5 mg/l de Hg.	58
4.1	Pasos básicos para el diseño del modelo matemático. Tomado y adaptado de [4].	68
4.2	Clasificación de los modelos matemáticos en procesos bioquímicos [2], [12]	70
4.3	Efecto de la inhibición en el crecimiento de biomasa [23].	73
4.4	Esquema descriptivo del proceso de crecimiento de biomasa y remoción de mercurio.	76
4.5	Cinéticas de crecimiento de biomasa comparadas con datos experimentales. a. Inóculo = 145 mg/l y $Hg_i=0$ mg/l b. Inóculo = 225 mg/l y $Hg_i=0$ mg/l. c. Inóculo = 145 mg/l y $Hg_i=2.5$ mg/l d. Inóculo = 225 mg/l y $Hg_i=2.5$ mg/l e. Inóculo = 145 mg/l y $Hg_i=5$ mg/l f. Inóculo = 225 mg/l y $Hg_i=5$ mg/l	83
4.6	Cinéticas simuladas para consumo de sustratos a. consumo de la fuente de carbono b. consumo de la fuente de fosfatos c. consumo de la fuente de nitratos d. intensidad lumínica.	84
4.7	Remoción de Hg al final del tiempo evaluado y su simulación del modelo	85
4.8	Cinética de remoción de Hg durante el tiempo de contacto y comparación con datos experimentales.	86
4.9	Validación de la cinética de crecimiento y remoción de Hg. a. Crecimiento de la microalga ($X_i = 225mg/l - Hg_i = 5mg/l$. b. Remoción de Hg. ($X_i = 225mg/l - Hg_i = 5mg/l$)	86

1.1	Conservación de células de <i>Scenedesmus</i> sp.	94
1.2	Activación de células de <i>Scenedesmus</i> sp.	95
2.1	Curva de calibración <i>Scenedesmus</i> sp.	96
2.2	Protocolo curva de calibración de biomasa	98
3.1	Curva de calibración para la fuente de fosfatos	99
4.1	Curva de calibración para la fuente de nitratos	101
5.1	Distribución de los datos.	102
5.2	Boxplot para cada factor	103
5.3	Gráfica de efectos principales	104
5.4	Gráfica de interacción	104
5.5	Gráfica de residuales	106
5.6	Valores ajustados Vs residuales	106
5.7	Distribución de los datos para la variable de respuesta de remoción de Hg.	108
5.8	Boxplot para cada factor	108
5.9	Gráfica de efectos principales	109
5.10	Gráfica de interacción	110
5.11	Gráfica de efectos principales.	111
5.12	Gráfica de efectos principales.	112

Lista de tablas

1.1	Histórico de producción anual de oro en Colombia [13]	13
2.1	Clasificación de algas por su fuente de energía [12]	20
2.2	Características del grupo uno de microalgas [2], [3]	20
2.3	Características del grupo dos de microalgas [6], [13]	20
2.4	Características del grupo tres de microalgas [3], [6]	21
2.5	Características del grupo cuatro de microalgas [3], [6], [14]	21
2.6	Reporte estimado de utilización de mercurio en el mundo [18].	23
2.7	Efectos por la exposición de mercurio [15], [21]	24
2.8	Legislación colombiana para disposición de mercurio [18].	25
2.9	Matriz de mercurio para aguas en Colombia [15], [22]	25
2.10	Concentraciones evaluadas de la fuente de carbono.	26
2.11	Condiciones de cultivo para el diseño experimental del efecto del pH y la fuente de carbono	28
2.12	Matriz experimental para la fuente de carbono	28
3.1	Composición de la microalga <i>Scenedesmus</i> sp. [14]	37
3.2	Fuentes de contaminación causada por metales	39
3.3	Métodos convencionales de remoción de metales	40
3.4	Diferencias entre los procesos de biosorción y bioacumulación [1], [46]	41
3.5	Publicaciones relevantes en el área de la remoción de metales pesados con microalgas	43
3.6	Publicaciones relevantes en el área de la remoción de metales pesados con <i>Scenedesmus</i>	44
3.7	Medio de cultivo CHU-13 [55].	45
3.8	Condiciones de cultivo del ensayo de crecimiento de biomasa y remoción de Hg	45
3.9	Niveles de los factores del diseño experimental	46
3.10	Valores para las cinéticas de crecimiento, ensayo de inóculo y concentración inicial de Hg	50
3.11	Modelo de efectos fijos para concentración final de biomasa	50
3.12	ANOVA para crecimiento de biomasa	50
3.13	Resumen del consumo de fosfatos para el ensayo de inóculo y Hg	53
3.14	Modelo de efectos fijos para la remoción de Hg.	57
3.15	ANOVA porcentaje remoción de mercurio	57
4.1	Características de la simulación para modelos cinéticos [1]	67
4.2	Modelos cinéticos no estructurados.	72
4.3	Mecanismos de inhibición en la cinética de crecimiento celular [6]	73
4.4	Modelos de adsorción y desorción.	74
4.5	Publicaciones relevantes acerca de modelos matemáticos aplicado a bioprocesos.	75
4.6	Condiciones de cultivo para la estimación de parámetros.	76
4.7	Intervalo de valores iniciales de los parámetros.	81
4.8	Parámetros del algoritmo genético	81
4.9	Parámetros pseudo-óptimos de las cinéticas sin inhibición	82
4.10	Concentraciones de los sustratos simuladas por el modelo.	82
4.11	Listado de variables empleadas en el modelo	88
1.1	Equipos y reactivos empleados para conservación de <i>Scenedesmus</i> sp.	93
2.1	Diluciones curva de calibración de biomasa.	97
5.1	Tabla de medias de la respuesta de biomasa.	105
5.2	Modelo de efectos fijos para concentración de biomasa	105
5.3	Resultados ANOVA	105
5.4	Normalidad de los residuales	106
5.5	Prueba de homocedasticidad	107
5.6	Prueba de independencia	107
5.7	Tabla de medias de la respuesta de Remoción de Hg	110

5.8	Modelo de efectos fijos para la remoción de Hg.	110
5.9	ANOVA para el porcentaje de remoción	111
5.10	Test de normalidad de los residuales	111
5.11	Test de homocedasticidad	112
5.12	Test de independencia de los datos	112

Capítulo 1

Notas introductorias

1.1 Introducción

La investigación y el desarrollo de procesos tales como la obtención de nuevas materias primas y la biorremediación de los ecosistemas a partir de la integración de los fundamentos de ingeniería química y el estudio de sistemas biológicos han permitido el avance de procesos biotecnológicos. Estos estudios enfocados en la problemática ambiental causada por diferentes factores como la contaminación por metales pesados, hacen parte de uno de los problemas ambientales más serios, por lo tanto, es un tema de interés llevar a cabo el desarrollo y la implementación de tecnologías biotecnológicas como alternativa de solución para tales problemas. La investigación de procesos biotecnológicos a partir de microalgas encaminados a la biorremediación del medio ambiente, es una alternativa prometedora ya que los cultivos microalgales aportan las condiciones necesarias para llevar a cabo los procesos de tratamientos biológicos adaptando su metabolismo a las necesidades requeridas, con la posibilidad de adsorber, metabolizar y acumular sustancias nocivas [1]. Estas características tienen resultados positivos en el medio ambiente, (sean suelos, cuerpos de agua superficial o subterránea [2], [3]), dado que contribuyen a la gestión y manejo de la contaminación ambiental causada por materiales peligrosos y compuestos orgánicos concentrados provenientes de fuentes domésticas o industriales [1].

Es por esta razón, en este trabajo, fue evaluada la remoción de mercurio empleando la microalga *Scenedesmus* sp en un medio de cultivo contaminado con este metal como aporte en la investigación sobre el tratamiento de aguas y remoción de metales pesados basadas en algas y biotecnología ambiental. En este primer capítulo se presenta la problemática sobre el tema de investigación y la importancia de proponer nuevas alternativas de tratamiento para la contaminación generada a partir de procesos de extracción de oro en Colombia; los objetivos de investigación y un breve reporte de la investigación acerca de la remoción de metales pesados empleando microalgas.

1.2 Planteamiento del problema

El vertimiento de compuestos químicos altamente perjudiciales en suelos y aguas se ha incrementado en forma paralela al desarrollo industrial dado que no se cumplen las leyes reglamentarias para el adecuado uso de recursos en el medio ambiente. Uno de los sectores donde más se evidencia este incumplimiento es en el minero ya que algunas de las técnicas utilizadas para la obtención y purificación de minerales usan sustancias como cianuro [4], ácidos fuertes y solventes [5], [6] y metales pesados [7] que afectan gravemente el medio ambiente.

Una de las actividades mineras sobre la que se presta más atención por su impacto ambiental es la extracción de oro ya que deja como remanente metales pesados que llegan a los ecosistemas en forma de residuos. Los metales pesados que surgen de la extracción del oro son principalmente Cd, Cromo (Cr), Cobalto (Co), Manganeso (Mn), Molibdeno (Mo), Ni, Pb, Estaño (Sn), Zn y Hg [8]. Este último ha recibido gran atención ya que es usado en minería artesanal donde no se controla el manejo ni su deposición final. El método más usado en este tipo de minería consiste en capturar el oro mediante el contacto con el mercurio, el mercurio se adhiere al oro formando una amalgama que facilita su separación, mediante una aleación que forma una sustancia muy viscosa de color blanco brillante la cual se calienta, evapora el mercurio y permite la separación final del oro [9].

El mercurio evaporado es tóxico y corrosivo, lo que es empeorado por el hecho de que sus vapores

son más pesados que el aire, impidiendo su disipación en la atmósfera y generando una movilidad significativa debido a que tiene una presión de vapor baja [8]. Además, tiene un efecto negativo frente a la biota ya que posee afinidad por esta, es altamente bioacumulable y entra a formar parte de la cadena trófica [10]. El mecanismo por el cual el mercurio suele entrar a esta red es a través de su transformación a metilmercurio para luego llegar a los organismos que hacen parte de la biota acuática y finalmente bioacumularse [11].

En el territorio colombiano, se ha identificado que la extracción de oro desde el 2004 ha aumentado debido a la inversión extranjera y a las exportaciones de la minería. Adicionalmente, se han venido estableciendo desde 2012 áreas de actividad minera en la región andina, la Sierra Nevada de Santa Marta y la Amazonía, que abarcan alrededor de $36\,326\text{ km}^2$. En 2010 Colombia produjo 53,6 toneladas de oro, mientras que en 2011 fueron 55,9 toneladas, mostrando un crecimiento del 4,3%. En 2012 la producción de oro se cerró con valores de 66,1 toneladas, reportando un crecimiento de cerca del 18% en comparación con 2011. En 2012, Colombia experimentó los mayores índices de producción de oro en más de una década. Este mismo año fue posicionada en el puesto 66 a nivel mundial reportando reservas de divisas de 10,4 toneladas equivalente a un 1,6% de las reservas de oro en el mundo, según los cálculos del consejo mundial del oro. Recientemente, en 2015 el histórico de producción de oro indicado por el Banco de la República a través del Ministerio de Minas y Energía y SIMCO reporta un volumen de 59,2 toneladas de oro. En la Tabla 1.1 se observan los históricos mencionados anteriormente [12], [13].

Tabla 1.1: Histórico de producción anual de oro en Colombia [13]

Año	Cantidad (ton/año)
2010	53,6
2011	55,9
2012	66,1
2015	59,2

Estas alzas provocan deterioro ambiental con efectos irreparables en las fuentes de agua, suelos, aire y salud humana debido a la gran cantidad de metales que se generan como resultado de esta actividad [14]. Las principales consecuencias que se pueden presentar en la salud humana por intoxicación con mercurio son daños en el sistema nervioso central y periférico, daño al ADN, reacciones alérgicas, dolor de cabeza y cansancio [9]. En el caso particular de Colombia se han reportado casos de personas con concentraciones de mercurio por encima de $0,17\text{ mg/kg}$ mientras los máximos permisibles, según la OMS, para contaminantes con efectos cancerígenos es de $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ [15], [16].

Según la OMS se estima que las consecuencias causadas por metales pesados alcanzan aproximadamente 15 millones de personas entre las cuales 3 millones corresponden a niños y mujeres que hacen parte de la población afectada por la minería aurífera artesanal y en pequeña escala en 70 países, en los que se encuentra el sur y sureste de Asia, el África subsahariana, América Latina, en menor porcentaje la Comunidad de Estados Independientes y otros países europeos [9].

Este desequilibrio ambiental y la preocupación por estos temas han obligado al desarrollo de sistemas para el tratamiento de aguas, suelos y aire contaminados a partir de métodos de recuperación de residuos como es la biorremediación [6], que ayuda a la descontaminación por medio de los procesos naturales de los ecosistemas y aporta una solución ambiental a estos temas [17]. En busca de alternativas se ha propuesto trabajar con microalgas como un camino viable para esta posible reparación del medio ambiente. Las microalgas son organismos fotosintéticos, unicelulares o pluricelulares que poseen una estructura celular sencilla capaces de convertir energía solar en energía química, siendo materia prima para biocombustibles [18], suplementos alimenticios [19], fármacos [20] y biorremediación [21]. La capacidad de estos microorganismos para reducir concentraciones de compuestos orgánicos en efluentes industriales es una alternativa interesante para contribuir a la eliminación de metales pesados [22].

Estos microorganismos presentan ciertos beneficios como ahorro de tiempo y energía, son amigables con el medio ambiente, su manipulación es fácil, se encuentran disponibles en cualquier época del año,

son reciclables y su costo es bajo [23], [24]. Particularmente, la microalga *Scenedesmus* sp., posee la capacidad de adsorber diferentes elementos metálicos y compuestos químicos presentes en formas de sales o iones metálicos [25]. Sus características le aportan ciertos beneficios con respecto a otras microalgas empleadas para la remoción de metales tales como: alta velocidad de crecimiento en comparación a otras plantas y microalgas; alta eficiencia respecto a la remoción de metales; alta relación superficie/volumen y por ende mayor área de contacto con el medio lo que permite que la remoción de metales sea alta; aplicabilidad tanto a sistemas discontinuos como continuos y buen desempeño en aguas que contienen diferentes concentraciones de metales, haciéndola tolerante a elevadas concentraciones de elementos químicos gracias a su alta actividad metabólica y capacidad de resistir fuertes variaciones ambientales [26], [27].

Dicho esto y con la finalidad de generar en este trabajo de investigación un aporte a la problemática de contaminación de aguas con mercurio a través del uso de las microalgas como una posible solución del problema planteado se establece la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto sobre la remoción de mercurio cuando se modifican las concentraciones iniciales de biomasa (inóculo) al emplear *Scenedesmus* sp., como agente de remoción en el proceso?

La experimentación propuesta permitió describir el proceso de remoción de mercurio ajustado a un modelo no estructurado que será una primera aproximación para el desarrollo de futuros trabajos que puedan incluir una modelación más completa, robusta y que pueda describir rutas metabólicas para el crecimiento celular de la microalga *Scenedesmus* sp.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Identificar las tendencias en la remoción de mercurio con base en la variación de la concentración inicial de biomasa empleando la microalga *Scenedesmus* sp.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar las cinéticas del proceso de remoción de mercurio de la microalga *Scenedesmus* sp. en aguas contaminadas con el metal.
- Evaluar el efecto que tiene la concentración inicial de biomasa sobre la remoción de mercurio cuando se emplea la microalga *Scenedesmus* sp.
- Implementar un modelo no estructurado que permita simular las tendencias en la remoción de metales pesados bajo diferentes condiciones iniciales de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp.

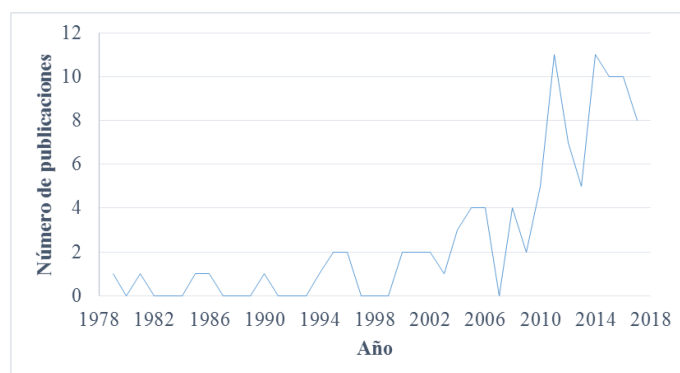
1.4 Las microalgas y su estudio en la remoción de metales pesados

Hoy en día se conocen más de 30.000 especies de algas las cuales se han venido clasificando de acuerdo a su color, morfología, tipo de reproducción y la más reciente clasificación ha sido respecto a propiedades submicroscópicas y quimicotaxonómicas que envuelven siete clases entre las que se encuentran las *Cyanophyceae* [28], *Bacillariophyceae* [29], *Chlorophyceae* [30], *Prasinophyceae* [31], *Prymnesiophyceae* [32].

La importancia y el desarrollo en la aplicación de estudios en biotecnología microalgal han permitido un mejoramiento tanto en la investigación de temas relacionados a las microalgas, el conocimiento de nuevas especies, principales características y estructuras como el uso de estas en la industria. Este mismo avance ha permitido la investigación de temas como el propuesto en este trabajo de investigación el cual que ha estado altamente soportado por una alta cantidad de publicaciones y

trabajos realizados con resultados positivos desde el punto de vista del medio ambiente motivo que promueve a la comunidad científica a seguir estudiando estas aplicaciones de origen biológico.

Figura 1.1: Número de publicaciones acerca de remoción de metales. Gráfica obtenida usando la base de datos Scopus



Mediante diferentes recursos y bases de datos bibliográficos es posible conocer resúmenes y citas de artículos de las revistas científicas más importantes del mundo. Scopus, es una de las bases de datos editada por Elsevier más grande del mundo en el género de ciencia y tecnología. La Figura 1.1 muestra por medio del buscador de resultados los documentos publicados sobre adsorción de metales pesados empleando microalgas en función del tiempo en años.

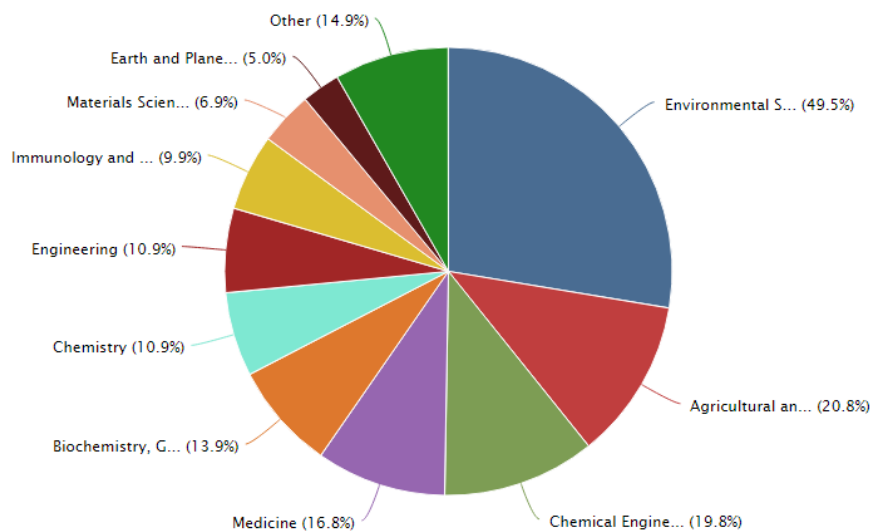


Figura 1.2: Distribución de temas de investigación sobre remoción de metales pesados. Gráfica obtenida usando la base de datos Scopus

De acuerdo a las gráficas anteriores se puede observar el crecimiento que ha tenido la investigación en este tema aplicado a diferentes campos de investigación; en la Figura 1.2 se pueden observar las publicaciones sobre adsorción de metales pesados empleando microalgas en función del área de investigación.

La búsqueda para conocer el análisis de resultados que reporta Scopus encontró: 351.669 documentos en búsqueda avanzada acerca de microalgas o algas, 62.237 documentos acerca de microalga, 8.427 documentos acerca de microalga *Scenedesmus*, 414 documentos acerca de microalga *Scenedesmus* y microalga *Scenedesmus* sp, 2.696 documentos acerca de metales pesados y algas, 101 documentos acerca de metales pesados, microalgas, adsorción, *Scenedesmus* y microalga *Scenedesmus* sp., cifras que muestran las tendencias en la investigación de remoción de metales pesados usando microalgas.

1.5 Referencias bibliográficas

- [1] J. V. Santafé, «Evaluación de las aguas residuales domésticas de la universidad autónoma de occidente como medio de cultivo natural para la Microalga Nativa *Chlorella*», 2015. dirección: <http://bdigital.uao.edu.co/handle/10614/7736>.
- [2] R. Posada, «Procesos de bioremediación», págs. 1-160, 2012.
- [3] C. Tejada, Á. Villabona y L. Garcés, «Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico Adsorption of heavy metals in waste water using biological materials», *Tecnológicas*, vol. 18, n.º 34, págs. 123-7799, 2015, ISSN: 01237799.
- [4] R. Saliba, H. Gauthier y R. Gauthier, «Adsorption of Heavy Metal Ions on Virgin and Chemically-Modified Lignocellulosic Materials», *Adsorption Science and Technology*, vol. 23, n.º 4, págs. 313-322, 2005, ISSN: 0263-6174. DOI: 10.1260/0263617054770039.
- [5] S. Nakamura y O. Nakano, *Method for neutralizing sulfuric acid acidic solution and hydrometallurgical method for nickel oxide ore*, 2016. DOI: 10.1016/j.(73). arXiv: arXiv:1208.5721.
- [6] D. W. O'Connell, C. Birkinshaw y T. F. O'Dwyer, «Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review», *Bioresource Technology*, vol. 99, n.º 15, págs. 6709-6724, 2008, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.036.
- [7] S. Lian, J. Ji, T. De-Jun, X. Hong-Bing, L. Zhen-Fu y G. Bo, «Estimate of heavy metals in soil and streams using combined geochemistry and field spectroscopy in Wan-sheng mining area, Chongqing, China», *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation*, vol. 34, n.º 1, págs. 1-9, 2015, ISSN: 1872826X. DOI: 10.1016/j.jag.2014.06.013. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jag.2014.06.013>.
- [8] P. Cordy, M. M. Veiga, I. Salih, S. Al-Saadi, S. Console, O. Garcia, L. A. Mesa, P. C. Velásquez-López y M. Roeser, «Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: The world's highest per capita mercury pollution», *Science of the Total Environment*, vol. 410-411, págs. 154-160, 2011, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.006.
- [9] OMS, *Mercury Exposure and Health Impacts among Individuals in the Artisanal and Small-Scale Gold Mining (ASGM) Community*, 2013. DOI: 10.1289/ehp.1307864. dirección: http://www.who.int/ipcs/assessment/public%7B%5C_%7Dhealth/mercury%7B%5C_%7Dasm.pdf (visitado 10-07-2016).
- [10] MADS - PNUMA, *Sinopsis Nacional de la Minería Aurífera Artesanal y de Pequeña Escala*, 2012. (visitado 15-07-2016).
- [11] J. Oliviero Verbel, «Efectos de la minería en Colombia sobre la salud humana», Tesis doct., Universidad de Cartagena, 2010, págs. 5-13, ISBN: 978-958-774-027-1.
- [12] M. Bernal, *Revista de Logística Minería de oro en Colombia_ auge y problemática*, 2016. dirección: <http://revistadelogistica.com/actualidad/mineria-de-oro-en-colombia-auge-y-problematica/> (visitado 25-07-2016).
- [13] C. Minera, *Histórico de producción de oro*, 2015. dirección: <http://www.upme.gov.co/generadorconsultas/Consulta.%5C%20Series.aspx?idModulo=4%7B%5C%7DtipoSerie=116%7B%5C%7Dgrupo=355>.
- [14] J. He y J. P. Chen, «A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools», *Bioresource Technology*, vol. 160, págs. 67-78, 2014, ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.068. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>.
- [15] C. Costa, «Resolución número 610 (24 de marzo de 2010)», *Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial*, n.º 610, págs. 1-8, 2010.
- [16] S. Suárez, «Resolución número 601 (04 de abril de 2006)», *Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial*, n.º 601, págs. 1-13, 2006.
- [17] J. D. García-García, R. Sánchez-Thomas y R. Moreno-Sánchez, «Bio-recovery of non-essential heavy metals by intra- and extracellular mechanisms in free-living microorganisms», *Biotechnology Advances*, vol. 34, n.º 5, págs. 859-873, 2016, ISSN: 07349750. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.05.003. dirección: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975016300519>.

- [18] T. M. Mata, A. A. Martins y N. S. Caetano, «Microalgae for biodiesel production and other applications: A review», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, n.º 1, págs. 217-232, 2010, ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2009.07.020.
- [19] M. Raventos, S. Duarte y R. Alarcon, «Application and Possibilities of Supercritical CO₂ Extraction in Food Processing Industry: An Overview», *Food Science and Technology International*, vol. 8, n.º 5, págs. 269-284, 2002, ISSN: 1082-0132. DOI: 10.1106/108201302029451.
- [20] L. Gómez, «Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos», *Revista Cubana de Química*, vol. XIX, n.º 2, págs. 3-20, 2007.
- [21] G. M. Gadd, «Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment», *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 84, n.º 1, págs. 13-28, 2009, ISSN: 02682575. DOI: 10.1002/jctb.1999.
- [22] D. W. Darnall, B. Greene, M. T. Henzl, J. M. Hosea, R. a. McPherson, J. Sneddon y M. D. Alexander, «Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass.», *Environmental science & technology*, vol. 20, n.º 2, págs. 206-8, 1986, ISSN: 0013-936X. DOI: 10.1021/es00144a018. dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288814>.
- [23] H. V. Perales-Vela, J. M. Peña-Castro y R. O. Cañizares-Villanueva, «Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae», *Chemosphere*, vol. 64, n.º 1, págs. 1-10, 2006, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.11.024.
- [24] D. Kratochvil y B. Volesky, «Advances in the biosorption of heavy metals», *Trends in Biotechnology*, vol. 16, n.º 7, págs. 291-300, 1998, ISSN: 01677799. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01218-9.
- [25] A. Pellón, J. Frades, A. Chacón, E. Pérez, A. Oña, M. D. C. Espinosa, C. Ramos, R. Mayarí y R. Escobedo, «Eliminación de cromo y cadmio mediante *Scenedesmus obliquus* en estado inmovilizado.», *Revista CENIC Ciencias Químicas*, vol. 36, n.º 3, págs. 175-180, 2005, ISSN: 10158553.
- [26] C. E. Andrade, A. L. Vera, C. H. Cárdenas y E. D. Morales, «Biomass production of microalga *Scenedesmus* sp. with wastewater from fishery», *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, vol. 32, n.º 2, págs. 126-134, 2009.
- [27] K. Suresh Kumar, H. U. Dahms, E. J. Won, J. S. Lee y K. H. Shin, «Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 113, págs. 329-352, 2015, ISSN: 10902414. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.019. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>.
- [28] R. G. Sheath, *Algal Ecology: Freshwater Benthic Systems*. 1997, vol. 36, págs. 331-332, ISBN: 0126684502. DOI: 10.2216/i0031-8884-36-4-331.1. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [29] R. A. Andersen, «The Microalgal Cell», *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, págs. 1-20, 2013, ISSN: 0003-2697. DOI: 10.1002/9781118567166.ch1. arXiv: 9809069v1 [arXiv:gr-qc].
- [30] R. E. Lee, *Basic characteristics of the algae*. 2008, págs. 3-30, ISBN: 9780521864084. DOI: 10.1017/CB09780521864084.002. arXiv: 394.
- [31] M. Alvarez y T. Gallardo, «CATALOGO DE LAS ALGAS CONTINENTALES ESPANOLAS.», *Acta botánica Malacitana*, vol. 11, págs. 17-38, 1986.
- [32] E. Paasche, «A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions», *Phycologia*, vol. 40, n.º 6, págs. 503-529, 2001, ISSN: 0031-8884. DOI: 10.2216/i0031-8884-40-6-503.1.

Capítulo 2

Determinación de las condiciones de cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.

2.1 Introducción

Los cultivos de microalgas son por naturaleza eco-amigables al ser organismos que contribuyen a la eliminación de contaminantes y a la producción de biomasa microalgal aplicada a diferentes escalas de la industria [1]. Cada cultivo microalgal de acuerdo a su especie dependerá de ciertos requerimientos para el adecuado crecimiento y producción de biomasa como es la fuente de nutrientes, condiciones ambientales y factores de crecimiento que deben ser considerados y evaluados antes de determinar cualquier sistema de cultivo [2].

De acuerdo al objetivo general del presente trabajo de investigación fue necesario realizar una etapa de pre-experimentación con el fin de asegurar un adecuado crecimiento de la microalga en un medio de cultivo contaminado con una solución de cloruro de mercurio $HgCl_2$. Dicho esto, el presente capítulo corresponde a la etapa pre experimental llevada a cabo para determinar las condiciones iniciales de cultivo empleadas en el desarrollo metodológico experimental obteniendo los rangos adecuados de operación. Los parámetros evaluados fueron la fuente de carbono, el tiempo de contacto y la concentración inicial de biomasa y mercurio.

Cada matriz experimental fue evaluada a escala de laboratorio con el fin de determinar las condiciones iniciales de cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp., las concentraciones de inóculo adecuadas para asegurar el crecimiento de la microalga en presencia de Hg y las concentraciones iniciales de Hg.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Generalidades de las microalgas

Las algas son los principales organismos fotosintéticos que forman parte de las cadenas alimentarias de agua dulce y marina ya que han formado parte de las fuentes básicas del metabolismo de organismos consumidores ,como el zooplancton y los crustáceos que se alimentan por filtración, además de funcionar como productores de metabolitos para alimentos [3]. El término microalga hace referencia a organismos microscópicos fotosintéticos que contienen clorofila y pigmentos carotenoides [4]. Víctor Hensen, el precursor de este término, lo acuñó al iniciar sus estudios acerca del plancton [5], quien observó que existía un grupo amplio de organismos autótrofos, microscópicos que representaban el primer eslabón de la cadena alimenticia, y que hoy se sabe habitan en más del 70 % de la superficie terrestre [2].

Se ha llegado a hablar de distintas variedades de microalgas, Richmond presenta cerca de 50.000 especies de las cuales alrededor de 30.000 han sido estudiadas y analizadas durante las últimas décadas [6]. Esta gran distribución geográfica, posiciona a las microalgas con un aporte aproximado del 32 % de la fotosíntesis global [2], en especial las acuáticas ya que estas poseen mecanismos moleculares que les permiten adaptarse a diferentes condiciones extremas para su crecimiento [7]. Si bien este mecanismo fotosintético es muy similar al de las plantas terrestres [8], es posible distinguirlas gracias a que las

microalgas poseen ciertas ventajas con respecto a las plantas terrestres tales como la eficiencia para convertir la energía solar en biomasa debido a su estructura celular simple y facilidad en el consumo de CO_2 y demás nutrientes [9].

Clasificación de las microalgas

Se conocen dos tipos básicos de células en las algas, procariotas y eucariotas. Las células procariotas no poseen organelos con membranas, es decir carecen de plastidios, mitocondrias, núcleos, cuerpos de Golgi y flagelos; este tipo de algas se conocen como cianobacterias, Figura 2.1.

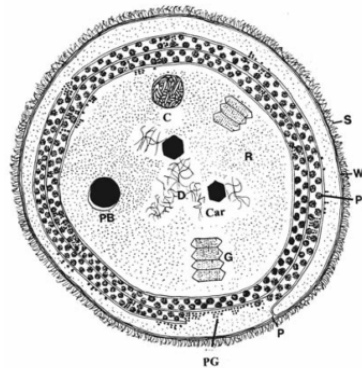


Figura 2.1: Esquema de una célula procariota [3]

Por su parte, las células eucariotas (Figura 2.2), contienen organelos los cuales están rodeados por una pared celular compuesta de polisacáridos que son parcialmente producidos y secretados por el cuerpo de Golgi, la parte restante de la célula es rodeada por la membrana plasmática y organelos como los flagelos, el núcleo, los cloroplastos y el citoplasma que también cumplen sus funciones metabólicas específicas dentro de la célula [4], [6].

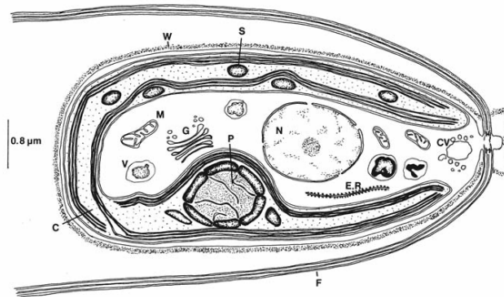


Figura 2.2: Esquema de una célula eucariota [3]

Además las microalgas pueden ser clasificadas por su color: a las procariotas se les conoce como algas verde azul [10] y a las eucariotas como algas verdes, rojas o doradas [11]. Otra forma de clasificarlas es según la fuente de energía que emplea cada tipo de alga, como se observa en la Tabla 2.1 [12]:

Tabla 2.1: Clasificación de algas por su fuente de energía [12]

Clasificación	Características
Fotoautótrofa	Algas que obtienen la energía del Sol y el carbono de compuestos inorgánicos como sales.
Fotoheterótrofa	Algas que obtienen la energía del Sol y emplean como fuente de carbono los compuestos orgánicos.
Mixotrófica	Algas capaces de crecer en procesos tanto autótrofos como heterótrofos, siendo así la fuente de energía tanto la luz como la materia orgánica. Por lo tanto, el carbono lo obtienen de compuestos orgánicos y del CO ₂ .
Heterótrofa	Algas que obtienen la energía y la fuente de carbono de compuestos orgánicos, esta propiedad permite que las algas puedan desarrollarse bajo ausencia de luz.

Al mencionar otros criterios de clasificación, uno de los más usados es el descrito por Lee [3]. Este consiste en clasificar las algas en cuatro grupos de acuerdo a la evolución del cloroplasto, tal como se explica a continuación:

Grupo uno: hace referencia a las cianobacterias las cuales poseen una estructura compuesta de peptidoglicano y una capa externa de lipopolisacáridos que contienen una membrana plasmática, Tabla 2.2.

Tabla 2.2: Características del grupo uno de microalgas [2], [3]

Tipo de alga	Pigmento fotosintético	Forma de las células	Hábitat
Prochlorophyta	Clorofila a	Unicelulares o filamentosas, con o sin ramificaciones, uni o multiseriadas	Ambientes marinos, agua dulce y suelos húmedos.

Grupo dos: son algas eucariotas que tienen solo un cloroplasto rodeado por dos membranas. Algunos ejemplos de algas que pertenecen a este grupo se muestran en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Características del grupo dos de microalgas [6], [13]

Tipo de alga	Pigmento fotosintético	Forma de las células	Hábitat
Rojas, Rhodophyceae	Clorofila a y d, carotenoides.	Sin células flageladas. Pared celular con una capa microfibrilar de celulosa y polisacáridos amorfos.	Ambientes marinos, agua dulce y unas pocas son terrestres.
Verdes	Clorofila a y b, carotenoides.	Uni/pluricelulares. Pared celular formada por celulosa.	Agua dulce, hábitat marinos, terrestres y subaéreas.

Grupo tres: tienen el cloroplasto rodeado por tres membranas, dentro de este grupo se encuentran las siguientes clases, Tabla 2.4:

Tabla 2.4: Características del grupo tres de microalgas [3], [6]

Tipo de alga	Pigmento fotosintético	Forma de las células	Hábitat
Euglenophyta	Clorofila a y b	Unicelulares, con flagelos, vacuolas contráctiles y manchas oculares	Agua dulce con materia orgánica descompuesta, aguas marinas o endosimbiontes [11].
Dinophyta	Clorofila a y c1. Floraciones rojo o marrón (altamente tóxicas). Presentan bioluminiscencia	Unicelulares y biflageladas.	Agua dulce y ambientes marinos. Agua dulce y ambientes marinos.

Grupo cuatro: su característica principal es que tienen el cloroplasto rodeado por cuatro membranas de cloroplastos. Algunos ejemplares se muestran en la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Características del grupo cuatro de microalgas [3], [6], [14]

Tipo de alga	Pigmento fotosintético	Forma de las células	Hábitat
Cryptophyta, pardo-doradas	Clorofila <i>ayc2</i> , fucoxantina y β -caroteno que les otorga su coloración oliva, marrón o rojo.	Unicelulares, biflageladas, células ovales y aplanadas, cubierta rígida e invaginación ventral.	Profundidades de agua dulce, ambientes marinos y continentales, de congelación invernal y polar.
Bacillariophyta, Diatomeas	Clorofila <i>a</i> , <i>c1yc2</i> .	Unicelulares. Colonias como filamentos o cintas.	Agua dulce y fondos marinos.
Prymnesiophyta o Haptophyta	Pigmentación amarilla presente en la fucoxantina y β -caroteno.	Pared celular de sílice, frústula.	Ambientes marinos, se acumulan en las playas produciendo una espuma desagradable
Prymnesiophyta o Haptophyta	Clorofila <i>a</i> , <i>c1yc2</i> y fucoxantina. Floraciones tóxicas.	Apéndice filamentosos en medio de dos flagelos lisos.	Ambientes marinos, se acumulan en las playas produciendo una espuma desagradable.

En este último grupo se clasifican un gran número de algas entre las que se pueden mencionar: Heterokontophyta, Synurophyceae, Eustigmatophyceae, pinguiphyceae, Dictyochophyceae, Raphidophyceae, Xanthophyceae, Phaeothamniophyceae, Phaeophyceae, Pelagophyceae, entre otras [6].

2.2.2 Uso de mercurio en Colombia

Colombia es un país rico en recursos naturales gracias a su ubicación geográfica y los procesos geológicos que han dado origen a grandes riquezas minerales, recursos que han sido explotados desde tiempos precolombinos cuando se extraía sal, oro y esmeraldas de forma artesanal. Esta actividad se intensificó desde el siglo XVI debido al interés de países extranjeros por poseer y manejar la industria del oro, lo que ha generado esclavitud, explotación humana y de recursos, retrasos en las regiones donde hay extracción de este mineral, pobreza, contaminación, narcotráfico, daños en la salud humana y un impacto irreversible en el ecosistema [15].

Aun así, es indudable que la extracción de oro es una enorme fuente de riquezas, por lo que el gobierno nacional en conjunto con la empresa privada han realizado en las últimas décadas grandes esfuerzos para mejorar las condiciones técnicas de la explotación aurífera y su impacto en las comunidades y en

el medio ambiente, logrando avances como *El Sistema de Información Minero Colombiano (SIMCO)*, el cual recopila la información estadística de la industria minera. En el *boletín estadístico de minas y energía* del 2016 elaborado por esta entidad, se mostró un resumen de la producción minera desde el 2012 que incluyó los principales datos acerca de la producción de oro, lo que permitió identificar los departamentos dónde se produce de manera significativa (Figura 2.3). Estas estadísticas posicionan a Antioquia como el departamento con mayor producción de oro, seguido de Chocó, Nariño, Cauca, Bolívar y Caldas.

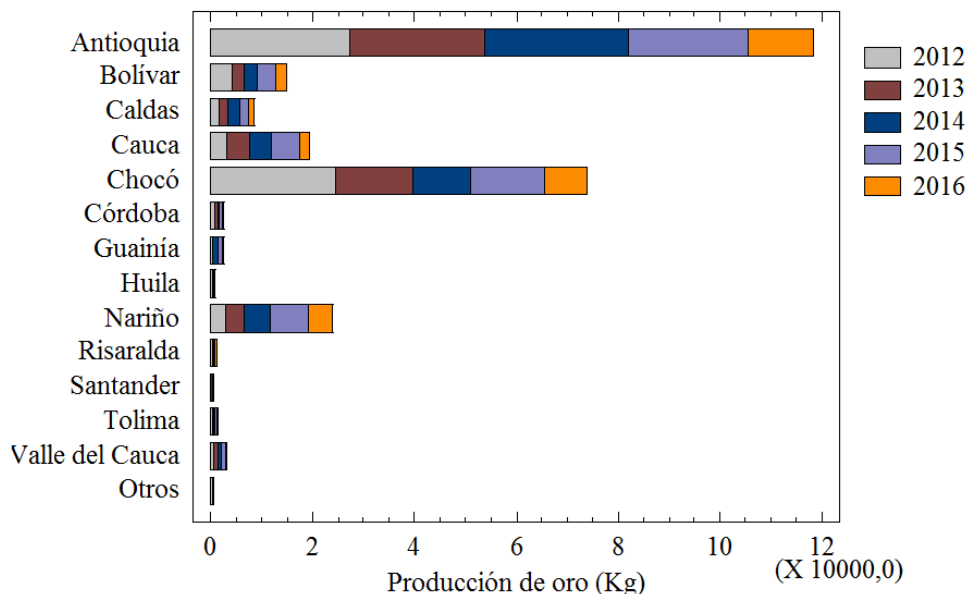


Figura 2.3: Producción de oro por departamentos [16]

Si bien Colombia está realizando grandes esfuerzos para fomentar la tecnificación del sector aurífero, la minería de oro artesanal y en pequeña escala, definidas por el banco mundial como "la explotación de depósitos minerales a pequeña escala, cuyos métodos utilizados son de tipo manual o inclusive el uso de equipos muy simples" suele practicarse de manera anti técnica, lo que generalmente implica la utilización de mercurio como método de separación entre el metal y el mineral, a menudo en condiciones inseguras y peligrosas para los mineros y el medio ambiente [15], [17].

