



Universidad de Valladolid



**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA Y
AMBIENTAL**

TESIS DOCTORAL:

**Biorremediación de aguas con metales pesados
mediante biomasa microalgal**

Presentada por **Ricardo Saavedra Concha**
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. Silvia Bolado Rodríguez

Dr. Raúl Muñoz Torre

Dra. María Elisa Taboada Meneses



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA Y
AMBIENTAL**

TESIS DOCTORAL:
Biorremediación de aguas con metales pesados
mediante biomasa microalgal

Presentada por **Ricardo Saavedra Concha**
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:
Dra. Silvia Bolado Rodríguez
Dr. Raúl Muñoz Torre
Dra. María Elisa Taboada Meneses



Universidad de Valladolid

**Tesis para optar al grado de Doctor,
con Mención Doctor Internacional,
presentada por el Bioingeniero:**

Ricardo Saavedra Concha

Siendo tutores en la Universidad de Valladolid:

Dra. Silvia Bolado Rodríguez

Dr. Raúl Muñoz Torre

Y en la Universidad de Antofagasta, Chile:

Dra. María Elisa Taboada Meneses

Valladolid, Septiembre de 2019



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA Y
AMBIENTAL**

Secretaría

La presente tesis queda registrada en el
folio número _____ del correspondiente libro
de registro número _____.

Valladolid _____ de Septiembre de 2019

Fdo. El encargado del registro



Universidad de Valladolid

AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DE TESIS

(Art. 7-2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D^a Silvia Bolado Rodríguez, con D.N.I. 13924580-N

Profesora del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente.

Centro Escuela de Ingeniería Industriales (Sede Dr. Mergelina)

Dirección a efecto de notificaciones Calle Prado de la Magdalena s/n, 47011, Valladolid

e-mail silvia@iq.uva.es

Como Directora de la Tesis Doctoral titulada "Biorremediación de aguas con metales pesados mediante biomasa microalgal" realizada por D Ricardo Sebastián Saavedra Concha, alumno del Programa de Doctorado Ingeniería Química y Ambiental, **autoriza** su presentación, considerando que dicho trabajo reúne los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral expresan su conformidad con dicha presentación. La Tesis se presenta por modalidad ordinaria, de acuerdo con el convenio firmado por la Universidad de Valladolid y la Universidad de Antofagasta, Chile. Esta tesis cuenta con el aporte de 2 artículos publicados en revistas Q1, indexados en JCR y uno en evaluación.

Valladolid, 26 de Septiembre de 2019

La Directora de la Tesis,

Fdo. Silvia Bolado Rodríguez

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D. Raúl Muñoz Torre, con D.N.I. 16811991-A.

Profesor del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente

Centro Escuela de Ingeniería Industriales (Sede Dr. Mergelina)

Dirección a efecto de notificaciones Calle Prado de la Magdalena s/n, 4 7011, Valladolid

e-mail mutora@iq.uva.es

Como Director de la Tesis Doctoral titulada "Biorremediación de aguas con metales pesados mediante biomasa microalgal" realizada por D. Ricardo Sebastián Saavedra Concha, alumno del Programa de Doctorado Ingeniería Química y Ambiental, **autoriza** su presentación, considerando que dicho trabajo reúne los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral expresan su conformidad con dicha presentación. La Tesis se presenta por modalidad ordinaria, de acuerdo con el convenio firmado por la Universidad de Valladolid y la Universidad de Antofagasta, Chile. Esta tesis cuenta con el aporte de 2 artículos publicados en revistas Q1, indexados en JCR y uno en evaluación.

Valladolid, 26 de Septiembre de 2019

El Director de la Tesis,

Fdo. Raúl Muñoz Torre

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



AUTORIZACIÓN DE LA DIRECTORA DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

D^a María Elisa Taboada Meneses, con D.N.I. 66288560.

Profesora del Departamento de Ingeniería Química.

Universidad de Antofagasta, Chile.

Dirección a efecto de notificaciones Av. Universidad de Antofagasta 02800, Antofagasta, Chile.

e-mail mariaelisa.taboada@uantof.cl

Como Directora de la Tesis Doctoral titulada "Biorremediación de aguas con metales pesados mediante biomasa microalgal" realizada por D. Ricardo Sebastián Saavedra Concha, alumno del Programa de Doctorado Ingeniería Química y Ambiental, **autoriza** su presentación, considerando que dicho trabajo reúne los requisitos para ser presentado como Tesis Doctoral expresan su conformidad con dicha presentación. La Tesis se presenta por modalidad ordinaria, de acuerdo con el convenio firmado por la Universidad de Valladolid y la Universidad de Antofagasta, Chile. Esta tesis cuenta con el aporte de 2 artículos publicados en revistas Q1, indexados en JCR y uno en evaluación.

Valladolid, 26 de Septiembre de 2019

La Directora de la Tesis,

Fdo. María Elisa Taboada Meneses

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



Universidad de Valladolid

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA Y
AMBIENTAL**

Reunido el tribunal que ha juzgado la Tesis Doctoral Titulada “Biorremediación de aguas con metales pesados mediante biomasa microalgal”, presentada por el Bioingeniero Ricardo Saavedra Concha, y en su cumplimiento con lo establecido por el Real Decreto 99/2011 de 28 de enero de 2011 acuerda conceder por _____ la calificación de _____.

Valladolid, a _____ de _____ de 2019

PRESIDENTE

SECRETARIO

VOCAL

Agradecimientos

A mi pilar fundamental de estos años, la Dra. Silvia Bolado Rodríguez. Silvia, gracias por entregarme tu confianza y apoyo desde el primer día. Gracias por tu tiempo y dedicación, por tus consejos y todos tus aportes a mi crecimiento profesional y personal.

Al Dr. Raúl Muñoz, por ser un ejemplo vivo del esfuerzo y dedicación. Gracias Raúl por darme la oportunidad de participar en tu grupo de investigación y ayudarme con buena disposición en todos los momentos que fueron necesarios.

A la Universidad de Antofagasta y el departamento de Ingeniería de Procesos de minerales, por recibirme con las puertas abiertas desde el inicio. A mi tutora la Dra. María Elisa Taboada, por su paciencia, confianza y su buena disposición. Al profe Teo, por su calidad humana, las gestiones y el apoyo entregado a lo largo de estos años. A la Sra. Patricia Varas, por su apoyo, su profesionalismo y rápida gestión cuando fue necesario. A mis compañeros y amigos del programa: Seba, Coni, Daniel, César, Andrea, Carito, Andrea Gutiérrez, Vero, Yanio y Fran, por su compañía, los buenos deseos y momentos compartidos. Al Dr. Carlos Riquelme, por permitirme participar por una breve estancia en el laboratorio que Ud. dirige. A Paola Marticorena, por su entrega y preocupación.

A la Universidad de Valladolid (UVa) por acogerme en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnologías del Medio Ambiente (DIQTMA). Ha sido un honor haber sido parte de esta gran escuela durante este tiempo y son un claro ejemplo de cómo hacer bien las cosas. A Begoña, porque siempre me recibiste con una sonrisa y los brazos abiertos. Gracias a tu tiempo, trabajo y dedicación. A los técnicos del laboratorio del DIQTMA: Mónica, Aracelli, Daniel, Enrique y Beatriz, por toda la ayuda brindada. A todos mis compañeros del Departamento de Ingeniería Química de la Uva, porque de alguna u otra forma siempre aportaron de manera positiva en mi trabajo. Gracias por su compañerismo y profesionalismo.

Gracias a todas las personas que tuve la oportunidad de conocer y compartir durante mi periodo en Valladolid, quienes me apoyaron y brindaron los mejores momentos de mi estancia en España. A mi querida "Resistencia Pucelana": Adri, Rayen, Gabo, Elena, Leo, Mario, Ángela, Sara e Isa. También a Kike y Cris, por su apoyo fundamental desde el primer día... ¡Admiro todo lo que hacen!, Mis amigos Che: Andrés, Agus y Dani Bordel. A "Pelao", Kathy, Raquel, Tania y Yasna. ¡Deseo lo mejor para sus vidas y espero que el destino nos vuelva a reencontrar!

Gracias a mi familia, por darme la oportunidad de consolidarme profesionalmente y cumplir el sueño de perfeccionarme en el extranjero. Gracias a su apoyo incondicional es que he podido crecer como persona y consagrar con éxito esta etapa de mi vida académica. Gracias por su paciencia.

Finalmente, agradezco a CONICYT, por el financiamiento entregado y hacer posible este proyecto.

¡Muchas gracias a tod@s!

TABLA DE CONTENIDO

Indice de figuras	21
Indice de Tablas	25
Resumen	26
ABSTRACT	28
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	30
1.1. Metales pesados - Aspectos generales y clasificación	31
1.2. Tratamientos de eliminación de MP en aguas contaminadas	36
1.3. Bioremediación como alternativa para el tratamiento de MP en aguas	39
1.4. Microalgas - Aspectos generales	40
1.5. Mecanismos de defensa de las microalgas frente a los MP	42
1.6. Factores que afectan el proceso de biorremediación de MP	47
1.7. Potenciales especies de microalgas para la biorremediación de MP	51
1.8. Tipos de sistemas empleados en procesos de biosorción	56
1.9. Modelos cinéticos e isothermas de equilibrio en el proceso de biosorción ...	60
1.10. Estudios de regeneración y reutilización de la biomasa para el proceso de biosorción	65
1.11. Biosorción en sistemas multimetálicos	67
1.12. Inmovilización de la biomasa	69
1.12. Aplicaciones industriales de las microalgas	73
CAPITULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE ESTUDIO	76
2.1. Presentación del problema	77
2.2. Antecedentes generales del área de estudio	77
2.3. catastro de información de la contaminación de MP en el río Loa	81
2.4. Selección de zona de estudio	84
2.5. Objetivos	85
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	88
3.1. Cultivo microalgal y reactivos empleados	89
3.2. Estudio comparativo del proceso de biosorción de As, B, Cu, Mn y Zn de soluciones acuosas mediante el uso de diferentes microalgas verdes	90
3.3. Influencia de la MO y el suministro CO ₂ en la biorremediación de MP por <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus almeriensis</i> en una matriz multimetálica	93

3.4. Estudio de biosorción de una solución multicomponente de MP por biomasa liofilizada de <i>Chlorella vulgaris</i> y <i>Scenedesmus almeriensis</i> : Estudios en batch y columnas de lecho fijo.....	96
3.5. Procedimientos analíticos	98
3.6. Procedimientos estadísticos	98
CAPÍTULO 4. “ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE BIOSORCIÓN DE AS, B, CU, MN Y ZN DE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES MICROALGAS VERDES”	99
4.1. Prólogo	100
4.2. Estudio de viabilidad e inhibición de crecimiento microalgal.....	101
4.3. Estudios de biosorción monometálica	104
4.4. Estudios de biosorción multimetálica	108
4.5. Estudios de caracterización	111
CAPITULO 5. “INFLUENCIA DE LA MO Y LA ADICIÓN DE CO₂ EN LA BIORREMEDIACIÓN DE MP POR <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>SCENEDESMUS ALMERIENSIS</i> EN UNA MATRIZ MULTIMETÁLICA”	113
5.1. Prólogo	114
5.2. Efecto de la MO en el proceso de biosorción de MP de una solución multimetálica sin adición de CO ₂	115
5.3. Efecto de la MO en el proceso de biosorción de MP desde una solución multimetálica con adición de CO ₂	122
5.4. Recuperación de MP adsorbidos por la biomasa microalgal	128
CAPÍTULO 6. “ESTUDIO DE BIOSORCIÓN DE UNA SOLUCIÓN MULTIMETÁLICA DE MP POR BIOMASA LIOFILIZADA DE <i>CHLORELLA VULGARIS</i> Y <i>SCENEDESMUS ALMERIENSIS</i> OPERANDO EN BATCH Y EN COLUMNAS DE LECHO FIJO”	131
6.1. Prólogo	132
6.2. Estudios de equilibrio con biomasa liofilizada en batch	132
6.3. Estudios cinéticos del proceso de biosorción.....	137
6.4. Estudios preliminares en columnas de lecho fijo	139
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	142
7.1. Conclusiones	143
7.2. Recomendaciones para futuros trabajos	146

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	149
8.1. Referencias	150
ANEXOS	166

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Origen de los MP y su ciclo dentro del ecosistema. (Masindi & Muedi, 2018).....	31
Figura 2. Clasificación de los MP en función de las propiedades que presenta su forma iónica como ácido de Lewis. (IUPAC Technical Report; Duffun, 2002)	32
Figura 3. Mecanismos del proceso de biosorción de MP a partir de microalgas. (He & Chen, 2014)	43
Figura 4. Mecanismo de absorción de iones metálicos al interior de la célula y proceso de detoxificación intracelular en células activas metabólicamente. (Handbook of microalgal culture: applied phycology and Biotechnology, 2° Edition, Cap.32, Pág. 604).....	45
Figura 5. Diseños básicos de biorreactores utilizados para la remoción continua de metales pesado desde aguas residuales (Mehta & Gaur, 2005).....	57
Figura 6. Curva de ruptura para filtros de lecho fijo. C_i = Concentración inicial, C_{ef} = Concentración final, C_R = concentración de ruptura, ZTM = zona de transferencia de masa. (Costodes et al., 2005)	59
Figura 7. Ecuaciones y gráficas representativas de tres de los más comunes isothermas de adsorción usadas para estudios de biosorción. Isothermas de Freundlich, Langmuir y Brunauer-Emmett-Teller (BET). (Forina & Gadd, 2014).....	62
Figura 8. Diagrama esquemático del proceso de inmovilización de microalgas, en donde A, representa un proceso pasivo (adsorción) y B representa un proceso activo (encapsulación de células microalgales). (Zeng et al., 2015).....	71
Figura 9. Mapa político de la región de Antofagasta, Chile.....	78
Figura 10. Cuenca del río Loa y sus principales afluentes, poblados y faenas mineras aledañas. Región de Antofagasta, Chile.	80
Figura 11. Plano de ubicación de las estaciones de muestreo para el análisis de la cuenca del río Loa, proyecto PROIM. (Evaluación ambiental físico, química y microbiológica de la cuenca del río Loa II región, Chile, Monardes 2007).....	81
Figura 12. Oasis de Quillagua, Zona Río Loa Bajo, Región de Antofagasta, Chile. (Original)	84
Figura 13. Diagrama resumen del estudio comparativo de biosorción - Capítulo 4.....	100
Figura 14. Evolución de la densidad óptica, la concentración de CO_2 en el espacio de cabeza y el pH en cultivos de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (concentración inicial: 0,025 g/L) en presencia de boro (A, C, E) y cobre (B, D, F).	103

Figura 15. Influencia del pH en las capacidades de biosorción (mg/g) de cultivos de Chlorophyceae spp. (CS), Scenedesmus almeriensis (SA), Chlorella vulgaris (CV) y Chlamydomonas reinhardtii (CR) a 1 g/L y a un tiempo de 3h, para soluciones individuales con concentraciones iniciales de A) arsénico 12 mg/L, B) boro 60 mg/L, C) cobre 3 mg/L, D) manganeso 3 mg/L y E) zinc.....105

Figura 16. Diferencias entre las capacidades de biosorción (q) a las 3 h y 10 min de tiempo de contacto (mg / g) en suspensiones de 1 g/L de: Chlorophyceae spp. (CS), S. almeriensis (SA), C. vulgaris (CV) y C. reinhardtii (CR), para soluciones individuales con concentraciones iniciales de A) arsénico 12 mg/L, B) boro 60 mg/L, C) cobre 3 mg/L, D) manganeso 3 mg/L y E) zinc 3 mg/L.107

Figura 17. Capacidad de biosorción (mg/g) a pH 7 para A) arsénico, B) boro, C) cobre, D) manganeso y E) zinc, en suspensiones de 1 g/L de Chlorophyceae spp. (CS), Scenedesmus almeriensis (SA), Chlorella vulgaris (CV), Chlamydomonas reinhardtii (CR)109

Figura 18. Comparación de las capacidades de absorción molar (mmol/g biomasa) de solución individual de boro y soluciones multimetálicas a pH 7 en cultivos a 1 g/L de Chlorophyceae spp. (CS), Scenedesmus almeriensis (SA), Chlorella vulgaris (CV), Chlamydomonas reinhardtii, en A) Solución de boro individual - 3h, B) Multimetálico - 3h, C) Multimetálico - 24h y D) Multimetálico - 72h110

Figura 19. Análisis comparativo de los espectros de FTIR obtenidos entre biomasa de C. reinhardtii sin contacto con la solución multimetálica (Rojo) y biomasa de C. reinhardtii incubada con la solución multimetálica a 10 min (Verde) y 3 h (Azul). A) Solución multimetálica [As-B-Cu-Mn-Zn], B) Solución individual de Cu, C) Solución individual de Mn, D) Solución individual de Zn, E) Solución cuaternaria de [As-Cu-Mn-Zn], F) Solución cuaternaria de [B-Cu-Mn-Zn].....112

Figura 20. Diagrama resumen del estudio de la influencia de la materia orgánica y el suministro de CO₂ en el proceso de bioremediación de una solución multimetálica mediante biomasa microalgal - Capítulo 5114

Figura 21. Evolución de la concentración de TOC (mg/L) en estudios de biosorción de Chlorella vulgaris (CV) y Scenedesmus almeriensis (SA), desarrollados en soluciones multimetálicas con distintas concentraciones iniciales de MO, a 1 g SST/L y pH 7.0. A) CV – sin suministro de CO₂; B) SA – sin suministro de CO₂; C) CV – con suministro de CO₂; D) SA – con suministro de CO₂.116

Figura 22. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de As en estudios de biosorción sin suministro de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con cultivos de Chlorella vulgaris (A) y Scenedesmus almeriensis (B), a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0 .117

Figura 23. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de B en estudios de biosorción sin suministro de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con cultivos de Chlorella vulgaris (A) y Scenedesmus almeriensis (B) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0 ..118

Figura 24. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn) en estudios de biosorción sin suministro de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO,

realizados con biomasa de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA), a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. A) CV-Cu; B) SA-Cu; C) CV-Mn; D) SA-Mn; E) CV- Zn; F) SA-Zn.120

Figura 25. Correlación esquemática de la materia orgánica (MO), crecimiento celular, concentración de TOC y el pH del medio en la capacidad de eliminación de la biomasa microalgal para la solución multimetálica.122

Figura 26. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de As en estudios de biosorción con suministro de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0.124

Figura 27. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de B en estudios de biosorción con suministro de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0.125

Figura 28. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn) en estudios de biosorción con suministro de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con cultivos de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. A) CV-Cu; B) SA-Cu; C) CV-Mn; D) SA-Mn; E) CV- Zn; F) SA-Zn126

Figura 29. Evolución de la eficiencia de recuperación de los metales pesados de una solución multimetálica (%) en estudios de *C. vulgaris* (CV) y *S. almeriensis* (SA) a una concentración de 1 g SST/L y pH 7.0, usando eluyentes (HCl, NaOH y CaCl₂) a dos concentraciones (0.1 M, 0.2 M). A) CV - HCl, B) SA - HCl, C) CV - NaOH, D) SA - NaOH, E) CV - CaCl₂, F) SA - CaCl₂130

Figura 30. Comparación de capacidades de biosorción (mg/g) entre soluciones individuales y obtenidas en solución multimetálica (SMM), en estudios empleando biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B), a una concentración de 1 g/L y pH 7.0.134

Figura 31. Capacidad total de biosorción (mg/g) de la biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a diferentes concentraciones de una solución multimetálica, desarrollado a una concentración de 1 g/L, a pH 7.0 y un tiempo de contacto de 180 min.135

Figura 32. Comparación de la relación fraccional (%) en la capacidad de biosorción multimetálica total (qT) a diferentes concentraciones de SMM, empleando biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B), a 1 g/L, pH 7.0 y a 180 min de tiempo de contacto. .136

Figura 33. Aplicación del modelo cinético de pseudo-segundo orden en el proceso de biosorción de una solución multimetálica a diferentes concentraciones empleando biomasa liofilizada de A) *Chlorella vulgaris* y B) *Scenedesmus almeriensis*137

Figura 34. Perfiles de las isothermas de adsorción de Freundlich implicadas en el proceso de biosorción de una solución multimetálica, usando biomasa microalgal liofilizada139

Figura 35. Efecto de la concentración del influente en las curvas de ruptura implicadas en el proceso de biosorción de una solución multimetálica usando biomasa microalgal floculada. A) *Chlorella vulgaris*, B) *Scenedesmus almeriensis*140

Figura 36. Efecto de la tasa de flujo en las curvas de ruptura implicadas en el proceso de biosorción de una solución multimetálica usando biomasa floculada de *Chlorella vulgaris*, a pH 7.0 y una concentración del influente de SMM_{2X} 141

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de los principales MP en humanos, plantas y microorganismos	34
Tabla 2. Límites máximos permitidos para la descarga de residuos líquidos a cuerpos de aguas fluviales sin capacidad de dilución del cuerpo receptor	35
Tabla 3. Resumen de ventajas y desventajas de las técnicas convencionales de remoción de MP en soluciones acuosas	38
Tabla 4. Comparación entre los principales sistemas de cultivo de microalgas	42
Tabla 5. Principales clases de ligandos presentes en la pared celular de las microalgas y su afinidad a distintos tipos de clases de metales	43
Tabla 6. Comparación entre los mecanismos de defensa de las microalgas: Procesos de biosorción y bioacumulación	46
Tabla 7. Listado con los principales resultados de estudios de biosorción de microalgas con eficiencia en remoción de MP	53
Tabla 8. Modelos cinéticos del proceso de adsorción y ecuaciones asociadas, presentadas en modo lineal y no lineal	63
Tabla 9. Modelos de cinética de adsorción e isothermas de equilibrio seleccionados para la biosorción de iones de MP en microalgas	64
Tabla 10. Eficiencia de la elución de metales por diferentes agentes de desorción	66
Tabla 11. Industrias generadoras de contaminación con MP y los principales metales asociados en los efluentes del sector industrial	68
Tabla 12. Recuento de estudios de remoción de MP y otros contaminantes mediante el uso de microalgas inmovilizadas.....	73
Tabla 13. Lista de patentes de productos asociados a la biosorción	75
Tabla 14. Selección y rango de concentración de los parámetros de estudio en sus valores mínimos y máximos alcanzados en los análisis de calidad del agua de la cuenca del río Loa.	82
Tabla 15. Parámetros de ajuste y coeficiente de correlación del modelo de pseudo segundo orden en el proceso de biosorción de una solución multimetálica realizadas a diferentes concentraciones mediante el uso de biomasa liofilizadas de <i>Chlorella vulgaris</i> (CV) y <i>Scenedesmus almeriensis</i> (SA).	137

RESUMEN

En este trabajo se estudia el empleo de microalgas para la biorremediación de la contaminación de metales pesados (MP) presentes en aguas. En particular, se demuestra la efectividad de cuatro especies de microalgas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* y *Chlorophyceae* sp.) en procesos de depuración de los elementos As, B, Cu, Mn y Zn. El estudio toma como base la composición en metales pesados del río Loa, en la región de Antofagasta, debido a la importante problemática que conlleva esta contaminación, en una zona con muy importante escasez de agua.

Se estudió el efecto de los principales factores de operación que afectan el proceso de biorremediación microalgal frente a la presencia de MP, empleando biomasa viva e inactiva y comparando las capacidades de biosorción tanto en disoluciones monometálicas como multimetálicas. Para ello, se evaluó el efecto de factores como pH (5.5 – 7.0 – 9.5) y tiempo de contacto (10 – 180 min) tanto en la cinética como en las isotermas de equilibrio. Estos estudios también fueron complementados con estudios de caracterización. Las pruebas de biosorción lograron demostrar altas tasas de eliminación, destacándose los procesos frente a Cu, (88%, *Chlorophyceae* sp., pH 7.0, 10 min), Mn (99,4%, *C. vulgaris*, pH 7,0, 180 min) y Zn (91,9%, *Chlorophyceae* sp., pH 5,5, 180 min). Se determinó que el pH influye individualmente, destacándose una mayor eliminación de Mn y Zn a pH 5,5 (*Chlorophyceae* sp., y *S. almeriensis*) y la eliminación de Cu a pH 7,0 (*Chlorophyceae* sp). En tanto, el tiempo de contacto disminuyó las tasas eliminación de As y B, mientras que favoreció una mayor capacidad de eliminación en los procesos de Cu, Mn y Zn.

Además, se evaluó una posible integración de los procesos de biorremediación de metales y de materia orgánica con microalgas. Para ello, se estudió el proceso de biosorción multimetálico empleando condiciones típicas de fotobiorreactores de tratamiento de aguas, como la concentración de la materia orgánica (MO) y el suministro de CO₂. Los resultados obtenidos evidenciaron que la presencia de MO produce una fuerte disminución en la capacidad de eliminación de MP (p.e. una disminución de un 22,7% y un 11,1% en las capacidades finales de biosorción por efecto de la presencia de MO en estudios desarrollados con *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente). Los procesos específicos más fuertemente afectados por la presencia de MO fueron los implicados en la eliminación de As (desde 2,2 a 0,0 mg/g usando *C. vulgaris* y desde 2,3 a 1,7 mg/g usando *S. almeriensis*) y Cu (de 3,2 a 2,3 mg/g en *C. vulgaris* y de 2,1 a 1,6 mg/g usando *S. almeriensis*). Se determinó que el efecto negativo asociado a la MO en el proceso de biosorción se reduce a medida que aumenta el tiempo de contacto. Esta variación responde a una respuesta metabólica de las especies, disminuyendo así la concentración de MO en el medio y su efecto negativo asociado al proceso. Del mismo modo, el suministro de CO₂ produjo una disminución de la capacidad total de biosorción en ambas especies de microalgas, reduciendo su capacidad en un 27% (desde 10,1 mg/g a 7,1 mg/g) en estudios desarrollados con *C. vulgaris* y en un 35% (desde 11,0 mg/g a 6,6 mg/g) empleando *S. almeriensis*.

Por otro lado, se trabajó en optimizar el proceso de biosorción/recuperación de los MP previamente adsorbidos por la biomasa microalgal. En este punto, se consideraron como factores el uso de

distintos tipos de eluyentes (HCl, NaOH, CaCl₂) y sus concentraciones (0.1 M y 0.2 M), el tiempo de contacto (10 – 20 – 60 min) y la presencia de MO en el proceso. Se determinó que HCl 0.1 M conllevó las mejores eficiencias de recuperación, con tasas sobre el 85% para el caso del As, 92% para Cu, y casi una completa recuperación ($\approx 100\%$) para Mn y Zn. En tanto, la presencia de MO durante la fase de carga repercutió positivamente en las posteriores tasas de recuperación.

En estudios con biomasa inactiva, la capacidad de biosorción total resultó ser fuertemente dependiente de la concentración del sistema multimetálico. Las máximas capacidades de biosorción fueron obtenidas empleando la disolución multimetálica más concentrada (SMM_{4x}: As: 48 mg/L, B: 240 mg/L, Cu-Mn-Zn: 12 mg/L), con valores de 56,0 mg/g en *C. vulgaris* y 56,3 mg/g en *S. almeriensis*, valores 6 y 3,5 veces superiores a los observados en SMM_{1x} y SMM_{2x}, respectivamente. Se observó que el aumento en la concentración de SMM favorece directamente la eliminación de As, Cu, Mn y Zn. Por el contrario, la eliminación de B se vio dramáticamente afectada. Esta disminución en las tasas de eliminación de B ocurre tanto en estudios con microalgas vivas como en microalgas muertas.

Finalmente, se realizó un análisis preliminar de la biosorción de MP empleando sistemas de columnas trabajando en lecho fijo con biomasa inactiva. Se demostró la necesidad de operar con bajas tasas de flujo (3 mL/min), aunque no se observó una tendencia clara respecto a la concentración del afluente. Aun así, los resultados permiten evidenciar un mayor desempeño de la especie *C. vulgaris*. Con esta contribución, es posible validar el sistema de columnas de lecho fijo como un sistema apto para el proceso de biorremediación de aguas con MP basado en biomasa microalgal, marcando un real antecedente para un futuro escalamiento del proceso.

ABSTRACT

In this work, the use of microalgae for the bioremediation of heavy metal (HM) contamination present in water is studied. In particular, the effectiveness of four green microalgae species (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis*, and *Chlorophyceae* sp.) in processes for the treatment of the elements: As, B, Cu, Mn, and Zn was demonstrated. The study is based on the heavy metal composition of the Loa river (Antofagasta region, Chile) due to the important problem that this pollution entails in an area with a severe water stress.

The effect of the main operating factors influencing microalgae-based HM bioremediation was studied, using live and inactive biomass, and comparing biosorption capacities in both monometallic and multimetallic solutions. In this context, the impact of factors such as pH (5.5 - 7.0 - 9.5) and contact time (10 - 180 min) on the kinetics and equilibrium isotherms was evaluated. The biosorption tests conducted revealed high elimination efficiencies, in particular the tests with Cu, (88%, *Chlorophyceae* sp., pH 7.0, 10 min), Mn (99.4%, *C. vulgaris*, pH 7.0, 180 min) and Zn (91.9%, *Chlorophyceae* sp., pH 5.5, 180 min). It was found that the pH influenced individually the removal of each MP, for instance a greater elimination of Mn and Zn was recorded at pH 5.5 (*Chlorophyceae* sp., and *S. almeriensis*) and the removal of Cu at pH 7.0 (*Chlorophyceae* sp.). Moreover, the contact time decreased the elimination efficiencies for As and B, while favouring the elimination capacity for Cu, Mn and Zn.

Additionally, the integration of microalgae-based heavy metal bioremediation and organic matter removal was evaluated. In this context, the multimetallic biosorption process was studied using typical conditions of water treatment photobioreactors, such as the concentration of organic matter (OM) and CO₂ supply. The results obtained showed that the presence of OM mediates a decrease in the HM elimination capacity (e.g. a decrease of 22.7% and 11.1% in final biosorption capacities in studies conducted with *C. vulgaris* and *S. almeriensis*, respectively). The specific processes most severely affected by the presence of OM were those involved in the removal of As (from 2.2 to 0.0 mg/g using *C. vulgaris* and from 2.3 to 1.7 mg/g using *S. almeriensis*) and Cu (from 3.2 to 2.3 mg/g in *C. vulgaris* and 2.1 to 1.6 mg/g using *S. almeriensis*). It was determined that the negative effect associated with the OM in the biosorption process is reduced as the contact time increases. This variation was likely caused by a metabolic response of the species, thus decreasing the concentration of MO in the environment and their negative effect associated with the process. Similarly, CO₂ supply induced a decrease in the total biosorption capacity in both microalgae species, reducing their capacity by 27% (from 10.1 mg/g to 7.1 mg/g) in studies conducted with *C. Vulgaris* and 35% (from 11.0 mg / g to 6.6 mg / g) using *S. almeriensis*.

On the other hand, an optimization study of the biosorption/recovery process of HM previously adsorbed by microalgal biomass was carried out. The influence of the type of eluent (HCl, NaOH, CaCl₂) and concentration (0.1 M and 0.2 M), contact time (10 - 20 - 60 min) and the presence of OM on HM recovery was assessed. It was determined that 0.1 M HCl supported the best recovery efficiencies, with values over 85% in the case of As, 92% for Cu, and almost a complete recovery (≈

100%) for Mn and Zn. Furthermore, the presence of OM during the loading phase exerted a positive impact on the subsequent recovery ratios.

The total biosorption capacity recorded in batch studies with inactive biomass was strongly dependent on the concentration of the multimetallic system. The maximum biosorption capacities were obtained using the more concentrated multimetallic solution (SMM_{4x}; composed of As: 60 mg/L, B: 240 mg/L, Cu, Mn and Zn: 12 mg/L), with values of 56.0 mg / g in *C. vulgaris* and 56.3 mg / g in *S. almeriensis*, values 6 and 3.5 times higher than those observed in SMM_{1x} and SMM_{2x}, respectively. It was observed that the increase in the concentration of SMM enhances the elimination of As, Cu, Mn, and Zn. On the contrary, the elimination of B was dramatically affected. This decrease in B removal rates occurs both in studies with live microalgae and dead microalgae.

Finally, a preliminary analysis of the biosorption of HM was performed using column systems operated as a fixed bed with inactive biomass. The need to operate with low flow rates (3 mL/min) was demonstrated, although a clear trend regarding the influent HM concentration was not observed. The results show a greater performance of the species *C. vulgaris*. Hence, it is possible to validate the fixed bed column system as a suitable microalgae-based system for the process of bioremediation of HM loaded water, which represents a first step for future scale-up of the process.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1. METALES PESADOS - ASPECTOS GENERALES Y CLASIFICACIÓN

Los metales pesados (MP) son considerados como uno de los principales agentes contaminantes para el medio ambiente. La presencia descontrolada de estos elementos puede provocar graves consecuencias tanto para la vida humana como para el ecosistema (Carolin et al., 2017). Por definición, el término “metal pesado” se emplea para definir a cualquier elemento químico que tenga características metálicas o metaloides, que presente una elevada densidad atómica y una alta toxicidad a bajas concentraciones (Suresh Kumar et al., 2015a). Se ha establecido que para considerarse MP, un elemento deba poseer una densidad atómica igual o superior a los 4000 kg/m³ (Burakov et al., 2018); o una densidad atómica 5 veces superior a la densidad atómica del agua (Hashim et al, 2011).

Los MP se pueden encontrar tanto naturalmente en la corteza terrestre en diversos tipos de minerales como en procesos de contaminación industrial, principalmente relacionados con el sector de la minería (Burakov et al., 2018; Puga et al., 2006). Muchos de estos metales actúan como micronutrientes esenciales para el crecimiento de especies vegetales, requeridos para el funcionamiento de variadas funciones bioquímicas y fisiológicas, como por ej: el zinc (Zn), cobre (Cu), manganeso (Mn), hierro (Fe), magnesio (Mg), níquel (Ni) y cobalto (Co) (Tchounwou et al., 2012). Sin embargo, existen otros elementos a los cuales no se les ha asociado ninguna función biológica conocida, siendo los más importantes: cadmio (Cd), plomo (Pb), mercurio (Hg), plata (Ag) y arsénico (As). Los MP son considerados como elementos estables, los cuales no pueden ser metabolizados por la mayoría de los organismos, bioacumulándose a través de la cadena trófica (Fig. 1).

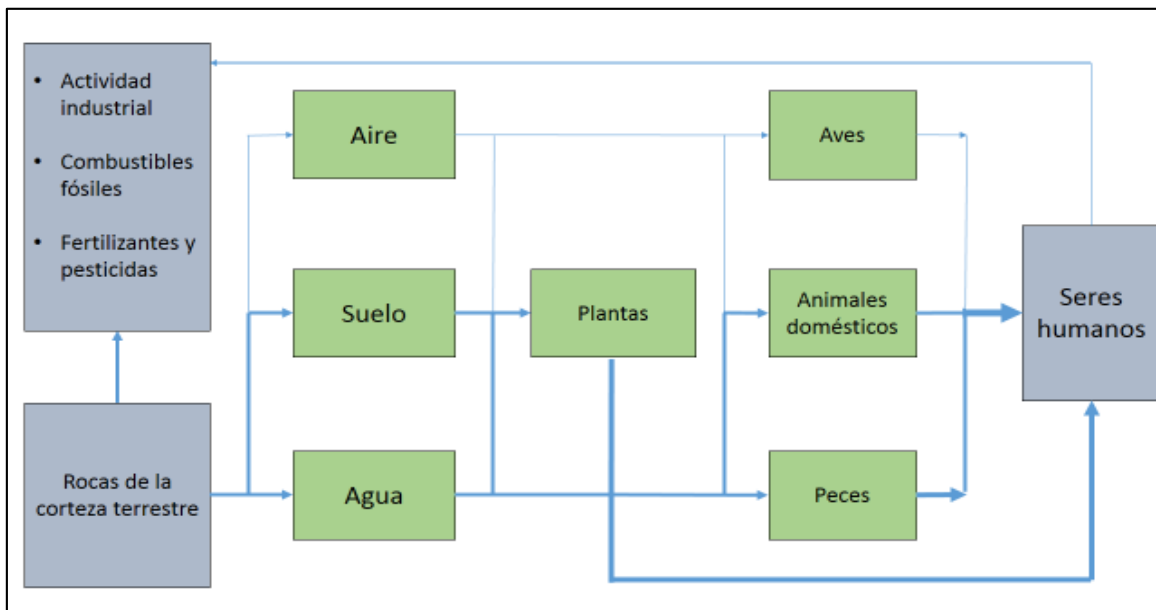


Figura 1. Origen de los MP y su ciclo dentro del ecosistema. (Masindi y Muedi, 2018)

Los MP presentan numerosas formas de clasificación. Entre estas, la más utilizada en aspectos medioambientales se define en función de las propiedades que presenta su forma iónica como ácido de Lewis. La importancia de esta clasificación es debido a que el grado de acidez de Lewis de cada ion metálico permite inferir la forma que presentará en la formación de complejos la unión entre el metal con los ligandos presentes en los organismos vivos. Para esta clasificación, existen tres clases definidas (Fig. 2):

- **Clase A:** Son aquellos iones metálicos que presentan una fuerte naturaleza ácida, preferentemente forman complejos con ligandos similares no polarizables, en vez de con compuestos donantes de oxígeno. La unión del ion metálico en estos complejos es principalmente de carácter iónico. En esta clase, se encuentra el aluminio (Al) y los pertenecientes al grupo I-A y II-A de la tabla periódica, entre otros. Cabe destacar que por definición los MP no se consideran en esta clase de metales.
- **Clase B:** Son aquellos iones de metales débiles que se unen preferentemente a ligandos polarizables. Su enlace mayormente es de tipo covalente. Entre ellos se encuentran: Ag, Hg, Au, Pt, Cd y el Cu (I), entre otros.
- **Clase límite o "borderline":** Son aquellos que presentan una naturaleza intermedia entre los metales de clase A y B, pudiendo presentar ambos tipos de enlace, en función de diversas variables presentes en el medio en que se encuentren. En este grupo se encuentran los principales MP implicados en los casos de contaminación de aguas, como por ejemplo, el Ni, Zn, Cu (II), Co, Mn y el Fe (II).