El gran número de mineros artesanales de oro en el país debido al aislamiento tecnológico y a las dificultades de orden público ha posicionado a Colombia como uno de los países en América y en el mundo con mayor uso de mercurio en la extracción a pequeña escala. De acuerdo a reportes del sistema de monitoreo *Mercury Watch*, organización dedicada a recopilar, analizar y publicar información relacionada con el tema, en el año 2010 Colombia ocupó el primer lugar en América latina al utilizar 75 Ton de mercurio, como se aprecia en la Tabla 2.6 tomada de la Revista de Salud Pública, donde se reportan valores estimados sobre el uso de mercurio en minería artesanal de oro a nivel mundial [18]. A esto debe agregarse que si bien la extracción de oro es de las fuentes con mayor generación de mercurio, esta no es la única, ya que existen otras fuentes generadoras de contaminación con este metal, reportadas en concentraciones más bajas, como las aguas subterráneas, ríos, aguas lluvias, agua potable, agua de mar y en general todas las aguas superficiales [19].

Dado que los principales mecanismos de contaminación de los ecosistemas por parte del mercurio utilizado en la minería son la dispersión en el aire de vapores y los residuos que llegan a los cuerpos de agua, el ser humano puede entrar en contacto fácilmente por exposición directa o por consumir alimentos contaminados, lo que conlleva serios problemas de salud [18]. Los miembros de la *minería aurífera artesanal y en pequeña escala* MAAPE (incluido Colombia) han reportado concentraciones de mercurio en la orina en rangos entre 50 y 100 $\mu\text{gHg/g}_{\text{creatinina}}$, concentraciones que en las primeras cifras podrían causar afectaciones tubulares renales y en las últimas signos neurales del envenenamiento por este metal [17], [19], aunque sus efectos dependerán en gran medida del tiempo de exposición. en

Tabla 2.6: Reporte estimado de utilización de mercurio en el mundo [18].

País	Mercurio destinado a minería del oro (Ton/año)	Ton. de oro producido (2011)	Ranking mundial en producción de oro
China	444,5	371	1
Colombia	75	36,9	19
Perú	70	188	6
Ecuador	50	N.D	N.D
Brasil	45	67,5	12
Venezuela	15	N.D	N.D
Bolivia	7,5	N.D	N.D
Suráfrica	7,5	198	5
México	7,5	86,6	10
Chile	4,0	44,5	17
Argentina	N.D	59,3	14

la Tabla 2.7, se muestran algunos de los efectos generados tras la exposición de mercurio, teniendo en cuenta el tiempo y el tipo de exposición, donde aguda corresponde a una aparición de los efectos en las primeras 24 horas de exposición y la crónica cuando hay una exposición continua o repetida por períodos de tiempo prolongados a bajas concentraciones del metal [15], [20], [21]. Es importante tener en cuenta que si bien todas las formas químicas del mercurio a concentraciones elevadas y según la manera de la exposición pueden generar daños, el dimetilmercurio ($Hg(CH_3)_2$) y el metilmercurio ($HgCH_3$) son las formas más tóxicas de este metal [20]. Estos compuestos químicos del mercurio generan daños en la salud humana como alteraciones al sistema inmunológico, alteraciones genéticas y daños al sistema nervioso [15], [19].

Es por esto que los efectos de la exposición de mercurio en la salud de las personas que viven en comunidades donde se practica la actividad minera ha sido ampliamente debatido y denunciado por diferentes entidades tanto locales como mundiales. Por ejemplo la OMS a través del convenio de Minamata sobre el mercurio, creó una serie de planes globales para trabajar estrategias de salud pública, recolección de datos y capacitación sanitaria dirigida a la MAAPE [19]. La legislación colombiana ha buscado reducir el uso del mercurio a través del monitoreo de las posibles fuentes de deposición de mercurio y de la regulación de las concentraciones permitidas en el ambiente estableciendo una normativa que en papel es estricta. En particular, el ministerio de ambiente y desarrollo sostenible y diversas entidades públicas autorizadas han sido encargadas de crear, modificar y hacer cumplir leyes, decretos y convenciones referentes al manejo, disposición y control de aquellos metales que pueden llegar a ser contaminantes para el medio ambiente y afectar la salud humana.

Una primera aproximación a la regulación del mercurio en la minería está incluida en las leyes que reglamentan y controlan el uso de metales pesados, Tabla 2.8, donde se establecen las disposiciones para el uso y control de mercurio en relación con el agua. En estas leyes se evidencia que la calidad del agua representa uno de los retos más grandes en términos de contaminación debido a la falta de industrialización de procesos por parte de las pequeñas y medianas empresas [19]. Dentro de la legislación cabe destacar el decreto 1594 en su capítulo IV, artículo 38 de 1984 ya que este reglamenta el uso y el manejo del recurso hídrico y sus atribuciones de acuerdo a las características del agua para cada uso [22]. En la Tabla 2.9 se presenta una matriz con los valores de referencia de mercurio y sus niveles límites en agua, aire, alimentos y biológicos recomendados por el instituto nacional de salud en población no expuesta a este metal [15].

Tabla 2.7: Efectos por la exposición de mercurio [15], [21]

Tipo de exposición	Forma de exposición	Efectos
Aguda	Vapor de mercurio	Tos, Disnea, Temblor, Nerviosismo, Alucinación, Insuficiencia, respiratoria, Espasmos musculares, Neumonía química, Disminución del campo visual, Bronquitis, Delirios, Ataxia, Disartria, Irritabilidad, Tendencia suicida, Coma, Muerte
	Sales de mercurio	Estomatitis, Gingivitis, Sialorrea, Deshidratación, Choque hipovolémico, Gastroenteritis aguda, Anuria, Vómito, Diarrea, Insuficiencia renal, Caída de los dientes, Muerte
Crónica	Vapor de mercurio	<p>Sistema nervioso: Irritabilidad, Tristeza, Ansiedad, Insomnio, Depresión, temblor, trastornos sensitivos en manos, pies y disminución del campo visual.</p> <p>Sistema digestivo: Dolor gingival, Ulcera de la mucosa oral, náuseas, Diarrea, Sabor metálico, Vómito, caída prematura de dientes, trastornos sensitivos en manos y piel.</p> <p>Sistema ocular: Reflejo parudzco en la cápsula anterior del cristalino y disminución del campo visual.</p> <p>Sistema renal: Proteinuria moderada, lo que sugiere la existencia de lesiones glomerulares y tubulares; en ocasiones se desarrolla síndrome nefrótico.</p> <p>Otras alteraciones: Dermatitis de contacto, efectos teratogénicos, mutagénicos y cancerígenos: atraviesan la barrera placentaria y pueden producir aborto espontáneo; *La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) no clasifica al mercurio metálico o a sus compuestos inorgánicos como cancerígenos.</p>
	Metilmercurio	<p>Sistema nervioso central: Periodo prodrómico de dos semanas a dos meses con astenia, adinamia, apatía, miedo, depresión y deterioro intelectual; posteriormente hay parestesias en extremidades distales, lengua y boca. En un Estado más avanzado hay ataxia, disartria, parálisis motora, diplopía, campo visual estrecho, ceguera, sordez, temblor intencional, parálisis y puede sobrevenir el coma y la muerte.</p> <p>Embriotoxicidad: (intoxicación por la exposición prenatal): Alteración psicológica, incoordinación motora, pérdida de audición, movimientos involuntarios, retardo en desarrollo motor, parestesias, parálisis muscular, ceguera, ataxia</p> <p>Intoxicación por exposición posnatal: Parestesias distales en extremidades, lengua y labios, en casos graves se observa estrechamiento del campo visual</p>

Tabla 2.8: Legislación colombiana para disposición de mercurio [18].

Ley 1658 (2013) [23]	
Establecen las disposiciones del uso del mercurio y su comercialización en la industria con el fin de reducir y eliminar los impactos ambientales. Esta ley busca minimizar el uso del mercurio de manera gradual empezando por el sector minero.	
Resolución 2115 (2007) [24]	
Señalan características, instrumentos básicos y frecuencias del sistema de control y vigilancia para la calidad del agua para consumo humano.	
Elemento o compuesto químico	Valor máximo aceptable (mg/l)
Mercurio	0,001
Decreto 1594 (1984) artículo 20 y 21 [22]	
Mercurio	Corresponde a la protección del medio ambiente así como el Capítulo II del Título VI -Parte III- Libro II y el Título III de la Parte III -Libro I- del Decreto - Ley 2811 de 1974 en cuanto a usos del agua y residuos líquidos. El límite permitido en el agua es de 2 ppb.

Tabla 2.9: Matriz de mercurio para aguas en Colombia [15], [22]

Matriz de mercurio	Límite	Fuente de referencia	
Límites en agua			
Agua potable	0,001 mg/l	Resolución 2115 de 2007 – Ministerio de la Protección Social, hoy Ministerio de Salud y Protección Social	
Consumo humano y doméstico	0,002 mg/l	Decreto 1594, capítulo IV, art. 38 de 1984	
Agua uso pecuario	0,01 mg/l	Decreto 1594 de 1984 - Ministerio de Salud	
Agua residual	0,01 mg/l	Vertimiento a red de acueducto	Resolución 3957 de 2009 - Secretaría Distrital de Ambiente
	0,00025 mg/l	Vertimiento a corriente principal	Resolución 3956 de 2009 - Secretaría Distrital de Ambiente
Límites en aire			
Hg zonas urbanas	10 – 20 ng/m ³	Decreto 602 de 1998, Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente (Secretaría Distrital de Ambiente)	
Hg zonas suburbanas	6 ng/m ³	Decreto 602 de 1998, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial	
Límite máximo permisible	1 ng/m ³	Resolución 610 de 2010, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Sostenible (Ministerio de Ambiente y desarrollo Sostenible)	
Límites en alimentos			
Consumo humano (Hg orgánico)	1,6 mg/kg	Consumo máximo semanal de mercurio orgánico	
Consumo humano	5 mg/kg	Consumo máximo semanal de mercurio total	
Pescado	0,5 mg/kg	Límites máximos de metilmercurio en pescado no depredador.	
Límites biológicos			
Sangre	≥ 20 ng/l	Expresado como mercurio total	Centro Toxicológico de Quebec (CTQ), 2011
Orina	≥ 50 ng/l		
Cabello	≥ 5 ng/l		

2.3 Materiales y métodos

Los diferentes experimentos realizados en esta etapa se llevaron a cabo a las mismas condiciones de iluminación, temperatura y agitación. La microalga se cultivó en medio de cultivo *CHU – 13* con un fotoperiodo 12:12 horas, un pH inicial de 7.4, una agitación de 150rpm y temperatura ambiente (una media de $25^{\circ}C \pm 3$).

Ensayo fuente de carbono

Para determinar la fuente de carbono más apropiada para el crecimiento de la microalga se realizaron seis experimentos, Tabla 2.10, cada uno con tres replicas haciendo variaciones de las concentraciones de bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) con el fin de seleccionar la mejor concentración de la fuente de carbono. Todos los experimentos se cultivaron en medio de cultivo *CHU-13* con un fotoperiodo 12:12 horas, un pH inicial de 7.4, una agitación de 150 rpm y temperatura ambiente (una media de $25^{\circ}C \pm 3$).

Tabla 2.10: Concentraciones evaluadas de la fuente de carbono.

Fuente de carbono	Concentración (mg/l)
$NaHCO_3$	400
	2000
	4000
	6000
	8000
	10000

El inóculo se trabajó a 30 mg/l, los experimentos se realizaron en frascos erlenmeyer de 250 ml con un volumen efectivo de 100 ml, Figura 2.4.

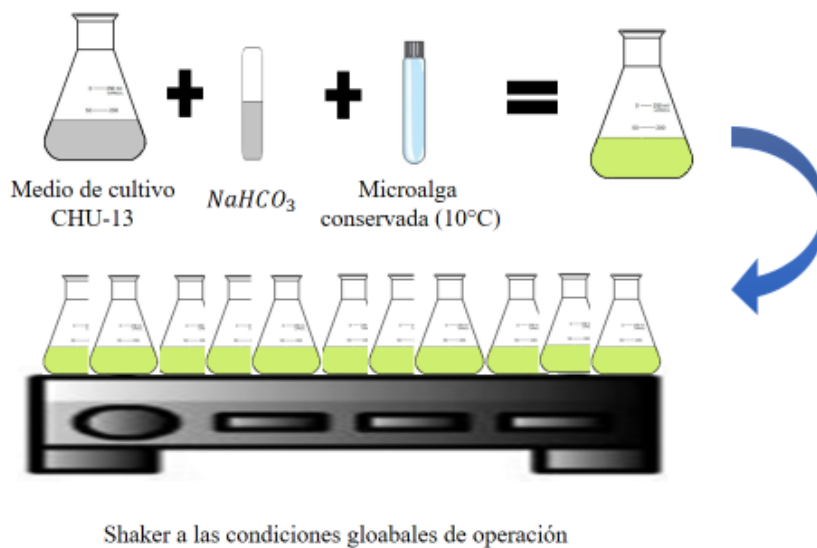


Figura 2.4: Esquema inoculación y cultivo de la microalga *Scenedesmus* sp.

El protocolo experimental se llevó a cabo cada 48 horas en el mismo horario, se midió concentración de biomasa, consumo de fosfatos y de nitratos. En la Figura 2.5 presenta un esquema del protocolo que se llevó a cabo: a) toma de muestras cada 48 horas durante 30 días, b) lectura de biomasa en espectrofotómetro a 437 nm, c) centrifugación de las muestras en eppendorff de 1 ml, d) análisis de muestras para cuantificación de fosfatos y nitratos, la evaluación del consumo de fosfatos y nitratos se realizó empleando una alícuota del medio de cultivo.



Figura 2.5: Esquema medición biomasa, fosfatos y nitratos. a) toma de muestras b) lectura de biomasa, c) centrifugación de las muestras, d) protocolo análisis para cuantificación de fosfatos y nitratos.

Efecto del pH, tiempo de adición de Hg y fuente de carbono en la remoción de Hg

Para conocer las mejores condiciones de cultivo en el crecimiento y remoción de la microalga *Scenedesmus* sp., en presencia de cloruro de mercurio ($HgCl_2$), la microalga se cultivó en medio de cultivo CHU-13, con posterior adición de $HgCl_2$ a una concentración de $5\mu g/l$ y se consideró la variación de tres factores relevantes para el cultivo microalgal.

Las variables evaluadas fueron pH, fuente de carbono y tiempo de adición de mercurio a la microalga *Scenedesmus* sp., estas condiciones fueron seleccionadas con base en investigaciones reportadas en literatura y estudios realizados previamente. Para el pH se trabajó a: pH entre 8-10 [25], buffer de fosfato a pH 6 [26], [27], pH inicial de 6 [28]. Para la fuente de carbono se seleccionó $NaHCO_3$ y CO_2 (aire) [29]. Para el tiempo de adición del mercurio se eligió el día cero y día siete del cultivo microalgal debido a que en estos días la microalga se encuentra en su fase inicial y exponencial respectivamente, fases en las que es posible evaluar la división celular de la microalga.

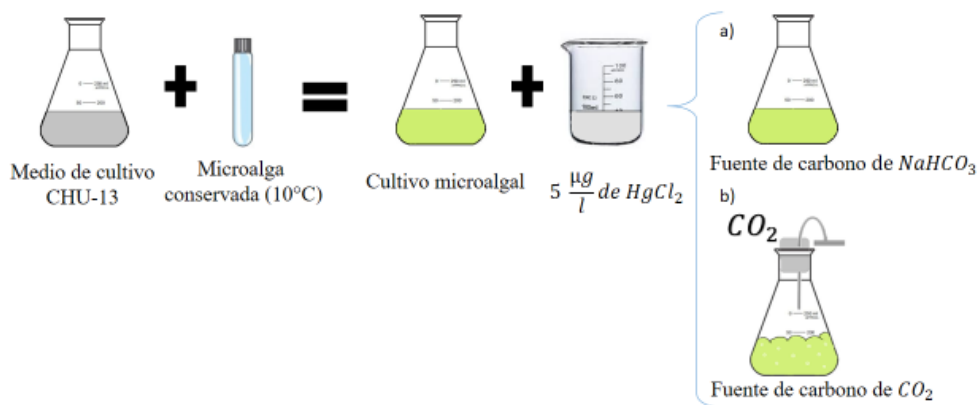


Figura 2.6: Esquema del cultivo microalgal con las diferentes fuentes de carbono. a) Fuente de Carbono de $NaHCO_3$. b) Fuente de carbono de CO_2

Como se muestra en la Figura 2.6, los cultivos que se realizaron con la fuente de carbono de $NaHCO_3$ se

mantuvieron en un agitador orbital (IK KS501 digital) a 150 rpm, temperatura ambiente y fotoperiodo natural, Figura 2.6a. Los cultivos que se realizaron con la fuente de carbono de CO_2 se mantuvieron con difusores a un flujo constante con el fin de asegurar una distribución homogénea de las células y los nutrientes dentro del cultivo, a este experimento se le ajustó el volumen de trabajo diariamente ya que el CO_2 podía volatilizar el cultivo microalgal, Figura 2.6b.

El cultivo se realizó durante 14 días con un total de 12 unidades muestrales y se midió la concentración de biomasa cada 48 horas por absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 437 nm y la concentración de mercurio en el medio fue medida por el método espectroscopia de absorción atómica (AA). Los resultados del crecimiento de biomasa se analizaron a partir de un diseño experimental con tres factores por medio de un Análisis de Varianza multifactorial (ANOVA). La matriz experimental se muestra en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11: Condiciones de cultivo para el diseño experimental del efecto del pH y la fuente de carbono

Condición de pH	Tiempo de adición Hg	
	Hg mitad cinética	Hg inicio cinética
I. pH $\sim 8 - 10$	1. Bicarbonato	1. Bicarbonato
	2. Aire	2. Aire
II. Buffer pH 6	1. Bicarbonato	1. Bicarbonato
	2. Aire	2. Aire
III. pH inicial 6	1. Bicarbonato	1. Bicarbonato
	NA	2. Aire

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Ensayo fuente de carbono

En la presente investigación se describió el efecto de las concentraciones iniciales de la fuente de carbono con respecto al crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., y se evaluó la respuesta de este factor para determinar la incidencia que tuvo la variación de ésta condición en el cultivo con microalga *Scenedesmus* sp.

Crecimiento celular debido a la fuente de carbono

En la Tabla 2.12 se reporta la matriz experimental empleada para los ensayos de la fuente de carbono. A partir de la nomenclatura establecida en esta, se obtuvo como resultado que la mejor concentración de $4NaHCO_3$ se alcanza en las cinéticas E_1, E_2 y E_3, E_4 . como se observa en la Figura 2.7:

Tabla 2.12: Matriz experimental para la fuente de carbono

Concentración biomasa (mg/l)	Fuente de carbono (mg/l)	Replicas		
30	400	E_1	E_2	E_3
	2000	E_4	E_5	E_6
	4000	E_7	E_8	E_9
	6000	E_{10}	E_{11}	E_{12}
	8000	E_{13}	E_{14}	E_{15}
	10000	E_{16}	E_{17}	E_{18}

Como se observa en la Figura 2.7 la cinética con mayor velocidad de crecimiento y producción de biomasa corresponde a la concentración de 400 mg/l y 2000 mg/l claramente diferenciadas con las demás cinéticas donde se observó una velocidad de crecimiento menor. Para las cinéticas con concentraciones de $NaHCO_3$ mayores, 4000, 6000, 8000 y 10000 mg/l, la fuente de carbono fue una fuente limitante para el crecimiento y entró a fase estacionaria en el día 15.

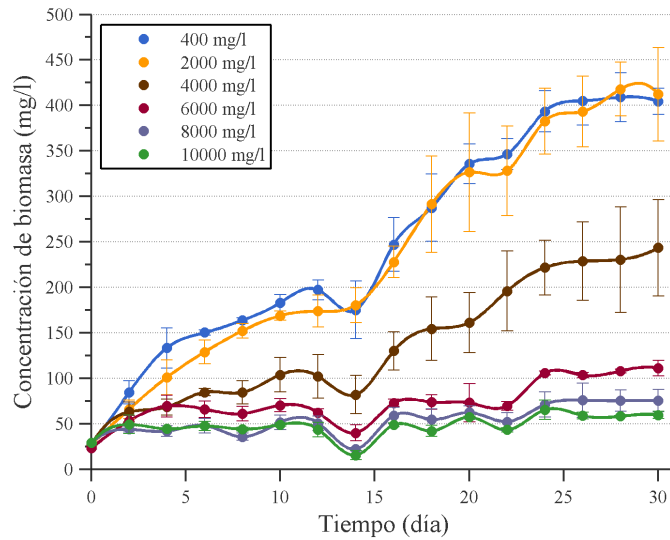


Figura 2.7: Cinéticas de crecimiento de biomasa del ensayo de la fuente de carbono

Consumo de la fuente de fosfato

El consumo de fosfatos de acuerdo a cada concentración de $NaHCO_3$ en el cultivo de microalga *Scenedesmus* sp., se observa en la Figura 2.8.

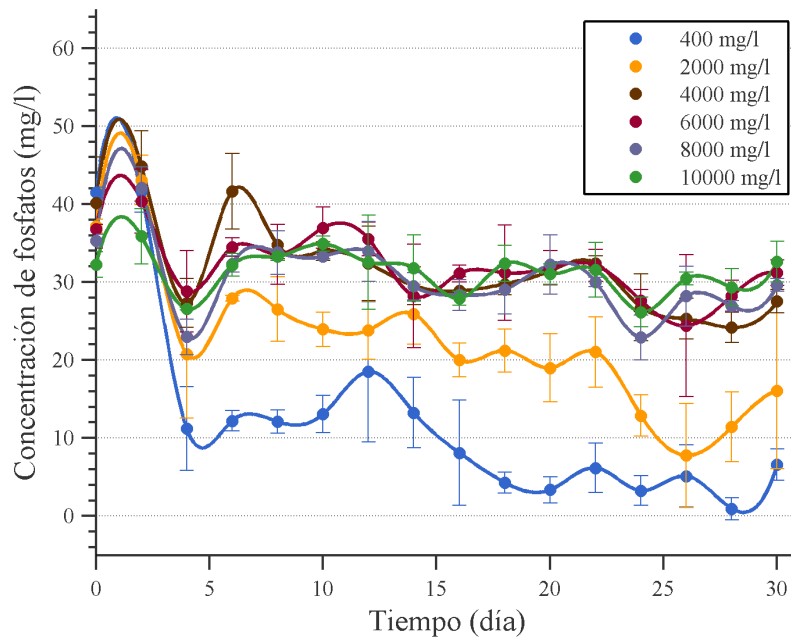


Figura 2.8: Consumo de la fuente de fosfato a diferentes concentraciones de la fuente de carbono

Como se observa en la Gráfica 2 la tendencia del consumo de fosfatos de acuerdo a la concentración $NaHCO_3$ es muy similar en todas las unidades experimentales los primeros días independientemente que la concentración de fosfatos no sea la misma. En general, se observó que el consumo de fosfatos mostró una velocidad de consumo más rápido en las concentraciones de $NaHCO_3$ bajas en comparación a las concentraciones altas de $NaHCO_3$.

Los resultados mostraron que las concentraciones de fosfatos para la concentración de $NaHCO_3$ de

400 mg/l y 2000 mg/l reportaron diferencias significativas respecto a las demás concentraciones de $NaHCO_3$. Los contenidos finales de fosfatos para estas concentraciones de $NaHCO_3$ fue de 7000 mg/l y 17000 mg/l respectivamente; mientras que para las demás concentraciones el consumo de fosfatos es mucho menor, aproximadamente fue de 28000 mg/l para la concentración de 4000 mg/l, de 31000 mg/l para la concentración de 4000 g/l, de 32000 mg/l para la concentración de 6000 mg/l y de 30500 mg/l para la concentración de 8000 mg/l.

Consumo de la fuente de nitratos

El consumo de nitratos presentó un comportamiento muy diferente al consumo de la fuente de fosfatos, en la Figura 2.9 se observa la tendencia que tuvo la relación del consumo de nitratos con respecto a la concentración de $NaHCO_3$. Los resultados mostraron que los nitratos son consumidos en su totalidad por la microalga independientemente de la concentración de bicarbonato de sodio.

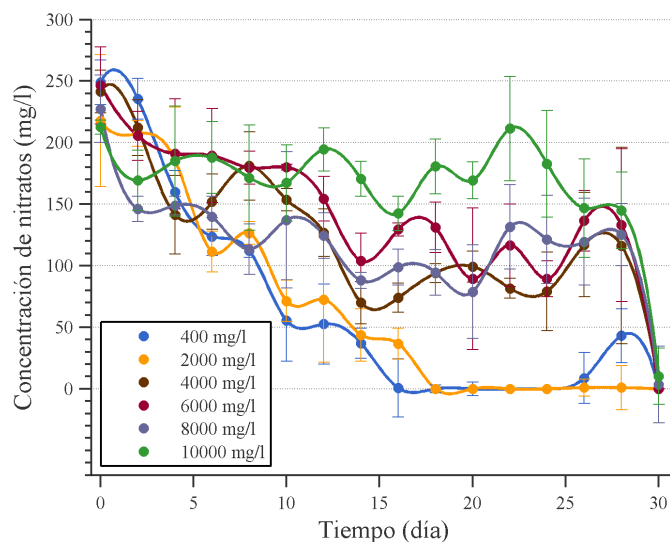


Figura 2.9: Consumo de la fuente de nitratos a diferentes concentraciones de la fuente de carbono

El consumo de nitratos para las concentraciones de 400 mg/l y 2000 mg/l mostró una velocidad de consumo mucho más rápida que a las demás concentraciones de $NaHCO_3$, para estas concentraciones la fuente de nitratos se agotó en día 16 y 17 respectivamente, mientras que las demás concentraciones se mantuvieron hasta el día 30. Este comportamiento puede ser debido a que la microalga para las concentraciones más altas de bicarbonato experimentó una fase de latencia aproximadamente en el día 17 lo que supondría un menor consumo de nutrientes y por ende un agotamiento más lento de estos.

2.4.2 Efecto del pH, tiempo de adición de Hg y fuente de carbono en la remoción de Hg

El efecto en la variación de las condiciones de pH, fuente de carbono y tiempo de adición de mercurio con el fin de determinar las mejores condiciones de cultivo que favorecieran el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., en presencia de $HgCl_2$ y la capacidad de remoción de este metal bajo las condiciones seleccionadas se describió por medio de la dinámica de producción de biomasa y porcentaje de remoción de mercurio en el sobrenadante.

El análisis estadístico del diseño multifactorial para el crecimiento de biomasa realizado en el software estadístico con acceso libre R [30], reportó a través del análisis de varianza (ANOVA) que la concentración final de biomasa presentó diferencias estadísticamente significativas solamente para el tiempo de adición de mercurio evaluado con un valor $p=0,00344$, mientras que los demás factores no fueron estadísticamente significativos al igual que sus interacciones.

Estos resultados indicaron que la adición de Hg al inicio de la cinética afectó menos la curva de crecimiento de la microalga y por consiguiente su concentración final. La Figura 2.10 representa las cinéticas de crecimiento de la microalga contaminada con Hg desde el día cero. En general, todas mostraron un crecimiento adaptativo evidenciado en una pequeña fase de latencia, período en el que *Scenedesmus* sp., se adapta a las condiciones del medio de cultivo y a la presencia de Hg. Luego se pudo observar que la microalga inició su fase exponencial que dependió de las condiciones particulares del medio de cultivo dadas por el experimento.

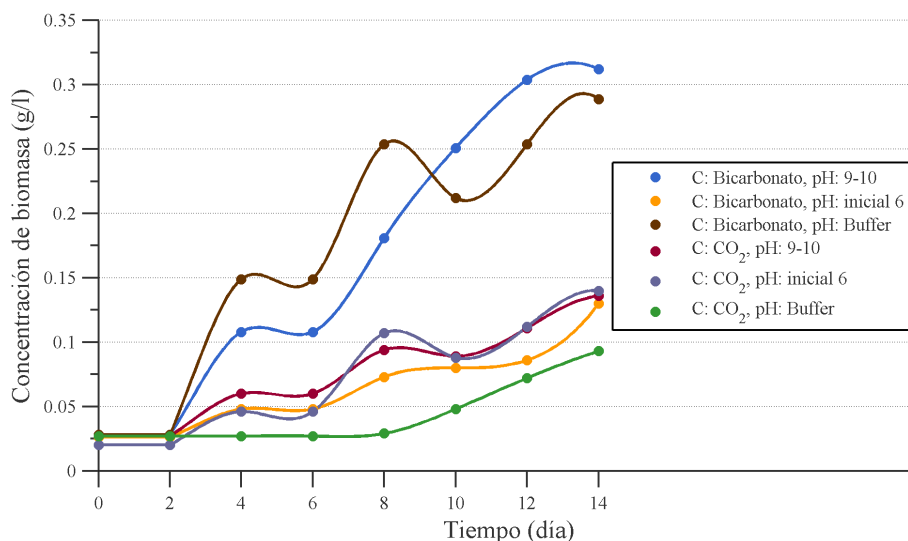


Figura 2.10: Cinéticas de crecimiento de la microalga con adición de Hg en $t=0$.

Al realizar el análisis gráfico se pudo observar dos comportamientos claramente diferenciados, como se evidencia en la gráfica, hubo dos ensayos que presentaron un comportamiento cinético mayor que los demás, estos ensayos fueron los correspondientes a $NaHCO_3$ como fuente de carbono con control de pH empleando una buffer de fosfatos ($pH=6$) y sin control pH (rango de pH natural de la microalga que oscila entre 9 y 10). Se observó que durante la fase exponencial hubo presencia de pequeñas fluctuaciones en la curva, lo cual puede ser explicado debido a que la microalga no se divide rápidamente y experimenta fluctuaciones en la concentración, además, estuvo expuesta a un metal que generó cambios en su metabolismo y por consiguiente en la tendencia de su crecimiento [31]. La tasa máxima de crecimiento (μ_{max}) observada durante la fase exponencial tuvo un mejor comportamiento para el ensayo sin control de pH y un rendimiento más alto en su cinética. Las cuatro curvas restantes, correspondientes a todos los ensayos con CO_2 como fuente de carbono y el ensayo con bicarbonato y $pH_i = 6.0$, presentaron una fase de latencia seguida de su fase exponencial con pequeños intervalos de crecimiento y una pequeña fase estacionaria, lo que conlleva a una velocidad de crecimiento menor.

Dado que el factor que tuvo un efecto en el comportamiento de la microalga en presencia de Hg fue el tiempo de adición del metal se analizó esta condición en la remoción de este en el medio de cultivo. En la Figura 2.11, se puede observar el porcentaje de remoción obtenido independiente de las demás condiciones del medio de cultivo establecidas para *Scenedesmus* sp. Se observa que los ensayos que experimentaron la adición del metal desde el día cero alcanzó mayores porcentajes de remoción ($99,5\% \pm 0,008$) que los ensayos a los que se adicionó Hg en el día 7 ($98,53\% \pm 0,63$).

En conclusión, los resultados obtenidos en este ensayo permitieron establecer las condiciones de cultivo con las que se evaluarían las cinéticas del crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., en presencia de Hg y el porcentaje de remoción de mercurio analizadas a continuación. Aunque el análisis estadístico encontró que el cambio de pH o la fuente de carbono no fueron significativos en ningún caso y fue indistinto usar uno u otra condición, a partir del análisis gráfico reportado en la experimentación y con base en la literatura de apoyo se seleccionaron las condiciones de pH y fuente de carbono.

Las condiciones seleccionadas para la fuente de carbono fue bicarbonato, ya que de acuerdo al análisis

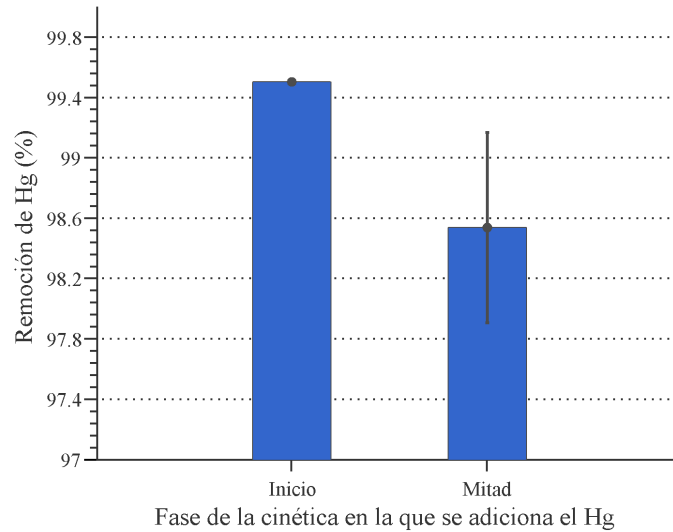


Figura 2.11: Cinéticas de crecimiento de la microalga con adición de Hg en $t=0$.

gráfico se evidenció una tasa de crecimiento alta y una cinética uniforme en su crecimiento, además que se conoce literatura donde el metabolismo microalgal se ve favorecido en presencia de compuestos orgánicos como el bicarbonato [32].

Los resultados obtenidos en esta pre experimentación se pueden complementar con los estudios realizados por Devgoswami et al. [33], quienes realizaron estudios de tres microalgas entre esas *Scenedesmus* sp., acerca de la respuesta de crecimiento, biomasa y producción de lípidos al variar la fuente de carbono en los cultivos. Las fuentes de carbono empleadas fueron bicarbonato de sodio (15, 30, 60 y 75 mg/l) y dióxido de carbono (79,29, 47,58 y 44 mg/l), las cuales reportaron para la microalga *Scenedesmus* sp., su mejor crecimiento a una concentración de 45 ppm (31 mg/l/día durante 17 días) concentración que está en el rango de la empleada en la presente investigación la cual fue de 40 mg/l y que ya en el apartado anterior (4.1.1) se experimentaron varias concentraciones de $NaHCO_3$ y fue por esta razón que se eligió trabajar con 40 mg/l de $NaHCO_3$. Por otro lado los resultados con CO_2 también reportaron un crecimiento favorable y al igual que en el caso del $NaHCO_3$, el uso de concentraciones altas de la fuente de carbono genera coagulación y crecimiento lento resultados que fueron similares en nuestro caso de estudio.

2.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que las condiciones iniciales de cultivo tienen un efecto en el crecimiento de la microalga, consumo de nutrientes y porcentaje de remoción de Hg que dependieron de cada parámetro definido. Para el caso de la fuente de carbono se evidenció que un contenido alto en la concentración de $NaHCO_3$ causa un efecto inhibitorio en el crecimiento de la microalga y una disminución en la velocidad de crecimiento siendo un factor limitante para la microalga.

Respecto al consumo de nutrientes se observó que el contenido de $NaHCO_3$ limita el consumo de fosfatos a altas concentraciones y por consiguiente tiene un efecto desfavorable en el crecimiento de la microalga y la disponibilidad de este en el medio de cultivo. Un comportamiento similar ocurrió con el consumo de nitratos en donde a concentraciones bajas de $NaHCO_3$ la microalga agotó esta fuente de nutriente luego del día 15 mostrando también que la fuente de nitratos puede ser un factor limitante en el crecimiento de la microalga.

Los resultados reportados para el porcentaje de remoción de Hg evidenció que la microalga tuvo una mayor tasa de crecimiento a un pH natural, fuente de carbono de $NaHCO_3$ y tiempo de adición del metal en el día cero y un porcentaje de remoción de Hg significativamente mayor. Comportamiento que

puede ser favorablemente debido al tiempo de adaptación que tiene la microalga cuando es contaminada con el metal desde el inicio de la cinética permitiéndole adaptarse a las condiciones de estrés a las que pueda estar expuesta. Estos resultados obtenidos permitieron establecer las condiciones de cultivo con las que se evaluaron las cinéticas del crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., en presencia de Hg y el porcentaje de remoción de mercurio analizadas en el siguiente capítulo (Capítulo 3).

2.6 Referencias bibliográficas

- [1] A. Hernández-Pérez y J. I. Labbé, «Microalgas, cultivo y beneficios», *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, vol. 49, n.º 2, págs. 157-173, 2014, ISSN: 07181957. DOI: 10.4067/S0718-19572014000200001. arXiv: 2197.
- [2] L. Gómez, «Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos», *Revista Cubana de Química*, vol. XIX, n.º 2, págs. 3-20, 2007.
- [3] R. E. Lee, *Basic characteristics of the algae*. 2008, págs. 3-30, ISBN: 9780521864084. DOI: 10.1017/CB09780511812897.002. arXiv: 394.
- [4] R. Harun, M. Singh, G. M. Forde y M. K. Danquah, «Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, n.º 3, págs. 1037-1047, 2010, ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2009.11.004.
- [5] M. Benfield, P. Grosjean, P. Culverhouse, X. Irigolen, M. Sieracki, A. Lopez-Urrutia, H. Dam, Q. Hu, C. Davis, A. Hanson, C. Pilskaln, E. Riseman, H. Schulz, P. Utgoff y G. Gorsky, «RAPID: Research on Automated Plankton Identification», *Oceanography*, vol. 20, n.º 2, págs. 172-187, 2007, ISSN: 10428275. DOI: 10.5670/oceanog.2007.63.
- [6] R. A. Andersen, «The Microalgal Cell», *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, págs. 1-20, 2013, ISSN: 0003-2697. DOI: 10.1002/9781118567166.ch1. arXiv: 9809069v1 [arXiv:gr-qc].
- [7] A. Muller-Feuga, «Growth as a function of rationing: A model applicable to fish and microalgae», *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 236, n.º 1, págs. 1-13, 1999, ISSN: 00220981. DOI: 10.1016/S0022-0981(98)00194-4.
- [8] R. A. Anderson, *Algal Culturing Techniques, 1st Edition*, 9. 2005, vol. 53, págs. 1-596, ISBN: 9788578110796. DOI: 10.1017/CB09781107415324.004. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [9] I. Priyadarshani, D. Sahu y B. Rath, «Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives», *Journal of Biochemical Technology*, vol. 3, n.º 3, págs. 299-304, 2012.
- [10] T. A. Davis, B. Volesky y A. Mucci, «A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae», *Water Research*, vol. 37, n.º 18, págs. 4311-4330, 2003, ISSN: 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00293-8.
- [11] D. Moreira, H. Le Guyader y H. Philippe, «The origin of red algae and the evolution of chloroplasts», *Nature*, vol. 405, n.º 6782, págs. 69-72, 2000, ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/35011054.
- [12] AST ingeniería S. L., «Aplicaciones de las microalgas: estado de la técnica», *Journal of Chemical Information and Modeling*, pág. 69, 2013, ISSN: 1098-6596. DOI: 10.1017/CB09781107415324.004. arXiv: arXiv:1011.1669v3. dirección: www.ast-ingenieria.com/7B%5C%7D5Cn.
- [13] J. He y J. P. Chen, «A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools», *Bioresource Technology*, vol. 160, págs. 67-78, 2014, ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.068. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>.
- [14] R. G. Sheath, *Algal Ecology: Freshwater Benthic Systems*. 1997, vol. 36, págs. 331-332, ISBN: 0126684502. DOI: 10.2216/i0031-8884-36-4-331.1. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [15] MADS - PNUMA, *Sinopsis Nacional de la Minería Aurífera Artesanal y de Pequeña Escala*, 2012. (visitado 15-07-2016).
- [16] Unidad de Planeación Minero Energética, «Boletín Estadístico: Minas y energía 2012 – 2016», *Ministerio de Minas y Energía*, pág. 200, 2016, ISSN: 2346-4992. dirección: http://www1.upme.gov.co/simco/Documents/Boletin%7B%5C_%7DEstadistico%7B%5C_%7D2012%7B%5C_%7D2016.pdf.

- [17] T. W. Bank, «Mining together : large-scale mining meets artisanal mining - a guide for action», págs. 1-52, 2009. dirección: <http://documents.worldbank.org/curated/en/2009/03/16272491/mining-together-large-scale-mining-meets-artisanal-mining-guide-action>.
- [18] F. A. Díaz-Arriaga, «Mercurio en la minería del oro: impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano Mercury in ASGM and its impact on water resources used for domestic water supply», *Rev. salud pública*, vol. 16, n.º 6, págs. 947-957, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rsap.v16n6.45406>.
- [19] OMS, *Mercury Exposure and Health Impacts among Individuals in the Artisanal and Small-Scale Gold Mining (ASGM) Community*, 2013. DOI: 10.1289/ehp.1307864. dirección: http://www.who.int/ipcs/assessment/public%7B%5C_%7Dhealth/mercury%7B%5C_%7Dasgm.pdf (visitado 10-07-2016).
- [20] P. Cordy, M. M. Veiga, I. Salih, S. Al-Saadi, S. Console, O. Garcia, L. A. Mesa, P. C. Velásquez-López y M. Roeser, «Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: The world's highest per capita mercury pollution», *Science of the Total Environment*, vol. 410-411, págs. 154-160, 2011, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.006.
- [21] J. Oliviero Verbel, «Efectos de la minería en Colombia sobre la salud humana», Tesis doct., Universidad de Cartagena, 2010, págs. 5-13, ISBN: 978-958-774-027-1.
- [22] M. D. Ambiente y D. Territorial, «Decreto 1594», *Ley 9 de 1979 - Ley 2811 1974*, vol. 1984, n.º Junio 26, pág. 55, 1984.
- [23] C. de Colombia, «LEY 1658», Congreso de Colombia, inf. téc., 2013.
- [24] MAVDT, «RESOLUCIÓN 2115», págs. 1-23, 2007.
- [25] P. A. Terry y W. Stone, «Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*», *Chemosphere*, vol. 47, n.º 3, págs. 249-255, 2002, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00303-4.
- [26] G. Bayramoglu y M. Yakup Arica, «Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies», *Bioresource Technology*, vol. 100, n.º 1, págs. 186-193, 2009, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.050.
- [27] A. Hamdy, «Biosorption of Heavy Metals by Marine Algae», *Current Microbiology*, vol. 41, n.º 4, págs. 232-238, 2000, ISSN: 0343-8651. DOI: 10.1007/s002840010126. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s002840010126>.
- [28] E. Capolino, M. Tredici, M. Pepi y F. Baldi, «Tolerance to mercury chloride in *Scenedesmus* strains», *BioMetals*, vol. 10, n.º 2, págs. 85-94, 1997, ISSN: 0966-0844. DOI: 10.1023/A:1018375005791.
- [29] Y. H. Wu, Y. Yu, X. Li, H. Y. Hu y Z. F. Su, «Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition», *Bioresource Technology*, vol. 112, págs. 193-198, 2012, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.037. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.037>.
- [30] R. C. Team, *Alenguage and environment for statistical computing*, vienna, Austria, 2018. dirección: <https://www.r-project.org/>.
- [31] M. E. Beltrán-Pineda y A. M. Gómez-Rodríguez, «Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión», *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 12, n.º 2, págs. 172-197, 2016, ISSN: 1900-4699. DOI: 10.18359/RFCB.2027.
- [32] K. Chojnacka y F. Marquez-Rocha, «Kinetic and Stoichiometric Relationship of the energy and carbon Metabolism in the Culture Microalgae», *Asian Network for Scientific Information*, págs. 21-34, 2004.