1	Class A																18		
H	Class B										Borderline						He		
2	Li	Be											B	C	N	O	F	Ne	
3	Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar	
4	K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe(III) Fe(II)	Co	Ni	Cu(II) Cu(I)	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr	
5	Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe	
6	Cs	Ba	*	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb(IV) Pb(II)	Bi	Po	At	Rn	
7	Fr	Ra	#	Rf	Db	Sg	Bh	Hs	Mt	110									
* lanthanide			La	Ce	Pr	Nd	Pm	Sm	Eu	Gd	Tb	Dy	Ho	Er	Tm	Yb	Lu		
# actinide			Ac	Th	Pa	U	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lr		

Figura 2. Clasificación de los MP en función de las propiedades que presenta su forma iónica como ácido de Lewis. (IUPAC Technical Report, 2002).

A pesar de no estar considerado el As en la Fig. 2, este elemento se considera un MP por convención, debido a que presenta características de metaloide y posee un importante efecto tóxico en el medioambiente (Wang et al., 2015). Si consideramos la naturaleza química del As, se puede considerar como un MP de clase límite (Bahar et al., 2013; Podder & Majumder, 2016). En el caso del B, este elemento no cae en la categoría de MP debido a su baja densidad atómica.

La toxicidad de los MP es a menudo dependiente de la forma química u especiación metálica en que se encuentren. Para la mayoría de estos elementos, la forma más tóxica es el estado de oxidación más estable. El principal mecanismo de toxicidad de los MP tiene relación con la capacidad de poder interferir en un amplio espectro en las actividades metabólicas de los organismos vivos (Kaplan, 2013a). Sus efectos tóxicos pueden ser causados por los siguientes mecanismos:

- El bloqueo de grupos funcionales que formen parte de moléculas con importancia biológica, como por ejemplo, enzimas y sistemas de transporte para iones y nutrientes esenciales.
- El desplazamiento y/o sustitución de iones metálicos esenciales presentes en biomoléculas y unidades celulares funcionales. Esto puede generar la modificación o inactivación de enzimas o la disrupción de la integridad de la membrana celular o de algún organelo específico (Cuizano and Navarro, 2008).
- La inducción de generación de especies de oxígeno reactivas (ROS, *por sus siglas en inglés, "reactive oxygen species"*) en el espacio intracelular, los cuales son altamente oxidantes y pueden ocasionar daños a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

Los efectos son nocivos para todo tipo de organismos, aunque su acción y potencia presenta importantes diferencias según el tipo de organismo. En la Tabla 1 se resume las principales implicancias de la acción de los MP para humanos, plantas y microorganismos.

Por otro lado, la presencia de MP en cuerpos de agua mediante efluentes asociados a actividad industrial produce un impacto incorregible en el sistema acuático, destruyendo la capacidad de los cuerpos de agua de purificarse por sí mismos (Veena et al., 2012). En el ecosistema marino, el ion metálico libre es la especie más tóxica, debido a sus características y capacidad de reacción (P. Tchounwou et al., 2012). En todo el mundo, se han ido estandarizado regulaciones y normativas con el fin de disminuir el impacto medioambiental y la toxicidad al ser humano. Estas regulaciones se desarrollan según la factibilidad técnica en la reducción de la concentración de los contaminantes en los efluentes y el factor económico de la aplicación efectiva de las tecnologías disponibles (Miazek et al., 2015).

Tabla 1. Efecto de los principales MP en humanos, plantas y microorganismos

Metal	Fuente	Efectos en los seres humanos	Efectos en plantas	Efectos en microorganismos
Arsénico	Actividad minera, pesticidas, rocas volcánicas, sedimentos, fundiciones	Daño neuronal, cardiovascular y desordenes respiratorios, conjuntivitis, dermatitis, cáncer a la piel	Daño a la membrana celular, inhibición de crecimiento, interfiere con procesos metabólicos críticos, pérdida de fertilidad, disminución de la producción frutícola, estrés oxidativo.	Inhibición de la actividad enzimática, reducción de la tasa de crecimiento
Cobre	Refinerías de la industria cuprífera minería, pinturas, blindajes, imprentas	Dolor abdominal, anemia, diarrea, dolor de cabeza, daño hepático y renal, desordenes metabólicos, nausea, vómito	Clorosis, estrés oxidativo, retardo del crecimiento	Interrupción de las funciones celulares, inhibición de la actividad enzimática
Mercurio	Corteza terrestre, actividad volcánica, la combustibles fósiles, termoeléctricas, minería	Tóxico para los sistemas nervioso e inmunitario, el aparato digestivo, la piel y los pulmones riñones y ojos.	inhibidor de crecimiento, afecta actividad enzimática, reducción de la fotosíntesis	Interrupción de las funciones celulares, inhibición de la actividad enzimática
Manganeso	Aguas superficiales, napas subterráneas, baterías, minería,	Neurotóxico, dificultad de aprendizaje, Mal de Parkinson, problemas de coordinación, carcinogénico	Daño en el proceso de fotosíntesis, afecta la actividad enzimática.	Muerte, disminución de la biomasa, inhibe crecimiento
Zinc	manufactura, minería, refinería del petróleo, plomería	Ataxia, depresión, irritación intestinal, hematuria, ictericia, impotencia, falla hepática y renal, degeneración macular, cáncer prostático.	Afecta los procesos de fotosíntesis, inhibe la tasa de crecimiento, reduce el contenido de clorofila, afecta la tasa de germinación	Muerte, disminución de la biomasa, inhibe crecimiento

(Ayangbenro y Babalola, 2017)

En la Tabla 2 se presentan los límites de descarga máximos permitidos de cada MP y otros elementos, como el B, que están regulado según la norma chilena Decreto Supremo Ds. 90. Esta norma establece la regulación de la emisión de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos en aguas marinas y continentales de superficie, especificando la descarga de residuos líquidos a cuerpos de agua fluviales sin capacidad de dilución del cuerpo receptor.

Tabla 2. Límites máximos permitidos para la descarga de residuos líquidos a cuerpos de aguas fluviales sin capacidad de dilución del cuerpo receptor

Componente	unidad	Concentración máxima permitida Ds. 90
Aluminio	mg/L	1
Arsénico	mg/L	0,01
Boro	mg/L	0,75
Cadmio	mg/L	0,01
Cianuro	mg/L	0,2
Cloruro	mg/L	400
Cobre total	mg/L	1
Cromo hexavalente	mg/L	0,05
Fósforo total	mg/L	10
Flúor	mg/L	1,5
Hierro disuelto	mg/L	1
Manganeso	mg/L	0,3
Mercurio	mg/L	0,001
Molibdeno	mg/L	0,007
Níquel	mg/L	0,1
Plomo	mg/L	0,2
Selenio	mg/L	0,01
Zinc	mg/L	1

(Ds. 90, Ley del gobierno de Chile. ID norma: 182637)

1.2. TRATAMIENTOS DE ELIMINACIÓN DE MP EN AGUAS CONTAMINADAS

La eliminación de los MP del agua se realiza mediante diversos tipos de tecnologías convencionales. Estas tecnologías se sustentan y se encuentran definidas en base a los siguientes mecanismos:

- Destrucción/degradación completa o sustancial de los contaminantes.
- Extracción de los contaminantes para su futuro tratamiento y disposición.
- Estabilización de los contaminantes en formas menos nocivas al medio ambiente.
- Separación y reutilización de los elementos no contaminantes, a partir de elementos contaminantes que requieren un tratamiento futuro.
- Confinamiento de los contaminantes, con el fin de restringir la exposición de estos hacia el medioambiente (Hashim et al., 2011).

Existen factores que se deben tener en consideración para escoger un método específico de remediación de MP en el agua, con el fin de que el proceso sea eficaz, de bajo costo y respetando el medio ambiente (Akunwa et al., 2014). Entre los factores se incluyen:

- El tipo y la concentración inicial del metal
- Heterogeneidad del agua a tratar
- Los niveles requeridos de purificación
- La flexibilidad y fiabilidad de la planta industrial
- Costos de inversión de capital inicial
- Costes de operatividad (consumo de energía y mantenimiento)
- Aplicabilidad técnica
- Simplicidad de la planta industrial
- Rentabilidad final del proceso

Los principales métodos convencionales de tratamiento de MP en soluciones acuosas han sido especificados según ventajas y desventajas, a continuación (Tabla 3):

PRECIPITACIÓN QUÍMICA

Este proceso se basa en la adición de químicos que reaccionan con los MP en forma iónica para formar precipitados insolubles en el agua, disminuyendo la toxicidad y/o movilidad de los MP dentro del medio (Hashim et al., 2011). Los principales químicos utilizados en este mecanismo son: Hidróxidos, tales como $\text{Ca}(\text{OH})_2$ y NaOH , Sulfuros, como el FeS y quelantes comerciales (Hlihor et al., 2017). Este método es efectivo en soluciones que presenten una alta concentración de MP, y posee una rápida cinética, alcanzando su efectividad en solo 1 hora de contacto (Zeng et al., 2015).

COAGULACIÓN-FLOCULACIÓN

Esta técnica se desarrolla mediante el ajuste de pH e implica la adición de sales férricas o de aluminio como coagulante, produciendo una desestabilización de las partículas coloidales dando

como resultado su aglomeración y la posterior sedimentación de estas. Las principales sales utilizadas son: Alumbre ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), Cloruro férrico ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) o sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Ismail et al., 2013; Rubio et al., 2015). El pH es un factor muy importante en este proceso, aunque varía específicamente en función del tipo de metal y sal utilizada. Se ha reportado que el pH óptimo para llevar a cabo este proceso de coagulación-floculación de los metales Zn(II), Cd(II), Mn(II), pH 11 con tasas de eficiencia de 99,77%, 99,67% y 99,3%, a una concentración inicial de 450 mg/L, 150 mg/L y 1085 mg/L, para cada metal respectivo (Kurniawan et al., 2006).

FLOTACIÓN

Esta técnica ha sido empleada para separar MP de una solución mediante la acción de microburbujas, las cuales por el proceso de adhesión transportan los MP a la superficie de la fase líquida, donde mecánicamente pueden ser separados del medio acuoso (Kurniawan et al., 2006). Se han hecho pruebas experimentales las cuales demuestran la efectividad de esta técnica en remoción de Cu^{+2} , Pb^{+2} y Cd^{+2} , alcanzando valores de remoción de 81,13%, 89,95% y 71,17% respectivamente (Yuan et al., 2008).

RESINAS DE INTERCAMBIO IÓNICO

El mecanismo de esta técnica radica en la capacidad de intercambiar de manera reversible iones metálicos que se deseen remover de la fase acuosa con iones de carga equivalente que se encuentran unidos a la superficie de una resina (Kurniawan et al., 2006). Esta resina no presenta ninguna modificación estructural y puede ser tanto de origen natural como sintética. Entre las resinas naturales se destaca la clinoptilolita, un tipo de zeolita que presenta afinidad hacia los iones de MP, que ha llegado a alcanzar una remoción de Zn^{+2} del 100%, al añadir 25 g/L de esta en sistema batch a pH 5.0, con una concentración inicial de metal de 65,4 mg/L (Athanasiadis y Helmreich, 2005).

FILTRACIÓN POR MEMBRANA

Esta técnica se basa en el uso de una membrana semipermeable que actúa como una barrera física para la separación de los compuestos solubles en el agua (Rubio et al., 2015). (Qdais y Moussa, 2004) estudiaron la remoción de Cu (II) y Cd (II) en agua residual sintética mediante nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO). Los resultados demostraron que ambas técnicas capaces de remover ambos metales a un porcentaje superior al 90%. Sin embargo, como NF requiere la utilización de menor presión que RO, los costos asociados a esta técnica serían menores, por lo que haría más económicamente viable el uso del proceso de la NF (Liu et al., 2008).

Tabla 3. Resumen de ventajas y desventajas de las técnicas convencionales de remoción de MP en soluciones acuosas

Tipo de tratamiento	Principal objetivo de eliminación	Ventajas	Desventajas
Precipitación química	MP y metales divalentes	Bajo costo de capital, fácil de operar	Alta generación de lodos, costo extra por disposición de lodos.
Coagulación-floculación	MP y sólidos suspendidos	Menor tiempo para depositar sólidos suspendidos, mejor sedimentación de lodo	Generación de lodos, costo extra por disposición de lodos.
Flotación	MP y sólidos suspendidos	Bajo costo, menor tiempo de retención hidráulica	Requiere tratamientos posteriores para mejorar la eficiencia de captación de MP
Intercambio iónico	compuestos solubles, cationes/aniones	No forma residuos, menor tiempo de operación	No todas las resinas de intercambio iónico son adecuadas para la eliminación de MP, propenso a generar <i>fouling</i> de membrana.
Osmosis reversa	Compuestos orgánicos e inorgánicos	Alta tasa de retención, eficiente a T° ambiente	Requiere alto costo energético, susceptible a <i>fouling</i> de membrana.
Nanofiltración	Sales de sulfatos y cationes en aguas duras [Ca(II), Mg(II)]	Requiere menor presión que la osmosis reversa	Alto costo, susceptible a <i>fouling</i> de membrana.

(Lesmana et al., 2009)

Además de las tecnologías previamente planteadas, existen las denominadas técnicas electroquímicas, las cuales, mediante el uso de electricidad, producen la formación de una capa de iones metálicos en la superficie de un cátodo. Estas tecnologías permiten la recuperación de metales en un estado elemental, es decir, sin carga neta. Sin embargo, a pesar de tener la ventaja de no dejar residuos, involucran un alto capital de inversión y un gasto energético elevado, por lo que no han sido ampliamente aplicadas. Dentro de ellas se encuentran: la electrodiálisis (ED), electrólisis de membrana (EM), electroflotación (EF) y electrocoagulación (EC) (Fu and Wang, 2011; Maldonado-Reyes et al., 2015). Estudios han demostrado su efectividad en la recuperación de diversos iones de MP, dentro de los cuales se encuentra la remoción de Mn^{+2} , en donde se obtuvo

una remoción de un 98,1% de Mn^{+2} en el proceso de EC a una concentración inicial de metal de 25 mg/L, en un tiempo de 30 min a pH 7 (Shafaei et al., 2010) y también se ha reportado la remoción de iones de As(III) y As(V), con una eficiencia de remoción de un 99% desde aguas subterráneas contaminadas (Parga et al., 2005).

Entre todos los métodos mencionados, el proceso más utilizado por la industria es la precipitación química, principalmente por su bajo costo de operación, efectividad y facilidad de operación (Fu y Wang, 2011). Sin embargo, si bien se ha demostrado la efectividad de las técnicas convencionales, estas son desventajosas debido a que requieren de grandes cantidades de reactivos y son ineficientes especialmente cuando existen altos volúmenes de aguas a concentraciones metálicas bajas (0-100 mg metal/L) (Suresh Kumar et al., 2015a). Aun así, a pesar de considerarse bajas concentraciones a nivel técnico, los MP a estas concentraciones provocan efectos extremadamente tóxicos para la salud y el medioambiente, por lo que la búsqueda de mejores tecnologías, más limpias y eficientes en soluciones diluidas es un importante nicho de investigación. Al mismo tiempo, el proceso de precipitación química requiere en algunos casos de la introducción de agentes químicos, implicando una importante generación de residuos secundarios, que necesitan un tratamiento para su disposición final, lo que encarece el costo (Montazer-Rahmati et al., 2011).

Los mejores resultados, sobre todo para bajas concentraciones de metales pesados, se obtienen mediante procesos de adsorción, especialmente con resinas de intercambio iónico de origen sintético (Nghah et al., 2011). Además, es un proceso reversible, que presenta la ventaja de regenerar el adsorbente utilizado con el fin de su reutilización en un nuevo proceso de adsorción (Kang et al., 2008). Sin embargo, esta técnica no ha podido masificarse producto del alto costo de los adsorbentes utilizados, siendo esto el principal obstáculo para su aplicación industrial (Lesmana et al., 2009). En la actualidad, se están estudiando nuevos tipos de adsorbentes con el fin de considerar a esta técnica como una posible alternativa para el tratamiento eficaz de MP en el agua, dentro de las cuales el uso de material biológico ha surgido con gran fuerza y se presenta como una promisorio técnica de remediación en el proceso de tratamiento de MP.

1.3. BIORREMEDIACIÓN COMO ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DE MP EN AGUAS

La biorremediación puede ser definida como el proceso de utilizar organismos vivos para transformar contaminantes peligrosos presentes en estado reactivo en el medioambiente, a productos residuales que presenten los contaminantes en estado inactivo (Dwivedi, 2012). El principal interés de utilizar material biológico es que es capaz de tratar de manera efectiva soluciones diluidas de contaminantes en los residuos líquidos, y su origen natural permite desarrollar los procesos de descontaminación sin el empleo de productos químicos o sintéticos (Fu and Wang, 2011). Existen cuatro tipos de material biológico que pueden ser utilizados como base para el desarrollo del proceso de biorremediación:

- Biomasa inerte, como lignina, exoesqueletos de organismos marinos, conchas, etc.
- Biomasa algal, micro y macroalgas.
- Biomasa vegetal
- Biomasa microbiana, como bacterias, hongos y levaduras

En términos de biomasa, las microalgas forman el grupo de productores primarios más grande a nivel mundial. Esto las hace particularmente atractivas debido a que están disponibles en todas las regiones del planeta y pueden crecer tanto en agua dulce como salada, bajo diversas condiciones climáticas (Apiratikul y Pavasant, 2008).

En comparación con otros tipos de biomasa, se destacan por las siguientes cualidades (Rodrigues et al., 2012):

- Alta capacidad de adsorción de metales
- Fácil manipulación
- Posibilidad de reciclaje/reutilización de la biomasa
- Rápida tasa de crecimiento
- Alta eficiencia
- Elevada área superficial, en función del volumen
- Alta selectividad
- Nula generación de compuestos tóxicos
- Útil tanto en sistemas batch como continuo.

1.4. MICROALGAS - ASPECTOS GENERALES

Las microalgas son un grupo de microorganismos que poseen un mecanismo fotosintético capaz de transformar la luz solar en energía química mediante la fotosíntesis oxigénica, similar al que exhiben los organismos del mundo vegetal. Estos pueden ser encontrados en todos los medioambientes acuáticos, tanto de agua dulce como agua salada. Son especies unicelulares pero que pueden subsistir tanto individualmente como en cadenas. Su tamaño varía según la especie, abarcando un rango de longitud de 2 – 200 micrómetros (Suresh Kumar et al., 2015a).

Al igual que las especies vegetales presentan un organelo denominado cloroplasto, donde se localiza la clorofila a y se produce la absorción de luz para la obtención de energía (Wang and Chen, 2009). Son los principales responsables del proceso de fotosíntesis en el planeta. En cuanto a su clasificación, existen diferentes criterios que pueden ser aplicados a las microalgas, tales como su pigmentación, su ciclo de vida, o su estructura celular. Los principales grupos microalgales son (Anastopoulos and Kyzas, 2015):

- Diatomeas (*bacillariophyceae*)
- Microalgas verdes (*chlorophyceae*)

- Microalgas doradas (*chrysophyceae*)
- Cianobacterias (Microalgas verde azuladas)

La principal característica de las diatomeas es la pared celular, compuesta por estructuras basadas en sílice. Posee la capacidad de poseer sitios de unión para el enlace de proteínas y polisacáridos. En tanto, el grupo de las microalgas verdes presentan una pared celular con importantes cantidades de almidón y glicógeno. Además de altas cantidades de celulosa, hemicelulosa y proteínas, para la formación de glicoproteínas (Romera et al., 2006). Estos constituyentes contienen numerosos grupos funcionales que son reactivos y que están involucrados en las propiedades de adsorción, capaces de formar complejos coordinados con los iones de MP (Anastopoulos y Kyzas, 2015).

Para el desarrollo de aplicaciones prácticas a gran escala, las microalgas pueden ser cultivadas principalmente en dos tipos diferentes de sistemas (Abinandan and Shanthakumar, 2015):

- Piscinas abiertas (*en inglés, "open pounds"*).
- Fotobiorreactores (PBRs)

Los cultivos desarrollados por piscinas abiertas han sido ampliamente estudiados, especialmente para el tratamiento de aguas residuales (Alcántara et al., 2015; Mansa et al., 2012; Rugnini et al., 2019). En esta categoría se incluyen tanto el uso de aguas naturales (lagos, lagunas y estanques), como artificiales (piscinas contenedoras). Los sistemas más utilizados son los tanques de baja profundidad, piscinas circulares y piscinas de tipo "*raceway*". Estos últimos han emergido como la manera más sustentable y económica de cultivo de microalgas. Una de las principales ventajas del uso de piscinas abiertas es su simplicidad, lo que resulta en bajos costos de producción y de operación. Además, son de fácil construcción, fácil operatividad y presentan una durabilidad mayor que la mayoría de los sistemas cerrados (Mata et al., 2010). Sin embargo, este tipo de cultivo presenta importantes limitaciones, tales como: la mala utilización de la luz por las células microalgales, las pérdidas por evaporización, la difusión de CO₂ hacia la atmósfera, la incapacidad de desarrollar cultivos microalgales puros y el requerimiento de vastas extensiones de terreno para su desarrollo (Mata et al., 2010; Ugwu et al., 2008). Otro factor importante para desarrollar este tipo de sistemas son las condiciones climáticas del lugar, ya que el mal tiempo afecta al crecimiento de las algas. Además, al ser un sistema abierto, este está expuesto fuertemente a la contaminación por el desarrollo de otros organismos externos, afectando de manera importante la producción. Finalmente, en muchos casos presentan ineficientes mecanismos de agitación, resultando en bajas tasas de transferencia de masa, y por consiguiente, una baja productividad de biomasa (Ugwu et al., 2008).

Por otro lado, los fotobiorreactores (PBRs) son un mecanismo de cultivo desarrollado bajo un sistema cerrado, con aspectos de ingeniería para sobrellevar los problemas presentados en los estanques abiertos y para desarrollar una producción de biomasa a gran escala (Ugwu et al., 2008). Los PBRs presentan múltiples ventajas, siendo su principal fortaleza la posibilidad de controlar las condiciones de operación para la optimización del cultivo, permitiendo alcanzar una alta

productividad de biomasa desde cultivos microalgales puros. Además, presentan una mejor protección frente a la contaminación, un óptimo uso del área de cultivo, una tasa eficiente de transferencia de gas y una disminución importante del *fouling* (Ugwu et al., 2008). Sin embargo, el alto costo inicial ha mermado el crecimiento del uso de esta tecnología y se requiere optimizar el manejo energético para su aplicación comercial a gran escala (Abinandan y Shanthakumar, 2015).

La Tabla 4 presenta un resumen comparativo entre los dos principales tipos de cultivo. En norma general, se puede indicar que para el desarrollo de proyectos de remediación de aguas residuales el tipo de cultivo más efectivo es el sistema HRAP (*high rate algal pond*). Este es un tipo de estanque “*raceway*” abierto, presenta una profundidad máxima de 50 cm, tiene forma de “pista de carrera” donde el agua es mantenida en movimiento en un circuito cerrado con una agitación desarrollada con una rueda de paletas y un sistema de aireación constante. A pesar de ser menos eficiente que el uso de PBRs, es económicamente rentable para el manejo de residuos y permite la captura de la energía solar para tratar los residuos (Craggs et al., 2014). Se ha reportado que las tasas de remoción de Cu^{+2} y Pb^{+2} en sistema de cultivo HRAP son hasta 10 y 2 veces mayores que en piscinas estabilizadoras, respectivamente (Toumi et al., 2000).

Tabla 4. Comparación entre los principales sistemas de cultivo de microalgas

	Estanques	PBRs
Capacidad de fijación de CO_2	Baja	Alta
Productividad de biomasa	Baja	Alta
Velocidad de crecimiento	Baja	Alta
Riesgo de contaminación	Extremadamente alto	Bajo
Pérdidas por evaporación	Altas	Bajas
Eficiencia de fotosíntesis	Baja	Alta
Área superficial	Baja	Extremadamente alta
Control del proceso	Difícil	Fácil
Coste de operación	Bajo	Alto
Escalado	Fácil	Difícil

1.5. MECANISMOS DE DEFENSA DE LAS MICROALGAS FRENTE A LOS MP

Las microalgas presentan capacidad de retención de numerosos MP, propiedad que puede ser utilizada con el fin de detoxificar y remediar el medio acuoso donde se encuentren presentes (Suresh Kumar et al., 2015b). Para esto, las microalgas utilizan una serie de grupos funcionales, presentes en las paredes celulares, que según su afinidad de unión frente a los MP, pueden clasificarse en tres tipos de ligandos (Tabla 5):

- **Tipo I**, aquellos que tienen la preferencia de captar iones metálicos de clase A, según la clasificación de ácido de Lewis, mediante el uso de oxígeno como enlace.

- **Tipo II**, aquellos que pueden unirse a cualquier clase de ligando, aunque con diferentes preferencias según la naturaleza de este.
- **Tipo III**, muestran una mayor afinidad por los metales de clase B, según la clasificación de ácido de Lewis.

Además, habitualmente, como respuesta a estos contaminantes las microalgas suelen modificar sus vías metabólicas (Perales-Vela et al., 2006). Estos mecanismos permiten mantener la homeostasis de la célula microalgal sobre el metal y prevenir el daño celular y la toxicidad que naturalmente presentan las MP que se encuentran libremente en el medio. Así, según la dependencia metabólica del organismo, suele hablarse de procesos de biosorción o de bioacumulación.

Tabla 5. Principales clases de ligandos presentes en la pared celular de las microalgas y su afinidad a distintos tipos de clases de metales

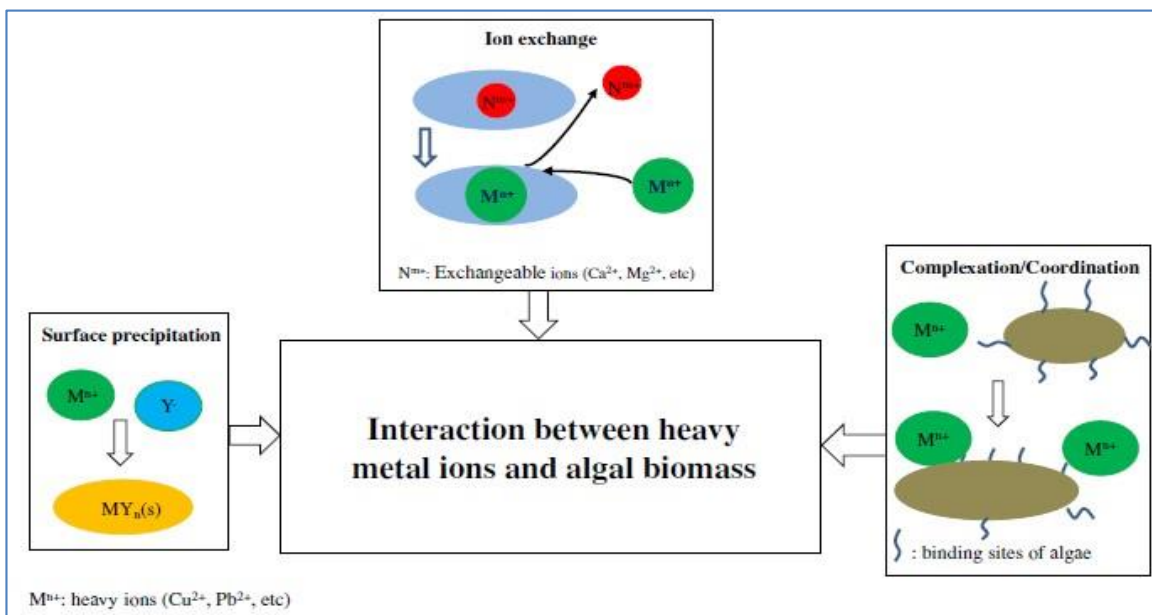
Clases de ligando		Ligandos	Clase de metal
I	Ligando afín a Clase A	F ⁻ , O ⁻² , OH ⁻ , H ₂ O, CO ₃ ⁻² , SO ₄ , RO ₂ SO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ⁻² , PO ₄ ⁻³ , ROH, RCOO ⁻ , C=O, ROR	Clase A: Li, Be, Na, Mg, K, Ca, Sc, Rb, Sr, Y, Cs, Ba, La, Fr, Ra, Ac, Al, Grupo de lantánidos y actínidos
II	Ligandos intermedios	Cl ⁻ , Br ⁻ , N ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₃ ⁻² , NH ₃ , N ₂ , RNH ₂ , R ₂ NH, R ₃ N, =N ⁻ , -CO-N-R, O ₂ , O ₂ ⁻ , O ₂ ⁻²	Iones límite: Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Cd, In, Sn, Sb, As
III	Ligando afín a Clase B	H ⁻ , I ⁻ , R ⁻ , CN ⁻ , CO, S ⁻² , RS ⁻ , R ₂ S, R ₃ As	Clase B: Rh, Pd, Ag, Lr, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi

(Wang y Chen, 2009)

PROCESO DE BIOSORCIÓN

El proceso de biosorción se define como un proceso fisicoquímico de captación de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos presentes en una solución acuosa, con el fin de remover o recuperarlos del medio en que se encuentran (Fomina y Gadd, 2014). En la biosorción, la captación de los iones metálicos se produce debido a las interacciones que se desarrollan entre los iones presentes en la solución acuosa con los grupos funcionales que están expuestos en la superficie exterior del organismo (Rayson y Williams, 2011; Suresh Kumar et al., 2015b). Los grupos funcionales que presentan una mayor relevancia en el proceso de biosorción son los grupos carboxilo, hidroxilo, sulfato, fosfato y amina (He y Chen, 2014). Entre estos, el más relevante en la captación de iones metálicos es el grupo carboxilo, seguidos por sulfatos asociados a polisacáridos y proteínas (Won et al., 2014).

Figura 3. Mecanismos del proceso de biosorción de MP a partir de microalgas.



(He y Chen, 2014)

El mecanismo de la biosorción es complejo, ya que depende principalmente de la composición química presente en la superficie celular (He y Chen, 2014). Estos pueden ser clasificados como biosorción química, en donde la interacción biomasa/ion metálico se produce mediante una reacción química mediante los mecanismos de intercambio iónico, formación de complejos, adsorción por quelación o precipitación (Fig. 3); o biosorción física, donde la retención del ion metálico ocurre vía fuerzas intermoleculares de Van Der Waals o interacciones electrostáticas (Cuizano y Navarro, 2008). Los diferentes mecanismos pueden ocurrir ya sea de manera conjunta o de manera sucesiva (Fomina y Gadd, 2014). Se ha reportado que la unión entre los iones metálicos y la superficie de la biomasa de *Vaucheria* sp., se basa en la vía de intercambio iónico, ya que las cargas de los cationes metálicos estudiados Cu (II), Mn (II), Zn (II) y Co (II), que fueron adsorbidos por la biomasa era proporcional a las cargas de los iones metálicos livianos, Na (I), K (I), Ca (II) y Mg (II) que fueron liberados por la misma. Esto demuestra que, en este caso específico, los iones metálicos compiten por asociarse a los sitios de unión con carga negativa presentes en la pared celular, liberando a los metales que estaban asociados antes del tratamiento de biosorción (Michalak y Chojnacka, 2010).

PROCESO DE BIOACUMULACIÓN

El proceso de bioacumulación puede ser definido como la absorción de un compuesto externo al interior de un organismo metabólicamente activo, producto de mecanismos de defensa y/o crecimiento celular durante el crecimiento de la microalga, los metales son removidos desde el medioambiente que les rodea y son acumulados dentro de las células (Mehta y Gaur, 2005; Perales-Vela et al., 2006). Se ha reportado que especies resistentes aisladas de sitios contaminados poseen una mayor capacidad de acumulación de MP comparados con las especies aisladas de sitios no contaminados (Chekroun y Baghour, 2013). Este proceso se suele producir en dos etapas bien

diferenciadas. La primera etapa se produce una interacción fisicoquímica entre el ion metálico en solución y los grupos funcionales presentes en la pared celular de la microalga, en un proceso similar al producido al mecanismo de biosorción comentado previamente (Kumar et al., 2016). Posteriormente, el ion metálico adsorbido es transportado hacia el interior de la célula a través de la membrana celular, acumulándose en el interior de ésta (Vijayaraghavan y Yun, 2008). Este proceso requiere de energía que es obtenida a partir del proceso de respiración desarrollado por el metabolismo de los organismos vivos que utilizados como biosorbente, es de cinética lenta y usualmente irreversible (Dueñas et al., 2014).

La segunda etapa del proceso de bioacumulación se puede llevar a cabo por una serie de mecanismos, entre los que se encuentran la unión covalente, la precipitación de superficie, reacciones redox, cristalización en la superficie celular o incluso difusión (Fig. 4) (Monteiro et al., 2012). Como la mayoría de los MP son hidrofílicos, el transporte a través de la membrana celular, de naturaleza lipofílica, debe ser mediado por proteínas específicas que se encuentran dentro de la estructura de la membrana, estas permiten crear un conducto de comunicación entre el espacio extracelular y el intracelular, con dirección de flujo tanto hacia el interior como hacia el exterior de la célula en casos determinados (Monteiro et al., 2011a).

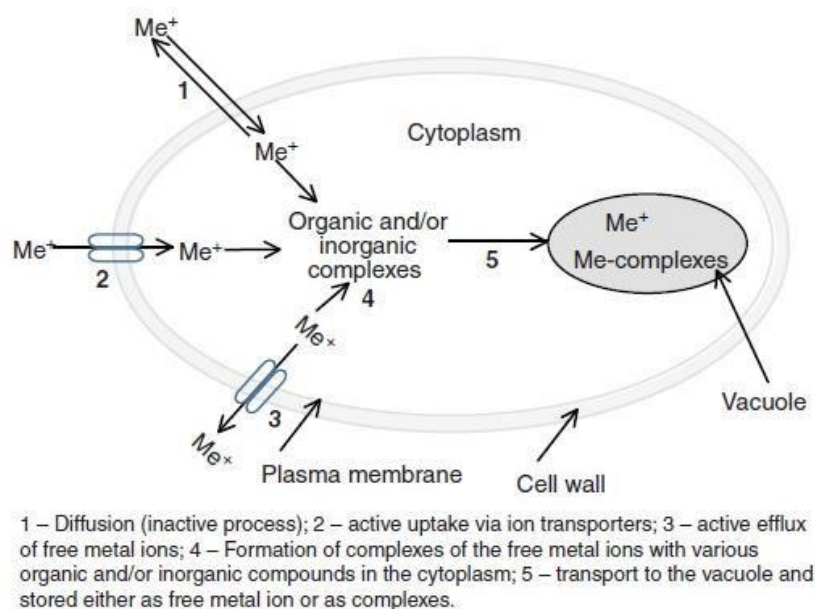


Figura 4. Mecanismo de bioacumulación de iones metálicos en el interior de la célula y proceso de detoxificación intracelular en células activas metabólicamente. (Handbook of microalgal culture: Applied Phycology and Biotechnology, 2º Edition, Cap.32, Pág. 604)

Una vez en el interior de la célula, un mecanismo común para la detoxificación celular intracelular es la formación de proteínas que se asocian a los metales, tales como las metalotioneínas (MT) y fitoquelatinas (PC), (Rodrigues et al., 2012; Suresh Kumar et al., 2015b). Estos complejos organometálicos son contenidos más adelante al interior de las vacuolas con el fin de facilitar un apropiado control de la concentración de iones de MP en el citoplasma, cumpliendo el rol de

prevenir o neutralizar la potencial toxicidad que poseen los iones metálicos mediante la producción de transportadores de metal ion-selectivos y su posterior excreción o compartimentalización (Arunakumara y Zhang, 2007). Se ha reportado el desarrollo, mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), de formaciones de cuerpos de alta densidad al interior de compartimientos presentes en la microalga *Pseudochlorococcum typicum*, las cuales asocian a la bioacumulación de Pb(II) (Shanab et al., 2012). Este proceso es regulado por la presencia misma de los iones metálicos, los cuales inducen de manera rápida la biosíntesis de estas proteínas transportadoras (Perales-Vela et al., 2006). Otro mecanismo de protección que poseen las microalgas es la metilación enzimática, el cual modifica la estructura de las proteínas con el fin de prevenir que elementos tóxicos reaccione con los grupos –SH en el interior de la célula (Suresh Kumar et al., 2015b).