- [33] C. Devgoswami, M. Kalita, J. Talukdar, R. Bora y P. Sharma, «Studies on the growth behavior of Chlorella, Haematococcus and Scenedesmus sp. in culture media with different concentrations of sodium bicarbonate and carbon dioxide gas», *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, n.º 61, págs. 13 128-13 138, 2011, ISSN: 16845315. DOI: 10.5897/AJB11.888. dirección: <http://www.academicjournals.org/ajb/full%20text/2011/10%20oct/Devgoswami%20et%20a1.htm>.

Capítulo 3

Cultivo de Microalga *Scenedesmus* sp. y su aplicación en procesos de remoción de metales pesados

3.1 Introducción

La investigación sobre el uso de microalgas como una alternativa a los procesos convencionales de remediación ambiental ha demostrado gran capacidad para el mejoramiento de la calidad de los ecosistemas aplicados a la transformación de elementos contaminantes como los metales pesados [1]. Estos microorganismos son eficientes en los tratamientos de biorremediación gracias a su alta tasa de crecimiento [2], alta tolerancia a las variaciones ambientales y posibilidad de crecer en aguas con altos contenidos de iones metálicos [3]. Entre las principales microalgas utilizadas para estos procesos de biotransformación ambiental se destacan algunas especies como *Ulva lactuca* [4], *Spirogyra* sp. [5], *Oedogonium* sp. [6], *Chlamydomonas* sp. [7], *Dendryphiella* sp. [8], *Chlorella* sp. [8] y *Scenedesmus* sp. [9], las cuales son especialmente aptas para este tipo de aplicación y hacen posible el estudio en este tema permitiendo que el presente trabajo de investigación sea una alternativa prometedora para la remoción de metales pesados empleando microalgas como *Scenedesmus* sp.

El presente capítulo tiene como finalidad evaluar el uso de microalgas, *Scenedesmus* sp., para su crecimiento y remoción de mercurio a diferentes concentraciones iniciales de biomasa y de mercurio a escala laboratorio con énfasis en la actividad minera. De acuerdo a la metodología propuesta, se describieron las cinéticas de crecimiento, consumo de nutrientes y remoción de mercurio de la microalga en presencia de este metal y se analizaron gráficamente y estadísticamente el efecto de cada factor en la concentración final de biomasa y porcentaje de remoción.

En este capítulo se presenta la experimentación llevada a cabo para evaluar la remoción de mercurio a partir de la microalga *Scenedesmus* sp. a escala laboratorio con énfasis en la actividad minera, las condiciones de cultivo que fueron evaluadas para llevar a cabo la experimentación y el cultivo de la microalga realizado en medio de cultivo CHU13 a diferentes concentraciones de inóculo 35, 70, 145 y 225 mg/l y mercurio inicial 2,5, 5,0 y 7,5 mg/l. La metodología experimental permitió evaluar el efecto inhibitorio que tiene el mercurio sobre *Scenedesmus* y los posibles cambios que genera en el metabolismo de la misma, sin embargo, deja ver los altos porcentajes de remoción que presenta la microalga.

3.2 Marco teórico

3.2.1 *Scenedesmus* sp.

Dentro de las algas verdes unicelulares se encuentra la microalga *Scenedesmus* sp., la cual pertenece a la división de las Chlorophytas, clase de las Chlorophyceae, orden Chlorococcales, familia Scenedesmaceae, género *Scenedesmus*. Sus orígenes se remontan a algunos registros fósiles de entre 70 y 100 millones de años de antigüedad. Estas son en general algas no móviles que se encuentran principalmente en agua dulce unidas a la superficie de las rocas formando colonias llamadas cenobios que pueden ser de dos, cuatro, ocho y hasta doce células entre las que se configura una arquitectura lineal. Su estruc-

tura celular es alargada sin apéndices, aunque presenta pequeñas espinas en sus extremos exteriores formadas por extensiones de la pared celular; además poseen vacuolas pequeñas las cuales contienen grandes porcentajes de aceite que les permite flotar en el agua [10]. Un ejemplo de su apariencia se aprecia en la Figura 3.1, imagen tomada de la microalga empleada en la investigación.



Figura 3.1: *Scenedesmus* sp, imagen tomada en microscopio óptico con magnificación de 100X.

Dada sus propiedades, es interesante observar que la microalga *Scenedesmus* sp posee un mecanismo de defensa, adaptación y regulación que consiste en la capacidad de cambiar su forma con el fin de buscar gradientes favorables en las condiciones de cultivo. Crece tanto en ambientes ácidos como básicos en presencia de dióxido de carbono o de alguna otra fuente sustituta de carbono inorgánico que requiere baja densidad celular y un estricto control de los factores ambientales abióticos como nutrientes, pH, temperatura y aireación [11].

Propiedades bioquímicas

Las microalgas presentan, en general, altos contenidos de proteínas, aminoácidos esenciales, ácidos grasos, carbohidratos, vitaminas hidrosolubles y liposolubles, aceites esenciales, aminas e hidrocarburos [12]. En particular, *Scenedesmus* posee una matriz amorfa compuesta por polisacáridos, y otros azúcares como galactosa, ribosa, xilosa, ácido glucurónico, aunque la composición de proteínas es significativa ya que representa aproximadamente entre el 10 y el 70 % del peso seco de la pared celular [13]. La sociedad española de microalgas reportó la composición de esta microalga, incluyendo la cuantificación de proteínas totales, lípidos, fibra bruta, materia orgánica y minerales, para aplicaciones en alimentos para animales, como se aprecia en la Tabla 3.1 Es importante aclarar que estas concentraciones pueden variar de acuerdo a las condiciones de cultivo a las que esté expuesta *Scenedesmus* [14].

Tabla 3.1: Composición de la microalga *Scenedesmus* sp. [14]

Composición	Porcentaje
Proteínas totales	24-35 %
Lípidos	2-3 %
Nutrientes digeridos	56-60 %
Fibra bruta	10-15 %
Materia orgánica	35 %
Minerales	23-25 %

Scenedesmus a diferencia de otras algas verdes que forman largos filamentos, es una microalga clorofita colonial que se caracteriza por la formación de cadenas cortas de cenobios de dos, cuatro, ocho o doce células formados a través de un mucilago, contiene una capa de pectina y celulosa en su pared celular, Figura 3.2, que bajo ciertas condiciones puede tener otras formas celulares ya sea en su forma unicelular

o con cenobios diferentes [15]. *Scenedesmus* posee formas alargadas en sus células centrales las cuales carecen de apéndices, sus colonias poseen extensiones en la pared celular y poseen dos espinas ubicadas hacia el exterior; también posee pequeñas vacuolas llenas de aceite que les permite flotar en el agua maximizando así su exposición a la luz solar [13].

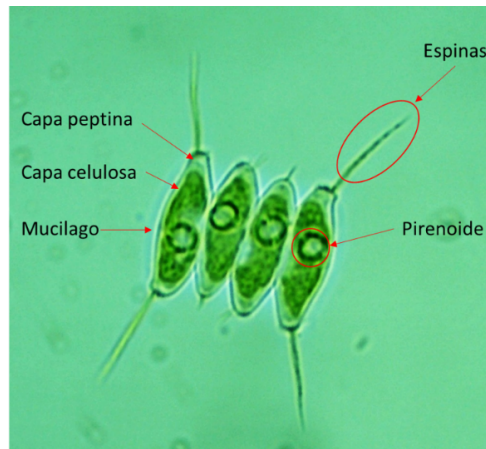


Figura 3.2: Estructura externa de *Scenedesmus* sp, imagen tomada en microscopio óptico con magnificación de 100X.

De acuerdo a la presencia o no de espinas en *Scenedesmus* es posible mencionar las características presentes en cada grupo. Las especies de *Scenedesmus* con espinas poseen células alargadas, están rodeadas de una capa péptica, su ciclo sexual no está definido, en cambio aquellas que no poseen espinas poseen células fusiformes, no poseen capa péptica rodeando la pared celular, las cuales a medida que la microalga envejece forman unicelas causadas por fragmentación [16].

La plasticidad fenotípica es otra de las propiedades que se puede presentar en la microalga *Scenedesmus*, esta hace referencia a la capacidad de un genotipo individual de producir varios fenotipos una vez expuesta a diferentes condiciones ambientales como disponibilidad de nutrientes [17], contaminación proveniente de aguas residuales [16], [17], temperatura y salinidad [18]. Esta plasticidad le ha permitido desarrollar una buena adaptabilidad en cuerpos de agua dulce contaminadas con metales pesados y en aguas corrientes provenientes de actividades industriales [19]. El fenómeno de adaptación que realiza en cuerpos de agua contaminadas con metales pesados se ha estudiado con diferentes especies de *Scenedesmus*, lo que la lleva a ser considerada como una especie dominante en este tipo de ambientes [9], [20].

Gracias a estas prometedoras propiedades, Se han realizado varios estudios sobre *Scenedesmus*. Por ejemplo, Egan [17], evidenció que existían dos clases de colonias espinosas en la microalga *Scenedesmus Armatus*, las cuales fueron cultivadas bajo diferentes tipos de condiciones naturales y artificiales. Sus resultados evaluaron el polimorfismo de la microalga cuando las condiciones ambientales fueron modificadas.

Monteiro [21], evaluó el efecto de los metales pesados en la estructura del fitoplancton en un río de Portugal, estudios que reportaron la presencia de diferentes especies de microalgas incluyendo la especie *Scenedesmus* la cual se adaptó y mostró gran resistencia ante la presencia de metales pesados un vez ocurrían ciertos cambios en su morfología.

Davis [22]; presentó una revisión acerca de las propiedades bioquímicas de las algas marrón aplicada a la biosorción de metales pesados en términos de los modelos de isoterma de sorción así como los modelos empleados para la caracterización de los procesos de sorción. Volesky presentó los rangos de energía correspondientes para la adsorción de metales pesados y livianos los cuales se encontraron en un rango de $7 - 11 \text{ kJ/mol}$ y $2,1 - 6 \text{ kJ/mol}$, respectivamente.

3.2.2 Tratamientos de remoción de metales pesados

Según un informe técnico de la IUPAC la definición de *metales pesados*, no es clara debido a sus diversas interpretaciones y a algunas contradicciones como las características físicas y químicas empleadas para determinar qué elementos hacen parte de este grupo, por lo que sugiere atenerse al nombre de *metales de transición* [23]. Este nombre es más general ya que engloba alrededor de 40 elementos de la tabla periódica con números atómicos entre el 21-30, 39-48, 71-80 y del 103-112, propiedades fisicoquímicas similares y alta toxicidad [24], [25]. Aun sin definición formal, la mayor parte de la comunidad científica usa el término metales pesados para referirse a un grupo de los metales de transición con pesos atómicos entre 63.5 y 200.6, densidad mayor a $5.0g/cm^3$ [26]. Los más importantes representantes de este grupo por su impacto en el medio ambiente son arsénico (As) [27], Selenio (Se) [28], Cadmio (Cd) [29], Cobalto (Co) [12], Plomo (Pb) [3] y Mercurio (Hg) [26]. Todos estos metales aunque son esenciales en el ecosistema se conoce que a altas concentraciones podrían provocar efectos tóxicos sobre los individuos que lo conforman [1].

En el tratamiento de efluentes contaminados por metales pesados generados por diferentes industrias como la metalurgia [30], curtiembre, galvanoplastia [31], hidrocarburos [32] y la minería [33], los metales pesados juegan un papel perjudicial debido a que se acumulan dentro de la cadena trófica y el ambiente. convirtiéndose en sustancias tóxicas para el hombre, animales, plantas y en general, en todo el ecosistema [1], [27]. En la Tabla 3.2, se mencionan algunos de los metales con mayores efectos negativos al medio ambiente y sus fuentes generadoras.

Tabla 3.2: Fuentes de contaminación causada por metales

Metal	Fuente de contaminación	Ambiente afectado	Efecto en seres humanos	Referencia
Cadmio	Plantas electrónicas, fundiciones, pilas, pigmentos y procesos de refinación	Agua, plantas y animales	Bronquitis, infertilidad, cáncer de próstata, daños vasculares y óseos.	[1], [34]
Cromo	Galvanoplastia, aleaciones, fabricación de colorantes y producción de acero	Agua superficial y subterránea	Al ser un elemento redox activo tiene un gran efecto dentro de la cadena trófica y cancerígeno alto	[1], [35]
Mercurio	Equipos eléctricos y científicos, pesticidas, amalgamas dentales, minería	Agua, aire, suelo y sedimentos	Daños al sistema nervioso, pulmones, riñones y cerebro	[36]
Plomo	Baterías, revestimiento de cables, tuberías, pinturas, aditivos para la gasolina	Suelo, aguas subterráneas y agua superficial	Nefrotoxicidad, sistema nervioso, gastrointestinal y cardiovascular	[37], [38]
Níquel	Aleaciones, baterías, residuos de minería	Plantas, suelo, aguas subterráneas	Cáncer, alteraciones del pulmón y efectos adversos en la sangre	[3], [38], [39]

Tratamientos convencionales

Los tratamientos convencionales para remoción de metales consisten en el desarrollo de diferentes técnicas aplicadas de acuerdo al tipo de industria, el metal a tratar y fuente de contaminación. En general, los tratamientos convencionales son muy empleados y eficientes, pero tienen algunas limitaciones [10]. La Tabla 3.3 presenta algunos de los métodos convencionales más empleados para la remoción de metales incluidas las ventajas y desventajas más representativas de estos procesos [40].

De acuerdo a las desventajas que se pueden llegar a presentar con los diferentes métodos convencionales se han buscado alternativas con tecnologías capaces de reducir la concentración de los metales pesados de acuerdo a cada legislación y que además permita la recuperación y reutilización del adsorbente disminuyendo los costos de estos tratamientos y un beneficio en el medio ambiente mayor [36].

Tabla 3.3: Métodos convencionales de remoción de metales

Método	Ventajas	Desventajas	Ref.
Precipitación química	Simple, Bajo costo, La mayoría de los metales pueden ser removidos	Se producen grandes cantidades de lodos, Disposición final	[10]
Coagulación química	Lodos de sedimentación, Deshidratación	Costoso, Gran consumo de químicos	[41]
Intercambio químico	Alta generación del material, Selectividad por metales	Costoso, Pocos metales pueden ser removidos	[31]
Métodos electroquímicos	Alta selectividad por metales, No hay consumo de químicos, La recuperación de metales	Alto costo de inversión, Alto costo de mantenimiento	[24]
Adsorción con carbón activado	La mayoría de los metales pesados pueden ser removidos, Alta eficiencia >99 %	Costo de carbón activado, No regenerado, El rendimiento depende del adsorbente	[42]
Zeolita	Metales removidos, Materiales económicos	Baja eficiencia	[41]
Procesos de membrana y ultrafiltración	Pocos desechos sólidos, Consumo de químicos es bajo, Alta eficiencia >95 %	Costos altos, El caudal empleado es bajo, Eficiencia afectada por otros metales	[43]
Flotación	Tiempos de retención bajos, Extracción de partículas pequeñas	Alto costo inicial, Alto costo de mantenimiento y operación	[44]
Adsorción	Varios contaminantes, Alta Capacidad, Cinética rápida	Rendimiento depende del tipo de adsorbente, Baja capacidad de sorción	[45]

Tratamientos alternativos

El tratamiento de aguas contaminadas basados en interacciones entre metales y materiales biológicos que ocurren dentro de los ciclos naturales de la materia han sido estudiados en bacterias, algas, hongos y levaduras desde los años 1960's. Los procesos naturales que ocurren cuando un compuesto químico interactúa con materiales biológicos se pueden describir de dos formas de acuerdo a la manera como interactúen [31]: cuando la unión se lleva a cabo en la pared celular se habla de *biosorción* y cuando se acumula en el interior de la célula se habla de *bioacumulación* [46].

La biosorción es un proceso físico-químico que ocurre cuando hay compuestos químicos solubles (sorbente) presentes en ambientes acuosos e interactúan con materiales biológicos uniéndose a la pared celular mediante adsorción [46]. Este proceso es muy similar a la adsorción convencional o intercambio iónico, la diferencia radica en que se emplea un material biológico, regenerable y selectivo [47].

La Bioacumulación por su parte, ocurre luego de la biosorción y tiene lugar a dos etapas adicionales, la primera consiste en el transporte de contaminantes a través de un sistema de transporte activo y la segunda en el consumo de energía al interior de la célula que tiene como consecuencia el aumento de concentración de células. Estos procesos suelen tener una limitante y es el uso en tratamientos continuos tanto de contaminantes orgánicos o inorgánicos para altas concentraciones y por largos períodos de tiempo ya que las altas concentraciones de contaminantes podría dar paso a la muerte de los organismos y afectar por completo el proceso de bioacumulación [26], [46]. La Tabla 3.4 presenta características comparativas de ambos procesos aplicado a la remoción de metales.

Estas diferencias que traen consigo ventajas y desventajas juegan un papel importante en cada ciclo natural de la materia en el medio ambiente ya que estos procesos ocurren en casi todos los procesos biológicos de tratamiento de aguas y es de gran interés aprovecharlos bajo condiciones controladas mediante métodos eficientes ya sean de adsorción o absorción.

Tabla 3.4: Diferencias entre los procesos de biosorción y bioacumulación [1], [46]

Biosorción	Bioacumulación
Proceso pasivo	Proceso activo
Biomasa sin vida	Biomasa con vida
Los metales se unen a la superficie de la pared celular	Unión en la superficie de la pared celular y además acumulación en el interior
Adsorción	Absorción
Proceso reversible	Proceso parcialmente reversible
No quiere nutrientes	Requiere de nutrientes
Un proceso de una etapa	Proceso de dos etapas
Rápido	Lento
No es controlado por el metabolismo	Controlado por el metabolismo
No se ve afectado por el efecto tóxico	Se ve afectado por el efecto tóxico
No hay crecimiento celular	Implica crecimiento celular
Alcanza concentraciones intermedias de equilibrio de los contaminantes	Alcanza muy bajas concentraciones de equilibrio de los contaminantes
Recuperación y reúso de contaminantes mediante un proceso de desorción	Los metales no pueden recuperarse
Biomasa puede regenerarse y usarse en varios ciclos de adsorción-desorción	La biomasa no puede recuperarse

3.2.3 Microalgas en la remoción de metales pesados

Las investigaciones llevadas a cabo en la remoción de metales incluyen ventajas como: rápida adsorción de metales, ahorro de tiempo, dinero y energía, facilidad de usar, disponibilidad durante todo el año, facilidad de manejo, reutilizabilidad, alta selectividad (que mejora su rendimiento) y aplicabilidad a diferentes concentraciones de metales. Si son comparadas con otro tipo de microorganismos es posible decir que son más efectivos debido a su mayor tasa de crecimiento, gran relación de superficie/volumen, adecuados para sistemas aeróbicos y anaeróbicos y no requieren inmovilización [27].

El proceso de remoción de iones metálicos a partir de microalgas está determinado por la estructura y composición química de cada microorganismo, aunque en general, este ocurre gracias a una estructura fibrilar agrupada en una matriz amorfa que posee la pared celular compuesta por varios polisacáridos y grupos funcionales como aminos, amidas, sulfatos y carboxilos que son capaces de atraer y adherir los iones metálicos. Este proceso se da de acuerdo al tipo de atracción que se dé entre el soluto y el adsorbente gracias a interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, uniones covalentes, interacciones redox, interacciones químicas iónicas y formación de complejos entre los grupos funcionales de la pared celular y estos iones metálicos. Estas interacciones pueden explicarse mediante la teoría de bases y ácidos duros y blandos de Lewis y las series de Irving-Williams [48].

Adicional, los procesos de remoción van a depender tanto de factores abióticos como el peso atómico, temperatura, pH, salinidad, potencial de reducción del metal, disponibilidad de agua y nutrientes; como de factores bióticos como la especie del microorganismo, área superficial, tolerancia, Tamaño y etapas de vida, competencia microbiana y depredación [27]. Uno de los factores relevantes a tener en cuenta en los procesos de remoción de metales pesados es el efecto del pH ya que este determina la especiación y solubilidad de los iones metálicos y también afecta las propiedades de la biomasa por protonación y desprotonación de sus sitios activos [34].

Otros factores es el tamaño de partícula, ya que en la adsorción se relaciona con la cantidad de adsorbato (soluto) que se puede adsorber y es directamente proporcional al volumen y al área externa. Finalmente, si la fuerza iónica aumenta puede suprimir la biosorción como resultado del incremento de la carga electrostática o la presencia de otros iones en solución puede competir con el metal de interés por los sitios de enlace [3].

3.3 Estado del arte

Las consideraciones mencionadas anteriormente, son posibles a través de los estudios realizados acerca de remoción de metales pesados por medio de microalgas, se ha encontrado por ejemplo, que iones de Pb(II), Cd(II), Cu(II) y Hg(II) se han eliminado eficazmente empleando distintos grupos de microalgas. Entre las algas posiblemente más empleadas dentro de la eliminación de metales se encuentran las microalgas verdes: *Chlorella Vulgaris* [12], [49], *Chlamydomonas* sp. [7], *Chlorococcum* sp. [50] y *Fischerella* sp., *Scenedesmus* [48]. Algas verdeazuladas: *Lyngbya spiralis*, *Tolypothrix tenuis*, *Stigonema* sp. y *Phormidium molle* [38]. Algas marrones: *M. pyrifer*, *U. pinnatifida*, *Laminaria japónica*, *Fucus vesiculosus* y *Sargassum vulgare* [22]. Algunas investigaciones reportadas en la literatura sobre algas se detallan a continuación en la Tabla 3.5:

Tabla 3.5: Publicaciones relevantes en el área de la remoción de metales pesados con microalgas

Autor	Descripción estudio	Ref.
Hamdy	<p>A partir de algas rojas y marrones evaluó la capacidad de adsorción de Cr^{3+}, Cd^{2+}, Cu^{2+} y Ni^{2+}, se encontró afinidad de acumulación por los diferentes iones probados para cada especie. Además, se demostró que la remoción fue muy alta durante las dos primeras horas tras lo cual no se presentaron cambios significativos en la cantidad de metal en el medio. Otro factor que se encontró relevante fue el efecto del pH que mostró un valor apropiado para pH entre 5 y 6.</p>	[51]
Chojnacka et al.	<p>Proceso de remoción de iones metálicos de Cr^{3+}, Cd^{2+} y Cu^{2+} empleando <i>Spirulina</i> sp. El estudio reportó que las condiciones de crecimiento de la biomasa influyen altamente la capacidad máxima de remoción, paralelamente, sus estudios concluyeron que los cultivos fotoautotróficos poseen mayor capacidad de adsorción. El intercambio iónico entre la superficie de la microalga y los metales dependieron del pH, del equilibrio de masa entre los iones metálicos y la capacidad de adsorción a través de reacciones de equilibrio. Estos factores, la morfología y las condiciones de crecimiento de la biomasa establecieron los mecanismos de adsorción física, el intercambio iónico y la modificación de grupos funcionales en la pared celular.</p>	[42]
Brinza et al.	<p>Estudiaron especies de micro/macro algas marinas como biosorbentes para la captación de metales de <i>K, Mg, Ca, Fe, Sr, Co, Cu, Mn, Ni, V, Zn, As, Cd, Mo, Pb, SeyAl</i>. Ellos exponen el uso aplicativo de varias microalgas entre ellas <i>Scenedesmus abundans</i>, <i>Scenedesmus quadricauda</i>, <i>Scenedesmus subspicatus</i> y reportan los factores físico-químicos que intervienen en los procesos de remoción, los mecanismos y los posibles modelos cinéticos empleados en la evaluación de biosorción de metales pesados.</p>	[50]
Gupta y Rastogi	<p>Estudiaron la adsorción de Pb (II) de aguas residuales con <i>Spirogyra</i> sp y obtuvieron una capacidad máxima de en 100 minutos para un pH de 5. Se encontró que una variación de la temperatura provocó un efecto significativo en la capacidad de adsorción, siendo mayor a temperaturas elevadas. Este estudio fue interesante pues se encontró que la cinética de remoción de esta microalga sigue el modelo de pseudo segundo orden y el equilibrio está muy bien descrito por la isoterma de Langmuir. El estudio indica que la estructura química de la microalga presenta grupos amino, carboxilo, hidroxilo y carbonilo que podrían explicar la capacidad de remoción de este microorganismo.</p>	[5]
Wan et al	<p>Estudiaron la remoción de por medio de biomasa microalgal libre e inmovilizada de <i>Chlorella</i> sp., y <i>Chlamydomonas</i> sp., de un río de Malasia. Sus estudios en <i>Chlorella</i> reportaron una capacidad máxima de en biomasa inmovilizada. Sus comparaciones demostraron el efecto de metales pesados en el crecimiento de microalgas; además, la caracterización de cada especie evidenció la unión de iones metálicos a los distintos grupos funcionales encontrados en la pared celular de cada microalga.</p>	[7]

3.3.1 Procesos de remoción con *Scenedesmus*

Los estudios aplicados a remoción de metales, la microalga *Scenedesmus* ha sido empleada en varios trabajos desarrollados en este tema como se menciona en la Tabla 3.6

Tabla 3.6: Publicaciones relevantes en el área de la remoción de metales pesados con *Scenedesmus*

Autor	Descripción estudio	Ref.
Fargasová	Capacidad de <i>Scenedesmus quadricauda</i> en la absorción de ciertos metales pesados y su crecimiento cuando está en presencia de estos metales. Sus estudios indicaron que el filoplancton juega un papel importante en la distribución de los metales debido a que podría ser capaz de afectar el comportamiento de los metales por medio de diferentes mecanismos responsables de la precipitación de estos metales y su destino final en lagos y aguas marinas.	[19]
Perales-Vela et al.	Capacidad de eliminación de <i>Cd</i> y <i>Cu</i> por medio de <i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> y <i>P. tricornutum</i> , estas al ser microorganismos fotosintéticos eucariotas que preferentemente producen péptidos los cuales son los responsables de inducir estrés a los metales pesados sintetizándolos por medio de codificaciones de genes y enzimas peptídicas son capaces de tener altos niveles de remoción.	[52]
Bayramoğlu et al.	Emplearon <i>Scenedesmus quadricauda</i> inmovilizada con alginato de calcio como fijador para eliminar iones de <i>Cu(II)</i> , <i>Zn(II)</i> y <i>Ni(II)</i> durante período cortos de tiempo, cinco días aproximadamente, y un pH promedio de 5.0 obteniendo durante período cortos de tiempo, cinco días aproximadamente, y un pH promedio de 5.0 obteniendo porcentajes de remoción altos. En sus estudios encontraron grupos de unión para la interacción entre la estructura de la microalga y los iones metálicos donde predominaron los grupos fenólicos y carboxilos comportamiento que puede deberse a los grupos amida de la biomasa microalgal.	[48]
McGinn et al.	Ensayaron la capacidad bioremediadora de <i>Scenedesmus</i> sp., en aguas residuales municipales mediante la remoción de nitrógeno y fósforo. Se encontró que en cultivos tipo batch se tenía una producción de biomasa de 130 mg/l (en seco). Además, que la remoción de <i>N</i> y <i>P</i> fue del 7% y 0,7% de la tasa de producción de biomasa, lo que indicó un proceso eficiente para este tipo de residuos. Por otro lado, demostraron la eficiencia en la remoción de metales de este tipo de algas de iones <i>Fe</i> , <i>Zn</i> y <i>Cd</i> y la parcial remoción de otros elementos como <i>Al</i> , <i>V</i> , <i>Pb</i> , <i>Co</i> , <i>Mn</i> , <i>Mg</i> , <i>Mo</i> , <i>Cr</i> y <i>Ba</i>	[53]
Roa et al.	Usaron <i>Scenedesmus incrassatulus</i> inmovilizada en alginato de calcio para estudiar la remoción de nitratos y fosfatos de un modelo de agua residual doméstica durante 8 días. Encontraron que la capacidad de remoción fue del 60% para nitratos y del 47% para fosfatos iniciales. Además, se demostró que el segundo día es cuando se presenta la mayor producción tanto de clorofila como de carotenos y se concluyó que en estas condiciones experimentales las microalgas son viables en el medio de inmovilización ya que observaron la aparición de un número importante de cenobios tres días después de la inoculación.	[54]

3.4 Materiales y métodos

3.4.1 Microorganismos y reactivos

La microalga *Scenedesmus* sp., perteneciente al cepario del grupo Bioprocesos de la Universidad de Antioquia, se conservó en medio de cultivo líquido CHU-13 (Tabla 3.7) [55]. Para su mantenimiento se transfirieron células jóvenes en suspensión filtradas en filtro de membrana de 0,2 μm cada siete días a erlenmeyer de 250ml y medio de cultivo fresco.

Tabla 3.7: Medio de cultivo CHU-13 [55].

Compuesto	Concentración
K_2HPO_4	400
KH_2PO_4	80
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	107
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	200
Citrato férrico	20
Ácido cítrico	100
$CoCl_2$	0,02
H_3BO_3	5,72
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	3,62
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,16
Na_2MoO_4	0,084
0.0072 NH_2SO_4	1 gota

3.4.2 Crecimiento de biomasa y remoción de mercurio

Condiciones de cultivo

A partir de los resultados obtenidos en los estudios previos se determinaron las mejores condiciones de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., Tabla 3.8, luego se eligieron las concentraciones de inóculo y de mercurio inicial para cada experimento realizado con el fin de asegurar el crecimiento de la microalga y la remoción de mercurio.

Tabla 3.8: Condiciones de cultivo del ensayo de crecimiento de biomasa y remoción de Hg

Condiciones de cultivo	Especificación
Fuente de Carbono	400 mg/l
Iluminación	Luz blanca artificial con intensidad lumínica de 800 a 1000 luxes
Fotoperiodo	12:12 horas
Temperatura	$27 \pm 3^\circ C$
Agitación	150 rpm
pH	7.4 (inicial)

Preparación de inóculo

Se preparó el medio de cultivo CHU-13 en erlenmeyer de 250 ml con 150 ml de volumen efectivo, una solución de $NaHCO_3$ como fuente de carbono y se esterilizó a $120^\circ C/15min$. Luego del protocolo de esterilización se llevó a cámara de flujo laminar vertical, se adicionó la solución de $NaHCO_3$ a 400 mg/l al medio de cultivo y se inoculó la microalga al medio líquido en las concentraciones de inóculo correspondientes.

Preparación del cultivo microalgal

Se tomó el inóculo preparado para cada una de las concentraciones de biomasa inicial, se adicionó la solución de $HgCl_2$ a las concentraciones iniciales determinadas para cada unidad experimental. Una vez preparados los medios de cultivo para cada ensayo se sometieron las unidades experimentales a las condiciones de cultivo durante un período de tiempo de 15 y 30 días en shaker KS 250 basic.

Diseño experimental

Se planteó un diseño experimental multifactorial de dos factores controlables correspondientes a la concentración de inóculo y la concentración inicial de mercurio, las variables de respuesta fueron concentración final de biomasa y porcentaje de remoción de mercurio. La concentración de inóculo

definida seleccionando porcentajes al 5 %, 10 %, 15 % y 20 % en los rangos de operación determinados por la curva de calibración (Anexo 1). La concentración de Hg para cada nivel se determinó con base en datos reportados en literatura y experimentación realizada previamente [26], [56]. En la Tabla 3.9 se muestran los factores definidos y los niveles para cada una de las variables. Estos experimentos fueron llevados a cabo por un período de tiempo de 16 días, tres replicas para la concentración de biomasa, dos replicas para el porcentaje de remoción y una muestra control.

Tabla 3.9: Niveles de los factores del diseño experimental

Factor	Niveles (mg/l)			
Concentración inóculo	35	70	145	225
Concentración inicial de mercurio	0	2,5	5	7,5

Los resultados fueron analizados a partir de un modelo lineal de efectos fijos, ecuación 3.1, teniendo en cuenta el análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de contrastes de comparaciones múltiples por el método de contraste de parejas basado en test F y χ^2 con un ajuste de valor p por el método de holm disponible en la librería phia [57], del software libre estadístico R en su versión i386 3.4.4.ink [58]. Para este experimento se estableció un nivel de significancia de 0,05 y se realizó una aleatorización en el orden en el que se tomaron las medidas diarias de cada unidad experimental, este procedimiento es fundamental para evitar sesgo, garantizar la independencia entre mediciones y para realizar un procesamiento estadístico adecuado de los resultados.

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij} \quad (3.1)$$

Donde:

y_{ij}	Intensidad de cada medición
μ	Media global
α_i, β_j	Efectos principales del inóculo y mercurio respectivamente
$(\alpha\beta)_{ij}$	Efecto de interacción entre inóculo y mercurio
ε_{ij}	Error aleatorio de cada medición

Determinación de las cinéticas celulares

La cuantificación del crecimiento de biomasa y el consumo de sustratos (fosfatos y nitratos) se llevó a cabo cada 24 horas tomando una alícuota de 1ml en cámara de flujo laminar de flujo vertical en condiciones asépticas, material esterilizado y expuesto a luz UV durante 20 min antes de la toma de muestras. Las muestras fueron analizadas para determinar la concentración de biomasa, luego eran llevadas a centrifugación en centrifuga sigma 2-16PK a 15.000 rpm/10min separando la biomasa del sobrenadante para evaluar la concentración de sustratos restantes en el medio para cada unidad experimental.

Determinación del porcentaje de remoción de Hg

La determinación del porcentaje de mercurio se llevó a cabo una vez finalizó la determinación de la concentración de biomasa y consumo de sustrato. Se llevó el medio de cultivo a centrifugación a 15.000 rpm/10min con el fin de separar la biomasa del sobrenadante. El sobrenadante se conservó en tubos falcon de 50 ml previamente esterilizados y se realizó la digestión del Hg en campana de extracción frontier junior EFB-4A2 (Anexo 7) para posteriormente llevar a cabo el análisis de Hg por medio de AA.

3.4.3 Métodos analíticos

Las técnicas analíticas empleadas se eligieron de acuerdo al objeto de estudio del trabajo de investigación.

Estimación de la concentración de biomasa

La determinación de las cinéticas de crecimiento celular se llevó a cabo por medio de la cuantificación de biomasa tomando un volumen representativo de aproximadamente 1ml de cada cultivo en una celda plástica (2ml), se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro UV-visible, la lectura de absorbancia se realizó a 437nm con agua destilada como blanco y fue contrastada con la curva de calibración de peso seco indirecto construida para la microalga *Scenedesmus* sp. (Anexo 2)

Curva de calibración de biomasa: Se construyó la curva de calibración de biomasa para determinar la concentración celular de biomasa mg/l y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de $437nm$ con el fin de llevar a cabo la cuantificación de biomasa (Anexo 2)[59]

Viabilidad celular: Se realizaron conteos celulares para todas las unidades experimentales cada 24 horas y se determinó el número de células por cenobio (agregado celular) en relación con el número total de células cuantificadas y se estableció la viabilidad celular contando las células por cenobio que perdieron pigmentación. Estas mediciones se llevaron a cabo en un microscopio Motic acoplado a un sistema de detección de imagen (Anexo 8).

Estimación de la concentración de fosfatos

La determinación de fosfatos se realizó por el método del ácido ascórbico reportado por Standard Methods correspondiente al Standard Methods for the examination of water & wastewater. Las lecturas se llevaron a cabo en un lector de microplatos Synergy. y se midió absorbancia a una longitud de onda de 880 nm con el fin de calcular las concentraciones de consumo de fosfatos diario para cada experimento. La curva de calibración se construyó a partir de una solución concentrada de K_2HPO_4 (anexo 3).

Estimación de la concentración de nitratos

La determinación de nitratos se realizó de acuerdo al protocolo establecido por el método del ácido salicílico para muestras de agua dulce. Se realizaron mediciones diarias en un lector de microplatos Synergy a una longitud de onda de 410 nm y se leyó la absorbancia para determinar la concentración de nitratos. Previo a esto se construyó la curva de calibración correspondiente a partir de una solución concentrada de KNO_3 (anexo 4).

Estimación de la concentración de Hg

La determinación de metales pesados se realizó por el método espectroscopia de absorción atómica (AA), en espectrómetro de AA Thermo Scientific ICE3500. Esta técnica permitió medir las concentraciones específicas de mercurio en el medio de cultivo.

Porcentaje de remoción Se determinó el porcentaje de remoción de acuerdo a cada concentración de mercurio empleada en cada experimento y se define como la cantidad másica de mercurio removido con respecto a la cantidad másica inicial del cultivo, ecuación 3.2.

$$R_{Hg} = \frac{(Hg_i - Hg_f)}{Hg_i} \quad (3.2)$$

Donde

Hg_i : Concentración de mercurio inicial mg/l
 Hg_f : Concentración de mercurio final mg/l

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Crecimiento de biomasa y remoción de Hg

Evaluación de las cinéticas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., en presencia de mercurio

Para determinar el comportamiento del crecimiento de biomasa y consumo de sustratos de la microalga *Scenedesmus* sp., en presencia de mercurio, se cultivó la microalga a diferentes concentraciones iniciales de biomasa y mercurio con una temperatura de 25°C, pH inicial 7, agitación orbital 150 rpm, fotoperiodo 12:12 horas en medio de cultivo CHU-13. Las cinéticas de crecimiento de biomasa y consumo de nutrientes muestran el comportamiento que tuvo cada concentración de mercurio (0 mg/l, 2,5 mg/l, 5 mg/l y 7,5 mg/l) en función a una concentración de biomasa fija (35 mg/l, 70 mg/l, 145 mg/l y 225 mg/l).

Cinéticas de crecimiento de biomasa

La concentración de biomasa muestra el crecimiento que tuvo la microalga a una concentración fija de esta en función de las variaciones de concentración inicial de mercurio durante 15 días, Figura 3.3. Las cinéticas se realizaron con una muestra control para comparar el efecto inhibitorio que experimenta la microalga en respuesta a la exposición de mercurio, estas cinéticas reportaron una reducción gráficamente significativa para todos los ensayos y dejó visto que independientemente de la concentración inicial de mercurio hubo inhibición en el crecimiento de la microalga de manera considerable. De igual manera la tasa de crecimiento disminuyó con respecto a la muestra control la cual tuvo una concentración promedio para todos los ensayos de 39,2 mg/l, mientras que para los ensayos sin importar sus concentraciones iniciales de inóculo ni mercurio fue de 13,6 mg/l, estos resultados se ven evidenciados en la concentración final de biomasa la cual fue proporcional a la concentración inóculo e inversamente proporcional a la de mercurio.

Los resultados analizados gráficamente mostraron que el comportamiento que tuvo el crecimiento de biomasa es una relación Inóculo/Hg que se vio favorecido a medida que se aumentó las concentraciones de inóculo ya que el crecimiento de biomasa dependió significativamente de la concentración inicial de mercurio ya que es la variable que limita el normal funcionamiento y metabolismo de la microalga.

Se pudo observar que las muestras con 0,0025g/l de metal experimentaron una velocidad de crecimiento mucho mayor que los demás los ensayos, los ensayos con 0,005g/l tuvieron una fase exponencial corta y luego aproximadamente en el día 3-4 entraron a una fase estacionaria donde la microalga se mantuvo viva y experimentó pequeñas fluctuaciones en su concentración, para los ensayos con 0,0075g/l las curvas de crecimiento presentaron la misma tendencia a todas las concentraciones de inóculo y aproximadamente en el día seis iniciaron su fase de muerte.

Para todos los ensayos se realizó seguimiento de pH y se evidenció que el pH inicial fue de 7.0, de 8.0 en la fase exponencial y de 6,8 en la fase de muerte para los ensayos con 0,0075 de Hg mientras que los ensayos con 0,0025g/l y 0,005g/l de Hg el pH se mantuvo en 9.0.

El resumen de los datos obtenidos para las cinéticas de crecimiento distinguiendo en función del Hg se muestra en la Tabla 3.10. En esta tabla se observa que la velocidad de crecimiento disminuye a medida que aumenta la cantidad de Hg para las tres primeras concentraciones, luego a la mayor concentración se evidencia un aparente aumento de la velocidad de crecimiento lo que indicaría que el metal presenta un comportamiento de inhibidor no competitivo, donde en un principio la velocidad de crecimiento aumenta pero el efecto global es una reducción de esta lo que ocasiona que llegue rápidamente a fase estacionaria y posterior muerte celular.