COMPARACIÓN ENTRE LOS PROCESOS DE BIOSORCIÓN Y BIOACUMULACIÓN

En la tabla 6, se comparan los procesos de defensa de las microalgas frente a la presencia de iones de MP, en donde se analiza tanto el proceso de biosorción como el proceso de bioacumulación.

Tabla 6. Comparación entre los mecanismos de defensa de las microalgas: Procesos de biosorción y bioacumulación

Biosorción	Bioacumulación
Proceso pasivo	Proceso activo
No controlada por el metabolismo	Controlada por metabolismo
Los metales se unen con la superficie celular	Los metales se unen tanto con la superficie celular como al interior de esta.
Asociada al proceso de adsorción	Asociada al proceso de absorción
Proceso reversible	Proceso parcialmente reversible
No requiere de la presencia de nutrientes	Requiere presencia de nutrientes
Proceso se produce en sólo una etapa	proceso se produce en dos etapas
Proceso rápido	Proceso lento
No se ve afectada por la presencia de tóxicos	Los tóxicos afectan el rendimiento del proceso
No ocurre crecimiento celular	Ocurre crecimiento celular
Intermedia concentración de equilibrio de iones metálicos	Baja concentración de equilibrio de iones metálicos

De la Tabla 6 se puede deducir que, al ser un proceso pasivo, la cinética de la biosorción es mucho más rápida que la de bioacumulación. La segunda etapa de la bioacumulación, es decir, cuando la célula microalgal absorbe el metal al interior de esta y lo compartimentaliza, es un proceso de cinética lenta y poco práctico para ser utilizado con fines industriales ya que requiere mantener el metabolismo celular activo y la concentración de iones metálicos en el interior de la célula podría generar efectos tóxicos afectando la viabilidad de esta (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

Con estos datos, en una primera instancia se podría indicar que el uso de la biosorción sería el proceso más apropiado para llevar a cabo de manera rápida y efectiva el tratamiento de grandes volúmenes de solución acuosa contaminada, dejando de lado la posibilidad de utilizar industrialmente las propiedades absorbentes y de concentración de metales en el interior de las células que presenta el proceso de bioacumulación (Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b). Sin embargo, si se realiza una comparación entre el proceso de biosorción con la primera etapa de la bioacumulación, la cual se produce en la etapa previa al ingreso de los metales hacia el interior de la célula, se puede indicar que la biosorción y la primera etapa de la bioacumulación son prácticamente idénticas (He y Chen, 2014). Esto abre la posibilidad de estudiar el proceso de la biosorción de dos maneras, mediante microalgas metabólicamente inactivas, es decir, con el uso de biomasa muerta; y mediante el uso de microalgas vivas, utilizando el proceso de la bioacumulación solo hasta completar su primera etapa. Además de lo anteriormente planteado, al ser la biosorción un proceso reversible, la misma biomasa podría ser utilizada en varias ocasiones sin perder sus características bioabsorbentes, reduciendo los costes del proceso.

1.6. FACTORES QUE AFECTAN EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN DE MP

Para el desarrollo de un proceso eficiente de biorremediación mediante el uso de microalgas es necesario identificar y optimizar los principales factores del proceso. Estos factores se pueden dividir en dos grupos según su naturaleza: Los factores bióticos o dependientes de la biomasa y los factores abióticos, los cuales dependen principalmente de las condiciones de operación (Suresh Kumar et al., 2015b).

FACTORES BIÓTICOS

ESPECIE DE LA MICROALGA

La capacidad de adsorción de iones de MP varía entre las especies de microalgas, producto de que la biosorción se asocia directamente con la composición química que presenta la superficie de la pared celular. Específicamente, la capacidad de biosorción se relaciona de manera proporcional a la cantidad de sitios de unión que presente la biomasa (Fomina y Gadd, 2014).

Muchas especies de microalgas han adaptado mecanismos para adaptarse a la exposición de MP. Esta habilidad se denomina capacidad de tolerancia, la cual sirve como herramienta para enfrentar un ambiente adverso. En un estudio comparativo de tolerancia frente a Cu(II), Pb(II) y Cd(II) de las dos especies de microalgas, *Isochrysis galbana* y *Tetraselmis chui*, se hallaron valores de EC₅₀ (concentración que provoca la muerte del 50% de la población) de 31,4 µmol/L, 37,8 µmol/L y 121,6 µmol/L, de *Isochrysis galbana* para cada ion, frente a 1,3 µmol/L, 10,9 µmol/L y 37,8 µmol/L de *Tetraselmis chiu*, respectivamente (Liu et al., 2011).

CONCENTRACIÓN DE LA BIOMASA

Estudios previos han demostrado una dependencia directa entre la capacidad de adsorción con la concentración de la biomasa. Por ejemplo, estudios desarrollados con *Chlorella vulgaris* para la remoción de Cu (II) con diferentes concentraciones de biomasa (5, 50, 100 y 1000 mg/L), obtuvieron capacidades de eliminación con valores de 22,62, 13,07, 8,61 y 6,14 mg/g para cada concentración mencionada, respectivamente (Mehta y Gaur, 2001a). Esta dependencia se ha atribuido a un aumento de las interacciones electrostáticas con la densidad celular, lo cual produce una disminución de la cantidad de sitios activos disponibles para la captación de los iones metálicos (Romera et al., 2006). Basado en estos datos, la operación con concentraciones de biomasa elevadas resultaría en un tratamiento con biomasa menores cargas de MP, lo cual disminuiría la eficiencia del proceso global. Por otro lado, se ha determinado que el aumento de la concentración de la biomasa produce una disminución del efecto tóxico de los MP. En un estudio de toxicidad de Cu (II) y Pb (II) realizado con *Tetraselmis chui*, se demostró que esta especie vio inhibido su crecimiento celular en un 80% cuando el estudio se realizó a una densidad celular inicial de 1×10^4 cel/mL, resultando significativamente mayor al 17% obtenido al realizar el mismo experimento a una concentración de biomasa inicial de 1×10^5 cell/mL (Liu et al., 2011).

No obstante, una baja concentración de biomasa afectará la eficiencia de la bioacumulación, siendo inadecuado para aplicaciones a gran escala, por lo que es necesario trabajar con valores intermedios de concentración de biomasa en estudios de biosorción (Debelius et al., 2009).

FACTORES ABIÓTICOS

pH

El pH es considerado como el parámetro abiótico más importante en la influencia de la biosorción de metales por biomasa microalgal (Brinza et al., 2007). Este factor varía de manera directa el proceso de biosorción en dos aspectos:

- La capacidad de biosorción de los sitios presentes en la superficie de la biomasa, ya que la biosorción del metal está relacionada a las propiedades ácido-base de varios grupos funcionales en la superficie de la célula, los cuales se pueden activar y desactivar según el pH que se encuentre en la solución (Monteiro et al., 2012).
- La química del ion metálico presente en la solución, la cual varía en distintas especiaciones según el pH del medio.

La selección del pH óptimo depende directamente de la especie de microalga y de la especie de metal que se desee remover (Brinza et al., 2007; Suresh Kumar et al., 2015b). En líneas generales se puede mencionar que a bajo pH, los sitios de unión presentes en la pared celular se asocian directamente al ion hidronio H_3O^+ o H^+ , lo cual impide el acercamiento de cationes metálicos por

resultado de la fuerza de repulsión que presenta la superficie microalgal. Esto ocurre en pH muy ácidos menores a pH 3, el cual se ha considerado como un valor límite (Brinza et al., 2007). Cuando se incrementa el pH de la solución, en el rango de pH de 3 a 6,5, los sitios de unión se desprotonan, por lo que sus cargas negativas se incrementan y nuevos grupos funcionales como carboxilo, fosfato, imidazol y amino son activados como sitios de unión. Estos aumentan la carga negativa neta de la superficie, permitiendo una mayor atracción de cationes con cargas positivas, como muchos de los MP que presentan cationes bivalentes, tales como: Zn^{+2} , Cu^{+2} , Ni^{+2} , Mn^{+2} , Cd^{+2} (Fomina y Gadd, 2014; Monteiro et al., 2012). Así, se ha reportado un pH óptimo de 4 para la adsorción de Cd (II) con *Chlorella vulgaris* (Aksu y Dönmez, 2006) y el incremento de la adsorción de cobre en la biomasa de *Spirogyra* desde un 31% a un 86% aumentando el pH de 1.0 a 7.0 (Bishnoi et al., 2007; Suresh Kumar et al., 2015b).

Por otro lado, en el rango de pH de 8 y 11 se tiende a producir en los iones metálicos el fenómeno de la precipitación, afectando directamente la capacidad de remoción de estos (Fu y Wang, 2011). A pH 9-12, tanto el grupo carboxilo como el fosfato e hidroxilo se encuentran disponibles como sitios de unión en la captación de metales, favoreciendo por ejemplo, la adsorción de As (Chojnacka et al., 2005; Monteiro et al., 2012).

FUERZA IÓNICA

La fuerza iónica es la concentración de la carga iónica presente en una solución. Este factor está fuertemente relacionado con la concentración de sales y cationes monovalentes, como el Na^+ y K^+ (Mehta y Gaur, 2005). Se ha determinado que, a un pH específico, cuando la fuerza iónica de la solución se ve incrementada, la capacidad de remoción del biosorbente se ve reducida (Fomina y Gadd, 2014). Por el contrario, si se disminuye la fuerza iónica, se incrementa la eficiencia de la remoción (Bilal et al., 2018).

Como ejemplo de esta dependencia, (Chen et al., 2015) estudiaron la adsorción de Cu (II) en alginato de calcio, ajustando la fuerza iónica mediante la adición de perclorato de sodio a concentraciones que van de 0,005 a 0,5 mol/L, con eficiencias de remoción de 95% y 80% respectivamente, atribuida a una competencia por los sitios de unión de la biomasa, entre los iones metálicos y otros iones presentes en la solución (Dwivedi, 2012).

CONCENTRACIÓN INICIAL DEL ION

El proceso de biosorción de MP se ve influenciado de manera importante con la concentración inicial del ion (Kumar et al., 2016). El aumento de la concentración inicial del ion produce un aumento de la capacidad de biosorción del metal, por lo que la cantidad de contaminante biosorbido por unidad de biosorbente también se ve aumentada, aunque sólo hasta el punto de saturación (Fomina y Gadd, 2014). Otro punto necesario a considerar es la tolerancia que presenta la biomasa en presencia del ion metálico que se desea remover. Si bien las microalgas presentan mecanismos de defensa frente a la presencia de MP, la tolerancia es un factor altamente variable que depende de muchos factores, como la especie que se utiliza como biosorbente, la densidad

celular, la composición del medio y las condiciones físicas del cultivo, por lo que se debe tener en consideración en los procesos de adsorción tanto en la biosorción como en la primera etapa de la bioacumulación (Debelius et al., 2009).

TEMPERATURA

La temperatura afecta a un número importante de factores que son relevantes para el proceso de biosorción de iones metálicos, entre los cuales se incluye la estabilidad de la especie iónica, la complejación de ligandos y la solubilidad del ion metálico. Teóricamente, el incremento de la temperatura favorece la solubilidad del ion metálico en la solución y en consecuencia debilitaría el proceso de biosorción de los iones en la biomasa, aunque no hay estudios relevantes que respalden aquella afirmación (Suresh Kumar et al., 2015b).

Con relación al proceso de biosorción, el efecto de la temperatura no es concluyente. En un estudio de biosorción de Ni^{2+} mediante el uso de biomasa seca de *Chlorella vulgaris*, la capacidad de adsorción aumentó de 48,1 mg/g a 15°C y 60,2 mg/g a 45°C indicando la presencia de un proceso endotérmico (Aksu y Dönmez, 2006). Sin embargo, son escasos los estudios que utilizan esta variable, resultando difícil determinar un efecto relevante de este factor en el proceso de biosorción. En un contexto termodinámico, se puede considerar que el efecto de la temperatura dependerá de la naturaleza de los grupos funcionales que actúan como sitios de unión en la superficie de la pared celular de la microalga, así la biosorción puede ser favorecida por una temperatura más elevada si el proceso de biosorción del metal es endotérmico, como ocurre en las interacciones ion metálico-carboxilo, mientras que las interacciones ion metálico-amina, al ser exotérmicas, se verían afectadas por el efecto de la temperatura.

Por otro lado, en el proceso de biosorción metálica mediante el uso de algas vivas el factor temperatura ejerce un valor más importante, ya que el incremento de la temperatura promueve el crecimiento celular, pero solo hasta alcanzar la temperatura óptima de cultivo. A temperaturas bajas, las microalgas son fácilmente inhibidas y el sobrecalentamiento de los cultivos de microalgas es un problema ya que provoca daños en la estructura física del biosorbente (Park et al., 2010). Generalmente, las temperaturas de estudio utilizadas rondan los 15-25°C, las cuales son las más adecuadas para el crecimiento celular (Larsdotter, 2006).

En muchos estudios, el factor de la temperatura no es considerado como una variable, realizando el estudio a temperatura ambiente (Atar et al., 2012). El control de la temperatura está asociado a un aumento de los requerimientos energéticos del proceso, lo cual encarecería los costos y su influencia suele ser menor en comparación a otros factores como por ejemplo, el pH (Mehta y Gaur, 2005).

ESPECIACIÓN DEL METAL

La especiación del metal es un factor relevante ya que se asocia a la toxicidad, movilidad y la reactividad que presentan los MP en la solución acuosa (Batool et al., 2018). La disponibilidad que presentan los iones metálicos para unirse a la superficie de la biomasa depende directamente de la

especiación, la cual está determinada en función de una serie de reacciones de tipo ácido/base, precipitación/disolución, óxido/reducción, sorción o intercambio iónico que influyen en la especiación, pero sobre todo, por el pH de la solución (Kaplan, 2013b).

Los efectos tóxicos de los iones metálicos en los organismos vivos se relacionan directamente con la concentración de iones libres en el agua, por lo que para mantener un proceso eficiente de remoción de iones de MP, es necesario mantener elevada la tasa entre la concentración de iones metálicos libres y el total de la concentración del metal en la solución (Suresh Kumar et al., 2015b). En un estudio realizado para la biosorción de Cr^{+3} y Cr^{+6} , utilizando como biosorbente *Spirulina* sp., se reportó que la capacidad de adsorción para cada forma de especiación de Cr fue de 304 mg/g y 333 mg/g, respectivamente (Doshi et al., 2008).

1.7. POTENCIALES ESPECIES DE MICROALGAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE MP

Para llevar a cabo un estudio en el área de la biosorción ya sea con microalgas vivas o muertas, un paso muy relevante es la selección de la especie de microalga a utilizar. En la Tabla 7 se pueden apreciar los principales casos de éxito desarrollados en los últimos años en el uso de especies de microalgas para la remoción de diferentes iones de MP, tales como: Cd^{+2} , Cu^{+2} , As, Mn^{+2} , Pb^{+2} y Zn^{+2} (Suresh Kumar et al., 2015b).

Se puede indicar que la mayoría de los estudios realizados en este tema trabajan en modo batch. El uso de un sistema continuo es aplicable principalmente en el uso de biomasa inmovilizada (Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b). Como factores más importantes se encuentra el tipo de biomasa utilizada, la cual puede ser mediante el uso de organismos vivos u biomasa muerta y la influencia del pH del medio donde se lleve a cabo el estudio. Con relación a los metales estudiados, la mayor cantidad de investigaciones se realiza para el estudio de adsorción de Cu, Cd y Zn (Tabla 7). De manera específica para cada metal podemos apreciar lo siguiente:

- **Cu⁺²:** En los estudios de remoción de iones de cobre, el organismo más utilizado es *Chlorella vulgaris*. Se ha estudiado esta especie en variadas formas, biomasa muerta y viva; libre o inmovilizada, obteniendo diferentes resultados. La mayor capacidad de remoción de cobre es alcanzada por la microalga *Spirulina* sp, la cual alcanza un valor de 389 mg/g (Doshi et al., 2008). El rango de pH utilizado es entre pH 4 a 7.
- **Zn⁺²:** La mayor capacidad de remoción de Zn^{+2} la ha presentado la microalga *Planorhynchium lanceolatum*, con un valor de 118,66 mg/g (Sbihi et al., 2014). El rango de pH de estudio de la remoción de Zn en su estado divalente se desarrolla entre los valores 5 y 7,5.
- **As:** Se han realizado estudios tanto para As (III) como para As (V), analizándose tanto la capacidad de absorción, como la toxicidad y mecanismos de detoxificación de cada especiación (Podder y Majumder, 2016). Los mejores rendimientos de absorción se han

obtenido mediante el uso de *Scenedesmus*, alcanzando una capacidad de absorción de 23 mg/g, en una solución con 30 mg/L de concentración de arsénico y pH 4. Este pH resultó óptimo tanto para el uso de microalgas vivas como muertas. Se ha determinado que los géneros de *Scenedesmus*, *Pandorina* y *Chlorella* son potenciales removedores de As presente en soluciones acuosas bajo diferentes condiciones ambientales (Dueñas et al., 2014; Sibi et al., 2014).

- **Mn⁺²**: Un estudio muy reciente realizado con la especie *Heterochlorella* sp., MAS3, demostró la factibilidad de esta especie para reducir la concentración de Mn (II) entre un 40 - 60%, a partir de una solución acuosa con 10-20 mg Mn/L, en estudios a pH ácido (3,5) (Abinandan et al., 2019). El rango estudiado suele ir de medio ácido (pH 3) hasta soluciones neutras a pH 7.0.
- **Boro (B(OH)₄⁻)**: En la actualidad, se ha publicado solo un estudio sobre descontaminación de aguas contaminados con boro mediante el uso de microalgas. (Taştan, B.E. et al., 2012b). (Laçin et al., 2015) obtuvieron un rendimiento máximo de remoción de 38,0% con *Chlorella* sp., se trabajando con una disolución con una concentración de 9,2 mg B/L. El rango de pH estudiado va entre pH 5-9, en donde el máximo valor de remoción alcanzado fue a pH 8.

Tabla 7. Listado con los principales resultados de estudios de biosorción de microalgas con eficiencia en remoción de MP.

Metal	Speciation	Organism	pH	Type of biomass	Metal uptake (mg/g)	Country
Cd	Cd ²⁺	<i>AER Chlorella</i>	3-7	Non-living	7.74	Germany
		<i>AER Porphyridium</i>	3-7	Non-living	7.55	Germany
		<i>AER Spirulina</i>	3-7	Non-living	7.28	Germany
		<i>Aulosira fertilissima</i>	5	Non-living	14.57	India
		<i>Calothrix parietina</i> TISTR 8093	7	Non-living	79	Thailand
		<i>Chaetoceros calcitrans</i>	8	Live	1055.27	Indonesia
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Cell wall	5.75	Canada
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Without cell wall	3	Canada
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Ca-alginate	28.9	Turkey
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Immobilized	79.7	Turkey
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Non-living	42.6	Turkey
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>			2.3	Sweden
		<i>Chlorella homosphaera</i>			8.4	Sweden
		<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	6.8-7.0		2.8	Sweden
		<i>Chlorella sorokiniana</i>	5	Non-living	33.5	Pakistan
		<i>Chlorella sorokiniana</i>	5	Immobilized	192	Pakistan
		<i>Chlorella sp. HA-1</i>			21.6	Taiwan
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4		86.6	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	62.3	Portugal
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	33.72	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	6	Non-living	12.45	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	3-7	Non-living	8.41	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	6.8-7.0		2.6	Sweden
		<i>Chlorella vulgaris</i> BCC 15	7	Non-living	76	Thailand
		<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP211/11B	7	Non-living	62	Thailand
		<i>Cyclotella cryptica</i>	6	Non-living	22.24	Germany
		<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>		Non-living	58.6	Portugal
		<i>Desmodesmus pleiomorphus</i> (ACOI 561)	4	Live	85.3	Portugal
		<i>Desmodesmus pleiomorphus</i> (L)	4	Live	61.2	Portugal
		<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	5	Non-living	7.2	India
		<i>Isochrysis galbana</i>		Live	0.02	Morocco
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6	Non-living	1.24	Germany
		<i>Phormidium</i> spp.	5	Non-living	9.6	USA
		<i>Pithophora odeogonia</i>	5	Non-living	13.07	India
		<i>Planothidium lanceolatum</i>	7	Live	275.51	Morocco
		<i>Porphyridium cruentum</i>	3-7	Non-living	8.84	Germany
		<i>Porphyridium purpureum</i>	6	Non-living	0.42	Germany
		<i>Pseudochlorococcum typicum</i>	7	Live	5.48	Egypt
		<i>Scenedesmus abundans</i>	7.8-8	Live	574	Portugal
		<i>Scenedesmus abundans</i>			0.64	Taiwan
		<i>Scenedesmus acutus</i> IFRPD 1020	7	Non-living	110	Thailand
		<i>Scenedesmus obliquus</i>			11.4	Portugal
		<i>Scenedesmus obliquus</i>		Non-living	60.8	Portugal
		<i>Scenedesmus obliquus</i> CNW-N	6	Non-living	24.4-108.5	Taiwan
		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	6	Non-living	7.29	Germany
		<i>Spirogyra hyalina</i>		Non-living	18.18	India
		<i>Spirogyra insignis</i>	6	Non-living	22.9	Spain
		<i>Spirogyra neglecta</i>	5	Non-living	27.95	India
		<i>Spirulina platensis</i>	6	Non-living	12.08	Germany
		<i>Spirulina platensis</i>	3-7	Non-living	8.06	Germany
		<i>Spirulina platensis</i>	7-8	Non-living	357	Italy
		<i>Spirulina platensis</i>		Live	44.56	India
		<i>Spirulina platensis</i> TISTR 8217	7	Non-living	98.04	Thailand
		<i>Spirulina platensis</i> TISTR 8217	4-7	Silica-immobilized	36.63	Thailand
		<i>Spirulina</i> spp.	7.5	Non-living	0.46	Poland
		<i>Spirulina</i> spp.			0.463	Taiwan
		<i>Synechocystis</i> sp.		Live	199.83	China
<i>Tetraselmis chuii</i>	8	Live	13.46	Indonesia		
<i>Tetraselmis chuii</i>		Live	292.6	Brasil		
<i>Tetraselmis chuii</i>		Non-living	210.54	Brasil		
<i>Tolypothrix tenuis</i> TISRT 8063	7	Non-living	90	Thailand		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Cell wall	0.89	Canada		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Without cell wall	1.3	Canada		
<i>Oscillatoria angustissima</i>	4	Non-living	15.32	India		
<i>Spirogyra hyalina</i>		Non-living	12.82	India		
<i>Spirulina</i> spp.	7.5	Non-living	0.01	Poland		
<i>Chlorella miniata</i>	3	Non-living	14.17	Hong Kong		
<i>Chlorella miniata</i>	4	Non-living	28.72	Hong Kong		
<i>Chlorella miniata</i>	4.5	Non-living	41.12	Hong Kong		
<i>Chlorella</i> spp.		Non-living	98	India		
<i>Chlorella</i> spp.			9.62	Pakistan		
<i>Spirulina</i>		Live	304	India		
<i>Spirulina</i> spp.		Non-living	167	India		

Metal	Speciation	Organism	pH	Type of biomass	Metal uptake (mg/g)	Country		
Cr ⁶⁺		<i>Spirulina</i> sp.(HD-104)		Live	306	India		
		<i>Chlamydomonas angulosa</i>	8.2	Non-living	5.32	India		
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	Non-living native	18.2	Turkey		
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	Heat-treated	25.6	Turkey		
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	Acid-treated	21.2	Turkey		
		<i>Chlorella vulgaris</i>	2	Non-living	23	Turkey		
		<i>Chlorella</i> spp.			9.62	Pakistan		
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	23.6	Turkey		
		<i>Dunaliella</i> sp. 1	2	Non-living	58.3	Turkey		
		<i>Dunaliella</i> sp. 2	2	Non-living	45.5	Turkey		
		<i>Nostoc muscorum</i>	3	Non-living	22.92	India		
		<i>Oscillatoria nigra</i>	8.2	Non-living	1.86	India		
		<i>Oscillatoria tenuis</i>	8.2	Non-living	7.35	India		
		<i>Phormidium bohneri</i>	8.2	Non-living	8.55	India		
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	2	Non-living	15.6	Turkey		
		<i>Spirulina</i>		Live	333	India		
		<i>Spirulina</i> spp.		Non-living	143	India		
		<i>Synechocystis</i> spp.	2	Non-living	19.2	Turkey		
		<i>Ulothrix tenuissima</i>	8.2	Non-living	4.56	India		
		Cr ₂ O ₇ ⁻²		<i>Chlorella</i> spp.		Non-living	104	India
				<i>Spirulina</i> sp.(HD-104)		Live	226	India
		Cu	Cu ²⁺	<i>Anabaena cylindrica</i>	4.0-5.0	Live	12.62	Taiwan
				<i>Anabaena spiroides</i>	4.0-5.0	Live	8.73	Taiwan
				<i>Asterionella formosa</i>	4.0-5.0	Live	1.1	Taiwan
				<i>Asterionella formosa</i>	4.0-5.0	Non-living	0.53	Taiwan
				<i>Aulacoseira varians</i>	4.0-5.0	Live	2.29	Taiwan
				<i>Aulacoseira varians</i>	4.0-5.0	Non-living	3.03	Taiwan
				<i>Aulosira fertilissima</i>	5	Non-living	21.77	India
				<i>Ceratium hirundinella</i>	4.0-5.0	Live	2.3	Taiwan
				<i>Ceratium hirundinella</i>	4.0-5.0	Non-living	5.75	Taiwan
				<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Cells with Cell wall	6.42	Canada
				<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Cells without cell wall	7.54	Canada
<i>Chlorella fusca</i>	6			Live	3.2	Turkey		
<i>Chlorella miniata</i>	6			Non-living	23.26	Hong Kong		
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	7			Live	2.4	China		
<i>Chlorella</i> spp.	7			Immobilized	33.4	Malaysia		
<i>Chlorella</i> spp.				Live	220	India		
<i>Chlorella</i> spp.				Non-living	108	India		
<i>Chlorella vulgaris</i>	2			Non-living	16.14	Spain		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4			Non-living	37.6	Turkey		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4			Non-living	34.89	Spain		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5			Non-living	40	Turkey		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5			Non-living	48.17	Spain		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5			Free	76.71	India		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5			Immobilized	63.08	India		
<i>Chlorella vulgaris</i>	5			Non-living	1.8	Turkey		
<i>Chlorella vulgaris</i>	6			Non-living	10.9	Germany		
<i>Chlorella vulgaris</i>	6				7.5	Turkey		
<i>Chlorella vulgaris</i>	6			Non-living	18.72	Hong Kong		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.0-5.0			Live	3.63	Taiwan		
<i>Chlorella vulgaris</i>	4.0-5.0			Non-living	4.26	Taiwan		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4.0-5.0			Live	8.21	Taiwan		
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4.0-5.0			Non-living	2.47	Taiwan		
<i>Microcystis</i> spp.	9.2			Non-living	0.003	India		
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6			Non-living	1.67	Germany		
<i>Phormidium</i> spp.	5			Non-living	10.1	USA		
<i>Pithophora odeogonia</i>	5			Non-living	23.08	India		
<i>Planothidium lanceolatum</i>	7			Live	134.32	Morocco		
<i>Porphyridium purpureum</i>	6			Non-living	0.27	Germany		
<i>Scenedesmus obliquus</i>	4.5			Non-living	20	Turkey		
<i>Scenedesmus obliquus</i>	7			Live	1.8	China		
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	6			Non-living	13.28	Germany		
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	4			Non-living	2.8	Turkey		
<i>Spirogyra insignis</i>	4			Non-living	19.3	Spain		
<i>Spirogyra neglecta</i>	5			Non-living	40.83	India		
<i>Spirulina</i>				Live	389	India		
<i>Spirulina platensis</i>	6			Non-living	10.33	Germany		
<i>Spirulina platensis</i>	6				10	Turkey		
<i>Spirulina platensis</i>	9	Live	0.85	Russia				
<i>Spirulina</i> spp.		Non-living	100	India				

Metal	Speciation	Organism	pH	Type of biomass	Metal uptake (mg/g)	Country
		<i>Spirulina</i> spp.			0.271	Poland
		<i>Spirulina</i> sp.(HD-104)		Live	576	India
Fe	Fe ³⁺	<i>Synechocystis</i> spp.	4.5	Non-living	23.4	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	2	Non-living	24.52	Spain
		<i>Microcystis</i> sp.	9.2	Non-living	0.03	India
Hg	Hg ²⁺	<i>Calothrix parietina</i> TISTR 8093	7	Non-living	19	Thailand
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Ca-alginate immobilized	35.9	Turkey
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Ca-alginate immobilized	106.6	Turkey
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Non-living	72.2	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i> BCC 15	7	Non-living	18	Thailand
		<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP211/11B	7	Non-living	16	Thailand
		<i>Cyclotella cryptica</i>	4	Non-living	11.92	Germany
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4	Non-living	0.51	Germany
		<i>Porphyridium purpureum</i>	4	Non-living	0.51	Germany
		<i>Pseudochlorococcum typicum</i>	7	Live	15.13	Egypt
		<i>Scenedesmus acutus</i> IFRPD 1020	7	Non-living	20	Thailand
		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	4	Non-living	9.2	Germany
		<i>Spirogyra hyalina</i>		Non-living	35.71	India
		<i>Spirulina</i> spp.	7.5	Non-living	1.34	Poland
		<i>Tolypothrix tenuis</i> TISRT 8063	7	Non-living	27	Thailand
Ni	Ni ²⁺	<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	5.0-5.5	Non-living	20.78	Brazil
		<i>Aulosira fertilissima</i>	5	Non-living	4.16	India
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Cell wall	0.4	Canada
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.5	Without cell wall	0.63	Canada
		<i>Chlorella miniata</i>	6	Non-living	20.37	Hong Kong
		<i>Chlorella miniata</i>	7.4	Live	1.37	Hong Kong
		<i>Chlorella</i> spp.		Live	122	India
		<i>Chlorella</i> spp.		Non-living	183	India
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5		58.4	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5	Free	59.29	India
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4.5	Immobilized	111.41	India
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4.7	Non-living	24.06	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5	Live	15.4	U.A.E
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5	Non-living	15.6	U.A.E
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5	Immobilized	28.6	U.A.E
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5	Non-living	42.3	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	6	Non-living	12.06	Hong Kong
		<i>Chlorella vulgaris</i>	7.4	Live	0.64	Hong Kong
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-5.5	Non-living	29.29	Brazil
		<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	5	Non-living	13.86	India
		<i>Phormidium</i> spp.	5	Non-living	5.7	USA
		<i>Pithophora odeogonia</i>	5	Non-living	11.81	India
		<i>Scenedesmus obliquus</i>	5	Non-living	18.7	Turkey
		<i>Spirogyra insignis</i>	6	Non-living	17.5	Spain
		<i>Spirogyra neglecta</i>	5	Non-living	26.3	India
		<i>Spirulina</i>		Live	1378	India
		<i>Spirulina</i> spp.	7.5	Non-living	0.19	Poland
		<i>Spirulina</i> spp.		Non-living	515	India
		<i>Spirulina</i> sp.(HD-104)		Live	1108	India
		<i>Synechocystis</i> spp.	5	Non-living	15.8	Turkey
Pb	Pb ²⁺	<i>Anabaena flosaquae</i>			70	China
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Ca-alginate immobilized	230.5	Turkey
		<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	6	Ca-alginate immobilized	380.7	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	97.38	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	90	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	6	Non-living	17.13	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5-5.5	Non-living	131.36	Brazil
		<i>Chlorella vulgaris</i> BCC 15	7	Non-living	127	Thailand
		<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP211/11B	7	Non-living	39	Thailand
		<i>Cyclotella cryptica</i>	6	Non-living	36.68	Germany
		<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	5	Non-living	24	India
		<i>Microcystis novacekii</i>	5	Non-living	80	Brazil
		<i>Oscillatoria laete-virens</i>	5	Live	21.6	India
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6	Non-living	1.49	Germany
		<i>Phormidium</i> spp.	5	Non-living	13.6	USA
		<i>Pithophora odeogonia</i>	5	Non-living	71.13	India
		<i>Porphyridium purpureum</i>	6	Non-living	0.32	Germany
		<i>Pseudochlorococcum typicum</i>	7	Live	4.49	Egypt
		<i>Scenedesmus acutus</i> IFRPD 1020	7	Non-living	90	Thailand
		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	6	Non-living	38.71	Germany
		<i>Spirogyra hyalina</i>		Non-living	31.25	India
		<i>Spirogyra insignis</i>	5	Non-living	51.5	Spain

Metal	Speciation	Organism	pH	Type of biomass	Metal uptake (mg/g)	Country
Zn	Zn ²⁺	<i>Spirogyra neglecta</i>	5	Non-living	90.19	India
		<i>Spirogyra</i> spp.	5	Non-living	140.84	India
		<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i>	7	Live	188	China
		<i>Spirulina maxima</i>	5.5	Intact biomass	~32	China
		<i>Spirulina maxima</i>	5.5	Pretreated biomass	~42	China
		<i>Spirulina platensis</i>	6	Non-living	16.97	Germany
		<i>Stigeoclonium tenue</i>	6.8	Non-living	0.86	Poland
		<i>Stigeoclonium tenue</i>	8.2	Non-living	0.38	
		<i>Synechocystis</i> spp.		Live	155.63	China
		<i>Tolypothrix tenuis</i> TISRT 8063	7	Non-living	31	Thailand
		<i>Arthrospira (Spirulina) platensis</i>	5.0-5.5	Non-living	33.21	Brazil
		<i>Aulosira fertilissima</i>	5	Non-living	19.15	India
		<i>Chlorella homosphaera</i>			15.6	Spain
		<i>Chlorella</i> spp.	7	Immobilized	28.5	Malaysia
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	24.19	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	4	Non-living	24.5	Turkey
		<i>Chlorella vulgaris</i>	6	Non-living	6.42	Germany
		<i>Chlorella vulgaris</i>	5.0-5.5	Non-living	43.41	Brazil
		<i>Cyclotella cryptica</i>	6	Non-living	242.9	Germany
		<i>Desmodesmus pleiomorphus</i>	5	Non-living	360.2	Portugal
		<i>Euglena gracilis</i>			7.5	Sweden
		<i>Hydrodictyon reticulatum</i>	5	Non-living	3.7	India
		<i>Isochrysis galbana</i>		Live	0.3	Morocco
		<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	6	Non-living	14.52	Germany
		<i>Phormidium</i> spp.	5	Non-living	9.4	USA
		<i>Pithophora odeogonia</i>	5	Non-living	8.98	India
		<i>Planorhynchium lanceolatum</i>	7	Live	118.66	Morocco
		<i>Porphyridium purpureum</i>	6	Non-living	2.01	Germany
		<i>Scenedesmus obliquus</i>		Non-living	22.3	Portugal
		<i>Scenedesmus obliquus</i>		Non-living	6.67	Egypt
		<i>Scenedesmus quadricauda</i>		Non-living	5.03	
		<i>Scenedesmus subspicatus</i>	6	Live	72.06	Germany
		<i>Spirogyra insignis</i>	6	Non-living	21.1	Spain
<i>Spirogyra neglecta</i>	5	Non-living	31.51	India		
<i>Spirulina platensis</i>	6	Non-living	7.36	Germany		
<i>Spirulina</i> spp.	7.5	Non-living	0.17	Poland		
<i>Stigeoclonium tenue</i>	6.8	Non-living	0.88	Poland		
<i>Stigeoclonium tenue</i>	8.2	Non-living	0.77			

(Suresh Kumar et al., 2015b)

1.8. TIPOS DE SISTEMAS EMPLEADOS EN PROCESOS DE BIOSORCIÓN

Existen dos tipos de sistemas habitualmente empleados para efectuar la biosorción, y su elección depende principalmente del tipo de biomasa y su método de inmovilización, los sistemas son:

1. **Sistema Batch:** Actualmente es el sistema más utilizado para el desarrollo de estudios ligados a la biosorción de MP (Romera et al., 2007; Sheng et al., 2007). Sin embargo, este sistema no es utilizado habitualmente a gran escala, debido a los bajos rendimientos que proporciona y las dificultades de separación de la biomasa libre empleada (Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b).
2. **Sistemas Continuos o Semicontinuos:** Normalmente se trata de procesos muy automatizados, con elevados rendimientos y que facilitan la reutilización de la biomasa. Son muy útiles en el caso de evaluar la factibilidad técnica del proceso en condiciones reales (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

En la mayoría de los casos, estos biorreactores continuos o semicontinuos trabajan con una configuración en columna (Figura 5).