Otra razón atribuida a la velocidad de crecimiento para estos resultados sugiere que el mecanismo de captación de la microalga fue una combinación entre biosorción y bioacumulación ya que al comparar las velocidades de crecimiento de las muestras control con las contaminadas por el metal se observa

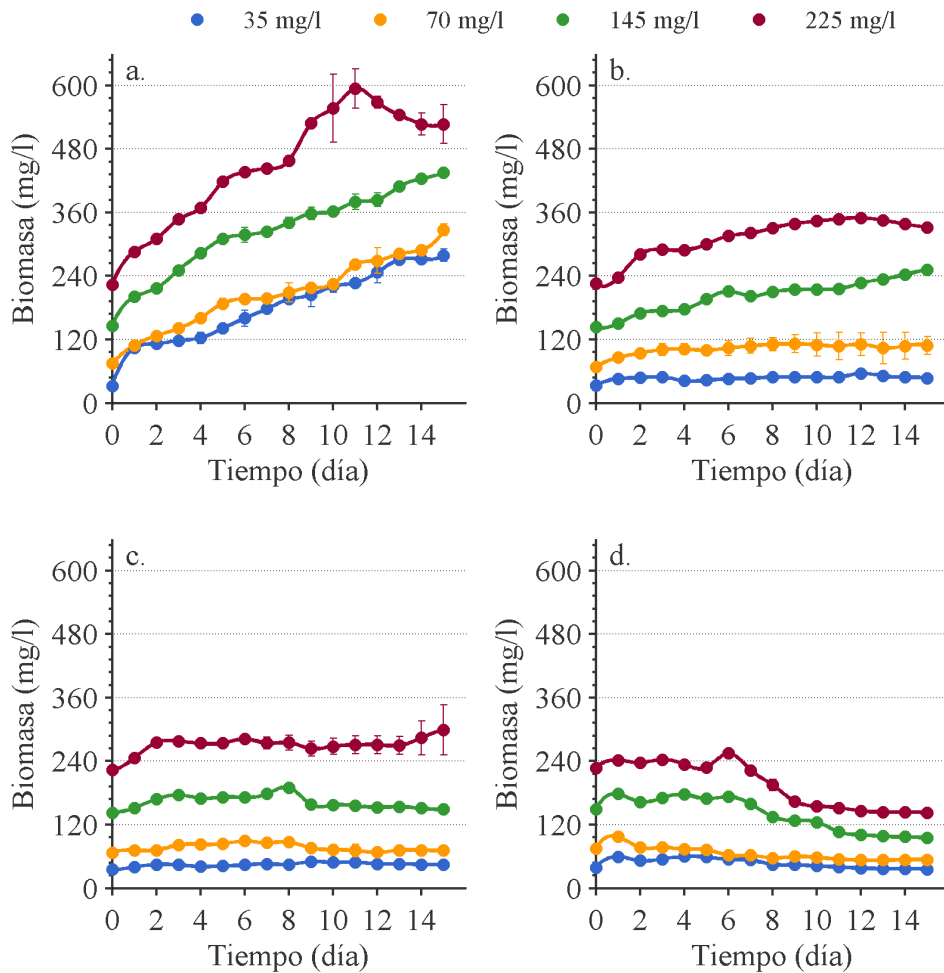


Figura 3.3: Cinéticas de crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp. a. Muestra control 35, 70, 145, 225 mg/l y 0 mg/l de Hg. b. curvas a 35, 70, 145, 225 mg/l y 2,5 mg/l de Hg. c. 35, 70, 145, 225 mg/l y 5 mg/l de Hg. d. 35, 70, 145, 225 g/l y 7,5 mg/l de Hg.

que son bajas, lo que podría indicar que a estas velocidades ocurriría la bioacumulación y por ende el transporte del metal en el interior de la célula [60].

Validación estadística

Luego de realizar el análisis gráfico presentado anteriormente, fue posible validar los resultados al evaluar cada uno de los factores propuestos en el diseño experimental. Esto se logró tras plantear las hipótesis de los factores, construir el modelo de efectos fijos, realizar el análisis de varianza (ANOVA) para finalmente analizar el efecto de los tratamientos en la variable respuesta. A continuación se presenta el análisis estadístico para la concentración final de biomasa.

El diseño experimental se definió a partir de un modelo de efectos fijos, el cual al reportar una interacción significativa se estudió por medio de un análisis de efectos simples con el fin de conocer la importancia que tienen los tratamientos y sus variaciones en cada uno de los niveles de cada factor. A partir del modelo general de efectos simples y al supuesto de cada hipótesis se construyó el modelo correspondiente para la concentración final de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp., Tabla 3.11, donde solo se muestran los tratamientos cuyo efecto fue significativo.

Como puede observarse, el efecto del nivel de inóculo de 70 mg/l no varió de forma significativa, lo

Tabla 3.10: Valores para las cinéticas de crecimiento, ensayo de inóculo y concentración inicial de Hg

Concentración inicial de Hg (mg/l)	Promedio concentración final de biomasa (mg/l)	Velocidad de crecimiento (mg/l)
0	360	18
2,5	188	15
5	137	13
7,5	78	20

Tabla 3.11: Modelo de efectos fijos para concentración final de biomasa

Parámetro (mg/l)	Estimado (mg/l)	Valor p
μ	297	2,00e-16
Hg (2,5)	-243	2,00e-16
Hg (5)	258	1,70e-11
Hg (7,5)	-263	1,73e-05
Inoculo (145)	142	2,00e-16
Inoculo (225)	99	5,1e-07
Hg (2,5)-Inóculo (7)	76	2,18e-12
Hg (5)-Inóculo (145)	-77	4,65e-06
Hg (7,5)-Inóculo (145)	-78	4,57e-06
Hg (2,5)-Inóculo (225)	171	1,20e-02
Hg (5)-Inóculo (225)	199	1,06e-04

cual se confirma con el análisis gráfico, figura 3.3, el cual mostró una velocidad de crecimiento similar tanto para concentraciones de inóculo de 70 mg/l como para 35 mg/l. De esta manera, odelo representó adecuadamente la concentración final de biomasa tras el periodo de tiempo evaluado, situación que se confirma con el coeficiente de correlación ajustado, $R2(ajustado) = 0,98$. Posteriormente fue posible realizar el análisis de varianza para la concentración de biomasa (ANOVA), Tabla 3.12, con un nivel de significancia definido para el experimento de $\alpha = 0.05$.

Tabla 3.12: ANOVA para crecimiento de biomasa

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor P
Concentración de Hg	0,5289	3	2e-16
Inóculo	0,2599	3	2e-16
Hg-Inóculo	0,0880	9	2,45e-12
Residuales	0,0119	32	

Teniendo en cuenta el nivel de significancia definido para el experimento y comparando con el valor p obtenido se concluye que la concentración de inóculo, la concentración inicial de mercurio y la interacción Hg-Inóculo del modelo planteado presentaron diferencias estadísticamente significativas, lo que podría indicar que la concentración final de biomasa depende tanto de la concentración de inóculo como de mercurio y del efecto que tuvieron entre sí, presentando un valor $p=2e-16$ tanto para la concentración de inóculo como de Hg. Este resultado confirma la relación observada en el análisis de las cinéticas para el crecimiento de la microalga en presencia de Hg.

Dado que la interacción entre factores fue significativa se analizaron los efectos simples y no los efectos principales tal como indica el principio de marginalidad. El análisis de efectos simples se realizó con base en la interacción Inóculo-Hg evaluando el efecto del Hg en cada uno de los niveles de inóculo. Al realizar el análisis de varianza para los efectos simples se encontró un efecto significativo para todos los niveles de inóculo y se realizó un análisis de comparaciones por parejas con el fin de evaluar la diferencia entre medias con base en el test de Holm de comparaciones múltiples. Los resultados de las comparaciones múltiples se muestran en la Figura 3.4.

Como se observa en los diagramas de cajas cuando la microalga se inocula a bajas concentraciones se ve afectada por el mercurio, mientras que cuando se inoculó a mayores concentraciones el efecto del

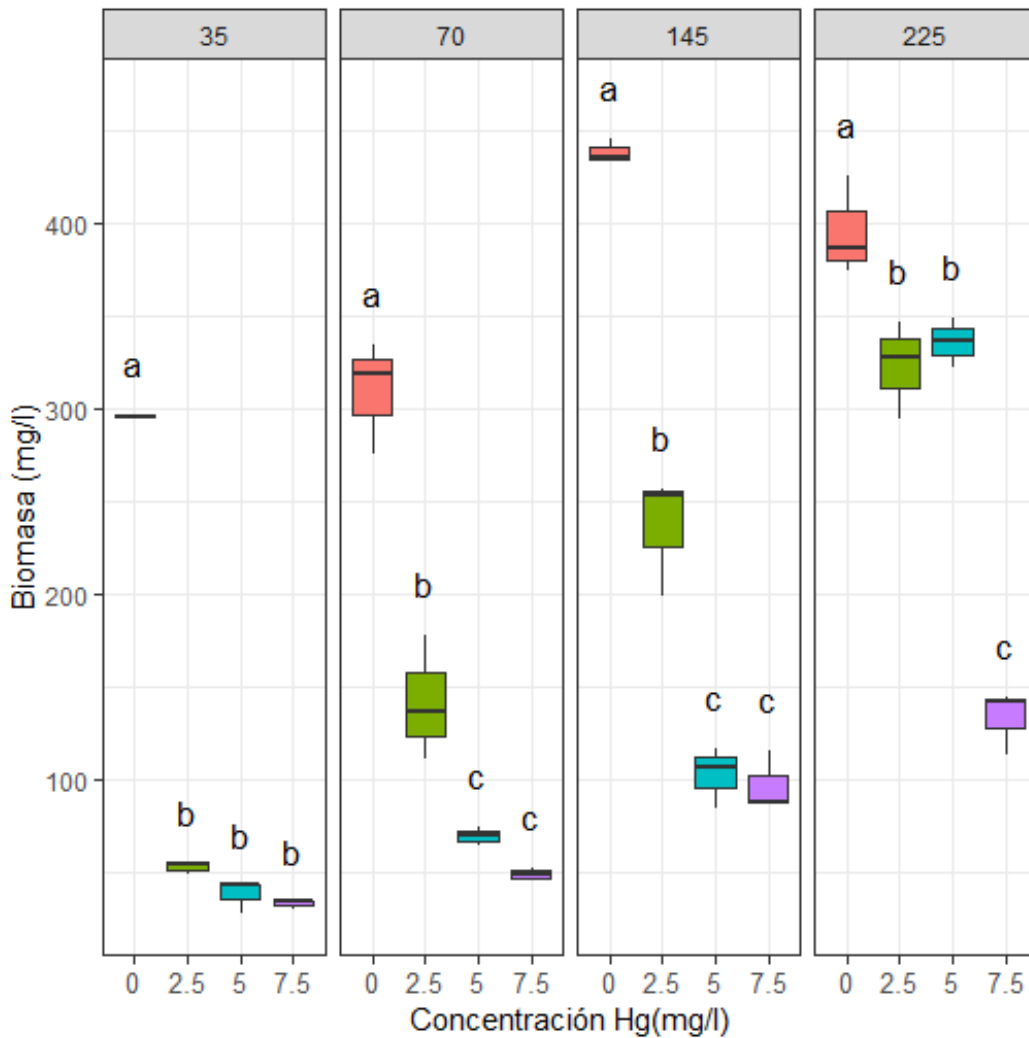


Figura 3.4: Boxplot y análisis de comparaciones múltiples dentro de cada concentración de inóculo. Las concentraciones de Hg que no compartan la misma letra tuvieron medias significativamente diferentes.

Hg en la concentración final de biomasa fue menor. Así, para la concentración de 35mg/l de inóculo se observó una caída significativa del crecimiento entre la muestra control y $2,5\text{mg/l}$ de Hg. Este comportamiento fue similar a las concentraciones de inóculo de $70\text{y}145\text{mg/l}$, ya que presentaron un efecto inhibitorio moderado a la primera concentración de Hg; mientras que a concentraciones mayores del metal ($5,0\text{y}7,5\text{mg/l}$) se observó una inhibición mayor y una concentración final de biomasa baja. De manera similar para la concentración de inóculo más alta el efecto inhibitorio del Hg fue moderado para las dos primeras concentraciones ($2,5\text{y}5,0\text{mg/l}$) y para la concentración de Hg de $7,5\text{mg/l}$ fue mucho más baja. Este análisis estadístico apoya los resultados analizados gráficamente los cuales concluyen que la microalga *Scenedesmus* sp., es dependiente de la relación Inóculo/Hg tanto en el crecimiento de biomasa como en el porcentaje de remoción de Hg. En ambos casos (gráfico y estadístico) se observa claramente el efecto inhibitorio que tiene el Hg sobre la microalga sin importar las concentraciones iniciales de biomasa ni Hg. Estos resultados muestran que la concentración final de biomasa será directamente proporcional a la concentración de inóculo e inversamente proporcional a la concentración inicial de Hg.

Consumo de fosfatos

La evaluación del consumo de la fuente de fósforo se llevó a cabo por medio del medio de cultivo CHU-13, el cual cumplió con los requerimientos de la microalga. El fósforo se estableció como uno de los macronutrientes para el medio de cultivo ya que aumentos significativos en la concentración no parece tener un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la microalga y se mantuvo a una concentración constante en todos los ensayos asegurando un aporte suficiente de fósforo al medio de cultivo.

Los comportamientos cinéticos, (Figura 3.5), para todos los ensayos se encontraron dentro de la curva de calibración realizada previamente, intervalo que estuvo comprendido en 0 – 0,66 nm, anexo 3. Las curvas control presentaron una velocidad de consumo constante hasta aproximadamente el día cinco para los ensayos correspondientes a las concentraciones de 70 mg/l y 145 mg/l y hasta el día siete para las concentraciones de 35 mg/l y 225 mg/l luego de ese tiempo se evidenció un consumo no homogéneo, el cual podría deberse a la presencia de mercurio en el medio de cultivo.

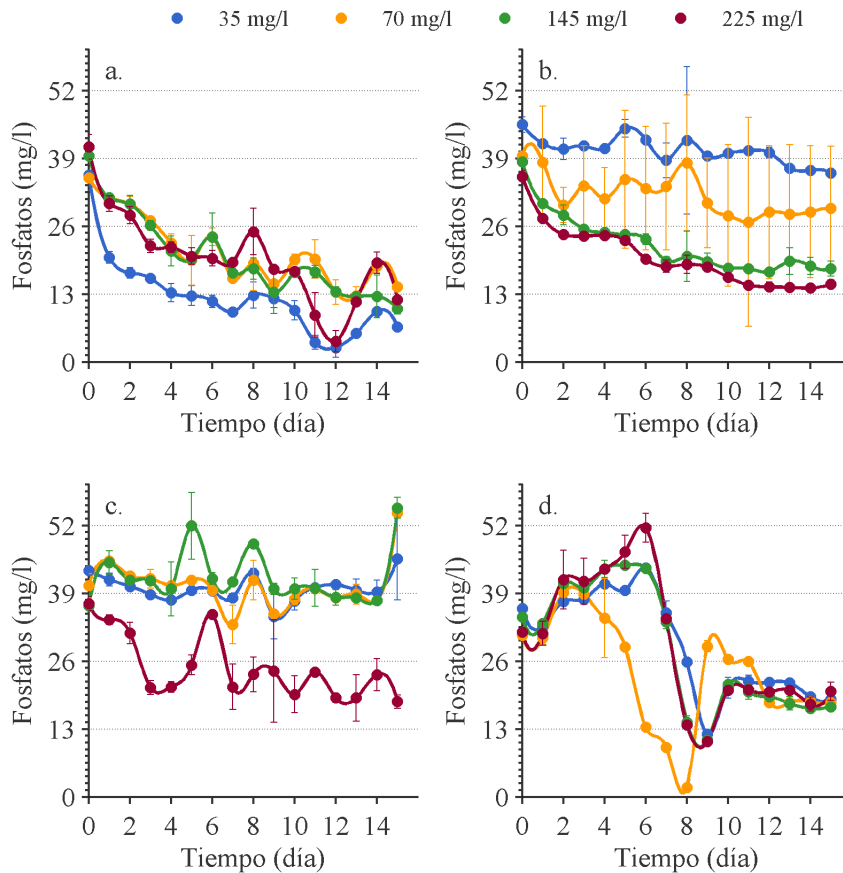


Figura 3.5: Cinéticas de consumo de fosfatos de la microalga *Scenedesmus* sp. **a.**Muestra control **b.**curvas a 2,5mg/l de Hg. **c.**5mg/l de Hg. **d.** 7,5mg/l de Hg.

El comportamiento cinético para los ensayos contaminados con mercurio presentó tendencias similares para las concentraciones de 0,0025g/l y 0,005g/l, estas evidenciaron poco consumo de fosfatos y pequeñas fluctuaciones en la tasa de consumo reflejados en algunos picos de aumento de la fuente de fosfatos. Para la concentración de 0,0075g/l se observó que aproximadamente en el día dos pareciera que no hubo consumo sino un aumento considerable de alguna fuente de fosfatos o compuesto con presencia de fósforo, dicho comportamiento tuvo una cinética diferente para cada concentración de inóculo.

Este fenómeno pudo ser generado por la presencia de Hg ya que este metal tiene un efecto en el metabolismo de la microalga que genera cambios, cambios que no corresponde al tema de estudio pero,

se presume, que el aumento de la fuente de fosfatos es generada a fenómenos tanto en la estructura de la microalga como en la bioquímica de la misma que pueden verse reflejados en una liberación de fósforo contenido en el interior de la microalga.

El consumo de fosfatos estuvo relacionado de acuerdo a la concentración de inóculo, este reportó mayor consumo en las cinéticas con mayor concentración de inóculo pero a su vez mayores variaciones ya que como se observa en las gráficas; por ejemplo, para las concentraciones más altas tanto de inóculo como de Hg la microalga experimentó un pico brusco de consumo y luego pareciera que esta empieza a soltar o producir fosfatos hasta que entra a su fase estacionaria, fenómenos que están asociados a cambios internos en la estructura de la microalga debido a que ocurre ruptura celular liberando el contenido de fosfatos al medio de cultivo [61]. Las velocidades de consumo de la fuente de fosfatos presentó una velocidad de consumo promedio de $0,0040 \text{ día}^{-1}$, en la Tabla 3.13 se muestran la concentración final de consumo por parte de la fuente de fosfatos y la velocidad de consumo para cada concentración de inóculo.

Tabla 3.13: Resumen del consumo de fosfatos para el ensayo de inóculo y Hg

Concentración de Hg	Consumo final de fosfatos (mg/l)	Velocidad de consumo ($\text{mg} \cdot \text{día}^{-1}$)
0	10,8	1,4
2,5 mg/l	24,62	0,9
5 mg/l	43,4	0,4
7,5 mg/l	18,59	13,4

Al revisar algunos trabajos relacionados a este estudio se puede citar principalmente el trabajo de Roa et al. [54], quienes evaluaron la remoción de fosfatos y nitratos empleando la microalga *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizada en alginato de calcio en medio de cultivo bold durante ocho días a condiciones muy similares de la presente investigación. Las cinéticas de consumo reportaron una remoción de fosfatos de 47% y mostró una tendencia muy similar al consumo de fosfatos por parte de *Scenedesmus* sp. (microalga evaluada en este estudio); también, se pudo observar una velocidad de consumo un poco más lenta para los primeros días de consumo. Por otra parte, no se presentó remoción total para el estudio de referencia ni agotamiento de la fuente para la presente investigación, lo que da una referencia de cómo es el consumo de la fuente de fosfatos por parte de la microalga en condiciones similares de cultivo.

Patel et al.[62], estudiaron la absorción de fosfatos y producción de lípidos con doble propósito, a remoción de fosfatos en aguas y la producción de biocombustibles, dentro de las especies estudiadas *Scenedesmus* reportó cinéticas de consumo con una eficiencia máxima de 55,5% (2,87 mg/l). En nuestro estudio, los comportamientos cinéticos para todas las concentraciones evaluadas son similares entre ellas pero difieren un poco respecto a las eficiencias reportadas por Patel, sin embargo la tendencia de consumo es la misma reportando consumos superiores al 50%. Este comportamiento va ir relacionado con la concentración final de biomasa ya que, el fósforo, al ser un ingrediente esencial para los mecanismos de conversión de energía interviene en los procesos de fotosíntesis y por ende en la producción de biomasa microalgal [63]; así, las concentraciones iniciales de la fuente de fosfatos como es el caso del estudio reportado por Patel tuvo influencia en la concentración final de biomasa y en nuestro estudio de la misma manera aunque no sea nuestro caso de investigación.

Los estudios de Patel, confirman lo investigado por otros autores [63], al concluir por un lado que el consumo de fosfatos va a depender de condiciones como el pH, la temperatura y la intensidad de luz a las que esté sometida la microalga y por otro lado con respecto al comportamiento de la fuente de fosfatos en microalgas, la cual hace énfasis en la capacidad de la microalga por almacenar fósforo en forma de polifosfatos como reserva de energía, capacidad que va a contribuir al crecimiento de biomasa y específicamente para nuestro caso de estudio podría favorecer la captación de Hg ya que este estudio encontró una relación entre el contenido de biomasa y la remoción de Hg.

Martinez et al. [61], estudiaron la eliminación de fósforo y nitrógeno en la microalga *Scenedesmus obliquus*, en aguas residuales a diferentes condiciones de temperatura y agitación reportando un consumo

de las fuentes de macronutrientes para la microalga de hasta 98 % para fosfatos y 100 % para nitratos. Para el caso de la fuente de fosfatos observaron que el medio de cultivo presentó una disminución notoria de P las primeras horas que no lo relacionan con un consumo por parte de la microalga sino a una adsorción en la paredes de las células y en el recipiente, fenómeno que se ha explicado por otros autores y han encontrado que este comportamiento va a depender de la concentración y el área superficial, resultados que pueden observarse en la presente investigación donde se observa una disminución rápida de la fuente de fosfatos, comportamiento que fue comprobado por medio del método del ácido ascórbico para la determinación de la concentración de fosfatos.

Por otro lado al igual que en esta investigación el consumo de fosfatos en ningún caso fue del 100 % y por el contrario se experimentó una lisis celular en el contenido de P, liberando su contenido en el medio de cultivo, fenómeno que fue reportado por Droop [64] y que los autores atribuyen a un envejecimiento de las células aunque esta explicación no va de la mano con la curva de crecimiento tanto para los autores como para esta investigación quienes asocian la ruptura celular con el pH del medio cuando alcanza valores por encima de 10.

Delgadillo et al. [65], evaluaron el efecto de la temperatura, el pH y la intensidad lumínica en la producción de biomasa y eliminación de fósforo y nitrógeno a partir de un consorcio nativo de microalgas-bacterias en aguas residuales. Estos resultados al igual que los de Martinez en su trabajo y que la presente investigación reportó que la concentración de fosfatos aumenta en el medio de cultivo luego de un tiempo determinado. Sus estudios argumentaron que podría deberse a una ruptura celular que libera el contenido de fosfatos intracelular en el medio como lo reporta Martinez en su trabajo y que en esta investigación se experimentó de la misma manera de acuerdo a las concentraciones de inóculo y Hg a las que estuvo expuesta la microalga. Un factor importante en el trabajo de Delgadillo fue el pH, el cual reportó que a medida que aumenta el pH es posible experimentar precipitación de P y a su vez favorece su consumo comportamiento que se podría asociar a este trabajo. En esta investigación se midió pH cada 24 y se reportó que los cultivos de *Scenedesmus* empezaron en un pH promedio de 7,0 y aumentó con el tiempo en promedio 7,0-9,0 y hasta 10,0 para las concentraciones más altas de inóculo y Hg, que, siendo así se podría intuir que la microalga también tuvo un comportamiento similar que el reportado por Delgadillo respecto a este factor.

Consumo de nitratos

El nitrógeno, al igual que el carbono y el fósforo son nutrientes limitantes en el crecimiento microalgal los cuales deben estar presentes en el cultivo a las proporciones adecuadas para asegurar la producción de proteínas y metabolitos primarios importantes en la división celular y por consiguiente en el crecimiento de la microalga [66].

La evaluación de las cinéticas, Figura 3.6, mostraron una velocidad de consumo promedio de $0,005 \text{ día}^{-1}$ con agotamiento de la fuente aproximadamente en el día 13 para la concentración de 70 mg/l y en el día 10 para las concentraciones de 145 y 225 mg/l . Para los ensayos con Hg no se presentó un consumo homogéneo ya que comparado con las muestras control presentaron mucha varianza y desviación para todas las concentraciones iniciales de biomasa y mercurio. Estas variaciones podrían deberse a la variabilidad inherente del método ya que este genera ruido al momento de trabajar, ocasionado además por la presencia de Hg en el medio CHU-13, el cual tiene efectos en el metabolismo de la microalga que genera cambios en la estructura bioquímica de la microalga.

El consumo de nitratos presentó un comportamiento muy diferente al consumo de la fuente de fosfatos, como se observa en la Figura 3.6. Los resultados muestran que para la muestra control, los nitratos son consumidos en su totalidad por la microalga independientemente de la concentración de inóculo pero cuando la microalga se encuentra con Hg las tendencias del consumo es poco controlable y varía de acuerdo a la concentración de Hg ya que a bajas concentraciones de Hg ($2,5 \text{ mg/l}$ y 5 mg/l) la microalga experimentó mayores variaciones en su cinética de consumo.

El fenómeno experimentado, al igual que para la fuente de fosfatos, se atribuye a cambios intracelulares y posiblemente fenómenos de flujo a nivel de la célula al ser expuesta a un agente contaminante como

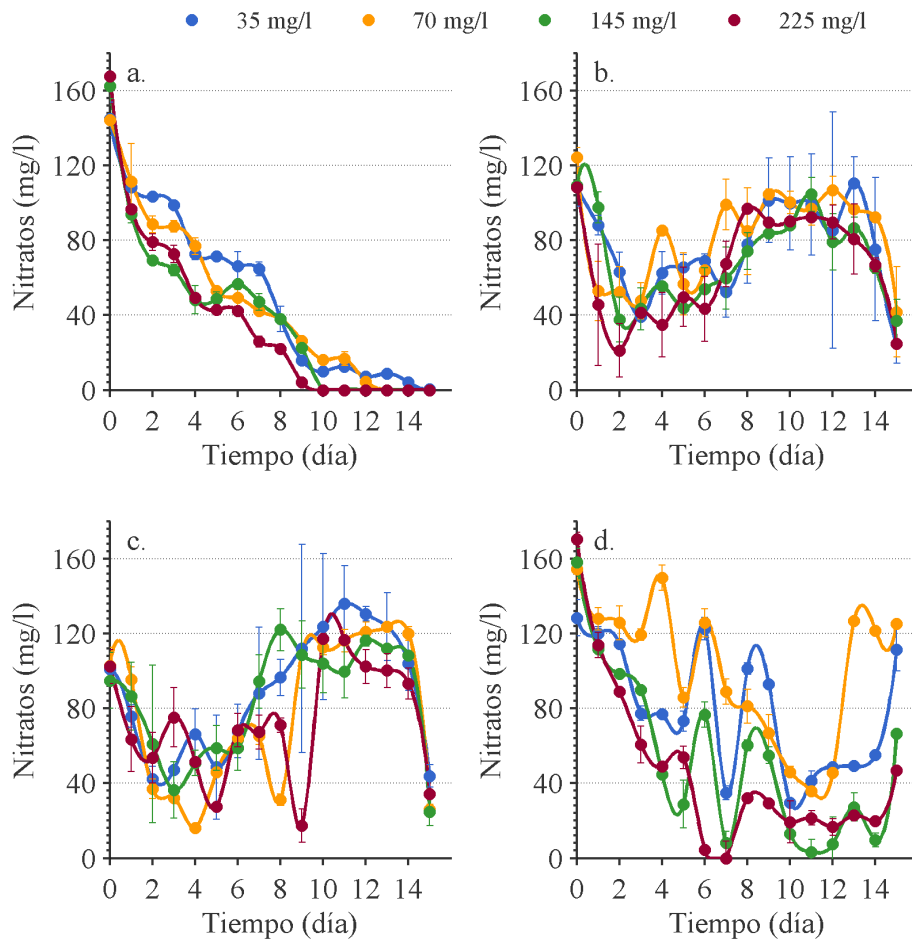


Figura 3.6: Cinéticas de consumo de nitratos de la microalga *Scenedesmus* sp. **a.** Muestra control 0mg/l de Hg. **b.** curvas a $2,5\text{g/l}$ de Hg. **c.** 5mg/l de Hg. **d.** $7,5\text{g/l}$ de Hg.

es el Hg. Finalmente, se evidenció gráficamente que la velocidad de consumo fue mayor dependiendo de la concentración de inóculo, es decir, para la concentración de inóculo de $7,5\text{ mg/l}$ tanto la muestra control, que reportó el agotamiento de nitratos al día nueve, como los demás ensayos experimentaron una velocidad de consumo mayor.

Estos resultados son similares a los realizados por Shi et al. [67], quienes evaluaron la eliminación de nitrógeno y fósforo de aguas residuales usando dos microalgas inmovilizadas, una de ellas una especie de *Scenedesmus*. Los resultados reportados por los autores describe el mayor consumo de nitratos en el día cuatro con una concentración de $0,10\text{ mg/l}$, que, comparando sus resultado con este estudio se observó un agotamiento de la fuente de nitratos para las muestras control aproximadamente en el día nueve con un consumo del 100% . Para los demás ensayos se reportó, que la mayor concentración de consumo fue de $0,3\text{ mg/l}$ correspondiente a la concentración de inóculo de 35 mg/l . Al final del experimento los autores reportaron una eficiencia de consumo del 96% a los nueve días, resultados similares en este trabajo los cuales reportan una eficiencia para el mayor consumo de $99,7\%$ en el día nueve correspondiente a la concentración de inóculo de 35 mg/l . Para las demás concentraciones se evidenció una concentración final de la fuente de nitratos promedio de $5,7\text{ mg/l}$ sin importar las condiciones de inóculo ni Hg.

Delgadillo et al. [65], reportó que frente al consumo de nitratos, las microalgas asimilan diferentes fuentes de nitrógeno y que este consumo va a depender de condiciones como la temperatura y el fotoperiodo el cual va a ser favorecido a altas temperaturas y fotoperiodos de luz, sus estudios describieron que a

temperaturas mayores hubo mayor absorción de la fuente de N y por consiguiente un crecimiento de la microalga que conlleva a un aumento en el pH. Para nuestra investigación, las cinéticas de consumo mostraron un agotamiento de la fuente de N para las muestras control al igual que en Delgadillo, comportamiento que cambia un poco cuando hay presencia de Hg y que se relaciona con los cambios en los mecanismos de absorción de nutrientes que experimenta la microalga cuando está en contacto con el metal. En general, los porcentajes de consumo son similares en ambas investigaciones, entre el 72%-83% para Delgadillo y aproximadamente de 68% en presencia de Hg y 99% sin Hg.

Taziki et al.[68], describió las diferentes formas de captación de nitratos por partes de microalgas y concluyó que las microalgas poseen una alta capacidad para eliminar nitratos gracias a sus ciclos biogeológicos los cuales son los responsables de producir compuestos con estados de oxidación favorables para la captación de nitratos. Estos procesos biológicos son más eficientes en las microalgas ya que requieren de relaciones menores de N/P/C lo que se ve reflejado en una recuperación de agua y nutrientes mucho menor y en un área superficial. Resultado que permitió esclarecer la importancia del uso de microalga en la problemática actual como un tratamiento terciario para la eliminación de compuestos orgánicos como nutrientes para las microalgas. Este trabajo además, discutió acerca de las condiciones de cultivo y su influencia en el consumo de nitratos como es el pH, intensidad de luz, fotoperiodo y concentración de N; lo que permitió comparar varios trabajos ya realizados (Wu et al. [69]) con el presente y se encontró que la fuente de nitratos se agota en promedio a los 7 días para los trabajos mencionados y al día nueve para la presente investigación con caídas bruscas como se muestra en las figuras correspondientes a las concentraciones de Hg de 2,5 y 5 mg/l a todas las concentraciones de inóculo.

Evaluación del efecto de la concentración inicial de biomasa sobre la remoción de mercurio

La estimación de Hg presente en un medio de cultivo de microalga *Scenedesmus* sp., realizada por medio de espectroscopia de absorción atómica permitió medir la concentración del metal y el porcentaje de remoción que obtuvo la microalga, el cual reportó valores mayores al 91,2 de Hg removido en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos de los análisis de AA mostraron que la microalga *Scenedesmus* sp., respondió favorablemente al medio de cultivo contaminado con el metal y removió altos porcentajes de Hg sin importar cada una de las concentraciones evaluadas, como se observa en la Figura 3.7.

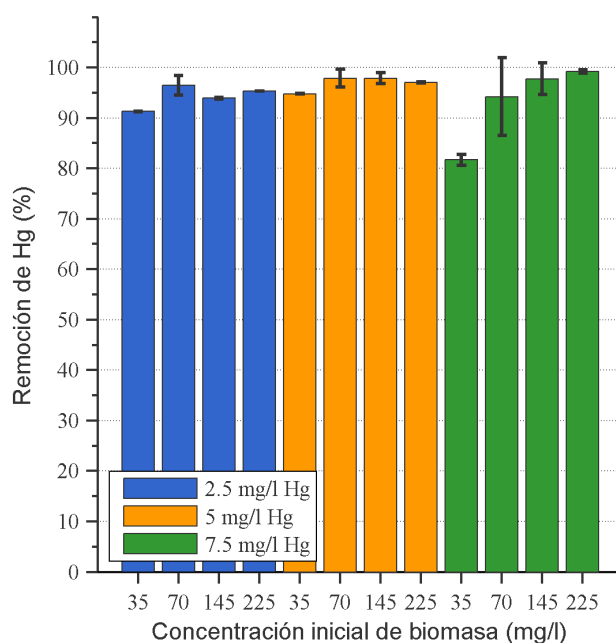


Figura 3.7: Porcentaje de remoción de Hg

Estos resultados fueron validados con el análisis estadístico planteado en la matriz metodológica co-

respondiente a la variable respuesta para el porcentaje de remoción de Hg. Al igual que el análisis para la concentración final de biomasa, en la Tabla 3.14, es posible observar el modelo de efectos fijos correspondiente al porcentaje de remoción de Hg planteado a partir del supuesto de cada hipótesis y al modelo general de efectos simples.

Tabla 3.14: Modelo de efectos fijos para la remoción de Hg.

Parámetro	Estimado	Valor P
μ	91,282	2,99e-16
Hg (7,5)	-9,609	0,000764
Inóculo (70)	5,182	0,03283
Hg-Inóculo (7,5-70)	8,554	0,01561
Hg-Inóculo (7,5-145)	13,447	0,000829
Hg-Inóculo (7,5-225)	13,469	0,000818

Los resultados descritos anteriormente permite observar cuales son los factores relevantes en el porcentaje de remoción de Hg. Se presentaron efectos significativos para la concentración de inóculo de 70mg/l y para la concentración inicial de Hg de $7,5\text{mg/l}$, mientras que las interacciones entre los niveles de los factores fueron significativas para las combinaciones a concentración inicial de Hg de $7,5\text{mg/l}$ e inóculo de $70, 145\text{y}225\text{mg/l}$, las demás posibles interacciones no tuvieron efectos significativos, lo que mostró un efecto importante en la interacción entre los factores a la mayor concentración de Hg. Este modelo representó adecuadamente el porcentaje de remoción, el cual se confirma con el coeficiente de correlación ajustado, $R2(\text{ajustado}) = 0,80$. Además, permitió realizar el análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de remoción de mercurio como se muestra en la Tabla 3.15, con un nivel de significancia definido para el experimento de $\alpha = 0.05$.

Tabla 3.15: ANOVA porcentaje remoción de mercurio

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Concentración de Hg	0.005014	2	5.428	0.02094
Inóculo	0.25638	3	18.506	0.0000851
Hg-Inóculo	0.017499	6	6.315	0.00342
Residuales	0.005542	12		

Como se muestra en el análisis de varianza (ANOVA), todos los factores presentaron diferencias significativas incluyendo la interacción Hg-inóculo. Como se puede observar la concentración de inóculo es el factor con mayor significancia con un valor $p = 8,51e - 05$, lo que indicaría que la concentración de inóculo es el factor con mayor influencia en el porcentaje de remoción de Hg. Este resultado confirma la estrecha relación que existe entre la concentración de inóculo, el Hg en el medio y la capacidad de la microalga por remover Hg. Al igual que en el análisis para la concentración final de biomasa, se analizaron solamente los efectos simples y no los efectos principales, el cual se realizó con base en la interacción inóculo-Hg evaluando el efecto del inóculo a cada uno de los niveles de mercurio.

Los resultados del análisis de los efectos simples sugirió la realización de una comparación por parejas para el nivel de Hg de $7,5\text{mg/l}$ con el fin de evaluar la diferencia entre medias basado en el test de *Holm* de comparaciones múltiples. Los resultados de las comparaciones múltiples se muestran en la Figura 3.8.

En la Figura 3.8 se describe el resultado del test de comparaciones múltiples y se observa que para las dos concentraciones más bajas de mercurio no hubo diferencias significativas, es decir, que todas las concentraciones de inóculo remueven la misma cantidad de Hg en promedio. Para la concentración de $7,5\text{mg/l}$ de Hg se obtuvo una remoción significativamente menor a la concentración de 35mg/l de inóculo, lo que indicaría que la microalga necesita concentraciones mayores de inóculo para garantizar una remoción más alta. Este resultado coincide con el encontrado en las cinéticas de crecimiento analizadas en donde las concentraciones más bajas de inóculo a concentraciones altas de Hg mostraron efectos inhibitorios más fuertes indicando la existencia de una relación máxima entre la concentración de Hg e inóculo sobre la cual se generan porcentajes de remoción más bajos.

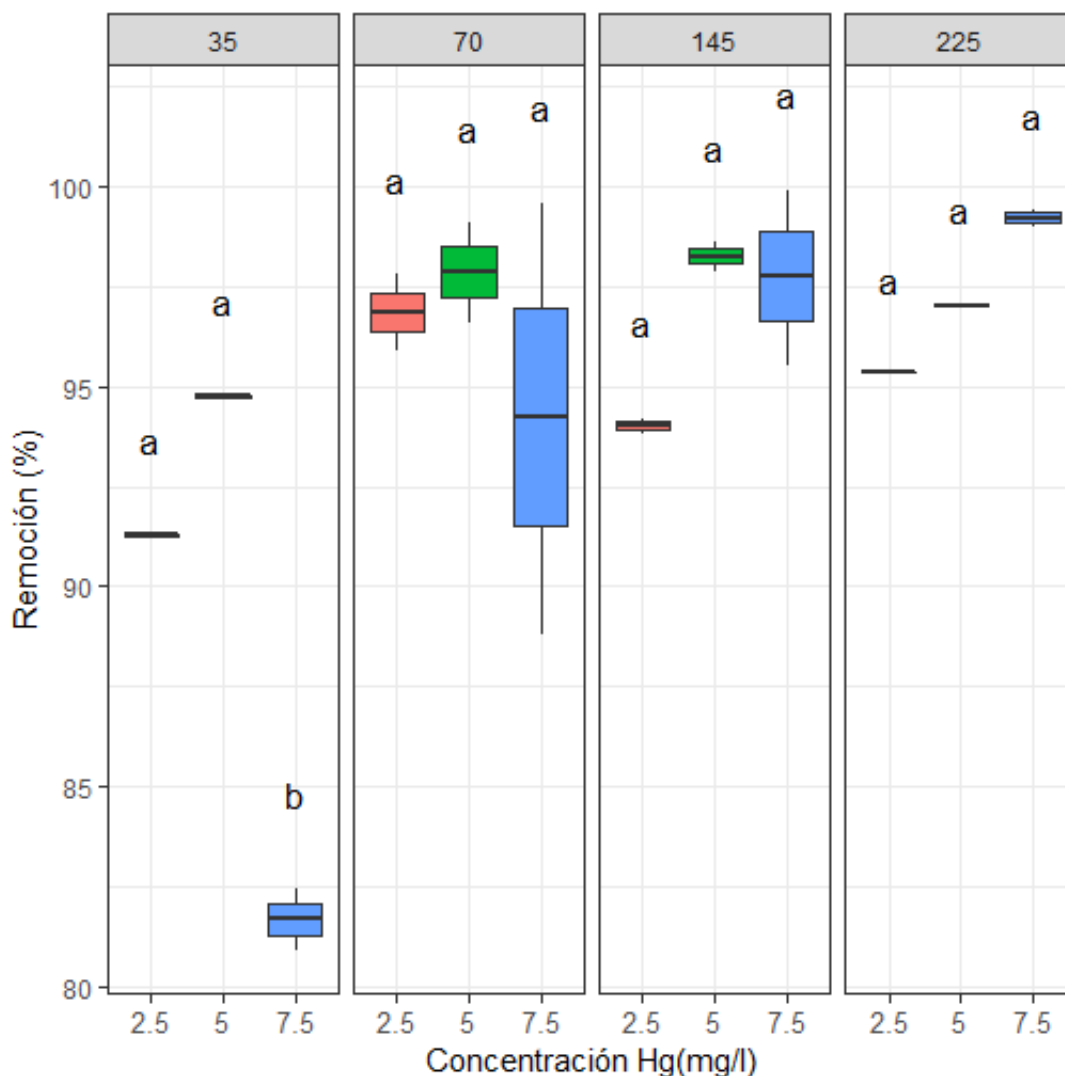


Figura 3.8: Cinéticas de consumo de fosfatos de la microalga *Scenedesmus* sp. **a.** Muestra control a 0 *mg/l* de Hg. Curvas **b.** 2,5 *mg/l* de Hg. **c.** 5 *mg/l* de Hg. **d.** 7,5 *mg/l* de Hg.

Estas representaciones gráficas de comparaciones múltiples mostraron que el porcentaje de remoción de Hg es mayor a medida que la concentración de inóculo aumenta, de la misma manera, presenta una tendencia de remoción proporcional a la relación Inóculo-Hg. El porcentaje de remoción promedio para todos los ensayos fue de 95,3%, donde la concentración que presentó mayor porcentaje de remoción fue de 99,96% correspondiente a la concentración de 145 *mg/l* para el inóculo y 7,5 *mg/l* para el Hg. Fue interesante observar en esta representación gráfica que a concentraciones mayores de Hg la distribución de los datos fue menos homogénea lo que posiblemente reflejó un efecto perjudicial del metal en el metabolismo de la microalga y por tal razón la inhibición del crecimiento.

Estos resultados coinciden con los reportados por Capolino et al. [56], quienes investigaron la toxicidad por cloruro de mercurio en dos cepas de *Chlorella* y una de *Scenedesmus* (aisladas) de biomasa viva y muerta en aguas contaminadas de Toscana (Italia). Las dos cepas de la microalga *Scenedesmus* fueron sometidas a una concentración de inóculo de 32 *mg/l* y a diferentes concentraciones de cloruro de mercurio (0, 0,5, 1,0, 2,5 y 5 μ/g). Sus estudios reportaron un mayor porcentaje de remoción para la especie *acutus* con un porcentaje de remoción de 68% ya fuera para biomasa viva o muerta, estos resultados fueron el punto de partida para la presente investigación y permitieron contrastar todos los comportamientos que presentó nuestra especie de *Scenedesmus* con las estudiadas por Capolino. A pesar de trabajar con especies y concentraciones tanto de biomasa y Hg diferentes se observó el mismo

efecto cuando se someten las microalgas a concentraciones altas de Hg de 5 $\mu\text{g/l}$ y 32 mg/l de biomasa para Capolino y 225 mg/l de inóculo 7,5 mg/l de Hg; en ambos casos el crecimiento de biomasa se ve afectado de forma negativa debido al efecto inhibitorio del Hg ya que este limita el ciclo celular produciendo cambios en el metabolismo de la microalga y se concluyó al igual que en esta investigación que incluso la concentración más baja de Hg generó una reducción significativa en el crecimiento.

Este estudio fue muy interesante para la presente investigación dado que tanto en los estudios previos como en la experimentación se observaron comportamientos similares por parte de las cepas, como fue la despigmentación de los cultivos a ciertas concentraciones de Hg, la precipitación de Hg causada por el pH del medio, el polimorfismo de *Scenedesmus* a lo largo de cada día de exposición al metal y la viabilidad celular para los estudios previos y el efecto inhibitorio altamente perjudicial para la microalga, las cinéticas de crecimiento y el porcentaje de remoción para la experimentación.

Monteiro et al. [70], evaluaron el crecimiento y la remoción de Zn y Hg a partir de microalgas silvestres de suelos que contenían metales pesados de una zona industrial al norte de Portugal, sus estudios reportaron una eliminación máxima de Hg de 335 $\mu\text{g/l}$ en un total de 350 $\mu\text{g/l}$, es decir, 95,7% y en general a todas las concentraciones probadas un rango de 93-98% de remoción. Aunque se trabajaron especies de *Scenedesmus* diferentes y las concentraciones trabajadas en este trabajo fueron menores en comparación a las empleadas en esta investigación, se obtuvo una eliminación máxima de Hg de 2,9 mg/l en un total de 7,5 mg/l en un medio de cultivo con una concentración de inóculo de 145 mg/l , es decir, 99% de remoción. Con respecto al efecto inhibitorio en ambas investigaciones se puede concluir que el crecimiento de biomasa en presencia de Hg inhibió significativamente sin importar la concentración de Hg, incluso para concentraciones de Hg tan bajas como 25 $\mu\text{g/l}$.

Shanab et al. [26], aislaron diferentes microalgas y evaluaron la tolerancia y eliminación de tres metales, los resultados obtenidos para *Scenedesmus* contaminada con Hg reportaron que este metal fue el más tóxico actuando como inhibidores metabólicos incluso a la concentración más baja que para ellos fue de 5 mg/l , resultados que apoyan esta investigación al observar que a la concentración de Hg más baja (2,5 mg/l) también afectó el metabolismo de la microalga. Shanab et al., reportó un porcentaje máximo de remoción de 97% muy similar al de esta investigación que se reportó de 99%.

Elección del mejor tratamiento

A partir de los resultados obtenidos en las cinéticas y el diseño experimental se eligió como mejor tratamiento el ensayo correspondiente a la concentración de 225 mg/l para el inóculo y 5 mg/l para el mercurio. Esta condición se seleccionó ya que a estas concentraciones la microalga no entra a su fase de muerte antes del tiempo esperado lo que permitió ver como la microalga *Scenedesmus* toleró la presencia de Hg en el medio de cultivo logrando un crecimiento favorable y a la vez un porcentaje de remoción alto.

El análisis estadístico no encontró diferencias significativas en ningún ensayo de acuerdo al porcentaje de remoción en función de la concentración inicial de biomasa ni para la de mercurio; sin embargo, si se observó que para la concentración más alta de mercurio (7,5 mg/l) y más baja de inóculo (35 mg/l) la microalga no tuvo un crecimiento favorable y el porcentaje de remoción es bajo comparado con los demás ensayos. Por esta razón se eligió la concentración de inóculo y de mercurio que asegure el crecimiento de biomasa y un porcentaje de remoción de Hg favorable, que, de acuerdo con las cinéticas de crecimiento reportadas para esta investigación y con una deseabilidad establecida de un 80% para el porcentaje de remoción de mercurio y un 20% para el crecimiento de biomasa, se encontró que las mejores condiciones de cultivo para este rango porcentual es a una concentración de 225 mg/l para el inóculo y 5 mg/l para el mercurio.

Esta condición estuvo basada en el concepto de optimización de variables estadísticas, donde se analizó el diseño factorial empleado en esta investigación en términos numéricos y se obtuvo que la mejor relación inóculo-Hg es la mencionada. Dadas estas condiciones, se llevó a cabo la validación de la presente investigación con el fin de poder describir y predecir las cinéticas de crecimiento de biomasa, consumo de sustratos y porcentaje de remoción de mercurio a partir de un modelo matemático no

estructurado, ver capítulo III.

3.6 Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo de investigación permitieron observar que hay una fuerte relación inóculo-Hg tanto en el crecimiento celular como en el porcentaje de remoción, la interacción más significativa fue al trabajar con la concentración más baja de inóculo (35 mg/l) y más alta de Hg (7,5 mg/l) la cual disminuyó el crecimiento celular en un 24,38% , comportamiento causado por la presencia de Hg el cual actúa como un agente inhibidor en el crecimiento celular de *Scenedesmus* sp y que afectó la viabilidad del tratamiento biológico, factor que se midió en términos de viabilidad celular, biomasa, velocidad específica de crecimiento y absorbancias. Para el caso del porcentaje de remoción a estas mismas condiciones se evidenció una remoción de 81 %, valor un poco bajo en comparación al porcentaje máximo de remoción.

Respecto al consumo de nutrientes y procesos metabólicos de *Scenedesmus* sp, se observó que la presencia de Hg afecta tanto el consumo de nutrientes como el metabolismo de la microalga debido a que la eficiencia de los aparatos fotosintéticos se asocian con el metabolismo del nitrógeno y este a su vez con la tolerancia de metales pesados, razón por la cual se concluye que la toxicidad de estos inhibidores metabólicos afecta tanto a los carbohidratos como a las proteínas.

Los resultados experimentales reportados permitieron concluir que la microalga *Scenedesmus* sp., requerirá mayores concentraciones para la remoción de mercurio a medida que la concentración de mercurio también sea mayor, ya que a mayor crecimiento de biomasa mayor fijación de Hg, es decir mayor área superficial para que el Hg se fije a la pared celular de la microalga, sin embargo, es importante tener en cuenta que es una relación que va a depender de las condiciones ambientales a las que esté expuesta la microalga y, que además, es necesario conocer la relación inóculo-Hg adecuada para no llegar a la muerte de la microalga. Para esta investigación, se encontró para la condición seleccionada como el mejor tratamiento, es decir, una concentración de inóculo de 225 g/l y una concentración inicial de Hg de 7,5 g/l que por cada gramo de microalga se removió 0,261 $g_{Hg}/g_{biomasa}$.

Adicional, parámetros como la temperatura y el pH son importantes para la velocidad específica de crecimiento, por ejemplo, a altas temperaturas se ve favorecido el crecimiento y la absorción de nutrientes como el nitrógeno, lo que se traduce en una velocidad de crecimiento mayor. En este estudio se observó que el pH se aumentó al correr de los días pero la velocidad de crecimiento no, este efecto podría ser causado porque la remoción de Hg es una combinación entre los procesos de biosorción y bioacumulación, donde una vez se inicia el proceso de bioacumulación la velocidad de crecimiento disminuye.

Los estudios previos mostraron que el pH podría afectar la protonación de los grupos funcionales en la biomasa así como la química del metal mostrando un efecto en la capacidad de adsorción del Hg en la microalga. En el caso de estudio se observó que a medida que la concentración de la solución de Hg aumentaba (150-650 mg/l), el pH experimentaba en primer lugar un aumento de 2,5 a 8,4 y luego una disminución fuerte, aproximadamente de 7,4 a 2,9, comportamiento que dio lugar a la precipitación de hidróxidos metálicos insolubles que restringieron la adsorción de Hg y causó despigmentación de la microalga, fenómeno que se asocia a la muerte celular.

Este resultado permite concluir que la microalga no resiste concentraciones en ese rango de operación y no es favorable para llevar a cabo remoción de Hg ya que no solo provoca la muerte de esta sino cambios en el metal como es la formación de hidroxilos causados por las diferencias de pH entre la microalga y el metal.

Es importante resaltar que aunque los procesos de biosorción tienen lugar con biomasa muerta, las microalgas vivas aportan ventajas respecto a la captación metabólica y al crecimiento continuo, condición que permite a la microalga tener cultivos con células jóvenes y por consiguiente un mayor crecimiento, es decir, mayor captación de metales.

Independientemente del mecanismo de captación de Hg se concluye que este metal afecta en todos los procesos fisicoquímicos de la microalga *Scenedesmus* sp, como es la inhibición de biosíntesis de clorofila a, que sin importar la concentración de Hg disminuye la producción de pigmentos como carotenos.

3.7 Recomendaciones

Los resultados encontrados permiten tener una luz hacia posibles estudios futuros enfocados en la remoción de sustancias contaminantes y biorremediación del medio ambiente a partir de microalgas. Dado estas posibilidades, este trabajo de investigación sugiere algunos estudios interesantes para dar continuación al tema de estudio como realizar un sistema multicomponente con el fin de evaluar el efecto de varios metales ya que en ocasiones estos se encuentran mezclados en las corrientes de desechos industriales, además, sería interesante evaluar la competencia entre metales dentro de un medio que contenga microalgas y así mismo estudiar los rendimientos de remoción de metales pesados.

Estos estudios podrían conducir a realizar experimentaciones con aguas residuales y si fuese así daría la posibilidad de un nuevo estudio como evaluar la remoción de P y N contenidos en estas mismas aguas residuales ya que se conoce que las microalgas poseen alta capacidad para eliminar compuestos de fósforo y nitrógeno convirtiéndolos en biomasa por medio de su consumo proporcionando así alternativas eficientes para el tratamiento de aguas tanto en remoción de metales como en la de cargas de fósforo y nitrógeno.

Es importante recalcar, que el método para el consumo de nutrientes por parte de la microalga en presencia de Hg no fue homogéneo y debido al efecto del metal en la bioquímica de *Scenedesmus*, se hace importante estudiar el efecto intracelular del Hg en el consumo de nutrientes como la fuente de fosfatos y nitratos y las concentraciones adecuadas teniendo en cuenta la presencia del metal, al igual que el considerar que algunos nutrientes son limitantes, lo que sugiere estudiar relaciones C/P/N.

Otro fenómeno interesante que se propone revisar es la evaluación a la tolerancia y resistencia del Hg a las condiciones de trabajo ya que son comportamientos diferentes que genera la microalga de acuerdo a las condiciones a las que esté sometida y así poder evaluar si hay un momento en el que el Hg ya no afecte más a la microalga, ya que por ejemplo en la presente investigación se observó que a las concentraciones más altas de inóculo (145 y 225 mg/l) con la concentración más alta de Hg (7,5 mg/l), la cinética de crecimiento experimentó la misma tendencia.

Finalmente, se ha observado que la biosorción de iones de metales pesados ocurre en dos etapas, una etapa pasivo inicial que corresponde a una absorción rápida (rangos de tiempo de minutos) gracias a adsorción de la superficie en los componentes de la pared celular, como son los grupos carboxilo, amina, hidroxilo, fosfato. La otra etapa corresponde a un proceso activo pero lento de absorción (rangos de tiempo de días y hasta meses) donde ocurre el transporte de membrana de los iones metálicos al citoplasma de la célula; lo que hace interesante evaluar y comparar el porcentaje de remoción de Hg en estas dos etapas con el fin de determinar qué proceso es más viable de acuerdo al objetivo del estudio.

3.8 Referencias bibliográficas

- [1] A. Pellón, J. Frades, A. Chacón, E. Pérez, A. Oña, M. D. C. Espinosa, C. Ramos, R. Mayarí y R. Escobedo, «Eliminación de cromo y cadmio mediante *Scenedesmus obliquus* en estado inmovilizado.», *Revista CENIC Ciencias Químicas*, vol. 36, n.º 3, págs. 175-180, 2005, ISSN: 10158553.
- [2] I. Priyadarshani, D. Sahu y B. Rath, «Microalgal bioremediation: Current practices and perspectives», *Journal of Biochemical Technology*, vol. 3, n.º 3, págs. 299-304, 2012.
- [3] C. Tejada, Á. Villabona y L. Garcés, «Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico Adsorption of heavy metals in waste water using biological materials», *Tecnológicas*, vol. 18, n.º 34, págs. 123-7799, 2015, ISSN: 01237799.

- [4] M. M. Areco y M. Dos Santos, «Biosorción , una técnica sustentable para la remoción de metales pesados de efluentes contaminados», *Las fronteras de la física y química ambiental en Ibero América*, n.º enero 2008, págs. 123-127, 2008.
- [5] V. K. Gupta y A. Rastogi, «Biosorption of lead from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species: Kinetics and equilibrium studies», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 152, n.º 1, págs. 407-414, 2008, ISSN: 03043894.
- [6] V. K. Gupta y A. Rastogi, «Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium* sp. from aqueous phase», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 153, n.º 1-2, págs. 759-766, 2008, ISSN: 03043894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.09.021.
- [7] W. O. Wan Maznah, A. T. Al-Fawwaz y M. Surif, «Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia», *Journal of Environmental Sciences (China)*, vol. 24, n.º 8, págs. 1386-1393, 2012, ISSN: 10010742. DOI: 10.1016/S1001-0742(11)60931-5. dirección: [http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60931-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60931-5).
- [8] R. O. Canizares-villanueva, F. Martínez-jeronimo y F. Espinosa-chavez, «Acute toxicity to *Daphnia magna* of efluentes containing Cd, Zn, and a mixture Cd-Zn, after metal removal by *Chlorella vulgaris*», *Environ. Toxicol.*, vol. 15, págs. 160-164, 2000.
- [9] J. M. Peña-Castro, F. Martínez-Jerónimo, F. Esparza-García y R. O. Camizares-Villanueva, «Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures», *Bioresource Technology*, vol. 94, n.º 2, págs. 219-222, 2004, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.12.005.
- [10] J. M. Peña-Castro, F. Martínez-Jerónimo, F. Esparza-García y R. O. Cañizares-Villanueva, «Phenotypic plasticity in *Scenedesmus incrassatulus* (Chlorophyceae) in response to heavy metals stress», *Chemosphere*, vol. 57, n.º 11, págs. 1629-1636, 2004, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.06.041.
- [11] C. Quevedo, S. P. Morales y a. Acosta, «*Scenedesmus* sp GROWTH IN DIFFERENT CULTURE mediums FOR MICROALGAL PROTEIN PRODUCTION», *VitaeRevista De La Facultad De Química Farmaceutica*, vol. 15, págs. 25-31, 2008, ISSN: 01214004.
- [12] R. A. Anderson, *Algal Culturing Techniques, 1st Edition*, 9. 2005, vol. 53, págs. 1-596, ISBN: 9788578110796. DOI: 10.1017/CB09781107415324.004. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [13] M. Lurling y P. B. Journals, «The effect of substances from different zooplankton species and fish on the i ...», vol. 25, n.º February, 2003.
- [14] SEMS, *Bioquímica y aplicaciones con Scenedesmus sp.* dirección: <http://www.seaweed.es/productos/scenedesmus/> (visitado 20-06-2010).
- [15] J. A. Acevedo y J. J. Ramírez, «Influencia De Un Gradiente Cruzado De Luz Y Temperatura», *Actual Biol*, vol. 25, n.º 79, págs. 141-145, 2003.
- [16] F. R. Trainor, J. R. Cain y L. E. Shubert, «Morphology and nutrition of the colonial green alga *Scenedesmus*: 80 years later», *The Botanical Review*, vol. 42, n.º 1, págs. 5-25, 1976, ISSN: 00068101. DOI: 10.1007/BF02860860.
- [17] P. F. Egan y F. R. Trainor, *The role of unicells in the polymorphic Scenedesmus armatus (Chlorophyceae)*, 1989.
- [18] M. L. Shuler y F. Kargi, «Bioprocess engineering: Basic concepts», *Journal of Controlled Release*, pág. 293, 2002, ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/0168-3659(92)90106-2. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [19] A. Fargasova, A. Bumbalova y E. Havranek, «Ecotoxicological effects and uptake of metals (Cu⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Mo⁶⁺, Ni²⁺, V⁵⁺) in freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*», *Chemosphere*, vol. 38, n.º 5, págs. 1165-1173, 1999, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/S0045-6535(98)00346-4.
- [20] M. Lurling, «Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive», vol. 39, n.º 2, págs. 85-101, 1997.

- [21] M. T. Monteiro, R. Oliveira y C. Vale, «Metal stress on the plankton communities of Sado River (Portugal)», *Water Research*, vol. 29, n.º 2, págs. 695-701, 1995, ISSN: 00431354. DOI: 10.1016/0043-1354(94)00156-2.
- [22] T. A. Davis, B. Volesky y A. Mucci, «A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae», *Water Research*, vol. 37, n.º 18, págs. 4311-4330, 2003, ISSN: 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00293-8.
- [23] J. H. Duffus, «“ HEAVY METALS ”— A MEANINGLESS TERM ? (IUPAC Technical Report) (IUPAC Technical Report)», vol. 74, n.º 5, págs. 793-807, 2002.
- [24] C. F. Aragón-tobar, «Diseño a escalas laboratorio y piloto de un sistema de remediación electrocinética de suelos contaminados con metales pesados», *Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria*, vol. 34, n.º 1, 2014.
- [25] M. E. Hodson, «Heavy metals - Geochemical bogey men?», *Environmental Pollution*, vol. 129, n.º 3, págs. 341-343, 2004, ISSN: 02697491. DOI: 10.1016/j.envpol.2003.11.003.
- [26] S. Shanab, A. Essa y E. Shalaby, «Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates)», *Plant Signaling & Behavior*, vol. 7, n.º 3, págs. 392-399, 2012, ISSN: 1559-2316. DOI: 10.4161/psb.19173.
- [27] K. Suresh Kumar, H. U. Dahms, E. J. Won, J. S. Lee y K. H. Shin, «Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 113, págs. 329-352, 2015, ISSN: 10902414. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.019. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>.
- [28] R. Q. Yu y W. X. Wang, «Biokinetics of cadmium, selenium, and zinc in freshwater alga *Scenedesmus obliquus* under different phosphorus and nitrogen conditions and metal transfer to *Daphnia magna*», *Environmental Pollution*, vol. 129, n.º 3, págs. 443-456, 2004, ISSN: 02697491. DOI: 10.1016/j.envpol.2003.11.013.
- [29] P. A. Terry y W. Stone, «Biosorption of cadmium and copper contaminated water by *Scenedesmus abundans*», *Chemosphere*, vol. 47, n.º 3, págs. 249-255, 2002, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/S0045-6535(01)00303-4.
- [30] J. P. Cazon, «Remoción de metales pesados empleando algas marinas», Tesis doct., University Nacional de la Plata, 2012, pág. 158.
- [31] D. I. Caviedes, R. A. Muñoz, A. Perdomo, D. Rodríguez e I. Sandoval, «Treatments for Removal of Heavy Metals Commonly Found in Industrial Wastewater . A Review», vol. 13, n.º 1, págs. 73-90, 2015.
- [32] S. M. N. Chan, T. Luan, M. H. Wong y N. F. Y. Tam, «Removal and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Selenastrum capricornutum*», *Environmental Toxicology and Chemistry*, vol. 25, n.º 7, págs. 1772-1779, 2006, ISSN: 07307268. DOI: 10.1897/05-354R.1.
- [33] P. Cordy, M. M. Veiga, I. Salih, S. Al-Saadi, S. Console, O. Garcia, L. A. Mesa, P. C. Velásquez-López y M. Roeser, «Mercury contamination from artisanal gold mining in Antioquia, Colombia: The world's highest per capita mercury pollution», *Science of the Total Environment*, vol. 410-411, págs. 154-160, 2011, ISSN: 00489697. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2011.09.006.
- [34] R. Posada, «Procesos de bioremediación», págs. 1-160, 2012.
- [35] A. Baral y R. D. Engelken, «Chromium-based regulations and greening in metal finishing industries in the USA», *Environmental Science and Policy*, vol. 5, n.º 2, págs. 121-133, 2002, ISSN: 14629011. DOI: 10.1016/S1462-9011(02)00028-X.
- [36] J. He y J. P. Chen, «A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools», *Bioresource Technology*, vol. 160, págs. 67-78, 2014, ISSN: 18732976. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.01.068. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>.
- [37] C. Nava-Ruiz y M. Méndez-Armenta, «Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio)», *Archivos de Neurociencias*, vol. 16, n.º 3, págs. 140-147, 2011, ISSN: 10285938.
- [38] S. Das, *Microbial, Biodegradation and bioremediation*, 1.ª ed., S. Das, ed. London, England: Elsevier, 2014, pág. 643, ISBN: 9780128000212.

- [39] N. Sridhara Chary, C. T. Kamala y D. Samuel Suman Raj, «Assessing risk of heavy metals from consuming food grown on sewage irrigated soils and food chain transfer», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 69, n.º 3, págs. 513-524, 2008, ISSN: 01476513. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2007.04.013.
- [40] D. W. O'Connell, C. Birkinshaw y T. F. O'Dwyer, «Heavy metal adsorbents prepared from the modification of cellulose: A review», *Bioresource Technology*, vol. 99, n.º 15, págs. 6709-6724, 2008, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.01.036.
- [41] F. Fu y Q. Wang, «Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review», *Journal of Environmental Management*, vol. 92, n.º 3, págs. 407-418, 2011, ISSN: 03014797. DOI: 10.1016/j.jenvman.2010.11.011.
- [42] K. Chojnacka, A. Chojnacki y H. Górecka, «Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: Kinetics, equilibrium and the mechanism of the process», *Chemosphere*, vol. 59, n.º 1, págs. 75-84, 2005, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.005.
- [43] M. Eduardo, G. P. Mesa y J. Luis, «Procesos de membranas para el tratamiento de agua residual industrial con altas cargas del colorante amarillo ácido 23 Membrane processes for treatment of acid yellow color 23 highly loaded residual waters», págs. 53-63, 2006.
- [44] T. A. Kurniawan, G. Y. Chan, W. H. Lo y S. Babel, ISSN: 13858947. DOI: 10.1016/j.cej.2006.01.015. arXiv: S0043-1354(97)00147-4.
- [45] E. b. Goharshadi y M. Moghaddam, «Adsorption of hexavalent chromium ions from aqueous solution by graphene nanosheets: Kinetic and thermodynamic studies», *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 12, n.º 7, págs. 2153-2160, 2015, ISSN: 17351472. DOI: 10.1007/s13762-014-0748-z. dirección: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84930934548%7B%5C%7DpartnerID=40%7B%5C%7Dmd5=0c759149de4dcb31df86c241d7252ccc>.
- [46] K. Chojnacka, «Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications», *Environment International*, vol. 36, n.º 3, págs. 299-307, 2010, ISSN: 01604120. DOI: 10.1016/j.envint.2009.12.001. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>.
- [47] G. M. Gadd, «Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment», *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 84, n.º 1, págs. 13-28, 2009, ISSN: 02682575. DOI: 10.1002/jctb.1999.
- [48] G. Bayramoglu y M. Yakup Arica, «Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies», *Bioresource Technology*, vol. 100, n.º 1, págs. 186-193, 2009, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.050.
- [49] D. W. Darnall, B. Greene, M. T. Henzl, J. M. Hosea, R. a. McPherson, J. Sneddon y M. D. Alexander, «Selective recovery of gold and other metal ions from an algal biomass.», *Environmental science & technology*, vol. 20, n.º 2, págs. 206-8, 1986, ISSN: 0013-936X. DOI: 10.1021/es00144a018. dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22288814>.
- [50] L. Brinza, M. Dring y M. Gavrilescu, «MARINE MICRO AND MACRO ALGAL SPECIES AS BIOSORBENTS FOR HEAVY METALS», *Environmental Engineering and Management Journal*, vol. 6, n.º 3, págs. 237-251, 2007.
- [51] A. Hamdy, «Biosorption of Heavy Metals by Marine Algae», *Current Microbiology*, vol. 41, n.º 4, págs. 232-238, 2000, ISSN: 0343-8651. DOI: 10.1007/s002840010126. dirección: <http://link.springer.com/10.1007/s002840010126>.
- [52] H. V. Perales-Vela, J. M. Peña-Castro y R. O. Cañizares-Villanueva, «Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae», *Chemosphere*, vol. 64, n.º 1, págs. 1-10, 2006, ISSN: 00456535. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.11.024.
- [53] P. J. McGinn, K. E. Dickinson, K. C. Park, C. G. Whitney, S. P. MacQuarrie, F. J. Black, J. C. Frigon, S. R. Guiot y S. J. B. O'Leary, «Assessment of the bioenergy and bioremediation potentials of the microalga *Scenedesmus* sp. AMDD cultivated in municipal wastewater effluent in batch and continuous mode», *Algal Research*, vol. 1, n.º 2, págs. 155-165, 2012, ISSN: 22119264. DOI: 10.1016/j.algal.2012.05.001. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2012.05.001>.

- [54] A. L. Roa y R. O. Canizares, «Bioremediación de aguas con fosfatos y nitratos utilizando *Scenedesmus incrassatulus* inmovilizado», *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, vol. 10, n.º 1, págs. 71-79, 2012, ISSN: 0120-4211.
- [55] A. R. Rao, C. Dayananda, R. Sarada, T. R. Shamala y G. A. Ravishankar, «Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents», *Bioresource Technology*, vol. 98, n.º 3, págs. 560-564, 2007, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.02.007.
- [56] E. Capolino, M. Tredici, M. Pepi y F. Baldi, «Tolerance to mercury chloride in *Scenedesmus* strains», *BioMetals*, vol. 10, n.º 2, págs. 85-94, 1997, ISSN: 0966-0844. DOI: 10.1023/A:1018375005791.
- [57] H. D. R. Martinez, «Analysing interactions of fitted models», *Journal of Statistical Software*, vol. 59, n.º 4, págs. 1-20, 2015, ISSN: 1548-7660. DOI: <http://www.jstatsoft.org/v34/i02/>. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [58] R. C. Team, *Alenguage and environment for statistical computing*, vienna, Austria, 2018. dirección: <https://www.r-project.org/>.
- [59] D. Arredondo, Bertha Olivia Voltolina, *Métodos y herramientas analíticas en evaluación de biomasa microalgal*, Centro de, V. D. Arredondo Vega Bertha Olivia, ed. La Paz, Baja California. México: Centro de investigaciones biológicas del noroeste, S.C., 2007, pág. 98, ISBN: 968-5715-51-3.
- [60] D. Schmitt, A. Muller, Z. Csogor, F. H. Frimmel y C. Posten, «The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth», *Water Research*, vol. 35, n.º 3, págs. 779-785, 2001, ISSN: 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00317-1.
- [61] M. Martínez, «Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*», *Bioresource Technology*, vol. 73, n.º 3, págs. 263-272, 2000, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00121-2.
- [62] A. Patel, S. Barrington y M. Lefsrud, «Microalgae for phosphorus removal and biomass production: A six species screen for dual-purpose organisms», *GCB Bioenergy*, vol. 4, n.º 5, págs. 485-495, 2012, ISSN: 17571707. DOI: 10.1111/j.1757-1707.2012.01159.x.
- [63] N. Brown, S. Pratt, N. Powell, A. N. Shilton, S. Pratt e Y. Chisti, «Factors Influencing Luxury Uptake of Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilization Ponds Factors Influencing Luxury Uptake of Phosphorus by Microalgae in Waste Stabilization Ponds», vol. 42, n.º February 2016, págs. 5958-5962, 2008. DOI: 10.1021/es703118s.
- [64] M. R. Droop, «The nutrient status of algal cells in batch culture», *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, vol. 55, n.º 3, págs. 541-555, 1975, ISSN: 14697769. DOI: 10.1017/S0025315400017240.
- [65] L. Delgadillo-Mirquez, F. Lopes, B. Taidi y D. Pareau, «Nitrogen and phosphate removal from wastewater with a mixed microalgae and bacteria culture», *Biotechnology Reports*, vol. 11, págs. 18-26, 2016, ISSN: 2215017X. DOI: 10.1016/j.btre.2016.04.003. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.003>.
- [66] A. Beuckels, E. Smolders y K. Muylaert, «Nitrogen availability influences phosphorus removal in microalgae-based wastewater treatment», *Water Research*, vol. 77, págs. 98-106, 2015, ISSN: 18792448. DOI: 10.1016/j.watres.2015.03.018. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2015.03.018>.
- [67] J. Shi, B. Podola y M. Melkonian, «Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: An experimental study», *Journal of Applied Phycology*, vol. 19, n.º 5, págs. 417-423, 2007, ISSN: 09218971. DOI: 10.1007/s10811-006-9148-1.
- [68] M. Taziki, H. Ahmadzadeh, M. A. Murry y S. R. Lyon, «Nitrate and Nitrite Removal from Wastewater using Algae», *Current Biotechnology*, vol. 4, n.º 4, págs. 426-440, 2016, ISSN: 22115501. DOI: 10.2174/2211550104666150828193607.
- [69] Y. H. Wu, Y. Yu, X. Li, H. Y. Hu y Z. F. Su, «Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition», *Bioresource Technology*, vol. 112, págs. 193-198, 2012, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.037. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.037>.

- [70] C. M. Monteiro, T. R. Brandao, P. M. Castro y F. X. Malcata, «Modelling growth of, and removal of Zn and Hg by a wild microalgal consortium», *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 94, n.º 1, págs. 91-100, 2012, ISSN: 01757598. DOI: [10.1007/s00253-011-3826-x](https://doi.org/10.1007/s00253-011-3826-x).

Capítulo 4

Modelo de crecimiento para la microalga *Scenedesmus* sp. y remoción de mercurio

4.1 Introducción

Un modelo se define como la imitación de la realidad y un modelo matemático es una forma particular para representar aquella realidad con el fin de evaluar una situación control de naturaleza matemática [1]. Los modelos matemáticos en ingeniería de procesos se basan en la determinación de parámetros cinéticos dado que es una herramienta esencial en la investigación y el estudio del comportamiento de los microorganismos con la finalidad de escalar los procesos biotecnológicos, optimizar la producción industrial y reducir los costos en los diferentes procesos para la fabricación de nuevos productos y una serie de procesos especializados a través de la aplicación de microbiología [2]. La simulación de modelos cinéticos requiere ciertas características para su construcción, planteamiento y validación, tal como se muestra en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1: Características de la simulación para modelos cinéticos [1]

Características
<ul style="list-style-type: none">▪ Definir los límites de la región control.▪ Determinar los objetivos del proceso de simulación con el fin de plantear el problema.▪ Poseer y examinar la teoría necesaria mediante relaciones matemáticas tales como ecuaciones diferenciales y expresiones algebraicas.▪ Especificar el conjunto de variables del modelo las cuales sólo pueden cambiar de acuerdo con las ecuaciones del modelo.▪ Verificar la validez de los datos generados por el computador frente a los datos teóricos o experimentales expresados.

La aplicación de los diferentes lenguajes de modelación y simulación permiten a partir de ecuaciones de balance de materia, balance de energía, cinética y fenómenos de transporte representar el comportamiento de un proceso expresado en forma de ecuaciones matemáticas para entender y resolver un conjunto de ecuaciones que constituyen un modelo básico y que aportarán una solución numérica inmediata [3].

4.2 Marco teórico

4.2.1 Sistemas Biológicos

Los sistemas biológicos son todos aquellos organismos, células o biomoléculas que se encuentran organizadas de acuerdo a su estructura y funciones dentro de un ecosistema, estos sistemas biológicos se encuentran organizados en niveles de población, individuos, tejidos, órganos, células y compartimentos en moléculas y átomos que tiene como base la información genética que sirven de maquinaria celular para traducir cualquier estructura o función [4].

Los sistemas biológicos son jerárquicos y tienen la posibilidad de describir diferentes niveles de organización que hacen posible conocer la estructura de cada organismo incluyendo aspectos fundamentales de la actividad biológica, procesos evolutivos y diferentes escalas de organización celular; todo esto para cumplir funciones importantes de desarrollo, crecimiento y mantenimiento en diferentes condiciones ambientales, y así, hacer posible el uso de organismos modelo de una célula a otra y comprender la relación de cada uno de estos niveles [4], [5].

Sin embargo, existen fenómenos biológicos con procesos complejos que no es posible explicar a partir de ciertos principios o que varían de acuerdo a la especie. Estos fenómenos se pueden estudiar por medio de conceptos matemáticos, computacionales o teóricos [4]. El modelado matemático y la simulación puede ser una herramienta muy útil para comprender la naturaleza interna y la dinámica de aquellos procesos de un sistema complejo en donde solo se conoce el comportamiento de este para llegar a predicciones sobre su desarrollo futuro y el efecto de las interacciones con el medio ambiente [6].

En este contexto, los fenómenos biológicos permiten estudiar cómo interactúan entre sí ciertas propiedades o comportamientos de cualquier átomo, molécula, célula, individuo o población. Es por esto que la construcción de modelos matemáticos predictivos es un objetivo fundamental en la investigación de sistemas biológicos, dado que pueden disminuir el error experimental y las limitaciones causadas por el número reducido de datos, solventar la poca disponibilidad de recursos y prever los resultados que se pueden llegar a presentar en un caso de estudio [5].

4.2.2 Modelación de sistemas biológicos

Los sistemas biológicos son considerados complejos debido a que los procesos celulares, físicos y químicos varían y dependen exclusivamente del organismo que se esté estudiando, el ambiente donde se esté desarrollando y las diferentes condiciones a las que esté expuesto ya sean naturales o inducidas [5]. Estos procesos que pueden estar apoyados por métodos matemáticos son empleados para la resolución de problemas de cálculo de parámetros para ser descritos a través de diferentes tipos de modelos [7].

Un modelo se define como la descripción de un sistema, y este a su vez se considera como la colección de objetos relacionados entre sí sobre el cual se pueden hacer observaciones y cuya estructura sirve como herramienta para explicar las características de estos objetos o procesos facilitando su interpretación y descripción [5], [8].

El diseño de un modelo se inicia con su representación gráfica, las reacciones químicas o diagramas de proceso, el sistema de ecuaciones de ecuaciones diferenciales para finalmente llegar a describir el comportamiento dinámico de la formulación matemática realizada. La Figura 4.1 describe gráficamente y de manera general el orden que se lleva a cabo en la construcción de un modelo matemático.

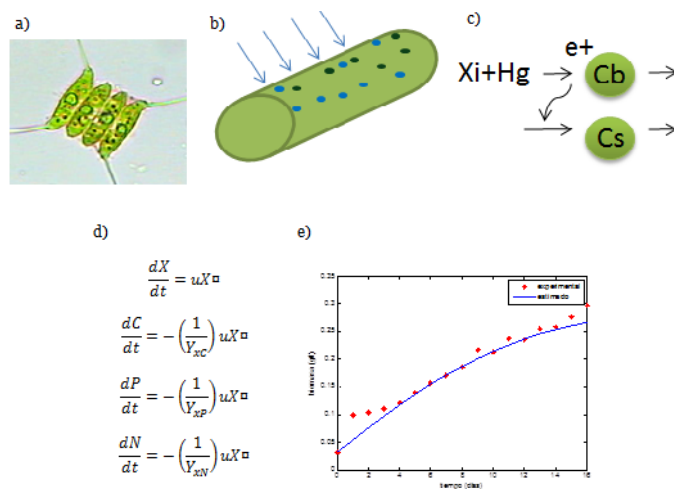


Figura 4.1: Pasos básicos para el diseño del modelo matemático. Tomado y adaptado de [4].

Correspondiente a la figura anterior es posible dilucidar los pasos básicos para tener en cuenta en la construcción de un modelo así: a) Descripción gráfica b) Representación gráfica que permita describir el sistema biológico que se está estudiando, por medio de formas geométricas o similitudes simétricas c) Reacciones químicas o diagramas de procesos representados mediante flechas. d) Una vez se ha definido una secuencia lógica del proceso es posible determinar el sistema de ecuaciones diferenciales, e) el cual permite predecir el comportamiento dinámico del sistema y simular este comportamiento con el fin de realizar una interpretación coherente en el caso de estudio. Así, si se construye un modelo computacional basado en procesos reales y justificado con datos experimentales se puede contar con un sistema que prediga cualquier comportamiento que se desee representar matemáticamente.

Dicho lo anterior, la construcción de modelos matemáticos y predictivos es un trabajo fundamental en la biología, investigación y comprensión de sistemas con alguna función biológica [4]. La modelación de sistemas biológicos aparte de tener en cuenta variables de proceso como la concentración de biomasa (X), concentración de sustratos (Si) y productos (Pi), también incluye reacciones metabólicas, procesos celulares, físicos, balances de materia y energía correspondientes a cada tipo de microorganismo empleado representando así sistemas complejos de modelación [9].

En microalgas, los procesos a nivel celular incluyen transporte y metabolismo de nutrientes, procesos de tipo energético tales como la fotosíntesis, donde predomina la transferencia de calor, por radiación y convección; el transporte de energía química, transporte de electrones y ATP; la transferencia de masa, equilibrio osmótico; el transporte activo y pasivo y la catálisis extracelular [5].

La termodinámica de las reacciones químicas en los sistemas biológicos posee un soporte experimental, conocimientos bioquímicos y leyes físicas de un sistema propuesto acompañado de una formulación matemática coherente [4]. Si en un modelo existe un buen ajuste entre los datos experimentales y las simulaciones del modelo la representación del sistema biológico será capaz de predecir tal proceso de acuerdo a las variables de entrada y salida previamente definidas [2].

Si se describe un modelo como una caja que contiene las leyes matemáticas capaz de predecir las salidas del sistema a partir de relaciones de variables de entrada-salida sin considerar el funcionamiento interno del sistema ya sea por falta de datos, datos deficientes o comprensión superficial es posible asociar esta aproximación a una *caja negra* [4]. Si por el contrario el modelo diseñado considera variables, funcionamiento y metabolitos como un sistema de componentes múltiples que relaciona las partes que conforman dicho sistema dentro de una comprensión profunda es posible asociar esta descripción a una *caja blanca* [5]. La construcción de estos últimos se hace compleja para ciertos sistemas por eso se hace necesario considerar también modelos de *caja gris* los cuales describen procesos semifísicos, una combinación de los dos anteriores. Esto implica la definición de mecanismos cinéticos y de transporte, la estimación de los parámetros cinéticos y de transporte clave, así como la validación del modelo con respecto a las especificaciones de rendimiento [1]. Esta clasificación fue considerada por Karplus [10], quien de acuerdo a la calidad de los datos o al grado de comprensión, expone que, para modelos de caja negra no se deben usar modelos para predicciones cuantitativas detalladas y hace énfasis en que ‘Usar un modelo para un propósito más riguroso que el apropiado para una disciplina puede ser engañoso, en el mejor de los casos, o peligroso, en el peor de los casos [5].

4.2.3 Clasificación de modelos

Los modelos que describen procesos biotecnológicos a partir de los balances de masa se describen en ecuaciones básicas como se muestra en las siguientes ecuaciones (4.1 y 4.2) [11]:

$$\frac{dX}{dt} = f(X, t, \theta) \quad (4.1)$$

$$Y = g(X, t, \theta) \quad (4.2)$$

Donde:

t : tiempo
 X_0 : vector de condiciones iniciales
 Y : vector de salida del modelo con nr
 $X = [X_1, X_2, \dots, X_r]$: vector de las variables de estado (biomasa, sustratos,...)
 $X = [\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_r]$: vector de parámetros del modelo

Estos modelos se pueden clasificar de acuerdo a la complejidad, sus características y su finalidad [2]. La complejidad de los modelos cinéticos para describir el comportamiento de la célula puede ser muy amplia debido a los diferentes tipos de modelos cinéticos que existen. Las diferentes formas de clasificar los modelos conducen a una variedad de características que tienen un impacto en las técnicas de solución, así como las posibles áreas de aplicación donde pueden ser utilizados [8].

Los modelos utilizados en biotecnología puede clasificarse en estructurado o no estructurado. Según Nielsen [2], la clasificación más simple son los modelos no estructurados donde se asume que la población celular es homogénea, es decir, no se considera la segregación de dicha población y la biomasa es descrita con una sola variable que generalmente corresponde a la concentración de biomasa total, aquí la célula se considera una entidad sin estructura interna. Si esta población se describe de manera individual y se le asigna una única variable a cada individuo, el modelo tendrá una estructura más robusta que incluya más de una sola variable considerando así la segregación en la población de las células convirtiéndose en un modelo estructurado. En la Figura 2 se muestra un esquema general de los tipos de modelos de acuerdo a los diferentes niveles en los que se puede considerar la estructuración celular [6].