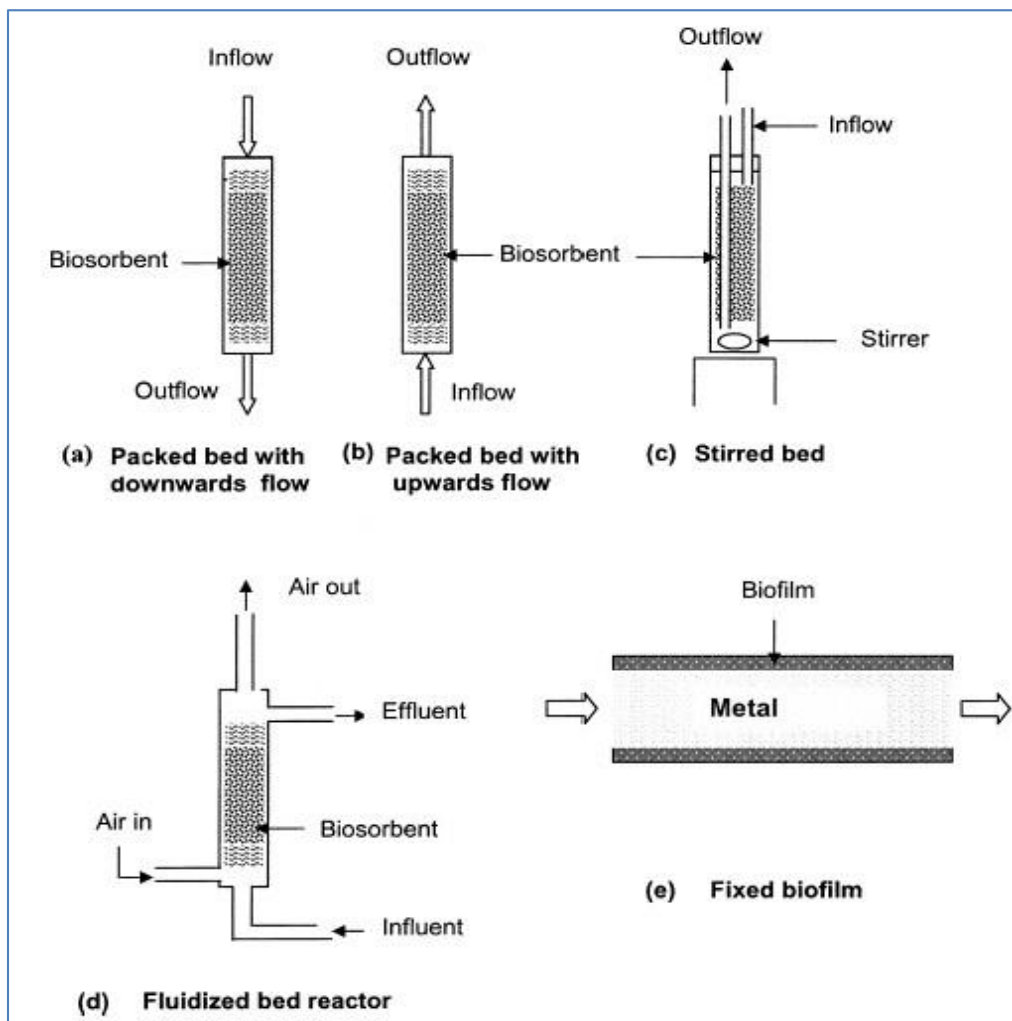


Figura 5. Diseños básicos de biorreactores utilizados para la remoción continua de MP desde aguas residuales. (Mehta y Gaur, 2005)

De todas las configuraciones presentadas en la Fig. 5, la configuración que ha sido establecida como la más efectiva, económica y conveniente es la de columna de relleno en lecho fijo, con la corriente de líquido circulando en flujo pistón a través del lecho de sólido adsorbente (Fig. 5a, 5b) (Soto et al., 2017). Otras columnas, tales como las de agitación continua (Fig. 5c) y de lecho fluidizado (Fig. 5d) son raramente utilizadas para el propósito de biosorción, principalmente debido a los altos costos de operación que requieren en su funcionamiento (Vijayaraghavan y Yun, 2008). Las ventajas del uso de columnas de relleno de lecho fijo son las siguientes: son simples de utilizar, presentan un alto rendimiento de operación, son de fácil escalamiento, las etapas de separación pueden ser automatizadas y presentan un alto grado de purificación.

La biomasa puede estar libre o inmobilizada, aunque el uso de células libres no se recomienda para el uso en columna debido a que a su baja densidad y tamaño tienden a producir obstrucción,

resultado en importantes caídas de presión, lo cual afecta de manera importante la efectividad del proceso (Wang y Chen, 2009). La columna es mantenida en modo vertical y dependiendo del sistema seleccionado, el flujo puede ingresar tanto por la zona superior de la columna manteniendo un flujo descendiente (Fig. 5a), o en sentido contrario en el caso de las columnas ascendentes (Fig. 5b).

El tamaño de la columna depende principalmente de la cantidad de flujo que se requiera tratar y del tiempo del ciclo que se desee realizar. El escalamiento del proceso para el uso de mayores cantidades de flujo es conseguido aumentando el diámetro y/o el número de columnas trabajando en paralelo, siempre tratando de mantener el flujo pistón del líquido (Naja y Volesky, 2006).

El principal factor para evaluar el desempeño del proceso de biosorción es en base a la capacidad de adsorción, la cual se mide en función de la masa de metal recuperado por unidad de volumen del sorbente, expresada generalmente en mg/g, normalmente en ensayos en batch. Una vez determinada la capacidad de adsorción del material, para diferentes concentraciones de disolución, se realizan ensayos en lecho fijo en semi-continuo. La eficiencia del proceso es determinada en función de la curva de ruptura, la cual describe la concentración de metal a la salida del lecho en función del tiempo y/o volumen del influente, para una altura de lecho fija (Ahmaruzzaman, 2011). Se suele trabajar con concentraciones normalizadas, calculadas como la relación entre la concentración de metal en el efluente (C_{ef}) y la concentración de metal en la solución inicial (C_i). Su gráfica resultante, operando con flujo pistón de la corriente líquida, tiene forma sigmoideal. En el interior del lecho fijo se pueden apreciar durante el proceso tres zonas principales (Fig. 6):

- Una zona de equilibrio, cercana a la entrada del líquido en el adsorbente, en la cual se ha alcanzado ya la capacidad máxima adsorbida en el equilibrio y la concentración del fluido se encuentra constante e igual a la inicial.
- Una zona de transferencia de masa, que es el lugar donde se desarrolla la adsorción. En ella la concentración del ion disminuye desde la concentración inicial a cero y la cantidad de metal adsorbido aumenta hasta alcanzar el valor de saturación. El tamaño de la zona de adsorción es dependiente de una serie de factores, tales como: la isoterma de adsorción, la tasa de flujo, la tasa de transferencia de masa hacia las partículas y la tasa de difusión en los poros de biosorbente.
- Una zona de lecho no utilizado, formada entre la zona de transferencia de masa y la salida de la columna. Donde inicialmente solo hay adsorbente sin la presencia de soluto y la concentración de metal en el líquido es nula.

La zona de transferencia de materia va avanzando a lo largo de la columna con el tiempo, hasta alcanzar el final de esta (Fig. 6). Cuando la concentración en el efluente alcanza un determinado valor relacionado con el límite de descarga permitido del metal que se desea remover, se llega al llamado tiempo de ruptura. En ese punto de ruptura el flujo debe ser detenido y el biosorbente debe ser cambiado. Si la columna continuase funcionando, aún con concentración no nula de metal

en el efluente, se alcanzaría el tiempo de saturación, en el que la concentración a la salida es idéntica a la de entrada. La cantidad de metal adsorbida hasta ese punto nos marca la capacidad máxima del lecho a saturación. La diferencia entre el tiempo de ruptura y el de saturación, nos indica la eficiencia del proceso (Mehta y Gaur, 2005). Es deseable una zona de transferencia de materia estrecha para que la utilización del adsorbente sea eficaz y los costes de energía de la regeneración sean menores (Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b).

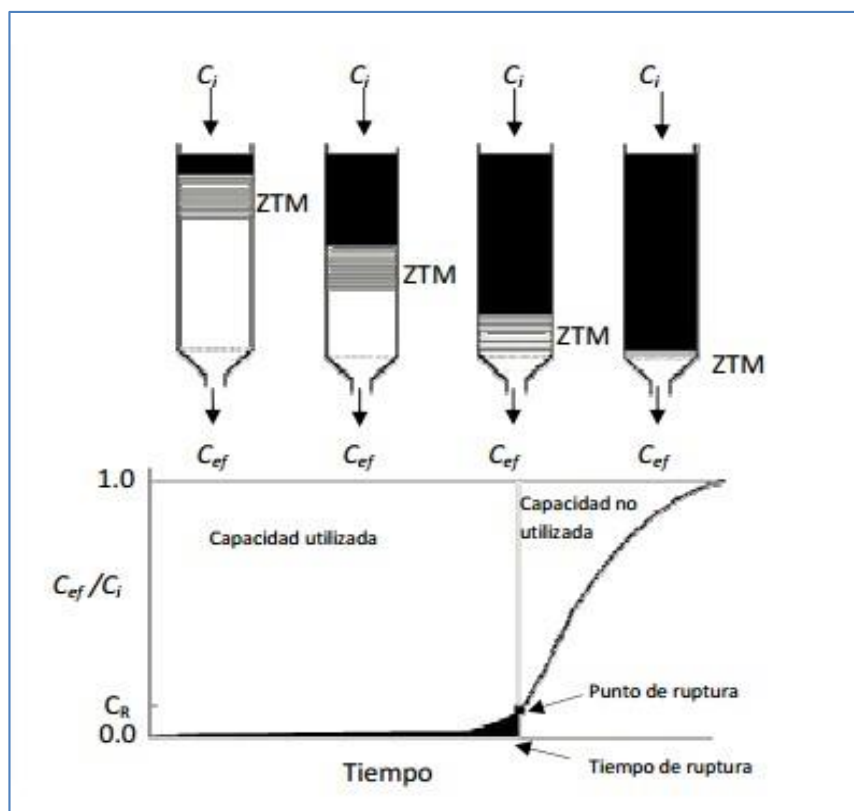


Figura 6. Curva de ruptura para filtros de lecho fijo. C_i = Concentración inicial, C_{ef} = Concentración final, C_R = Concentración de ruptura, ZTM = Zona de transferencia de masa (Taty-costodes et al., 2005).

El proceso de biosorción en lecho fijo es influenciado principalmente por tres parámetros experimentales claves, presentados a continuación:

- **La velocidad de flujo de la solución acuosa:** Este factor es muy importante ya que determina el periodo de contacto de los iones metálicos con el sorbente en la columna. Se ha determinado que el tiempo para alcanzar el tiempo de ruptura y saturación disminuye al aumentar las tasas de flujo, aunque se debe tener en consideración que un aumento de este factor produce una disminución de la capacidad útil del lecho. En un estudio que analiza las velocidades de flujo en un proceso de biosorción con *Scenedesmus obliquus* CNW-N inmovilizada, se estudiaron los tiempos de ruptura a distintas velocidades (0,057 BV/min, 0,114 BV/min y 0,170 BV/min, donde BV: *Bed Volume*, volumen total del lecho fijo) a una concentración inicial de Cd^{+2} de 7,5 mg/L y a un tamaño del lecho de 18 cm de largo

por 1 cm de diámetro. Los resultados indican el tiempo de ruptura alcanzado para cada velocidad indicada corresponde a 15,5 h, 6,5 h y 0,33 h, respectivamente. Esto se produce porque el biosorbente se satura más rápido a una mayor velocidad de flujo, debido la mayor tasa de carga del metal ingresada y porque la anchura de la zona de transferencia de materia aumenta con la velocidad de flujo (Chen et al., 2014).

- **La longitud del lecho:** Si se aumenta longitud del lecho, también lo hacen los tiempos de ruptura y de saturación consiguiéndose una mayor tasa de remoción de metal. Estudios de biosorción de Co (II) con *Sargassum wightii* con lechos de 15, 20 y 25 cm proporcionaron tiempos de ruptura de 7,6, 10,1 y 13,1 h, respectivamente (Vijayaraghavan et al., 2005). Si se analiza la capacidad útil de adsorción, se puede apreciar que esta aumenta con el tamaño de la columna, alcanzando valores de 46,1 mg/g, 47,0 mg/g y 50,7 mg/g, debido al aumento de porcentaje de lecho usado hasta el punto de ruptura (Vijayaraghavan et al., 2005).
- **La concentración de iones de MP:** La capacidad de adsorción del biosorbente y, por tanto, la eficiencia del proceso se ven favorecidas al aumentar la concentración. Además, el tiempo de ruptura disminuye con la concentración de metal. Estudios realizados sobre adsorción de Cu^{+2} a tres concentraciones iniciales (10, 25 y 50 mg/L) alcanzaron el punto de ruptura en 41 h, 24 h y 13,5 h, respectivamente (Singh et al., 2012).

Si se desea conseguir un buen proceso de biosorción en columna se tiene que utilizar un sorbente que produzca que el proceso posea como características: un punto de ruptura tardío, una zona de transferencia de masa lo más corta posible, una alta capacidad de adsorción, una curva de ruptura escarpada y una alta eficiencia (Kumar et al., 2016).

1.9. MODELOS CINÉTICOS E ISOTERMAS DE EQUILIBRIO EN EL PROCESO DE BIOSORCIÓN

El equilibrio determina el potencial de adsorción del sistema, el valor máximo alcanzable para una concentración determinada. La relación, en el equilibrio entre las concentraciones en la fase líquida y la sólida a una temperatura dada se denominan isotermas de equilibrio. Para ajustar estos equilibrios pueden emplearse diferentes modelos, caracterizados por parámetros definidos y cuyos valores permiten expresar las propiedades de la superficie de la biomasa y la afinidad de esta frente a los diferentes iones de MP (Bulgariu y Bulgariu, 2012). Las isotermas de equilibrio describen el equilibrio alcanzado en sistemas Batch (He y Chen, 2014), pero también sirven para explicar y predecir el comportamiento experimental de la biosorción en lecho fijo (Wang y Chen, 2014). Los modelos más usados para la descripción de la biosorción isoterma son:

1. **Modelo Langmuir:** Este modelo ha sido aplicado exitosamente para describir procesos de biosorción donde prevalece la biosorción pasiva, es decir, donde el proceso de adsorción es el que presenta mayor relevancia en la capacidad total de biosorción (Ibrahim, 2011). El modelo Langmuir está basado en tres supuestos, que son los siguientes:

- I. El proceso de la biosorción toma lugar en un sorbente de superficie homogénea y se produce con características de monocapa.
- II. Las especies adsorbidas, en este caso iones metálicos, no poseen interacción entre ellas, sino que interaccionan solo con los sitios de unión en la superficie del biosorbente.
- III. Las energías de adsorción en los sitios de unión son idénticas e independientes de la presencia de especies adsorbidas en sitios adyacentes (Lesmana et al., 2009; Mehta y Gaur, 2005).

El modelo puede ser expresado mediante la ecuación presente en la Figura 7. En donde q y C_{ef} corresponden a las cantidades de metal adsorbido en el sorbente en el equilibrio (mg/g) y la concentración de equilibrio en la solución (mg/L) respectivamente, q_m es la máxima capacidad de adsorción del sorbente (mg/g), y b es la constante de adsorción de equilibrio relacionado con la afinidad de los sitios de unión (L/mg).

2. **Modelo Freundlich:** Es un proceso ampliamente utilizado para describir la adsorción de iones metálicos dentro de una superficie heterogénea, y en un proceso de adsorción multicapa. Su ecuación y gráfica se presenta en la Figura 7, en donde se aprecia que K es una constante designada para la capacidad de adsorción relativa, n es el factor de heterogeneidad, el cual a medida que presente un menor valor, significa que la superficie presente una mayor heterogeneidad. Este modelo proporciona una descripción más realista de la adsorción de metal por biosorbentes de origen orgánico debido a que considera las diferencias de afinidad en la superficie heterogénea de la biomasa (Fomina y Gadd, 2014). A diferencia de la isoterma de Langmuir, Freundlich no asume en su ecuación la saturación de la adsorción del metal, sino que considera que los sitios de unión que poseen una atracción más fuerte hacia los iones metálicos son ocupados en primer lugar, y que esta fuerza de unión va disminuyendo a medida que se produce el incremento del grado de ocupación de los sitios de unión por los MP (Winters et al., 2017).