Dependiendo del nivel en la descripción de la vía metabólica, como se muestra en la Figura 4.2, un modelo puede ser no estructurado-no segregado donde se considera al microorganismo como un único componente. No estructurado segregado el cual describe rutas metabólicas a partir de una red de ecuaciones. Estructurado-no segregado modela a la célula como un sistema de múltiples componentes, es decir, tiene en cuenta sus componentes intracelulares. Estructurado segregado donde se considera a la célula como discreta, es decir, toda la distribución del microorganismo y sus propiedades [5], [8].

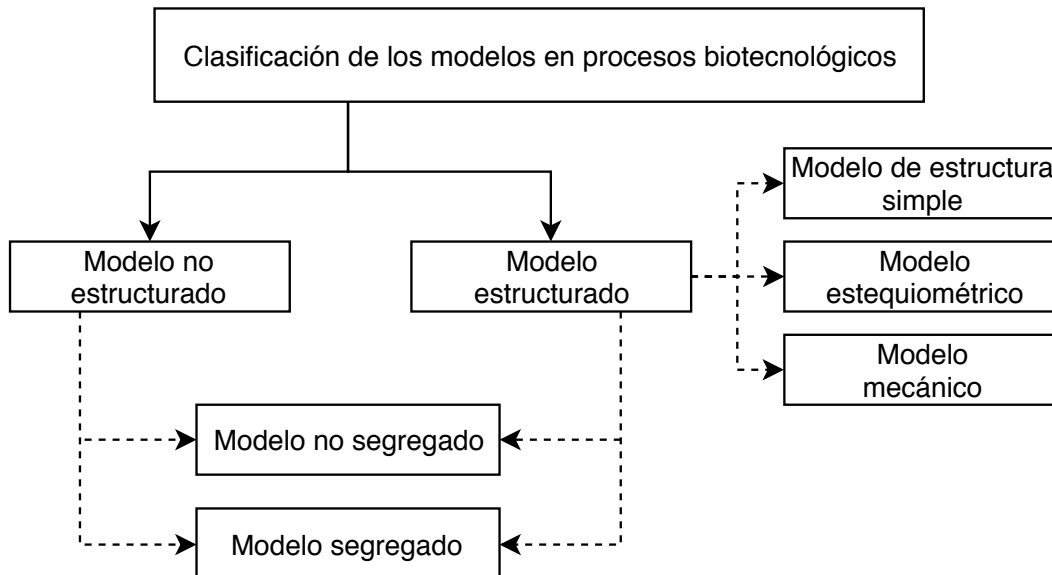


Figura 4.2: Clasificación de los modelos matemáticos en procesos bioquímicos [2], [12]

Así, un modelo puede ser no estructurado si considera la célula como una entidad sin estructura interna, estructurado si se describen las características internas de la célula o sus partes (reacciones metabólicas, procesos celulares, etc.) y segregado o no segregado en función de si se considera o no la heterogeneidad de la población celular, por ejemplo, la posición en el ciclo celular que diferencia entre células jóvenes, células en reproducción y células en fase de senescencia [6].

4.2.4 Modelos en procesos biotecnológicos

Modelos no estructurados

Los modelos no estructurados tienen una simplicidad matemática que permite representar adecuadamente un amplio conjunto de reacciones biológicas, estos consideran la dinámica extracelular en los procesos de crecimiento celular, absorción de sustratos y producción de metabolitos sin tener en cuenta el comportamiento intracelular. Este tipo de modelos describen el crecimiento celular (C_x), ecuación 4.3, el cual puede depender de la concentración del sustrato limitante C_s , ecuación 4.4 y la producción de producto, ecuación 4.5, como se muestra a continuación [12], [13].

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4.3)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \left[\frac{1}{Y_{x/s}}(\mu) + \frac{1}{Y_{p/s}}(u_p) + m_s \right] C_x \quad (4.4)$$

$$\frac{dCP}{dt} = \delta\mu X + \beta X \quad (4.5)$$

Donde:

X, S, P :	Concentración de biomasa, sustrato y producto gl^{-1}
μ :	Tasa específica de crecimiento d^{-1}
$Y_{x/s}, Y_{p/s}$:	Factor de rendimiento sustrato y producto g/g
μ_{max} :	Tasa máxima de crecimiento celular específica d^{-1}
u_p :	Tasa específica de formación de producto d^{-1}
m_s :	Coefficiente de mantenimiento (g/d_g)

El efecto de la composición del medio de cultivo que relaciona la concentración de sustrato con la velocidad de crecimiento fue estudiado por Monod en 1958, quien describió las ecuaciones básicas para explicar la interacción entre el crecimiento de microorganismos y el sustrato limitante en el crecimiento celular, ecuación 4.6 [3].

$$\frac{1}{x} \frac{dX}{dt} = u = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (4.6)$$

Donde:

X :	Concentración de biomasa gl^{-1}
u :	Velocidad específica de crecimiento d^{-1}
S :	Concentración del sustrato limitante gl^{-1}
K_s :	Constante de saturación de sustrato gl^{-1}

El modelo propuesto por Monod está formado por simplificaciones de expresiones propuestas previamente de acuerdo a las condiciones correspondientes de cada sistema como la ley de Malthus [14], la ecuación propuesta por M'Kendrich y Pai [8] o el modelo por Blackman [15]. Así mismo, ha servido como expresión fundamental para nuevas ecuaciones y modelos propuestos con el fin de representar el crecimiento de la biomasa, tasas de crecimiento, actividad, limitaciones por sustrato, inhibidores u otros parámetros que permiten proponer nuevos modelos de acuerdo al interés de estudio [16]. El desarrollo de ecuaciones alternas para expresar el crecimiento celular tales como el modelo de Esener et al [17], la ecuación de Moser [18], el modelo de Teissier [12], como se muestra en la Tabla 4.2, la cual enlista los diferentes modelos no estructurados propuestos en el estudio de modelos cinéticos:

Tabla 4.2: Modelos cinéticos no estructurados.

Modelo	Expresión cinética	Referencia
Monod	$\frac{C_s}{K_s + C_s}$	[13]
Blackman	$\frac{C_s}{K_s + C_s}$	[19]
Teissier	$1 - e^{k_s C_s}$	[13]
Moser	$\frac{C_s^N}{K_s^N + C_s^N}$	[13]
Contois	$\frac{C_s}{K_s C_X + C_s}$	[13]
Powel	$\frac{C_s}{K_s C_X + C_s}$	[2]
Mason and Millis	$\frac{C_s}{K_s + C_s} + K_1 C_s$	[13]
Vavilin	$\frac{C_s^N}{K_s^{N-M} C_{S(t=0)} + C_s^N}$	[13]
Logistic law	$1 - \frac{X}{K_{X_1}}$	[2]
Haldane	$\frac{S}{K_m + S + K_1 S^2}$	[20], [21]

Con base en las expresiones descritas en la Tabla 4.2, es posible observar la simplicidad de la ecuación de Monod con respecto a las propuestas posteriormente, las cuales poseen mínimo dos o más parámetros ajustables aumentando su complejidad y permitiendo tener un mejor ajuste de los datos experimentales. También se han propuesto expresiones para el crecimiento asumiendo que existe inhibición causada por la presencia de alguna sustancia que puede ser un sustrato, producto o una sustancia que se comporta solo como un inhibidor en el crecimiento. La inhibición por sustrato fue propuesta por Wayman y Tseng, quienes consideraron la presencia de una concentración alta de sustrato donde la célula no se comporta de la misma manera en su crecimiento [22], debido a que, por ejemplo, la inhibición por sustrato prolonga la fase inicial de la cinética, mientras que la inhibición por producto reduce principalmente la tasa de crecimiento en la fase final [13].

modelos de inhibición

Los modelos más usados para simular el comportamiento en el crecimiento de microorganismos están basados en los principios de la cinética enzimática, donde debe ser considerado el efecto de la sustancia inhibitoria en la captación de cada sustrato [19]. En la Tabla 4.3 se explican las posibles relaciones que puede tener el sustrato con el inhibidor y como esto modifica la expresión de la tasa de crecimiento específica.

Además de la tabla 4.3, en la gráfica de biomasa contra el tiempo, Figura 4.3, es posible observar el efecto de los diferentes tipos de inhibidores. El inhibidor competitivo disminuye la velocidad de la reacción, pero permite que el cultivo llegue a la misma concentración final con una velocidad de crecimiento mayor. En el inhibidor incompetitivo ambas curvas se comportan aparentemente igual al inicio, luego la pendiente comienza a disminuir y al final llega a fase estacionaria a una concentración máxima menor. Finalmente, el inhibidor no competitivo modifica la concentración máxima de biomasa que se obtiene, siendo diferente a la curva original desde el inicio de la cinética [23].

Tabla 4.3: Mecanismos de inhibición en la cinética de crecimiento celular [6]

Tipo de inhibición	Descripción	Efecto general	Ecuación para μ
Competitiva	El sustrato y el inhibidor son sustancias fisicoquímicamente análogas, por lo que la célula no diferencia una de la otra, ocasionando que estas compitan por ser ligadas a los mismos sitios activos. El efecto se reduce al incrementar la concentración del sustrato.	$k'_S > K_S$	$\frac{\mu_{max} S}{K_S \left(1 + \frac{I}{K_I}\right) + S}$
No competitiva	El inhibidor y el sustrato pueden estar ambos ligados a la célula; cuando se forma este complejo, no hay producción de biomasa. El inhibidor tiene afinidad sea por la biomasa sola que por el sistema biomasa-sustrato. Este efecto puede ser causado no solo por la unión al sitio activo, sino también por la unión a otro sitio que causa la pérdida de afinidad por el sustrato.	$\mu'_{max} < \mu_{max}$	$\mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \frac{K_I}{I + K_I}$
Incompetitiva	El inhibidor se adhiere solo después que la célula se ha unido al sustrato. El inhibidor no necesita ser similar al sustrato y su efecto es mayor a concentraciones altas de sustrato.	$\mu'_{max} < \mu_{max}$ $K'_S < K_S$	$\frac{\mu_{max}}{1 + \frac{K_S}{S} + \frac{I}{K_I}}$

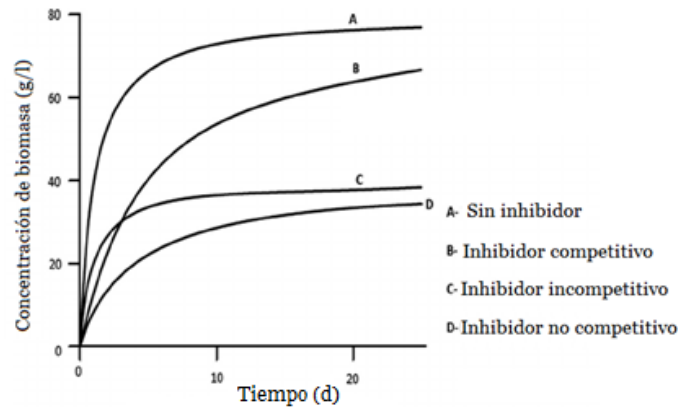


Figura 4.3: Efecto de la inhibición en el crecimiento de biomasa [23].

Modelos de adsorción

El fenómeno de adsorción desarrollado por Langmuir en 1916 considera que la superficie del adsorbente contiene un número fijo de lugares de adsorción y cada lugar es capaz de adsorber una sola molécula. Para ello se establecen ciertas implicaciones como que: la adsorción de las moléculas del fluido se adsorben en puntos discretos llamados centros activos, la energía de las especies adsorbidas es la misma en toda la superficie, la cantidad de moléculas que se adsorben corresponden a una monocapa, la adsorción ocurre por colisión entre las moléculas del fluido y los centros activos y la velocidad de

desorción depende del material adsorbido en la superficie [24].

La adsorción y el intercambio iónico son mecanismos importantes en los procesos de remoción de metales pesados, en estos procesos los cationes presentes inicialmente en los sitios de unión de la biomasa, se intercambian con aquellos que se encuentran en solución como es el caso de los metales, los cuales pueden ser acomplejados, adsorbidos o depositados sobre la superficie de la biomasa [25].

Los modelos de adsorción se pueden representar por medio de diferentes modelos físicos y químicos los cuales intentan relacionar la cantidad de metal adsorbido por unidad de masa del adsorbente con la concentración del remanente del metal en solución. Algunos modelos matemáticos de isothermas empleados para adsorción y desorción se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4: Modelos de adsorción y desorción.

Modelo	Expresión	Referencia
Lineal	$q = K_d C_e$	[26]
Freundlich	$q = K_f C_e^{1/n}$	[27]
Langmuir	$q = \frac{b q_m C_e}{1 + b C_e}$	[28]
Temkin	$q_e = \frac{RT}{b} \ln(A_T C_e) \zeta$	[29]
Langmuir–Freundlich	$q = \frac{q_m b C_e^{1/n}}{1 + b C_e^{1/n}}$	[30]
Redlich–Petersen	$q = \frac{k_{rp} C_e}{1 + a_{rp} C_e^\beta}$	[31]
Radke–Prausnitz	$q = \frac{a \tau C_e^\rho}{a + \tau C_e^{\rho-1}}$	[31]

El uso de cada expresión descrita en la Tabla 4.4 depende entonces del tipo de capas adsorbidas las cuales están dadas por las posibles interacciones que puedan ocurrir en los sitios activos, a los posibles equilibrios entre las fases líquida y sólida y a las condiciones ambientales de la muestra tales como pH, temperatura, fuerza iónica. Finalmente, estos modelos permiten establecer, por ejemplo, la capacidad máxima de adsorción de un metal por la biomasa contenida, la afinidad entre iones metálicos, los sitios activos, describiendo así la eficacia de un proceso [32].

4.3 Estado del arte

A lo largo de la historia de la modelación matemática de bioprocesos se han estudiado y realizado diferentes investigaciones con el fin de demostrar las bases fenomenológicas de ciertas ecuaciones empíricas aún empleadas en el planteamiento de modelos con aplicación en biotecnología y estudios para representar las isothermas de sorción por medio de expresiones matemáticas. En la Tabla 4.5, se describen algunos de los trabajos realizados en este tema.

Tabla 4.5: Publicaciones relevantes acerca de modelos matemáticos aplicado a bioprocesos.

Autor	Descripción estudio	Ref.
Shuter (1979)	Modelo simple de los procesos de crecimiento microalgal con el fin de mostrar que el tamaño de la célula en la tasa de crecimiento y los cambios ambientales inducidos tales como intensidad de luz, disponibilidad de nutrientes inorgánicos y temperatura en la composición celular pueden ser descritos por medio de parámetros ajustables y controlados que contribuyen a maximizar la tasa específica de crecimiento.	[33]
Kunikane (1984)	Modelo cinético de crecimiento microalgal y absorción de sustratos para el fósforo y el nitrógeno donde la tasa de crecimiento de biomasa y las tasas de absorción de sustratos están directamente relacionadas con el contenido de nitrógeno mientras que el fósforo controla el metabolismo celular y el flujo de energía celular.	[34]
Chojnacka (2004)	Analizó el crecimiento de diferentes cepas de microalgas con el fin de evaluar el crecimiento microalgal relacionado al metabolismo y la variación de distintos factores como la intensidad lumínica y la fuente de carbono. Al estudiar distintas cepas y el efecto de ciertas condiciones en su crecimiento, Katarzyna propuso un modelo cinético en el que explica que dependiendo del modo en que se comporte la intensidad lumínica en un medio de cultivo esta va a ser capaz de afectar el metabolismo de la microalga, los mecanismos de consumo de sustratos y por ende el crecimiento y producción de biomasa, así, esta revisión permite conocer la influencia de la intensidad lumínica en la tasa específica de crecimiento.	[35]
Davis et al (2003)	Revisión acerca de las propiedades bioquímicas de las algas marrón aplicada a la biosorción de metales pesados para los modelos de isotermas de sorción así como los modelos empleados para la caracterización de los procesos de sorción. Volesky presenta los rangos de energía correspondientes para la adsorción de metales pesados y livianos los cuales se encuentran en un rango de 7-11 kJ.mol ⁻¹ y 2,1-6 kJ.mol ⁻¹ , respectivamente.	[36]
De Farias (2016)	Estudio experimental con la microalga <i>Scenedesmus Obliquus</i> en un Sistema de dos etapas en un fotobiorreactor con el fin de mejorar la producción de biomasa. Seguido a la experimentación apoyó sus estudios por medio de un modelo de simulación semiempírico, el modelo matemático propuesto y ajustado a los datos experimentales reportó una relación entre la productividad celular y la tasa mínima de reutilización.	[37]
Gupta y Rastogi (2008)	Evaluaron la capacidad de biosorción de cadmio (II) por medio de biomasa de la microalga <i>Oedogonium sp.</i> Los experimentos se realizaron por lotes variando condiciones de pH inicial, concentración de alga, tiempo de contacto y temperatura; las variaciones reportaron que la capacidad máxima de captación de Cd (II) fue a 25°C, pH inicial de 5.0 en 55 minutos y una concentración inicial de iones de Cd (II) de 200 mg/l. Emplearon un modelo pseudo de segundo orden y el equilibrio se describió por medio de isotermas de Langmuir las cuales permitieron determinar los parámetros termodinámicos del proceso. Se encontró además que la estructura química de la microalga presenta grupos amino, carboxilo, hidroxilo y carbonilo que podrían explicar la capacidad de remoción de ese microorganismo.	[38]
Schmitt (2001)	Evaluó la cinética de adsorción de seis iones metálicos, aluminio, zinc, mercurio, cobre, cadmio plomo empleando cuatro especies diferentes de microalgas entre las que se encuentra <i>Scenedesmus sp.</i> Smitch describió la tasa de adsorción de estos metales usando la ecuación de Langmuir para determinar los valores más altos de la tasa de adsorción. Para la adsorción de mercurio por ejemplo la constante de velocidad máxima alcanzó 24,2 h ⁻¹ . En todo su estudio, Schmitt llegó a su conclusión que el mecanismo de adsorción sobre las algas es una mezcla de adsorción y acumulación.	[25]
Salvestrini (2017)	Salvestrini (2017) [26], emplea la isoterma de Langmuir de forma diferencial con el fin de evaluar de manera muy detallada los modelos pseudo de primer y segundo orden y estimar los parámetros cinéticos de adsorción que a su estudio corresponde a la concentración inicial de soluto, concentración de adsorbente, velocidad de adsorción, cantidad de adsorción en equilibrio y la capacidad máxima de adsorción del adsorbente.	[24]

4.4 Materiales y métodos

Se realizaron cultivos de la microalga *Scenedesmus* sp., en condiciones de cultivo seleccionadas en presencia de mercurio con el fin de evaluar el efecto del metal sobre el crecimiento de esta microalga (ver capítulo 2). Las condiciones seleccionadas para la realización del modelo se muestran en la Tabla 4.6, las concentraciones de inóculo y Hg inicial fueron seleccionadas de acuerdo a las reportadas por el diseño experimental.

Tabla 4.6: Condiciones de cultivo para la estimación de parámetros.

Parámetro	Concentración
Inóculo	225 mg/l
Fuente de carbono	400 mg/l
Fuente de fosfatos	40 mg/l
Fuente de nitratos	170 mg/l
Concentración inicial de Hg	5 mg/l

4.5 Modelación

La producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp., y la remoción de mercurio están regidas por el proceso mostrado en la Figura 4.4. El crecimiento de biomasa se da a partir del consumo de micronutrientes y macronutrientes (fuente de carbono, fosfatos y nitratos) y la absorción de energía lumínica para posteriormente iniciar el proceso de adsorción de mercurio que queda retenido en la pared celular.

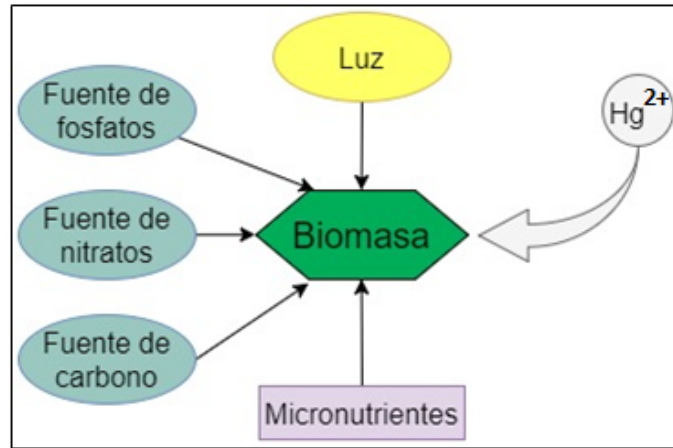


Figura 4.4: Esquema descriptivo del proceso de crecimiento de biomasa y remoción de mercurio.

4.5.1 Planteamiento del modelo cinético

A partir de este proceso se identificaron las variables más relevantes y se desarrolló un modelo cinético no estructurado, ecuación 4.7, que incluye las dinámicas de crecimiento celular, consumo de nutrientes y porcentaje de remoción de mercurio a partir de ecuaciones para las concentraciones de biomasa, fosfatos, nitratos, intensidad lumínica y porcentaje de remoción de mercurio [39].

$$Y = [XCPNIM]^T g(X, t, \theta) = \left[\frac{dX}{dt} \frac{dC}{dt} \frac{dP}{dt} \frac{dN}{dt} \frac{dI}{dt} \frac{dM}{dt} \right]^T \quad (4.7)$$

Donde X,C,P,N y M Corresponden a las variables de estado: concentración de biomasa, concentración de carbono, concentración de fosfatos, concentración de nitratos, concentración de mercurio en equilibrio en la fase líquida, expresadas en gl^{-1} y la intensidad lumínica absorbida I expresada en $Klux$.

El sistema de ecuaciones diferenciales fue descrito en Matlab (*TheMathworks, Inc.*) y posteriormente se integró mediante la función *ode23s*.

Modelo de crecimiento de biomasa y consumo de sustratos

Una vez conocidas las variables de estado y a partir de lo observado en la metodología experimental se plantean los balances de materia para las variables correspondientes a biomasa (ecuación 4.8) [37], carbono (ecuación 4.9) [40], fosfatos (ecuación 4.10) [41] y nitratos (ecuación 4.11) [37] mediante las siguientes expresiones:

$$\frac{dX}{dt} = uX \quad (4.8)$$

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{1}{Y_{XC}}uX \quad (4.9)$$

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{1}{Y_{XP}}uX \quad (4.10)$$

$$\frac{dN}{dt} = -\frac{1}{Y_{XN}}uX \quad (4.11)$$

Donde:

Y_{xC}	Rendimiento de sustrato en biomasa para C
Y_{xP}	Rendimiento de sustrato en biomasa para P
Y_{xN}	Rendimiento de sustrato en biomasa para N
u	Velocidad específica de crecimiento (mg/l)

Dado que la velocidad de reacción de las ecuaciones 4.8 a 4.11 son de primer orden, es posible ajustar un modelo empírico de crecimiento, donde la velocidad específica de crecimiento u depende del consumo de sustratos y del efecto de la intensidad lumínica absorbida [35].

Efecto de la intensidad lumínica

En el cultivo microalgal correspondiente a la presente investigación se trabajó con una única fuente de energía proveniente de luz artificial (luz led) con una intensidad lumínica fija. De acuerdo a esta condición se asumió el sistema microalgal como un cultivo autotrófico ya que la energía lumínica es convertida en energía química a través de fotosíntesis [42], [43].

En este tipo de cultivos la intensidad de luz puede ser considerada un sustrato físico y ser descrita mediante ecuaciones de Monod debido a que no se observa fotoinhibición. Esta condición se asume ya que no se superaron los rangos inhibitorios encontrados en estudios previos en el que la intensidad lumínica es capaz de afectar el crecimiento de la microalga *Scenedesmus* sp., la ecuación 4.12 describe este comportamiento [35].

$$u = \mu_{max} \left(\frac{I}{k_I + K_I + I} \right) \quad (4.12)$$

Donde:

μ_{max} : Tasa máxima de crecimiento celular específica (d^{-1})
 I : Intensidad lumínica (Klux)
 k_I : Constante de saturación de luz (Klux)

Es necesario considerar que la intensidad de luz no es homogénea en todo el cultivo ya que la transmisión y el fenómeno de autoensombrecimiento no son despreciables. Esto es causado porque las células que están más cercanas a la fuente de luz absorben la mayoría de los fotones. Así, si se asume que la dirección de la luz no cambia al atravesar el cultivo y que el efecto de dispersión de luz por partículas es despreciable con respecto a la absorción, es posible utilizar la ley de Lambert-Beer que relaciona la concentración celular con la intensidad media del cultivo y se calcula asumiendo una conformación cilíndrica con la fuente de luz ubicada sobre el cultivo. La expresión obtenida a partir de las consideraciones anteriores se muestra en la ecuación 4.13 [20], [44].

$$I = \frac{I_0}{\epsilon h_c X} 1 - e^{\epsilon h_c X} \quad (4.13)$$

Donde:

I_0 : Intensidad lumínica incidente (Klux)
 ϵ : Absortividad molar
 h_c : Altura efectiva del cultivo (cm)

Efecto de la inhibición por mercurio

Debido al uso de mercurio en el presente experimento, fue necesario incluir un componente en la expresión de la velocidad específica de crecimiento celular para poder considerar el efecto de inhibición causado por este metal. Dado que no se conoce el mecanismo de inhibición del mercurio frente a la captación de los sustratos empleados en el presente trabajo, sería necesaria la realización de análisis preliminares variando la concentración de los sustratos y del metal, lo cual se aleja del alcance de esta investigación. Sin embargo se conoce que el mercurio inhibe competitivamente los receptores de Ca^{2+} , de Zn^{2+} y probablemente otros iones divalentes presentes en el medio, lo que causa una disrupción general en el metabolismo de la célula. Se plantea entonces la utilización del modelo más general, es decir, un modelo de inhibición no competitiva, ya que este asume que el mercurio se une en cualquier momento a la biomasa sin importar la captación de los sustratos [45].

La elección de un inhibidor no competitivo se justificó cualitativamente ya que las gráficas obtenidas en el experimento con presencia del metal fueron inferiores a las de control desde el inicio de la cinética para todas las concentraciones de inóculo, tal como se mostró en la Figura 4.3 [23]. De esta manera se plantea el efecto que tiene el mercurio en la microalga *Scenedesmus* sp., y que afecta la velocidad de crecimiento del cultivo microalgal disminuyéndola como se muestra en la ecuación 4.14:

$$u' = u \left(\frac{K_M}{k_M + M_0 - M} \right) \quad (4.14)$$

Donde:

u' : Velocidad de crecimiento en presencia del mercurio (mg/l)
 K_M : Constante de inhibición del mercurio (mg/l)
 M_0 : Concentración inicial de mercurio (mg/l)
 M : Concentración final de mercurio (mg/l)

Velocidad específica de crecimiento

A partir de las ecuaciones definidas anteriormente es posible describir la tasa específica de crecimiento como una cinética tipo Monod para múltiples sustratos, ecuación 4.15, la cual se presenta en función del consumo de cada uno de los nutrientes, donde se consideran limitantes junto con la intensidad lumínica absorbida en el proceso y de la concentración adsorbida del mercurio que se comporta como un inhibidor no competitivo.

$$u = \mu_{max} \left(\frac{C}{K_C + C} \right) \left(\frac{P}{K_P + P} \right) \left(\frac{N}{K_N + N} \right) \left(\frac{I}{K_I + I} \right) \left(\frac{K_M}{K_M + M_0 - M} \right) \quad (4.15)$$

Donde:

- μ_{max} : Tasa máxima de crecimiento celular específica (d^{-1})
- C : Concentración de carbono (mg/l)
- k_C : Constante de afinidad por la fuente de carbono (mg/l)
- P : Concentración defosfatos (mg/l)
- k_P : Constante de afinidad por la fuente de fosfatos (mg/l)
- N : Concentración de nitratos (mg/l)
- k_N : Constante de afinidad por la fuente de nitratos (mg/l)
- I : Intensidad lumínica ($Klux$)
- k_I : Constante de saturación de luz ($klux$)

modelos de la adsorción de mercurio

Las isotermas de adsorción se caracterizan por tener parámetros definidos cuyos valores expresan las propiedades superficiales y la afinidad del biosorbente. En este estudio se planteó el uso del modelo de adsorción de Langmuir en forma diferencial el cual asume que los iones de mercurio se comportan como un gas ideal a temperatura constante y el adsorbente, en este caso la microalga *Scenedesmus* sp., se asume como una superficie sólida ideal homogénea compuesta de distintos sitios capaces de unir solo una molécula de adsorbido y las moléculas adsorbidas no interactúan con ninguna molécula adyacente lo que indica que todos los sitios poseen la misma afinidad por el adsorbente [46]. La tasa de adsorción en el modelo de Langmuir se describe en la ecuación 4.16:

$$V \frac{dM}{dt} = k_d q - k_a M (q_m - q) \quad (4.16)$$

Que junto al balance de masa, ecuación 4.17:

$$q = \frac{M_0 - M}{X} \quad (4.17)$$

Donde:

- K_a : Constante de adsorción
- K_d : Constante de desorción
- q : Peso del metal adsorbido por unidad de adsorbente ($\frac{m_{Hg}}{mg_{Biomasa}}$)
- q_m : Capacidad máxima de adsorción ($\frac{m_{Hg}}{mg_{Biomasa}}$)
- V : Volumen del cultivo (l)

4.6 Estimación de parámetros

La estimación de parámetros se formula como una programación no lineal (NLP) de restricciones algebraicas diferenciales con el fin de encontrar los valores óptimos θ^* a partir de unos parámetros iniciales θ_0 que minimizan la función objetivo $J(\theta)$, es decir la diferencia mínima entre los datos experimentales y los datos teóricos, tal como se describe en la ecuación 4.18 [47]:

$$\text{mín } J(\theta) = \sum_{i=1}^n [Y_{exp}(t_i) - Y_{sim}(\theta, t_i)]^T Q(t_i) [Y_{exp}(t_i) - Y_{sim}(\theta, t_i)] \quad (4.18)$$

Donde:

- θ : $\theta = [\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_m]$ vector del conjunto de parámetros del modelo
- θ^* : Valores óptimos de los parámetros del modelo
- n : Número de observaciones
- Y_{exp} : Vector de observaciones, es decir las variables de salida medidas experimentalmente
- t_i : Tiempo (día)
- Y_{sim} : Vector de resultados del modelo (predicciones)
- $Q(t_i)$: Matriz diagonal de ponderación

La metodología general para la estimación de parámetros inicia con una rutina de optimización para obtener un subconjunto pseudo-óptimo de los parámetros $\theta^* = [\theta_1^*, \theta_2^*, \dots, \theta_m^*]$ partiendo de un conjunto inicial de parámetros $\theta_0 = [\theta_{01}, \theta_{02}, \dots, \theta_{0m}]$, para lo cual se planteó como función objetivo $J(\theta)$ la sumatoria de las sumas de los cuadrados de los residuales (SSres) calculadas a partir de las curvas normalizadas respecto al valor inicial de biomasa, nitratos y fosfatos, como se observa en las ecuaciones 4.19 y 4.20:

$$J(\theta) = \sum_{l=X,N,P} (SS_{res,l}) \quad (4.19)$$

$$SSR_{res,l} = \sum_{i=1}^n (Y_{exp,i}^N - Y_{sim,i}^N)^2 \quad (4.20)$$

Donde

- Y_{exp}^N : Vector de observaciones normalizados, es decir las variables de salida medidas experimentalmente normalizadas respecto a las condiciones iniciales
- $Y_{sim,i}^N$ $Y = [y_1, y_2, \dots, y_n]$ es el vector de resultados normalizados del modelo (predicciones)

Para minimizar esta función se implementó un algoritmo genético, un método de búsqueda para optimización basado en las mecánicas de la selección natural y la genética, en este caso, una población de n_{pob} individuos generados aleatoriamente, cada uno con un set de parámetros θ_i elegido aleatoriamente de un intervalo fijo cuyo valor máximo fue encontrado en literatura como se muestra en la Tabla 4.7. Este θ_i es codificado en binario y puesto a prueba con la función $J(\theta)$ para determinar su aptitud. Entre menor fue el valor de la función $J(\theta)$ evaluada para cada individuo, mayor fue su probabilidad de generar una descendencia. Este protocolo se ejecutó durante un número de generaciones n_{gen} .

Para seleccionar cada pareja de individuos, se usó la metodología de torneo entre n_{tor} miembros elegidos aleatoriamente de la población, de donde los dos más aptos de estos tenían una probabilidad de apareamiento p_a . De existir apareamiento, se eligió la metodología de entrecruzamiento homogéneo,

Tabla 4.7: Intervalo de valores iniciales de los parámetros.

Símbolo	Intervalo inicial θ_i	Unidades
μ_{max}	0-100	día ⁻¹
K_C	0-1000	mg/l
K_P	0-200	mg/l
K_N	0-2	mg/l
K_I	0-10	Klux
Y_{XC}	0-10	$mg_{biomasa}/mg_{carbono}$
Y_{XP}	0-20	$mg_{biomasa}/mg_{fosfatos}$
Y_{XN}	0-10	$mg_{biomasa}/g_{nitratoso}$
I_0	0-400	Klux
ϵ	0-10	-
K_M	0-1	mg/l
q_m	0-0,2	$mg_{Hg}/mg_{biomasa}$
K_a	0-350	-
K_d	0-50	-

en donde se evaluó bit a bit el genoma y dada una probabilidad p_c se intercambiaba el bit entre las dos secuencias. Si no había apareamiento, los individuos de la siguiente generación fueron iguales a los padres. Finalmente para aumentar la diversidad genética de la población se usaron dos estrategias, la primera fue utilizar una probabilidad p_m de mutación espontánea en cada bit de cada individuo producido, mientras que la segunda fue impedir que un individuo se apareara con sí mismo. Los valores mencionados anteriormente se encuentran en la Tabla 4.8, correspondientes a la columna “Valor”.

Tabla 4.8: Parámetros del algoritmo genético

Condición	Sigla	Valor
Número de generaciones	n_{gen}	10000
Población	n_{pob}	20
Participantes en cada torneo	n_{tor}	4
Probabilidad de mutación espontánea	p_m	0.15
Probabilidad de entrecruzamiento	p_c	0.5
Probabilidad de apareamiento	p_a	0.98

Este algoritmo se ejecutó dos veces: primero para ajustar el modelo a la cinética de crecimiento y consumo de sustratos del alga sin presencia de Hg en el medio ya que los términos asociados al metal planteados en el modelo no eran calculables bajo esta condición y posteriormente se ejecutó la estimación de los otros tres parámetros ajustándolos a la cinética de remoción y de crecimiento de biomasa en presencia de la concentración inicial de Hg seleccionada. En la Tabla 4.9 se muestran los parámetros obtenidos. Es importante recalcar que la capacidad máxima de remoción q_m muestra que por cada gramo de microalga máximo es posible remover 41 mg de Hg.

Tabla 4.9: Parámetros pseudo-óptimos de las cinéticas sin inhibición

Parámetro	Valor pseudo-óptimo
μ_{max}	298.985
K_C	733.563
K_P	329.341
K_N	0,07
K_I	3.524
Y_{XC}	1,043
Y_{XP}	10.797
Y_{XN}	1,711
I_0	497.742
E_P	6.631
K_M	0,535
q_m	0,041
K_a	26,786
K_d	8,25

4.7 Resultados

4.7.1 Crecimiento de biomasa

En la Figura 4.5 se observan las curvas de la cinética de crecimiento de biomasa simulada y comparada con los datos experimentales obtenidos en el capítulo 2. En general, todas las curvas presentan un ajuste bueno con un R2 entre 0.87 y 0.96. En la Figura 5a y la Figura 4.5b. se presenta el modelo propuesto para las dos inóculos evaluados (145 y 225 mg/l) y una concentración inicial de Hg=0 mg/l. Es posible observar que la microalga experimentó su fase exponencial aproximadamente hasta el día once, posteriormente entra a su fase estacionaria y se mantiene hasta el final del tiempo evaluado. En las cinéticas para las concentraciones de Hg de 2,5 y 5 mg/l (Figura 4.5c-f) se observa que la microalga reduce significativamente su velocidad de crecimiento a medida que aumenta la cantidad de metal en el medio y no alcanza a llegar a fase estacionaria.

4.7.2 Consumo de sustratos

Se realizó la simulación para el consumo de sustratos e intensidad lumínica para una concentración de inóculo de 225 mg/l y Hg_i de 0 y 5 mg/l como se determinó en el capítulo II dado que esta condición de cultivo fue la reportada como el mejor tratamiento. En la Tabla 4.10 se observan la concentración inicial para cada uno de los sustratos, la cual es la misma sin importar la concentración de Hg y las concentraciones finales simuladas por el modelo para el control y en presencia del metal.

Tabla 4.10: Concentraciones de los sustratos simuladas por el modelo.

Sustrato	Concentración inicial (mg/l)	Concentración final simulada (mg/l)	Concentración final simulada (mg/l)
Fuente de carbono	400	121	316
Fuente de fosfatos	40	13	32
Fuente de nitratos	170	0	122
Fuente lumínica	93	40	67

Como se puede observar en la tabla anterior las concentraciones finales simuladas varían significativamente entre el tratamiento control y el que tiene 5 mg/l de Hg, comportamiento que complementa el ya reportado en el capítulo anterior y que es debido a que el Hg inhibe el metabolismo de la microalga, tanto crecimiento como consumo de sustratos. Este fenómeno se observa más claramente en La Figura 4.6, donde se muestran las cinéticas para cada sustrato a las condiciones reportadas en la Tabla 4.10.

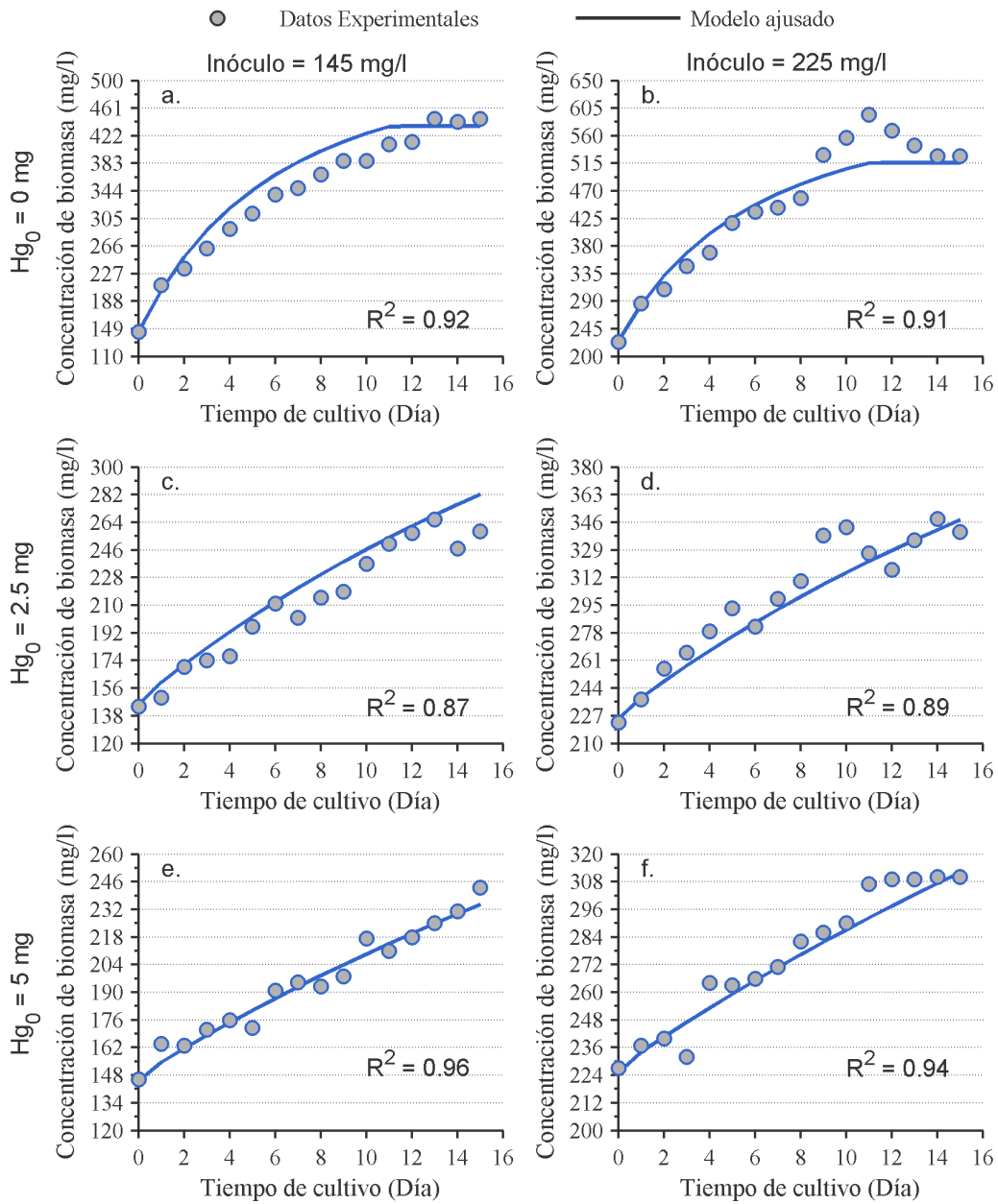


Figura 4.5: Cinéticas de crecimiento de biomasa comparadas con datos experimentales. **a.** Inóculo = 145 mg/l y $Hg_i=0$ mg/l **b.** Inóculo = 225 mg/l y $Hg_i=0$ mg/l. **c.** Inóculo = 145 mg/l y $Hg_i=2.5$ mg/l **d.** Inóculo = 225 mg/l y $Hg_i=2.5$ mg/l **e.** Inóculo = 145 mg/l y $Hg_i=5$ mg/l **f.** Inóculo = 225 mg/l y $Hg_i=5$ mg/l

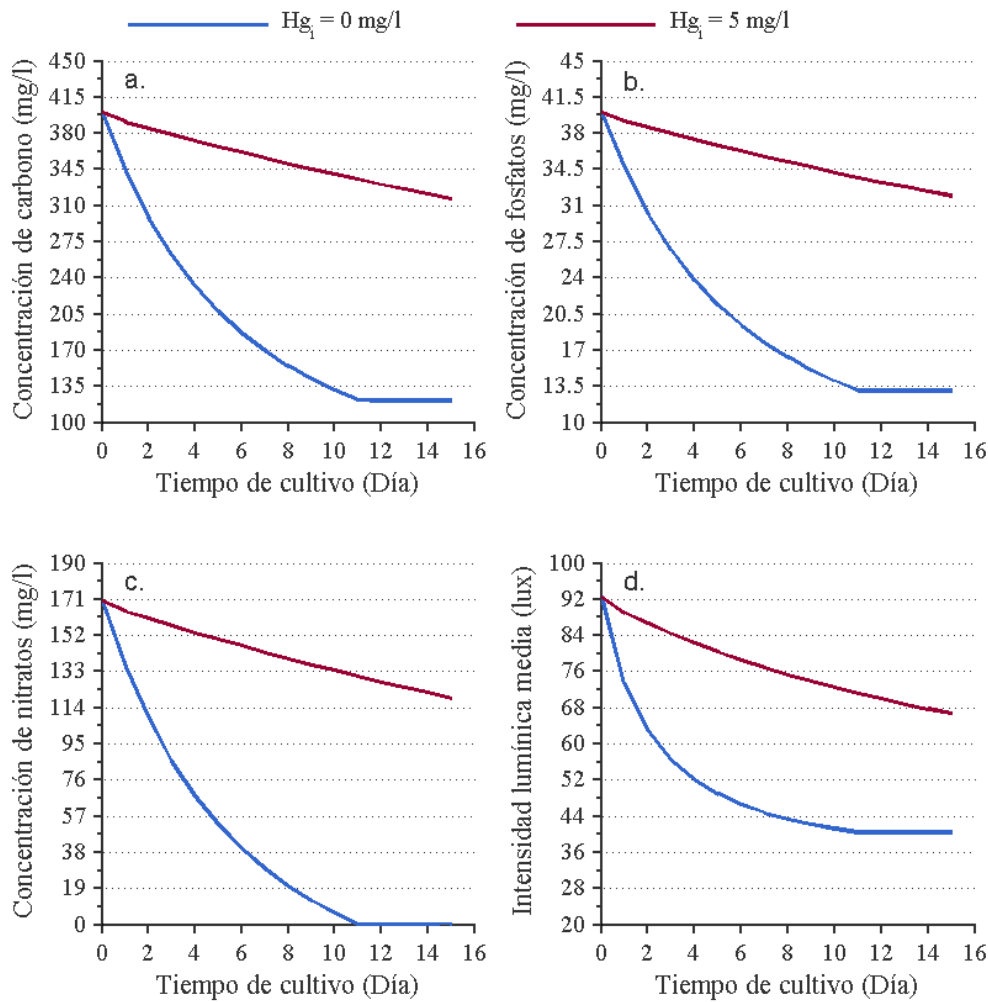


Figura 4.6: Cinéticas simuladas para consumo de sustratos a. consumo de la fuente de carbono b. consumo de la fuente de fosfatos c. consumo de la fuente de nitratos d. intensidad lumínica.

Como se puede observar, La Figura 4.6 en todos los casos deja ver el efecto inhibitorio que tiene el Hg sobre la velocidad de crecimiento de la microalga lo cual se refleja en una tasa de consumo menor de todos los sustratos. Para todos los casos es posible observar que la microalga deja de consumir estos sustratos en el día once para entrar a su fase estacionaria, comportamiento que coincide con la fase estacionaria reportadas en las curvas de crecimiento. Finalmente, se observa que ni la fuente de carbono ni la de fosfatos se agotan, mientras que la fuente de nitratos es el único macronutriente que se agota en el día once, lo que indicaría que este es el sustrato limitante de la cinética para la microalga *Scenedesmus sp* en las condiciones experimentales establecidas. La intensidad lumínica tampoco es un factor inhibitorio en el crecimiento de la microalga ya que nunca llega a cero y porque como ya se mencionó anteriormente, se trabajó por debajo de los rangos inhibitorios.

4.7.3 Remoción de mercurio

Para describir el comportamiento de la remoción de mercurio, se simuló a diferentes concentraciones de inóculo (35,7,145 y 225 mg/l) y diferentes concentraciones iniciales del metal (2,5 y 5 mg/l). En la Figura 7 se observa la remoción de Hg en el punto final del tiempo evaluado (15 días) para cada condición descrita a partir de los datos experimentales y las predicciones para la remoción de Hg.

En esta representación gráfica, es posible observar que a concentraciones bajas de Hg el modelo predice

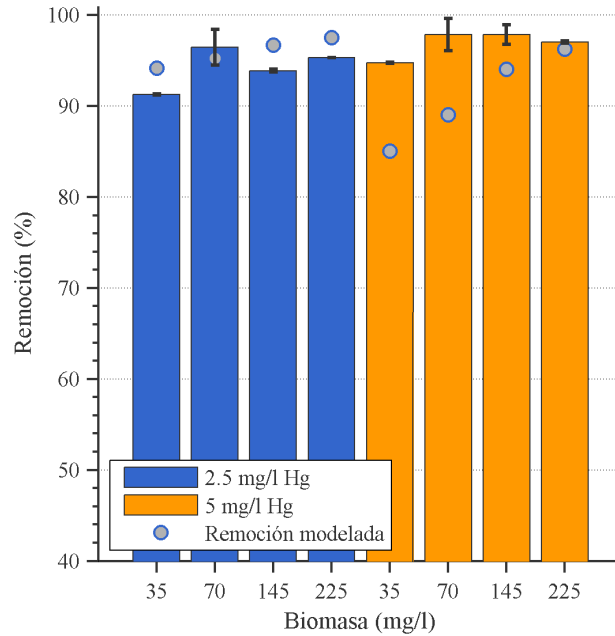


Figura 4.7: Remoción de Hg al final del tiempo evaluado y su simulación del modelo

una remoción muy cercana a los datos reportados experimentalmente, mientras que a concentraciones de 5 mg/l el modelo predice una remoción mucho menor. Esto podría explicarse a que no se está teniendo en cuenta la bioacumulación que es más significativa debido a mayores gradientes y por esto el modelo subestima la concentración removida [48].

Estos comportamientos obtenidos tanto en los resultados experimentales (capítulo II) como en la simulación del modelo corresponden a la relación Inóculo-Hg, la cual reportó una dependencia entre estos dos factores e indica que sin importar la concentración de Hg empleada, la velocidad de crecimiento de la microalga se ve afectada. Este fenómeno aumenta a medida que se incrementa la concentración de Hg en el medio dado que el efecto inhibitor del metal aumenta, lo que representa un menor crecimiento de biomasa y por ende un menor porcentaje de remoción; lo mismo ocurre a medida que aumenta la concentración de Inóculo, si se mantiene la concentración de Hg, es posible una mayor remoción a las concentraciones de Hg determinadas.

Finalmente, es posible observar que los datos experimentales reportan el mayor crecimiento y el mayor porcentaje de remoción en el punto final de la cinética para el ensayo para una concentración de inóculo de 145 mg/l y una concentración de Hg_i de 5 mg/l. Sin embargo, como se puede observar en el gráfico de barras arrojado, la predicción que más se ajustó a los datos experimentales y reportó mayor porcentaje de remoción fue para la concentración de $X_i = 225\text{mg/l}$ y $Hg_i = 5\text{mg/l}$, resultados que se apoyan con los obtenidos en el capítulo II por el análisis estadístico.

En la Figura 4.8 se presenta la modelación de la remoción de Hg a las concentraciones de inóculo y Hg_i determinadas donde se evidencia la buena capacidad que tiene *Scenedesmus* para remover Hg. Como se puede observar, la microalga remueve Hg desde el primer día reportando una remoción de 91,6% tanto para los datos simulados como para los reportados experimentalmente; con una remoción final de 98,5% que se ajusta muy bien a los datos experimentales con un $R^2 = 0,99$.

4.7.4 Validación del modelo

La validez del modelo se evaluó a las condiciones experimentales sugeridas en el capítulo II para verificar el ajuste del modelo propuesto. En la Figura 4.9 se muestra la validación del modelo correspondiente al crecimiento de biomasa y remoción de Hg a una concentración de inóculo de 225 mg/l y 5 mg/l de Hg.

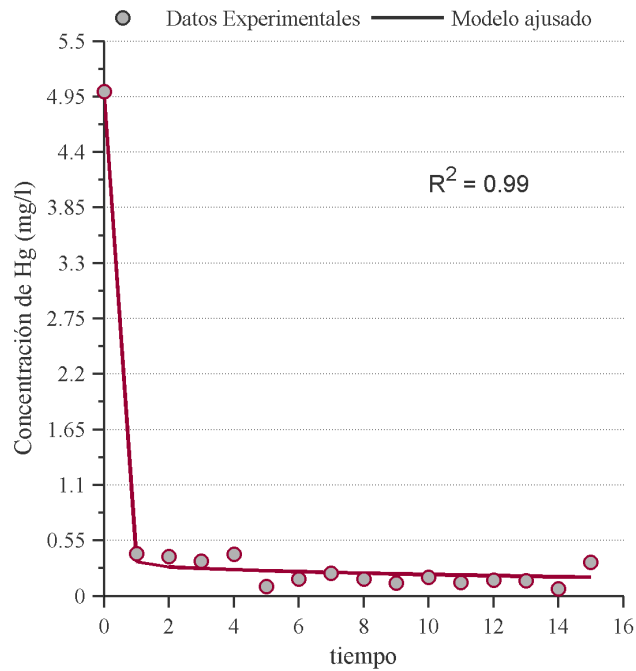


Figura 4.8: Cinética de remoción de Hg durante el tiempo de contacto y comparación con datos experimentales.

Se observa que el modelo se ajustó muy bien al nuevo paquete de datos experimentales, reportando un $R^2 = 0,89$ para la cinética correspondiente al crecimiento de biomasa y un $R^2 = 0,99$ para la remoción de Hg.

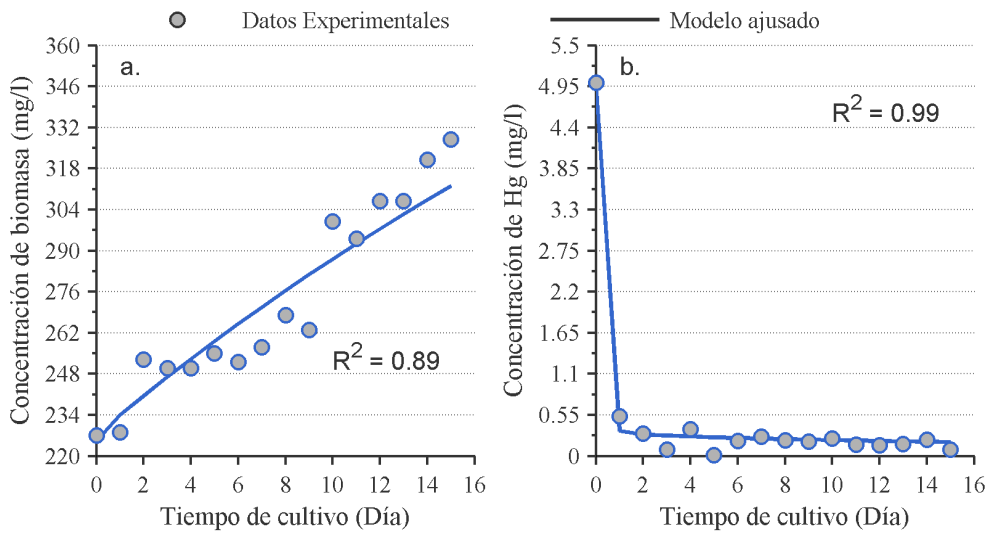


Figura 4.9: Validación de la cinética de crecimiento y remoción de Hg. a. Crecimiento de la microalga ($X_i = 225\text{mg/l} - Hg_i = 5\text{mg/l}$). b. Remoción de Hg. ($X_i = 225\text{mg/l} - Hg_i = 5\text{mg/l}$)

Los resultados obtenidos en el modelo propuesto son similares a los estudios realizados por Monteiro *et al.* [49], quienes estudiaron la capacidad de diferentes consorcios en la remoción de dos metales pesados, zinc y mercurio. Su estudio reporta que el crecimiento de biomasa en presencia de Hg se inhibió incluso a la concentración más baja lo que hizo necesario construir el modelo bajo esta condición presentada en la microalga, fenómeno tomado en cuenta también en esta investigación.

El modelo empleado tanto por Monteiro como por esta investigación se basó en ecuaciones de Monod

para la tasa específica de crecimiento y en un modelo de inhibición no competitiva por parte del metal asumiendo una dependencia entre la tasa de crecimiento sobre la biomasa real experimentada y las concentraciones de metal en solución. Por ejemplo, ellos obtuvieron una inhibición del crecimiento hasta del 90%, mientras que en el presente trabajo, aunque se utilizó una concentración mucho mayor, la inhibición fue de solo 58%. En cuanto a la remoción de Hg, ellos obtuvieron un rango muy amplio de remociones máximas debido a que evaluaron varias condiciones, la mejor remoción fue $32.1 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$ que comparada con la del presente trabajo, que fue de $19 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$, presentó mejores concentraciones de remoción.

Por otro lado, estudios como el de Esmali *et al.* [50], evaluaron el modelo de isothermas de Langmuir y el de Freundlich para la remoción de Hg a partir de *S. glaucescens* y *G. corticata*, obteniendo una capacidad máxima de remoción (q_m) de $147 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$ y de $-4,71 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{Biomasa}}$ respectivamente. Se aprecia que estos valores fueron muy diferentes a los obtenidos en esta investigación, ya que la capacidad máxima de remoción fue menor respecto a su primera microalga y mucho mejor comparada con la segunda, ya que la capacidad máxima de remoción de Hg a partir de *Scenedesmus sp.*, fue de $19 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$. Es importante resaltar que estos investigadores emplearon polvo de biomasa seca como adsorbente.

Inthorn y colaboradores [51], estudiaron 52 especies de algas con el fin de evaluar la remoción de cadmio, plomo y mercurio, en donde una de las algas estudiadas correspondió a *Scenedesmus acutus*, la cual fue la que presentó mayor remoción entre las algas verdes con un porcentaje de 97% para Hg. Sus estudios fueron descritos a partir de un modelo de isothermas de Langmuir el cual reportó una capacidad máxima de remoción de Hg a partir de *Scenedesmus acutus* de $20 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$, que comparado con esta investigación fue similar ya que se obtuvo una $q_m = 19 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$, esta diferencia pudo ser debida a la concentración de Hg empleada en cada investigación o que en el trabajo de Inthorn se usa biomasa seca.

Schmitt *et al.* [25], reportaron en sus estudios una remoción de Hg usando *Scenedesmus subspicatus* máxima de 72,06% y propusieron en su modelo isothermas de Langmuir donde obtuvieron una $q_m = 9,20 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$ que comparada con la reportada en esta investigación es menor ya que la encontrada en esta investigación fue de $q_m = 19 \text{ mg}_{\text{Hg}}/\text{g}_{\text{biomasa}}$. al igual que su porcentaje de remoción que fue de 99%.

En la Tabla 4.11 se presenta un resumen de los símbolos empleados en las diferentes ecuaciones matemáticas.

Tabla 4.11: Listado de variables empleadas en el modelo

Símbolo	Nombre de la variable	Unidades
C	Concentración de carbono	mg/l
h_c	Altura efectiva del cultivo	cm
I	Intensidad lumínica	Klux
I_0	Intensidad lumínica incidente	Klux
K_a	Constante de adsorción	–
K_C	Constante de afinidad por la fuente de carbono	mg/l
K_I	Constante de saturación de luz	Klux
K_M	Constante de inhibición de mercurio	mg/l
K_N	Constante de afinidad por la fuente de nitratos	mg/l
K_P	Constante de afinidad por la fuente de fosfatos	mg/l
N	Concentración de nitratos	mg/l
n	Número de observaciones	–
P	Concentración de fosfatos	mg/l
q_m	Capacidad máxima de adsorción	$mg_{Hg}/mg_{biomasa}$
$Q(t_i)$	Matriz diagonal de ponderación	–
V	Volumen del cultivo	l
Y	$Y=[y_1, y_2, \dots, y_n]$ es el vector de resultados del modelo (predicciones) arrojados por el modelo	–
y_{exp}	Vector de observaciones, es decir las variables de salida experimentales medidas	–
Y_{xC}	Rendimiento de sustrato en biomasa para C	$mg_C/mg_{biomasa}$
Y_{xN}	Rendimiento de sustrato en biomasa para N	$mg_N/mg_{biomasa}$
Y_{xP}	Rendimiento de sustrato en biomasa para P	$mg_P/mg_{biomasa}$
t_i	Tiempo	días
u	Velocidad específica de crecimiento	$día^{-1}$
ϵ	Absortividad molar	–
μ_{max}	Tasa máxima de crecimiento celular	$día^{-1}$
θ	$\theta = [\theta_1, \theta_2, \dots, \theta_m]$ es el vector para el conjunto de parámetros del modelo	–

4.8 Conclusiones

El modelo propuesto en esta investigación permitió predecir el comportamiento del crecimiento de biomasa y consumo de sustratos (fuente de carbono, fosfatos y nitratos) para la microalga *Scenedesmus* sp a diferentes concentraciones de inóculo, 145 mg/l y 225 mg/l sin presencia de Hg. De esta manera, el modelo permitió ajustar la fase exponencial y la fase estacionaria de la microalga de acuerdo al período de tiempo evaluado en la experimentación y describe el comportamiento de la microalga a las condiciones experimentales establecidas.

Cuando la microalga fue contaminada con Hg, el modelo propuesto permitió predecir las cinéticas de crecimiento de biomasa y remoción de Hg a las concentraciones de inóculo ya mencionadas y a 2,5, 5 y 7,5 mg/l de Hg_i . El ajuste de parámetros en el crecimiento de biomasa en presencia de Hg reportó una dependencia entre la concentración de inóculo y Hg_i debido a un efecto inhibitorio por parte del metal ya que independiente de su concentración la microalga se ve afectada, corroborando los resultados obtenidos en el capítulo 2. Además, se disminuye significativamente su velocidad de crecimiento afectando el ajuste en el modelo matemático.

4.9 Recomendaciones

La realización de un modelo matemático no estructurado para esta investigación sugiere que se debe continuar con el estudio del fenómeno de la remoción de Hg y su efecto en el metabolismo de la microalga ya que con respecto al crecimiento de biomasa en presencia de Hg se podría proponer un

modelo capaz de predecir el efecto que tiene el Hg de provocar la muerte celular a altas concentraciones.

Estos estudios podrían ampliarse si se propone un modelo que además estudie el fenómeno del consumo de sustratos de la microalga en presencia de Hg ya que cuando en el medio de cultivo hay presencia de este metal se observan variaciones que generan desviaciones grandes en las cinéticas de consumo; sería interesante modelar el ciclo de absorción/liberación de fosfatos y nitratos que se observó en esta investigación.

Observando el comportamiento tanto experimental como matemático de esta investigación podría estudiarse el crecimiento de biomasa a concentraciones menores de Hg con el fin evaluar si hay un punto donde la velocidad de crecimiento no se ve afectada por el efecto inhibitorio del metal en la microalga *Scenedesmus* sp. Además, para tener un punto de comparación con la mayoría de la literatura encontrada sería interesante el uso de biomasa seca y la evaluación de la cinética de adsorción en una escala de tiempo más corta.

4.10 Referencias bibliográficas

- [1] K. M. Hangos e I. T. Cameron, *The Role of Models in Process Systems Engineering*. 2001, vol. 4, págs. 3-18, ISBN: 9780121569310. DOI: 10.1016/S1874-5970(01)80025-4. dirección: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874597001800254>.
- [2] J. Nielsen y G. L. Villadsen, John, *Principles Bioreaction Engineering Principles*. 2003, pág. 536. DOI: 10.1007/978-1-4615-0767-3.
- [3] A. Duarte, «Introducción a la ingeniería bioquímica», *Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química. Instituto de Biotecnología*, 1995.
- [4] C. W. Edda Klip, Wolfram Liebermeister y A. Kowald, *Systems Biology*. 2016, vol. 2, págs. i-488, ISBN: 9788578110796. DOI: 10.1017/CB09781107415324.004. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [5] J. Haefner, *Modeling Biological Systems: Principles and Applications*. 2005, ISBN: 9780387250120.
- [6] J. Nielsen, «Bioreaction Engineering Principles», *Psychological Science*, vol. 25, n.º 9, págs. 1682-1690, 2014, ISSN: 1467-9280. DOI: 10.1007/s13398-014-0173-7.2. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [7] A. Villegas, J. P. Arias, D. Aragón, M. Arias y S. Ochoa, «Modelling and parameter determination of biomass production from cell cultures of *Thevetia peruviana*»,
- [8] A. A. Martín, F. G.-O. Soria y V. E. S. Mazorra, *Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: aplicación a la producción de xantano*. Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones, 1999.
- [9] I. J. Dunn, E. Heinzle, J. Ingham, J. E. Pfenosil, D. M. Fundamentals y C. R. Edition, *Biological Reaction Engineering, Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, Second. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA, 2003, pág. 521, ISBN: 3527307591.
- [10] W. Karplus, «Place of systems ecology models in spectrum of mathematical-models», en *Simulation*, SIMULATION COUNCILS INC PO BOX 17900, SAN DIEGO, CA 92117, vol. 29, 1977, págs. 94-94.
- [11] A. Villegas, J. P. Arias, D. Aragon, S. Ochoa y M. Arias, «Structured model and parameter estimation in plant cell cultures of *Thevetia peruviana*», *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 40, n.º 4, págs. 573-587, 2017, ISSN: 16157605. DOI: 10.1007/s00449-016-1722-6.
- [12] A. Villegas, J. P. Arias, D. Aragón, S. Ochoa y M. Arias, «First principle-based models in plant suspension cell cultures: a review», *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 37, n.º 8, págs. 1077-1089, 2017, ISSN: 15497801. DOI: 10.1080/07388551.2017.1304891. dirección: <http://dx.doi.org/10.1080/07388551.2017.1304891>.
- [13] K. Schugerl y K.-H. Bellgardt, eds., *Bioreaction Engineering*. Springer Berlin Heidelberg, 2000. DOI: 10.1007/978-3-642-59735-0. dirección: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-59735-0>.
- [14] J. Murray y L. Glass, *Mathematical Biology 1: an introduction*, Third edit, S. Antman, S. L., J. Marsden y S. Wiggins, eds. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2000.

- [15] R. A. Anderson, *Algal Culturing Techniques, 1st Edition*, 9. 2005, vol. 53, págs. 1-596, ISBN: 9788578110796. DOI: 10.1017/CB09781107415324.004. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [16] F. Alberto, O. Quintana, H. Alvarez, H. Antonio y B. Castro, «Enfrentando el modelado de bioprocesos: una revisión de las metodologías de modelado Facing bioprocess modeling: a review of the methodologies of modeling Enfrentando a modelagem de bioprocesos: uma revisão de metodologias de modelagem», vol. 30, n.º 1, pág. 74, 2016. DOI: 10.18273/revion.v30n1-2017006. dirección: <http://www.redalyc.org/pdf/3420/342052520006.pdf>.
- [17] A. A. Esener, J. A. Roels y N. W. Kossen, «Theory and applications of unstructured growth models: Kinetic and energetic aspects», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 25, n.º 12, págs. 2803-2841, 1983, ISSN: 10970290. DOI: 10.1002/bit.260251202.
- [18] A. Muller-Feuga, «Growth as a function of rationing: A model applicable to fish and microalgae», *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 236, n.º 1, págs. 1-13, 1999, ISSN: 00220981. DOI: 10.1016/S0022-0981(98)00194-4.
- [19] M. L. Shuler y F. Kargi, «Bioprocess engineering: Basic concepts», *Journal of Controlled Release*, pág. 293, 2002, ISSN: 01683659. DOI: 10.1016/0168-3659(92)90106-2. arXiv: arXiv:1011.1669v3.
- [20] H. Mochamad Bagus, «Systems and Control Group IDENTIFICATION OF ALGAE GROWTH KINETICS», Tesis doct., Wageningen University, 2009, pág. 576.
- [21] C. Nazaral, «Análisis y desarrollo de observador empleando LMI aplicado a bioprocesos», 2009.
- [22] M. Wayman y M. C. Tseng, «Inhibition-Threshold substrate concentrations», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 18, n.º 3, págs. 383-387, 1976, ISSN: 10970290. DOI: 10.1002/bit.260180308.
- [23] J. Berg, J. Tymoczko y L. Stryer, «Biochemistry», *Biochemistry*, 2007. DOI: 10.1007/978-3-8274-2989-6. dirección: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/>.
- [24] S. Salvestrini, «Analysis of the Langmuir rate equation in its differential and integrated form for adsorption processes and a comparison with the pseudo first and pseudo second order models», *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, págs. 1-18, 2017, ISSN: 18785204. DOI: 10.1007/s11144-017-1295-7.
- [25] D. Schmitt, A. Muller, Z. Csogor, F. H. Frimmel y C. Posten, «The adsorption kinetics of metal ions onto different microalgae and siliceous earth», *Water Research*, vol. 35, n.º 3, págs. 779-785, 2001, ISSN: 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(00)00317-1.
- [26] T. A. Saleh, «Isotherm, kinetic, and thermodynamic studies on Hg(II) adsorption from aqueous solution by silica- multiwall carbon nanotubes», *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 22, n.º 21, págs. 16721-16731, 2015, ISSN: 16147499. DOI: 10.1007/s11356-015-4866-z.
- [27] J. Wang y C. Chen, «Biosorbents for heavy metals removal and their future», *Biotechnology Advances*, vol. 27, n.º 2, págs. 195-226, 2009. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2008.11.002. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>.
- [28] I. Langmuir, «The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum», *Journal of the American Chemical Society*, vol. 40, n.º 9, págs. 1361-1403, 1918, ISSN: 15205126. DOI: 10.1021/ja02242a004.
- [29] A. Dada, A. P. Olalekan, A. M. Olatunya y O. Dada, «Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich Isotherms Studies of Equilibrium Sorption of Zn 2+ Unto Phosphoric Acid Modified Rice Husk», *IOSR Journal of Applied Chemistry*, vol. 3, n.º 1, págs. 38-45, 2012, ISSN: 22785736. DOI: 10.9790/5736-0313845. arXiv: arXiv:1011.1669v3. dirección: <http://www.iosrjournals.org/iosr-jac/papers/vol3-issue1/J0313845.pdf>.
- [30] R. Sips, «On the Structure of a Catalyst Surface. II», *The Journal of Chemical Physics*, vol. 18, n.º 8, págs. 1024-1026, 1950, ISSN: 0021-9606. DOI: 10.1063/1.1747848. dirección: <http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1747848>.
- [31] J. P. Cazon, «Remoción de metales pesados empleando algas marinas», Tesis doct., University Nacional de la Plata, 2012, pág. 158.
- [32] D. Kratochvil y B. Volesky, «Advances in the biosorption of heavy metals», *Trends in Biotechnology*, vol. 16, n.º 7, págs. 291-300, 1998, ISSN: 01677799. DOI: 10.1016/S0167-7799(98)01218-9.

- [33] B. Shuter, «A model of physiological adaptation in unicellular algae», *Journal of Theoretical Biology*, vol. 78, págs. 519-552, 1979.
- [34] S. Kunikane y M. Kaneko, «Growth and nutrient uptake of green alga, *Scenedesmus dimorphus*, under a wide range of nitrogen/phosphorus ratio—II. Kinetic model», *Water Research*, vol. 18, n.º 10, págs. 1313-1326, 1984.
- [35] K. Chojnacka y F. Marquez-Rocha, «Kinetic and Stoichiometric Relationship of the energy and carbon Metabolism in the Culture Microalgae», *Asian Network for Scientific Information*, págs. 21-34, 2004.
- [36] T. A. Davis, B. Volesky y A. Mucci, «A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae», *Water Research*, vol. 37, n.º 18, págs. 4311-4330, 2003, ISSN: 00431354. DOI: 10.1016/S0043-1354(03)00293-8.
- [37] C. E. De Farias Silva, B. Gris y A. Bertucco, «Simulation of microalgal growth in a continuous photobioreactor with sedimentation and partial biomass recycling», *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 33, n.º 4, págs. 773-781, 2016, ISSN: 01046632. DOI: 10.1590/0104-6632.20160334s20150016.
- [38] V. K. Gupta y A. Rastogi, «Equilibrium and kinetic modelling of cadmium(II) biosorption by nonliving algal biomass *Oedogonium* sp. from aqueous phase», *Journal of Hazardous Materials*, vol. 153, n.º 1-2, págs. 759-766, 2008, ISSN: 03043894. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2007.09.021.
- [39] K. Hangos e I. Cameron, *Process Modelling and Model Analysis*. 2001, pág. 561.
- [40] G. Buitron, I. Figueroa-Gonzalez y G. Quijano, «Kinetic characterization of *Scenedesmus quadricauda* under low irradiation conditions», *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, n.º September, 2017, ISSN: 10974660. DOI: 10.1002/jctb.5438.
- [41] Y. H. Wu, Y. Yu, X. Li, H. Y. Hu y Z. F. Su, «Biomass production of a *Scenedesmus* sp. under phosphorous-starvation cultivation condition», *Bioresource Technology*, vol. 112, págs. 193-198, 2012, ISSN: 09608524. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.02.037. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.037>.
- [42] R. A. Andersen, «The Microalgal Cell», *Handbook of Microalgal Culture: Applied Phycology and Biotechnology*, págs. 1-20, 2013, ISSN: 0003-2697. DOI: 10.1002/9781118567166.ch1. arXiv: 9809069v1 [arXiv:gr-qc].
- [43] R. Harun, M. Singh, G. M. Forde y M. K. Danquah, «Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products», *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 14, n.º 3, págs. 1037-1047, 2010, ISSN: 13640321. DOI: 10.1016/j.rser.2009.11.004.
- [44] M. H. Huesemann, J. Van Wagenen, T. Miller, A. Chavis, S. Hobbs y B. Crowe, «A screening model to predict microalgae biomass growth in photobioreactors and raceway ponds», *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 110, n.º 6, págs. 1583-1594, 2013, ISSN: 00063592. DOI: 10.1002/bit.24814.
- [45] R. Beauvais-Fluck, V. I. Slaveykova y C. Cosio, «Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*», *Scientific Reports*, vol. 7, n.º 1, págs. 1-12, 2017, ISSN: 20452322. DOI: 10.1038/s41598-017-08515-8.
- [46] K. Y. Foo y B. H. Hameed, «Insights into the modeling of adsorption isotherm systems», *Chemical Engineering Journal*, vol. 156, n.º 1, págs. 2-10, 2010, ISSN: 13858947. DOI: 10.1016/j.cej.2009.09.013.
- [47] C. G. Moles, P. Mendes y J. R. Banga, «Parameter estimation in biochemical pathways: A comparison of global optimization methods», *Genome Research*, vol. 13, n.º 11, págs. 2467-2474, 2003, ISSN: 10889051. DOI: 10.1101/gr.1262503.
- [48] K. Chojnacka, «Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications», *Environment International*, vol. 36, n.º 3, págs. 299-307, 2010, ISSN: 01604120. DOI: 10.1016/j.envint.2009.12.001. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.12.001>.
- [49] C. M. Monteiro, T. R. Brandao, P. M. Castro y F. X. Malcata, «Modelling growth of, and removal of Zn and Hg by a wild microalgal consortium», *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 94, n.º 1, págs. 91-100, 2012, ISSN: 01757598. DOI: 10.1007/s00253-011-3826-x.

- [50] A. Esmaeili, B. Saremnia y M. Kalantari, «Removal of mercury(II) from aqueous solutions by biosorption on the biomass of *Sargassum glaucescens* and *Gracilaria corticata*», *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 8, n.º 4, págs. 506-511, 2015, ISSN: 18785352. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.01.008. dirección: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.01.008>.
- [51] D. Inthorn, N. Sidtitoon, S. Silapanuntakul y A. Incharoensakdi, «Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae», *ScienceAsia*, vol. 28, págs. 253-261, 2002, ISSN: 1513-1874. DOI: 10.2306/scienceasia1513-1874.2002.28.253.

Anexo 1

Microalga *Scenedesmus* sp.

1.1 Protocolo mantenimiento y conservación

Tabla 1.1: Equipos y reactivos empleados para conservación de *Scenedesmus* sp.

Equipos	Reactivos
Tubos de ensayo de 20 ml	
Tubos de ensayo de 20 ml	
Tubos eppendorf de 1,5 ml	
Tubos Falcon de 50 ml	Cultivo fresco de <i>Scenedesmus</i> sp.
Erlenmeyers de 100 ml	Agua destilada estéril
Autoclave Sturdy SA 300VF	<i>NaCl</i> , solución isotónica 0,9 %v/v
Cámara de flujo laminar de flujo vertical	Medio de cultivo CHU13 modificado fresco líquido
Micropipeta de 50 μ l BOECO Germany	
Espectrofotómetro Termo Spectronic Helios α	

1.1.1 Preparación de células

Se toman células frescas de aproximadamente cuatro días de cultivo y se procede a concentrar el material mediante centrifugación en tubos falcón de 50 ml a 5000 rpm durante 10 minutos. Durante el proceso, se realizan lavados de la biomasa con agua destilada estéril que permitan remover el medio de cultivo en su totalidad. Posteriormente, se prepara una muestra de células y medio de cultivo fresco, se mezclan volúmenes iguales, nuevamente se agitan en vortex hasta obtener una solución homogénea y se llevan a tubos eppendorf de 1,5 ml, empleando puntas de 1000 μ l estériles. Lleve a nevera a una temperatura de 12°C, Figura 1.1. **Nota:** Recuerde que debe preparar medio líquido y ajustar pH a 4.5. Etiquete las muestras almacenadas en nevera para que pueda determinar la fecha en la que debe realizarse la activación de los cultivos (mes dos y mes tres).

1.1.2 Reactivación de células

La activación de las células conservadas se lleva a cabo transfiriendo todo el contenido de un tubo eppendorff a un tubo de ensayo de 20 ml previamente esterilizado y que contiene medio de cultivo fresco CHU13 modificado (3 ml aproximadamente). Se detiene el cultivo cuando observe crecimiento celular (coloración verde pálido). Los tubos en los que se observa un crecimiento representativo y que no muestren señales de contaminación (observaciones macroscópicas y microscópicas) son llevados a erlenmeyers de 3 ml con medio de cultivo fresco CHU13 modificado, se toman muestras de biomasa cada dos días durante 20 días a fin de establecer el comportamiento del crecimiento celular mediante mediciones conteo celular. Este mismo procedimiento es llevado a cabo durante el tiempo que desee realizarse el estudio, Figura 1.2.

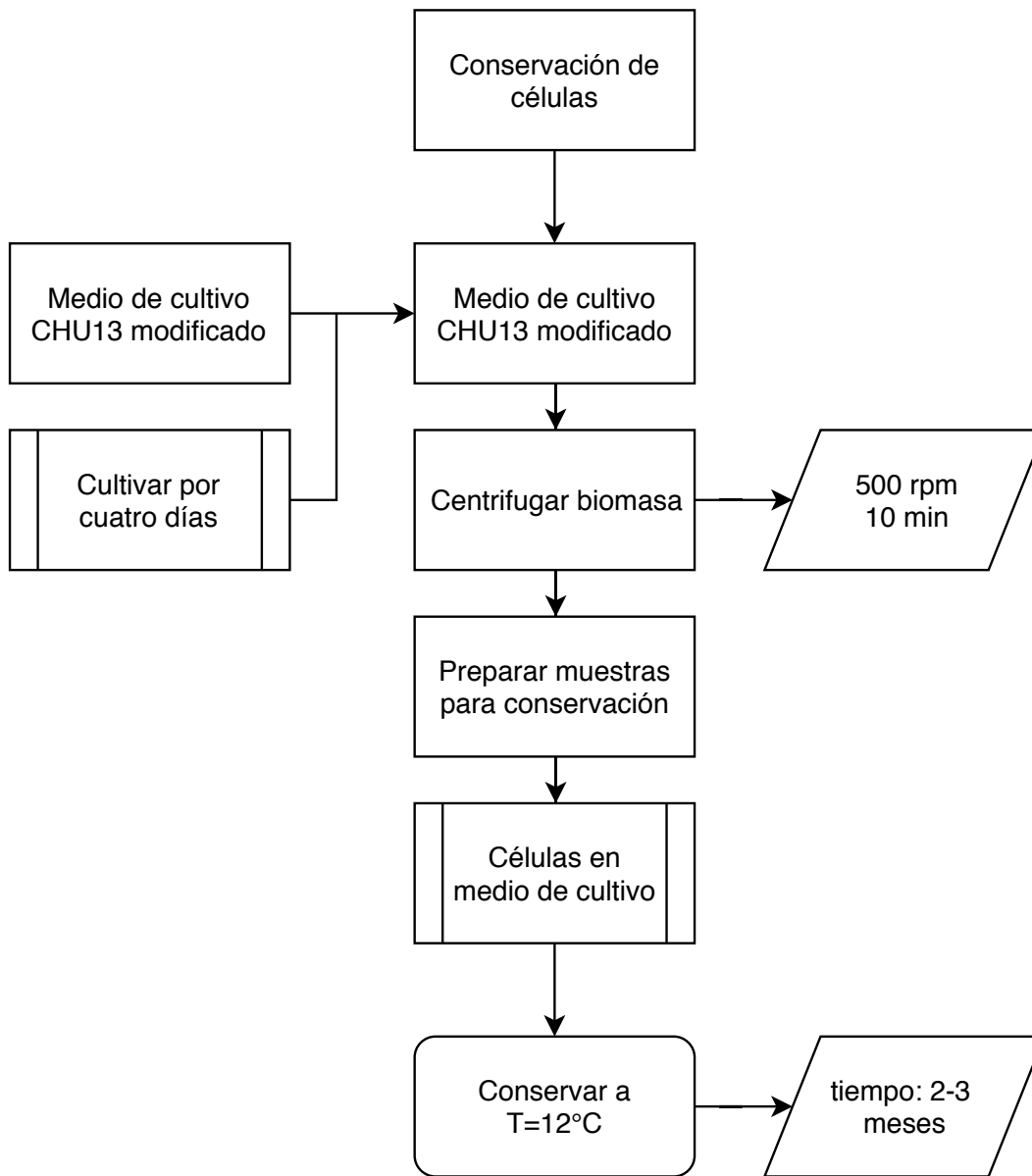


Figura 1.1: Conservación de células de *Scenedesmus* sp.

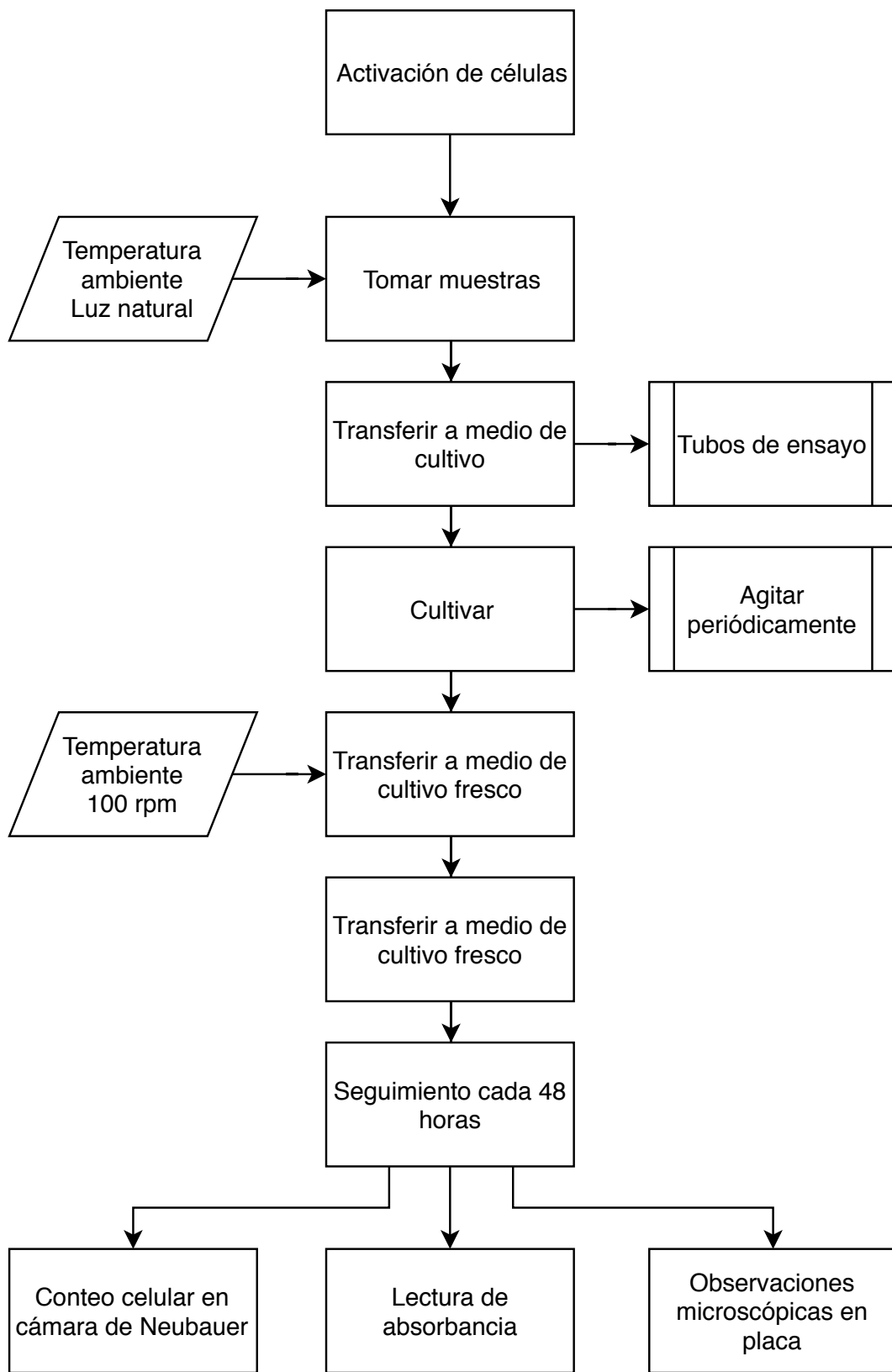


Figura 1.2: Activación de células de *Scenedesmus* sp.

Anexo 2

Determinación de biomasa microalgal por método de peso seco indirecto

2.1 Preparación de la curva estándar

Luego de observar un crecimiento representativo del microorganismo en medio líquido, se procede a sembrar a una escala mayor, proceso que se conoce como inoculación, con el fin de permitir el crecimiento de las células y la obtención de un volumen representativo de biomasa. Después de obtener un cultivo con una alta densidad celular se procede a centrifugar toda la suspensión, se descarta el sobrenadante y se lavan las células con solución salina al 0,9 % esta solución se homogeniza y corresponde a la solución madre. Se procede a realizar diluciones de esta solución que se encuentren máximo a 2.0 unidades de absorbancia. En la Figura 2.1, se observa la curva la curva de calibración para biomasa correspondiente a *Scenedesmus* sp.

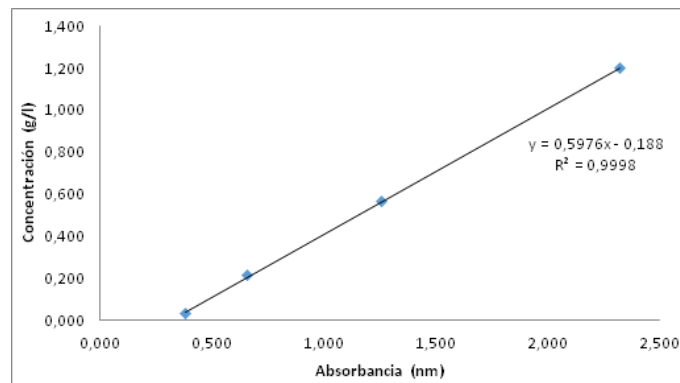


Figura 2.1: Curva de calibración *Scenedesmus* sp.

2.1.1 Protocolo

$$X = \frac{\text{Peso } (F + M) - \text{Peso } (F)}{\text{Volumen filtrado } (10\text{ml})} \quad (2.1)$$

Donde:

F : Peso del filtro

M : Peso del filtro con biomasa

Tabla 2.1: Diluciones curva de calibración de biomasa.

Dilución	Suspensión de biomasa <i>ml</i>	Agua (<i>ml</i>)
1/10	0,5	4,5
2/10	1	4
3/10	1,5	3,5
4/10	2	3
5/10	2,5	2,5
6/10	3	2
7/10	3,5	1,5
8/10	4	1
9/10	4,5	0,5
10/10	5	-

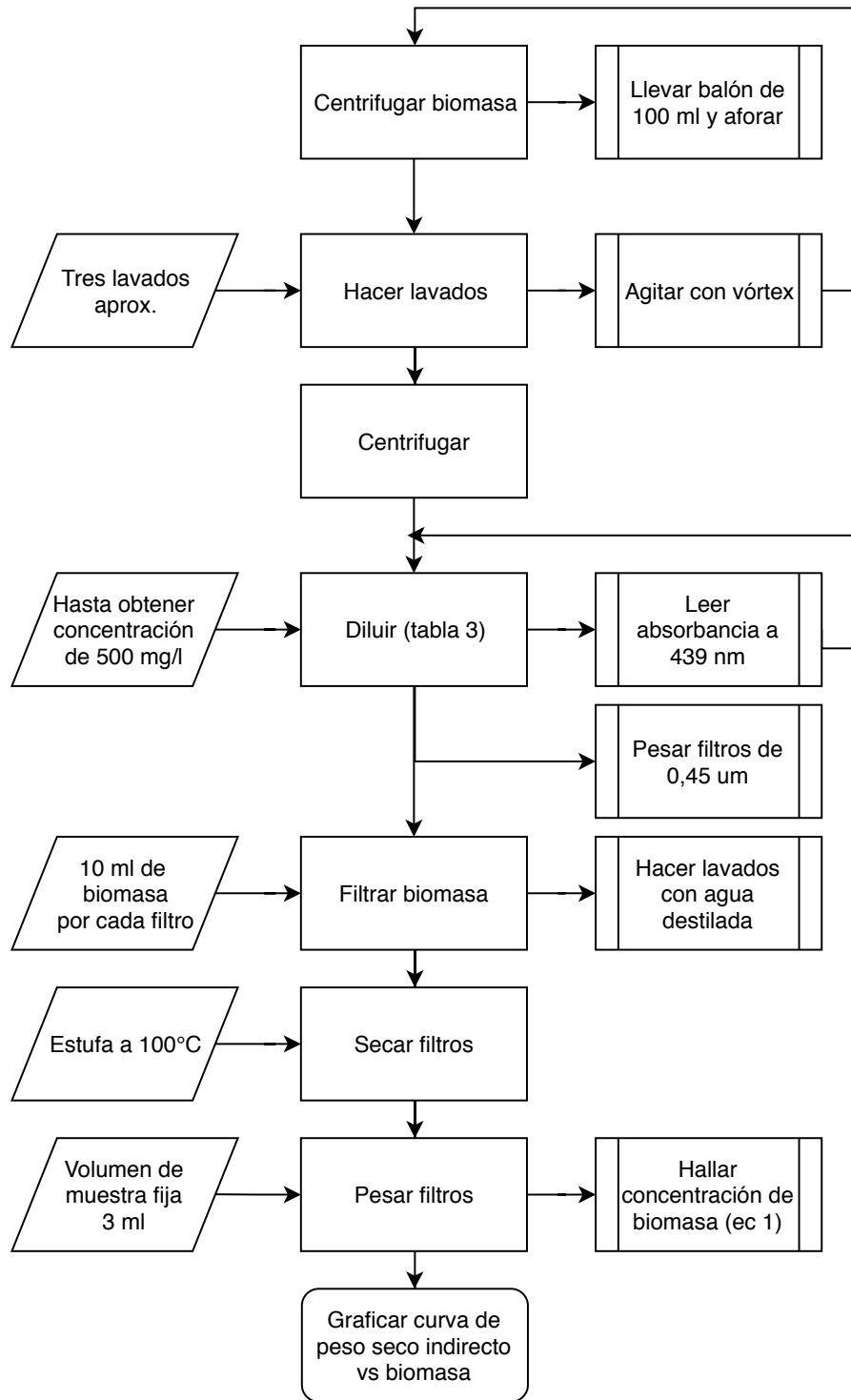


Figura 2.2: Protocolo curva de calibración de biomasa

Anexo 3

Determinación de fosfatos por espectrofotometría UV

3.1 Preparación de la curva de calibración

La curva de calibración para el método del ácido ascórbico reportado por el Standard Methods para muestra de agua dulce modificado en el grupo de Bioprocesos, se realiza a partir de una solución concentrada de K_2HPO_4 a 1000 mg/l , a partir de esta se realizan diluciones de concentración conocida por triplicado y se lee en un lector de microplatos Synergy a 880 nm

3.1.1 Curva de calibración

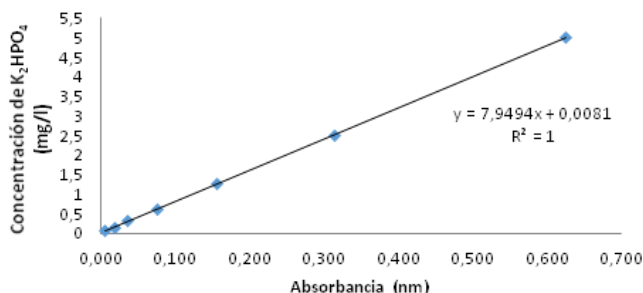


Figura 3.1: Curva de calibración para la fuente de fosfatos

3.2 Protocolo método analítico determinación de fosfatos por el método del ácido ascórbico

3.2.1 Preparación de soluciones

1. Mezclar 70 ml de H_2SO_4 concentrado hasta 500 ml de agua MilliQ.
2. Disolver $1,3715\text{ g}$ de $K(SbO)C_4H_4O_6$ (Tartrato de Antimonil Potasio) hasta 500 ml de agua MilliQ.
3. Disolver 20 g de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ (Molibdato de Amonio) en 500 ml de agua MilliQ.
4. Disolver $1,76\text{ g}$ de $C_6H_8O_6$ (Ácido Ascórbico) en 100 ml de agua MilliQ. Esta solución es estable por una semana a $4^\circ C$.
5. Reactivos combinados: mezclar 50 ml de solución de Ácido Sulfúrico, 5 ml de solución de Tartrato de Antimonil Potasio de agua MilliQ, 15 ml de solución de Molibdato de Amonio y 30 ml de Ácido Ascórbico. Mezclar después de adicionar cada reactivo. Los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de ser mezclados y mantener el orden descrito, no debe presentar turbidez.
Nota: este reactivo es estable por cuatro horas.

3.2.2 Tratamiento de las muestras

1. Las muestras deben estar a pH 7,0 al momento de realizar el análisis.
2. Tomar 1 *ml* de muestra (dilución 1/10) y adicionar 160 μ m del reactivo combinado.
3. Agitar en vórtex
4. Leer absorbancia a 880 *nm* después de 10 min y antes de 30 min.

Anexo 4

Determinación de nitratos por espectrofotometría UV

4.1 Curva de calibración

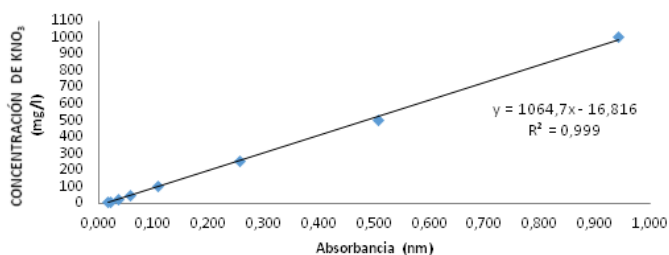


Figura 4.1: Curva de calibración para la fuente de nitratos

4.2 Protocolo

4.2.1 Preparación de soluciones

1. Solución A: Disolver 5 g de $C_7H_6O_3$ (Ácido Salicílico) en 100 ml de H_2SO_4 concentrado. Este reactivo debe prepararse semanalmente y debe mantenerse almacenado en un recipiente ámbar.
2. Solución B: Disolver 40 g de $NaOH$ en pellets en 100 ml de agua MilliQ, completar volumen hasta 500 ml en agua MilliQ

4.2.2 Tratamiento de las muestras

1. Tomar 10 μl de muestra y llevarlos a tubos eppendorff de 1,5 ml.
2. Adicionar 40 μl de la solución A, agitar en vórtex y dejar reposar por 20 min.
3. Adicionar 1 ml de la solución B, agitar nuevamente y dejar enfriar a temperatura ambiente.
4. Transferir la muestra a los microplatos y leer absorbancia a 410 nm.
5. Registrar absorbancia y calcular la concentración usando la curva de calibración

Anexo 5

Diseño experimental

5.1 Evaluación del efecto de la concentración inicial de biomasa y el inóculo sobre el crecimiento de biomasa

5.1.1 Exploración gráfica de los datos

El análisis gráfico permitió obtener información sobre la distribución, comportamiento del experimento y evaluar posibles efectos que influyen en la respuesta. En la Figura 5.1 se observan tres tipos de gráficos representativos para el análisis e inferencia de datos correspondientes al conjunto de factores y niveles.

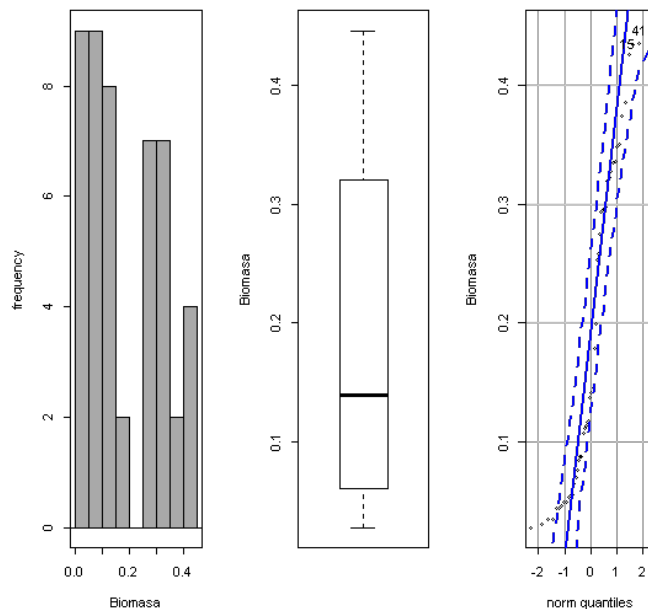


Figura 5.1: Distribución de los datos.

En el histograma (Figura 5.1, izquierda) se pudo observar una posible distribución bimodal de los datos agrupados asimétricamente y una dispersión entre los datos lo que podría decir que se encuentran contenidos en un diagrama de frecuencia con una tendencia poco homogénea. Se pudo observar una concentración de biomasa mayor a 0,4 g/l y un pico principal correspondiente al intervalo entre 0 y 0,1 g/l aproximadamente con otros picos representativos entre 0,25 y 0,35 g/l , este comportamiento muestra una posible distribución no normal de los datos que podría deberse a que el tamaño de muestra es pequeño. Adicionalmente, se observó una posible variabilidad de los datos dando una idea de tener un conjunto de datos no normales con posible presencia de dos datos atípicos.

En el diagrama de caja (Figura 5.1, centro) se observó que la mediana de los datos fue de 0,1395 g/l presentando una posible distribución asimétrica que se observa con la posición de la mediana (no central) y el tamaño de los bigotes que son completamente asimétricos indicando una posible dispersión

de los datos.

La grafica de percentiles (Figura 5.1, derecha) indicó que los datos se ajustan a la zona teórica con algunos puntos que se alejan de la normalidad lo que podría representar una posible distribución normal debido a que no se alejan demasiado de la línea recta. De igual manera presentó dos datos atípicos correspondientes a los tratamientos 15 y 41 que corresponden a los experimentos con concentración inicial de mercurio de 0 y 0,145 g/l de inóculo. De acuerdo a la orientación de los cuantiles se podría inferir que posee una asimetría negativa.

Al realizar el análisis gráfico del diagrama de caja por cada factor, Figura 5.2, se observó en términos generales que el tamaño de los bigotes de cada box plot no es igual lo que indicaría una posible distribución asimétrica. Con respecto a la varianza de los datos, ambos factores presentaron cajas un poco asimétricas lo que podría representar varianzas en los datos. En general, La mayor varianza se presentó para los valores de 0,145 g/l para la concentración de inóculo y 0,0025 g/l para la concentración de mercurio representado también una distribución asimétrica dado que sus respectivas medianas no presentaron una tendencia central.

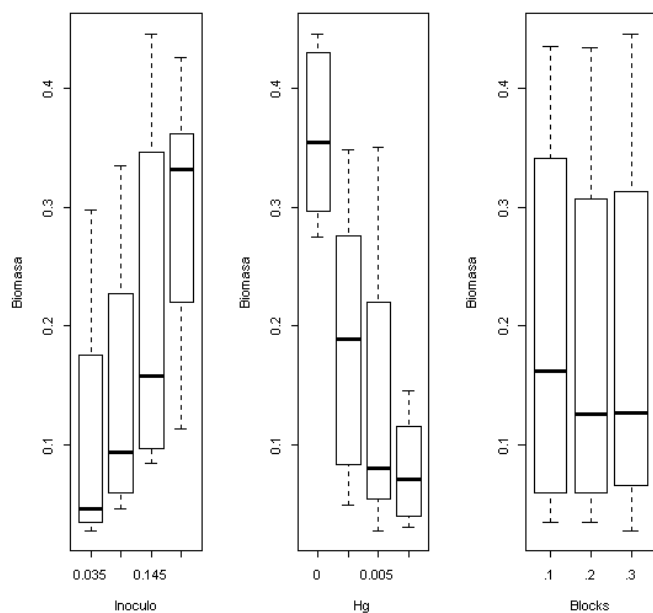


Figura 5.2: Boxplot para cada factor

Al analizar los box plot por factores, en la gráfica de inóculo (Figura 5.2, izquierda) se podría inferir que podría haber diferencias significativas entre 0,035 g/l y 0,225 g/l y para los demás niveles del factor no hay diferencias significativas, todos los niveles presentaron distribuciones asimétricas. En el gráfico de remoción por mercurio (Figura 5.2, centro) no se observaron posibles diferencias significativas entre los datos con una distribución poco asimétrica de los datos y no presentó datos atípicos. Al analizar el efecto independiente de cada factor mediante el gráfico de medias, Figura 5.3, se pudo observar que el gráfico de medias para el inóculo presentó posibles diferencias significativas. Para el factor correspondiente a la concentración inicial de mercurio es posible inferir que la concentración inicial de mercurio también presentó posibles diferencias significativas de manera significativa al igual que para la concentración de 0,0075 g/l . En general, ambos factores presentaron diferentes diferencias significativas e influyen posiblemente en el porcentaje de remoción

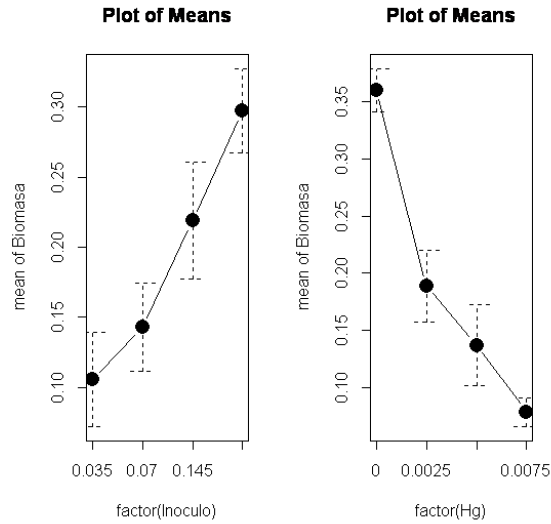


Figura 5.3: Gráfica de efectos principales

Finalmente, en la gráfica de interacción, Figura 5.4 , se observaron posibles interacciones entre la concentración de inóculo de 0,145 g/l y 0,225 g/l y la concentración inicial de mercurio de 0,0025g/l ya que se presentaron entrecruzamiento en los niveles del experimento.

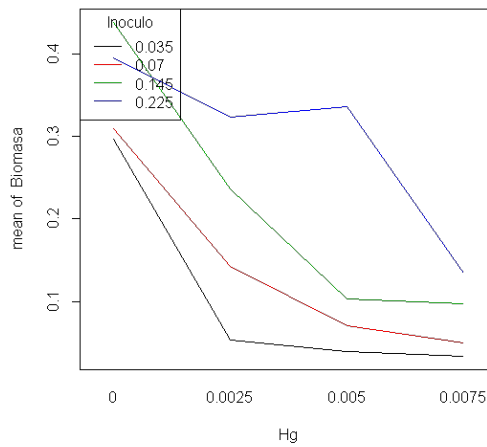


Figura 5.4: Grafica de interacción

5.1.2 Modelo de efectos fijos

Con base en la matriz experimental se calcularon las medias del experimento que se muestra en la Tabla 5.1

Tabla 5.1: Tabla de medias de la respuesta de biomasa.

Hg (g/l)	Inóculo (g/l)				Media
	0,035	0,07	0,145	0,225	
0	0,297	0,309	0,438	0,395	0,360
0,0025	0,053	0,142	0,237	0,323	0,188
0,005	0,039	0,070	0,103	0,336	0,137
0,0075	0,033	0,049	0,097	0,134	0,078
Media	0,105	0,143	0,219	0,297	0,191

La tabla de medias describe los promedios correspondientes a los factores, los tratamientos y la media global. A partir del modelo general de efectos simples y al supuesto de cada hipótesis se construyó el modelo correspondiente para la concentración de biomasa de la microalga *Scenedesmus* sp., Tabla 5.2.

Tabla 5.2: Modelo de efectos fijos para concentración de biomasa

Parámetro (g/l)	Estimado (g/l)	Valor p
μ	0,297	2,00e-16
Hg (0,0025)	-0,243	2,00e-16
Hg (0,005)	0,258	1,70e-11
Hg (0,0075)	-0,263	1,73e-05
Inoculo (0,145)	0,142	2,00e-16
Inoculo (0,225)	0,099	5,1e-07
Hg (0,0025)-Inóculo (0,07)	0,076	2,18e-12
Hg (0,005)-Inóculo (0,145)	-0,077	4,65e-06
Hg (0,0075)-Inóculo (0,145)	-0,078	4,57e-06
Hg (0,0025)-Inóculo (0,225)	0,171	1,20e-02
Hg (0,005)-Inóculo (0,225)	0,199	1,06e-04

5.1.3 ANOVA

El resultado del ANOVA se presenta en la Tabla 5.3. Este modelo obtuvo un valor de R2 ajustado de 98.03 %.

Tabla 5.3: Resultados ANOVA

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor P
Concentración de Hg	0,5289	3	2e-16
Inóculo	0,2599	3	2e-16
Hg-Inóculo	0,0880	9	2,45e-12
Residuales	0,0119	32	

5.1.4 Validación del modelo

Para validar el modelo se realizaron pruebas de independencia, normalidad y homocedasticidad con base a las hipótesis planteadas.

Prueba de normalidad de los residuales

A partir del test de Shapiro-Wilk para la normalidad de los residuales, se obtuvo un valor $p = 0,3467$ que comparado con el α del experimento ($\alpha=0,05$) permitió NO rechazar la hipótesis nula, es decir, los residuales tienen una distribución normal.

Tabla 5.4: Normalidad de los residuales

Test de Shapiro-Wilk	
W	Valor P
0,97357	0,3467

Con el fin de verificar la normalidad de los datos gráficamente se presenta el histograma correspondiente a los residuales, Figura 5.5.

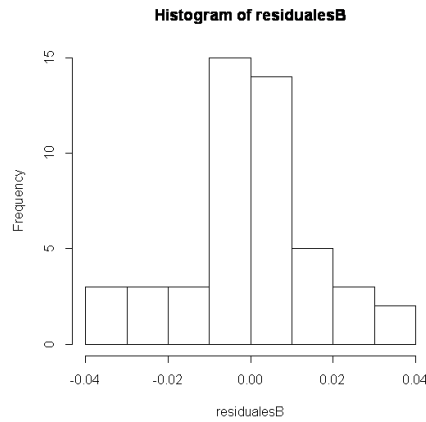


Figura 5.5: Gráfica de residuales

5.1.5 Prueba de homocedasticidad

Se realizó el test de puntaje con el fin de evaluar el comportamiento de la varianza de los datos y evaluar si permanece constante en los diferentes niveles de los factores. La Figura 5.6 representa la dispersión de los residuales con respecto a las predicciones de los tratamientos. En el diagrama se pudo observar que la distribución de los valores ajustados vs los residuales se registraron por todo el rango de operación y se puede observar que la mayoría están alejados de la línea de tendencia lo que podría indicar que las varianzas no son constantes. Si se observa la línea de tendencia (línea roja) es posible observar que la varianza no es lineal lo que se explicaría por el aparente comportamiento anormal de las mediciones incluyendo los datos atípicos en los datos 2, 34 y 45 del diseño planteado. Este comportamiento posiblemente provocó una varianza mucho mayor que las demás mediciones que presentaron un comportamiento más homogéneo.

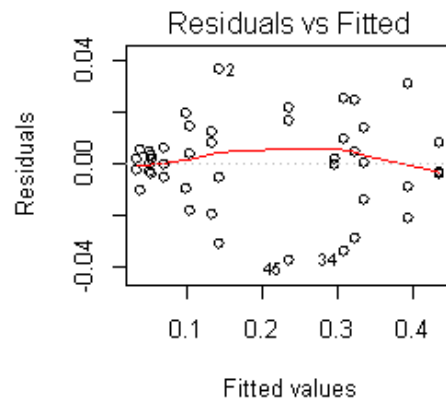


Figura 5.6: Valores ajustados Vs residuales

En la Tabla 5.5, se muestra el test realizado para probar homocedasticidad correspondiente al test de Breush-Pagan. A partir de este test (Tabla 5.5) se observó que los factores tienen una varianza homogénea ya que el valor $P(p = 0.1909)$ es mayor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$ cumpliendo el supuesto para homocedasticidad.

Tabla 5.5: Prueba de homocedasticidad

Factor	Breush-Pagan	
	BP	Valor P
Interacción Inóculo-Hg	2,9986	0,08334

5.1.6 Prueba de independencia

La independencia se probó por medio del diagrama de orden vs residuales, el cual permitió verificar la independencia entre las variables y las distribuciones relativas a cualquier valor. El test de Durbin-Watson, Tabla 5.6, permitió conocer la correlación de los datos, es decir, si una medición afecta directamente a otras. Para el modelo planteado se obtuvo un valor $P = 0,575$ que comparado con el nivel de significancia ($\alpha = 0,05$) permitió NO rechazar que la correlación sea nula y por consiguiente que los datos sean independiente.

Tabla 5.6: Prueba de independencia

Test de Durbin-Watson	
DW	Valor P
1,19027	0,8429

5.2 Evaluación del efecto de la concentración inicial de biomasa sobre la remoción de mercurio

5.2.1 Exploración gráfica de los datos

El análisis gráfico permitió obtener información sobre la distribución, comportamiento del experimento y evaluar posibles efectos que influyen en la respuesta. En la Figura 5.7 se observan tres tipos de gráficos representativos para el análisis e inferencia de datos correspondientes al conjunto de factores y niveles.

En el histograma (Figura 5.7, izquierda) se puede observar un porcentaje de remoción mayor al 70 % presentando un pico principal correspondiente al intervalo entre 95 % y 99 % aproximadamente, este comportamiento muestra una posible distribución no normal de los datos que podría deberse a que el tamaño de muestra es pequeño. Adicionalmente, se observó un sesgo hacia la izquierda que podría deberse a una variabilidad de los datos posiblemente en los tratamientos que presentaron un porcentaje de remoción menor al 90 % (entre 80-85 %). Este gráfico indicaría que la microalga *Scenedesmus sp.*, en la mayoría de los casos presenta un porcentaje de remoción alto, excepto para el pico izquierdo que presentó un porcentaje de remoción menor del 85 % dando una idea de tener un conjunto de datos no normales.

En el diagrama de caja (Figura 5.7, centro) se observó que la mediana de los datos fue de 95.44 % de remoción presentando una posible distribución asimétrica que se observa con la posición de la mediana (no central) y el tamaño de los bigotes; gráficamente la mayoría de los datos estuvieron entre 94 % y 98 % aproximadamente y se observa presencia de datos atípicos a un solo lado (lado inferior) lo que indica un sesgo en la medida.

La grafica de percentiles (Figura 5.7, derecha) indicó que los datos se ajustan a la zona teórica lo que indica una posible distribución normal debido a que no se alejan demasiado de la línea recta, presentó dos datos atípicos correspondientes a los tratamientos 8 y 16 que corresponden a los experimentos con

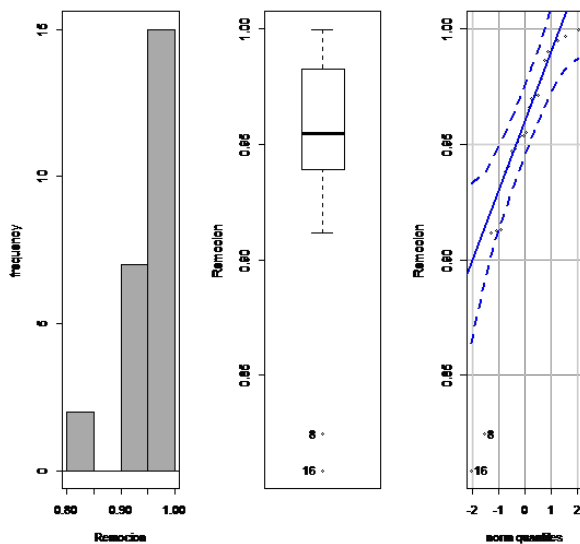


Figura 5.7: Distribución de los datos para la variable de respuesta de remoción de Hg.

la concentración más baja de inóculo (0,035g/l) y la concentración de mercurio más alta (0,0075g/l). De acuerdo a la orientación de los cuantiles se podría inferir que posee una asimetría negativa.

Al realizar el análisis gráfico del diagrama de caja por cada factor, Figura 5.8, se observó en términos generales que el tamaño de los bigotes de cada caja no es igual lo que indicaría una posible distribución asimétrica. Con respecto a la varianza de los datos, esta es posible analizarla de acuerdo al tamaño de la caja, si ambos factores tuvieran cajas simétricas podría darse que las varianzas fueran iguales, en este caso no se observó este comportamiento lo que podría indicar que las varianzas no tienen tal igualdad.

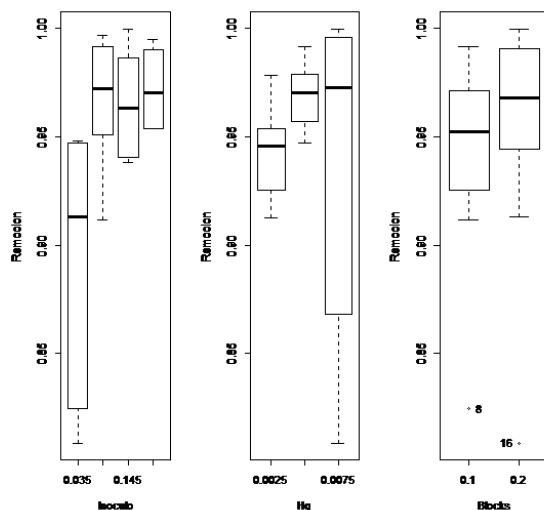


Figura 5.8: Boxplot para cada factor

La mayor varianza se presentó para los valores de 0,0075g/l en el mercurio y 0,035 g/l para el inóculo representado también una distribución asimétrica dado que sus respectivas medianas no presentaron una tendencia central posiblemente porque fue el experimento que presentó menor porcentaje de remoción

frente a las demás unidades experimentales.

Al analizar los box plot por factores, en la gráfica de inóculo (Figura 5.8, izquierda) se observó que la concentración de 0,035 g/l presentó una distribución asimétrica y una varianza de los datos alta, para los otros niveles aparentemente es posible observar una distribución simétrica y una tendencia central en sus medianas sin posibles diferencias significativas entre los datos. Para la concentración de 0,145 g/l el tamaño de los bigotes podría indicar que las mediciones realizadas para este nivel presentaron un comportamiento concentrado de los datos evidenciado por la ausencia del bigote inferior para este box plot.

En el gráfico de remoción por mercurio (Figura 5.8, centro) se observaron posibles diferencias significativas para la concentración de Hg correspondiente a 0,0075 g/l presentó una desviación de los datos muy alta entre los datos y la concentración de Hg correspondiente a 0,0075 g/l presentó una desviación de los datos muy alta. Es posible observar una distribución asimétrica sin presencia de datos atípicos lo que podría indicar que hay un sesgo en la medida y una posible distribución no normal de los datos o errores experimentales durante las mediciones finales.

En el gráfico de efectos principales, Figura 5.9, se pudo observar que el gráfico de medias correspondiente al inóculo presentó posibles diferencias significativas y como se puede observar gráficamente sería el factor que influye en el porcentaje de remoción en comparación con el otro factor. Para el factor correspondiente a la concentración inicial de mercurio es posible inferir que la concentración más alta de Hg (0,0075 g/l) presentó diferencias significativas. Desde el punto de vista para un análisis de efecto simple ambos factores influyen posiblemente en el porcentaje de remoción, a concentraciones menores de mercurio, entre las concentraciones de 0,005 y 0,0075 g/l, se presentó mayor efecto en comparación a los intervalos con menores concentraciones. Se observó también, que para la menor concentración de inóculo la remoción fue visiblemente menor aunque la desviación es muy grande.

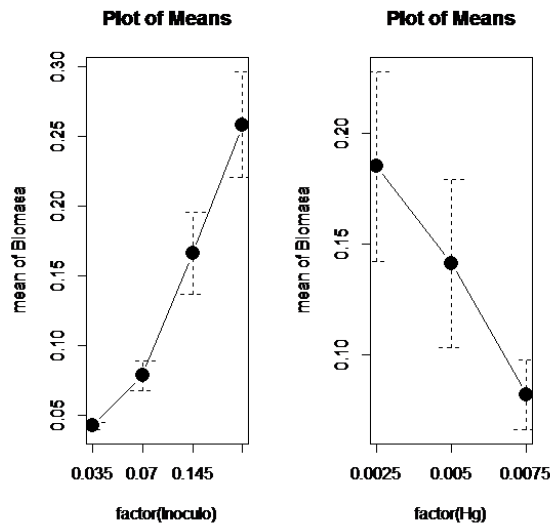


Figura 5.9: Gráfica de efectos principales

Finalmente, en la gráfica de interacción, Figura 5.10, se observa que el mercurio y el inóculo no presentan una interacción fuerte ya que no se presenta entrecruzamiento entre las diferentes líneas.

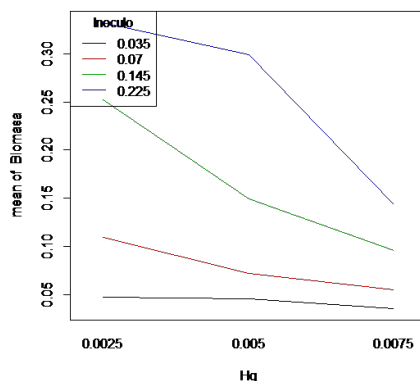


Figura 5.10: Grafica de interacción

5.2.2 Modelos de efectos fijos

Para el análisis de porcentaje de remoción de mercurio, la Tabla 5.7, describe las medias del experimento.

Tabla 5.7: Tabla de medias de la respuesta de Remoción de Hg

Hg (mg/l)	Inóculo (mg/l)				Media
	35	70	145	225	
2,5	91,28	96,46	93,90	95,35	94,25
5	94,76	97,86	97,86	97,03	96,87
7,5	81,67	95,41	97,74	99,21	93,51
Media	89,23	96,58	96,50	97,20	94,88

Al igual que el análisis para la concentración final de biomasa, en la Tabla 5.8, es posible observar el modelo de efectos fijos correspondiente al porcentaje de remoción de Hg planteado a partir del supuesto de cada hipótesis y al modelo general de efectos simples.

Tabla 5.8: Modelo de efectos fijos para la remoción de Hg.

Parámetro	Estimado	Valor P
μ	91,282	2,99e-16
Hg (0,0075)	-9,609	0,000764
Inóculo (0,07)	5,182	0,03283
Hg-Inóculo (0,0075-0,07)	8,554	0,01561
Hg-Inóculo (0,0075-0,145)	13,447	0,000829
Hg-Inóculo (0,0075-0,225)	13,469	0,000818

Los resultados descritos anteriormente permite observar cuales son los factores relevantes en el porcentaje de remoción de Hg presentando diferencias significativas para la concentración de inóculo de 0,07g/l y para la concentración inicial de Hg de 0,0075g/l, las demás concentraciones tanto de inóculo como de $Hg_{inicial}$ no presentaron significancia estadística. Para las interacciones entre los niveles de los factores se evidenció efectos significativos para las combinaciones con una concentración inicial de Hg de 7,5 mg/l y 70, 145 y 225 mg/l de inóculo, las demás posibles interacciones no tuvieron diferencias significativas.

5.2.3 ANOVA

El modelo permitió realizar el análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de remoción de mercurio, Tabla 5.9, y representó adecuadamente el porcentaje de remoción, situación que se confirma con

el coeficiente de correlación ajustado, R^2 (ajustado) = 80

Tabla 5.9: ANOVA para el porcentaje de remoción

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
Concentración de Hg	0.005014	2	5.428	0.02094
Inóculo	0.25638	3	18.506	0.0000851
Hg-Inóculo	0.017499	6	6.315	0.00342
Residuales	0.005542	12		

5.2.4 Validación del modelo

Para validar el modelo se realizaron pruebas de independencia, normalidad y homocedasticidad con base a las hipótesis planteadas.

Prueba de normalidad de los residuales

Con el fin de verificar la normalidad de los datos gráficamente se presenta el histograma correspondiente a los residuales, Figura 5.11.

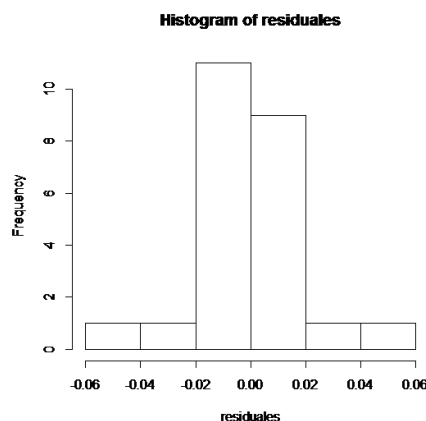


Figura 5.11: Gráfica de efectos principales.

A partir del test de Pearson chi-square para la normalidad de los residuales (Tabla 5.10), se obtuvo un valor $p=0,1562$ que comparado con el α del experimento ($\alpha=0,05$) permitió NO rechazar la hipótesis nula, es decir, los residuales provienen de una distribución normal.

Tabla 5.10: Test de normalidad de los residuales

Test de Pearson chi-square	
P	Valor P
8	0,1562

Prueba de homocedasticidad

Los test para probar homocedasticidad se realizaron con el fin de evaluar el comportamiento de la varianza de los datos y determinar si permanece constante y sin variación en los diferentes niveles de los factores. La Figura 6 representa la dispersión de los residuales con respecto a las predicciones de los tratamientos.

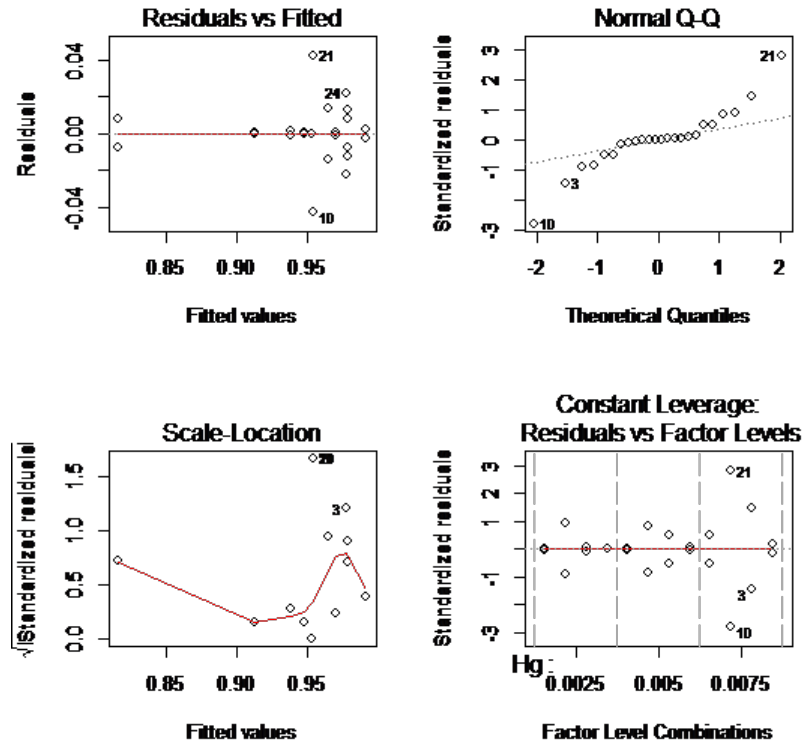


Figura 5.12: Gráfica de efectos principales.

En la Figura 5.12 se puede observar que la línea de tendencia es lineal y que los puntos están concentrados en el extremo derecho con algunos puntos centrales lo que indicaría que las varianzas no son constantes, además que presenta datos atípicos correspondientes a las mediciones 21 y 24. Por lo tanto estos datos van a provocar una varianza mucho mayor que las demás mediciones que presentaron un comportamiento más homogéneo. En la Tabla 5.11, se muestra el test de Breush-Pagan para probar homocedasticidad.

Tabla 5.11: Test de homocedasticidad

Test de Breush-Pagan		
Factor	BP	Valor P
Interacción Hg-Inóculo	0,49012	0,4839

Prueba de independencia

El test de Durbin-Watson (Tabla 5.12) permitió conocer si los datos están correlacionados, es decir, si una medición afecta directamente a otras. Para el modelo planteado se obtuvo un valor $P=0,8916$ que comparado con el nivel de significancia ($\alpha=0,05$) permitió NO rechazar que la correlación sea nula y por consiguiente que los datos sean independiente.

Tabla 5.12: Test de independencia de los datos

Test de Durbin-Watson	
DW	Valor P
1,8685	0,8916