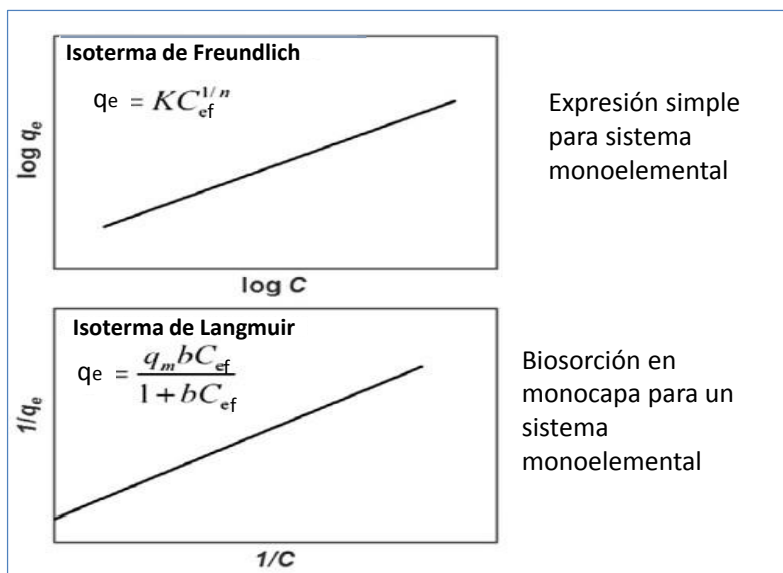


Figura 7. Ecuaciones y gráficas representativas de tres de los más comunes isothermas de adsorción usadas para estudios de biosorción. Isothermas de Freundlich y Langmuir. (Fomina y Gadd, 2014)

La cinética del proceso de biosorción puede definirse como la velocidad con la que se alcanza el equilibrio entre la concentración de metal enlazado a la superficie de la biomasa y la concentración de metal en la fase líquida del medio (Jayakumar et al., 2015). Su estudio es de gran interés para comprender de manera global el proceso de la biosorción, y para predecir las condiciones óptimas de las variables implicadas en los procesos de adsorción (Anastopoulos y Kyzas, 2015). Se han desarrollado modelos cinéticos que son utilizados para ajustar los datos experimentales en el proceso de la biosorción de MP en disolución. Estos modelos nos dan información acerca de los mecanismos de adsorción y las etapas de control, tales como el transporte de masa o los procesos de reacción química (Abdolali et al., 2014). Los principales modelos cinéticos son:

- **El modelo de Pseudo Primer Orden (PS1):** Este modelo considera que la velocidad de ocupación de los sitios de unión de la superficie celular por los iones metálicos es proporcional al número de sitios desocupados presentes en el biosorbente. Su ecuación lineal y no lineal de este modelo cinético se expresan en la Tabla 8. En la ecuación, q_t y q_e son las cantidades de metal adsorbidos en el biosorbente al tiempo t y en el equilibrio, respectivamente (mg/g), y k_1 es el coeficiente cinético del primer orden.
- **El modelo de Pseudo Segundo Orden (PS2):** Este modelo aplicable cuando la velocidad de ocupación de los sitios de adsorción es proporcional al número al cuadrado de los sitios no ocupados en la superficie del biosorbente. Sus ecuaciones tanto lineal como no lineal también se encuentran presentes en la Tabla 8. En donde k_2 es el coeficiente cinético de segundo orden.

Tabla 8. Modelos cinéticos del proceso de adsorción y ecuaciones asociadas, presentadas en modo lineal y no lineal

Isoterma		Ecuación
Pseudo-primer orden	(no lineal)	$q_t = q_e(1 - e^{-k_1 t})$
Pseudo-primer orden	(lineal)	$\ln(q_e - q_t) = \ln(q_e) - k_1 t$
Pseudo-segundo orden	(no lineal)	$q_t = \frac{k_2 q_e^2 t}{1 + k_2 q_e t}$
Pseudo-segundo orden	(lineal)	$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \left(\frac{1}{q_e}\right)t$

(Anastopoulos y Kyzas, 2015)

A pesar de utilizarse ambos modelos cinéticos, se ha determinado que la cinética de adsorción del metal en las microalgas sigue más a menudo el modelo de Pseudo-segundo orden, producto de que la velocidad del proceso de adsorción presenta cambios frente a la concentración inicial del ion, adaptándose de mejor modo al proceso real de experimentación en un proceso de Pseudo-segundo orden (Kumar et al., 2016; Mehta y Gaur, 2005).

Existen numerosos estudios que han reportado el uso de isotermas asociadas a modelos cinéticos de segundo y de primer orden, para ajustar los datos experimentales en sistema batch y poder utilizar los parámetros como referencia para la determinación de las condiciones óptimas del proceso (Anastopoulos y Kyzas, 2015). En la Tabla 9 se presentan los estudios más relevantes basados en microalgas. Se aprecia que debido a la simplicidad del proceso y al adecuado ajuste proporcionado, en líneas generales, la isoterma de equilibrio más utilizada para la determinación de las condiciones del proceso de biosorción es la isoterma de Langmuir. En cuanto a los modelos cinéticos, la mayor parte de los estudios han utilizado el modelo PS2, es decir, el modelo de Pseudo-segundo orden.

Tabla 9. Modelos de cinética de adsorción e isoterma de equilibrio seleccionados para la biosorción de iones de MP en microalgas

Biosorbente	Característica	Metal	Modelo de isoterma	modelo cinético	Qm (mg/g)
<i>Spirulina platensis</i>		Cu ⁺²	L	-	1,64 - 1,94
<i>Chlorella vulgaris</i>		Cu ⁺²	L	-	1,14- 1,47
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa seca típica	Cu ⁺²	L	PS2	17,3
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa seca enriquecida en carbohidratos	Cu ⁺²	L	PS2	33,44
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa viva típica	Cu ⁺²	F	PS2	40,65
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa viva enriquecida en carbohidratos	Cu ⁺²	F	PS2	35,59
<i>Spirulina platensis</i>		Cr ⁺²	L	-	12,3 - 16,8
<i>Chlorella vulgaris</i>		Cr ⁺²	L	-	10,2 - 13,7
<i>Chlorella miniata</i>		Cr ⁺³	L	-	14,7 - 41,2
<i>Scenedesmus quadricauda</i>		Cr ⁺³	L	PS2	58,47
<i>Scenedesmus quadricauda</i>		Cr ⁺⁶	F	PS2	46,51
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa seca típica	Ni ⁺²	L	PS2	52,63
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa viva típica	Ni ⁺²	F	PS2	90,91
<i>Arthrospira platensis</i>	Biomasa viva enriquecida en carbohidratos	Ni ⁺²	F	PS2	63,29
<i>Spirulina platensis</i>		Zn ⁺²	L, D-R	PS1, PS2	2,1
<i>Chlorella vulgaris</i>		Zn ⁺²	L, D-R	PS1, PS2	2,2

(Anastopoulos y Kyzas, 2015)

Se ha demostrado que la cinética del proceso de captación de cationes metálicos a partir de biomasa microalgal toma lugar dentro de los primeros 20 a 60 minutos de contacto. El corto tiempo requerido se debe a que este proceso resulta ser un mecanismo independiente del metabolismo celular. Después de ese tiempo, el proceso continúa hasta alcanzar un equilibrio aproximadamente a las 3 h de iniciado el proceso (Abdel-Ghani y El-Chaghaby, 2014). Sin embargo, la cinética varía en función de la naturaleza del ion metálico que se desea remover. Estudios realizados muestran que para aniones metálicos, el proceso de biosorción resulta mucho más lento que para metales

cati3nicos, pudiendo demorar en alcanzar el equilibrio en un plazo de entre 12 h a varios d3as, seg3n las caracter3sticas de la naturaleza del organismo biosorbente, siendo el principal factor la especie de la microalga (He y Chen, 2014).

1.10. ESTUDIOS DE REGENERACI3N Y REUTILIZACI3N DE LA BIOMASA PARA EL PROCESO DE BIOSORCI3N

El estudio de la regeneraci3n de la biomasa es un factor clave si se desea aplicar la tecnolog3a de la biosorci3n por microalgas para la eliminaci3n de MP (Wang y Chen, 2014). Es necesario considerar que la biosorci3n sea un proceso reversible para que la biomasa tenga la capacidad de desligarse de los metales captados y as3 permitir la recuperaci3n de los metales, la regeneraci3n y el posterior uso de la biomasa microalgal para un pr3ximo ciclo. Si se consideran los costes de operaci3n y los costes ambientales, la reutilizaci3n de la biomasa y la recuperaci3n de los metales reducir3an el gasto global del proceso y la dependencia continua del suministro de biosorbente (Levy et al., 2007; Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b).

La recuperaci3n de los metales unidos a la biomasa requiere el empleo de un agente de eluci3n o eluyente, soluci3n que mediante sus propiedades fisicoqu3micas permite la separaci3n del sorbente de los metales y el reuso de la biomasa para m3ltiples ciclos de biosorci3n/desorci3n (Suresh Kumar et al., 2015b). Los requerimientos que debe cumplir el eluyente son los siguientes (Wang y Chen, 2014):

- No debe ocasionar da3o al funcionamiento ni a la estabilidad de la microalga.
- Debe presentar un bajo costo de producci3n.
- Debe ser ecol3gico y amigable con el medio ambiente.
- Debe poseer una alta efectividad.
- Debe preservar la capacidad de biosorci3n del sorbente para mantener la efectividad en los pr3ximos ciclos de uso.

El 3xito del proceso de recuperaci3n depende de la elecci3n del eluyente, la cual depende en gran modo del tipo de biosorbente, del mecanismo de desorci3n y la estabilidad mec3nica de la biomasa. Uno de los m3todos m3s comunes de desorci3n de MP presentes en la biomasa microalgal es el uso de agentes 3cido/base para modificar el pH de la soluci3n (Monteiro et al., 2012). En el caso de los iones cati3nicos como el Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mn^{+2} y Cd^{+2} , una dr3stica ca3da del pH del medio ocasiona la sustituci3n prot3nica de los cationes met3licos que est3n anclados en los sitios de uni3n de la superficie celular, desplaz3ndolos nuevamente hacia la soluci3n (Bilal et al., 2018). Considerando que la mayor3a de los biosorbentes exhiben un mecanismo de intercambio i3nico, el uso de moderadas concentraciones de un 3cido fuerte permite generar un buen proceso de recuperaci3n (Suresh Kumar et al., 2015b). Adem3s de esto, el uso de 3cidos para la desorci3n es beneficioso debido a que las soluciones 3cidas son uno de los residuos m3s comunes en los procesos industriales y si el proceso fuese utilizado para tratamiento de residuos industriales, estas soluciones de descarte pueden ser usadas para regenerar los biosorbentes (Lata et al., 2015).

Además, habitualmente, como respuesta a estos contaminantes las microalgas suelen modificar sus vías metabólicas (Xiao y Zheng, 2016). Estos mecanismos permiten mantener la homeostasis de la célula microalgal sobre el metal y prevenir el daño celular y la toxicidad que naturalmente presentan las MP que se encuentran libremente en el medio. Así, según la dependencia metabólica del organismo, suele hablarse de procesos de biosorción o de bioacumulación.

Tabla 10. Eficiencia de la elución de metales por diferentes agentes de desorción

Desorbent	Metal	Biosorbent	Desorption of sorbed metal (%)	Reference
CaCl ₂ , 0.05 mM	Cd	<i>Sargassum</i> sp.	42	Esteves, Valdman, and Leite, 2000
CaCl ₂ , 0.05 mM	Zn	<i>Sargassum</i> sp.	48	Esteves, Valdman, and Leite, 2000
CaCl ₂ , 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	11	Karna et al., 1999
CaCl ₂ , 0.1 M	Co	<i>P. valderianum</i>	40	Karna et al., 1999
CaCl ₂ /HCl, 1:3, pH 2.5	Co	<i>Ascophyllum nodosum</i>	96	Kuyucak and Volesky, 1989d
Citric acid	Pb	<i>Spirulina maxima</i>	75	Gong et al., 2005
EDTA, 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	100	Karna et al., 1999
EDTA, 0.1 M	Co	<i>P. valderianum</i>	100	Karna et al., 1999
EDTA	Cu	<i>Sargassum kjellmanianum</i>	98	Zhou et al., 1998
EDTA, 0.1 M	Pb	<i>Spirulina maxima</i>	91	Gong et al., 2005
EDTA, pH 2.5	Co	<i>Ascophyllum nodosum</i>	60	Kuyucak and Volesky, 1989d
H ₂ SO ₄ , 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	47	Karna et al., 1999
H ₂ SO ₄ , 0.1 M	Co	<i>P. valderianum</i>	75	Karna et al., 1999
HCl, 0.1 M	Zn	<i>Sargassum</i> sp.	60	Esteves, Valdman, and Leite, 2000
HCl, 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	43	Karna et al., 1999
HCl, 0.1 M	Co	<i>P. valderianum</i>	78	Karna et al., 1999
HCl, 0.11 N	Cu	<i>Sargassum kjellmanianum</i>	98	Zhou et al., 1998
HCl, 0.5 M	Cd	<i>Sargassum</i> sp.	100	Esteves, Valdman, and Leite, 2000
HCl, 1 N	Cr	<i>Pachymeniopsis</i>	0.25	Lee et al., 2000
HCl, pH 1.55	Pb	<i>Chlorella minutissima</i>	90.2	Roy et al., 1993
HCl, pH 1.55	Zn	<i>C. minutissima</i>	91.5	Roy et al., 1993
HCl, pH 1.55	Cd	<i>C. minutissima</i>	1.2	Roy et al., 1993
HCl, pH 1.55	Ni	<i>C. minutissima</i>	0.3	Roy et al., 1993
HCl, pH 2.7	Co	<i>Ascophyllum nodosum</i>	91	Kuyucak and Volesky, 1989d
HCl, 0.1 M	Pb	<i>Spirulina maxima</i>	85	Gong et al., 2005
HCl:EDTA, (1:1)	Cd	<i>Padina pavonica</i>	90	Ofer, Yerachmiet, and Shmuel, 2003
HCl:EDTA, (1:1)	Ni	<i>Padina pavonica</i>	90	Ofer, Yerachmiet, and Shmuel, 2003
HNO ₃ , 0.1 M	Pb	<i>S. maxima</i>	92	Gong et al., 2005
KHCO ₃ , pH 6	Co	<i>A. nodosum</i>	57	Kuyucak and Volesky, 1989d
KSCN, 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	3	Karna et al., 1999
KSCN, 0.1 M	Co	<i>P. valderianum</i>	13	Karna et al., 1999
KSCN, pH 2.5	Co	<i>Ascophyllum nodosum</i>	98	Kuyucak and Volesky, 1989d
NaHCO ₃ , 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	6.4	Karna et al., 1999
NaOH, 1 N	Cr	<i>Pachymeniopsis</i>	17	Lee et al., 2000
NaOH, 0.1 M	Cd	<i>Sargassum</i> sp.	<6	Esteves, Valdman, and Leite, 2000
NaOH, 0.1 M	Zn	<i>Sargassum</i> sp.	<6	Esteves, Valdman, and Leite, 2000
NH ₄ Cl, 0.1 M	Co	<i>Phormidium valderianum</i>	30	Karna et al., 1999
NH ₄ Cl, 0.1 M	Cd	<i>P. valderianum</i>	20	Karna et al., 1999
NH ₄ Cl, pH 2.8	Co	<i>Ascophyllum nodosum</i>	78	Kuyucak and Volesky, 1989d
NH ₄ OH, 0.1 M	Cd	<i>Phormidium valderianum</i>	2.2	Karna et al., 1999
NH ₄ OH, 0.1 M	Co	<i>P. valderianum</i>	11	Karna et al., 1999

(Mehta y Gaur, 2005)

A pesar de que no se puede realizar una comparación absoluta entre los distintos agentes de elución debido a las diferentes condiciones experimentales en que han sido llevados a cabo los estudios previamente presentados, es razonable indicar que los ácidos minerales y el quelante EDTA son los eluyentes que presentan la mejor eficiencia en la capacidad de desorción de los cationes metálicos de los biosorbentes algales (Vannela y Verma, 2006). Sin embargo, el uso del EDTA no está recomendado en casos de biomasa inmovilizada en matrices naturales, debido a que afecta la

estructura física de la biomasa y además, al ser un quelante poderoso, no es seguro para el medio ambiente (Fawaz et al., 2018). Por otro lado, las sales inorgánicas y los ácidos orgánicos presentan también apreciables tasas de eficiencia (Tabaraki y Nateghi, 2014). En un estudio de desorción de Co^{+2} , Cu^{+2} y Zn^{+2} desarrollado con la biomasa de *Spirulina platensis*, se compararon diversos agentes de elución y se determinó la eficiencia de cada uno de ellos. Los mejores rendimientos de desorción para cada ion estudiado fueron alcanzados por HCl (0,1 M), con valores de desorción de 95,5%, 98,1% y 95,6% respectivamente (Piccini et al., 2019). Los procesos de desorción desarrollados con H_2SO_4 (0,1 M) y HNO_3 (0,1 M) también presentaron elevados valores, todos sobre el valor de 93,2% (Vannela y Verma, 2006). En otro estudio, el proceso de desorción con ácido nítrico (0,1 M) ha sido caracterizado como una técnica de alta eficiencia, capaz de remover el 98%, 90% y 95% de iones de MP Cr^{+3} , Cd^{+2} y Cu^{+2} enlazados a la biomasa sin causar la pérdida de la capacidad de biosorción, preservando las propiedades biosorbentes de la microalga *Spirulina sp.*, (Chojnacka et al., 2005).

La mayoría de los estudios confirman la eficacia del HCl como agente eluyente, pero algunos estudios revelan disminuciones de hasta un 26% de la capacidad de adsorción del biosorbente para los ciclos siguientes de sorción (Rangsayatorn et al., 2004). Se atribuye esta reducción al daño de los sitios de unión y a la hidrólisis de los polisacáridos presentes en la superficie celular de la biomasa (Monteiro et al., 2012; Ponce et al., 2015). Sin embargo, existen estudios en donde se reporta que el uso de HCl (0,1 M) como agente de elución para la biomasa de *Chlorella vulgaris* en el proceso de remoción de Ni^{+2} mantiene una capacidad de adsorción constante durante tres ciclos de biosorción/desorción (Lata et al., 2015).

El factor de la concentración del eluyente es un punto importante que debe ser considerado para impedir daños en la biomasa microalgal y la disminución en la capacidad de biosorción. Si bien se ha determinado que el ácido nítrico es un buen agente de elución, a concentraciones elevadas de 1,0 M afecta de manera importante la estructura celular de la biomasa, afectando directamente a la capacidad de adsorción. El mismo caso se ha reportado con HCl 1,0 M. En base a las referencias previamente presentadas, parece adecuado el uso de concentraciones del orden de 0,1 M para eluyentes (Abdolali et al., 2015b; Cechinel et al., 2018). La elución es también se ve influenciada por el volumen del eluyente, el cual debe ser el más bajo posible para obtener la máxima concentración de soluto en el menor volumen posible.

1.11. BIOSORCIÓN EN SISTEMAS MULTIMETÁLICOS

Si bien el estudio de la biosorción de iones metálicos por efecto de las microalgas ha ido aumentando en los últimos años, la mayoría de estas investigaciones se han realizado en soluciones monometálicas. Sin embargo, para diseñar sistemas de tratamiento de aguas contaminadas con presencia de MP, es necesario considerar la interferencia entre diversos tipos de iones en sistemas multi-componentes (Cechinel et al., 2016; Henriques et al., 2019). En lugares que presentan contaminación de sus aguas producto del efecto de la solubilización de los suelos, como en el norte

de Chile, la carga iónica en el agua suele ser muy diversa e incluye diferentes tipos de MP. En el caso de los efluentes industriales, también presentan variados elementos (Tabla 11) incluyendo además de MP una alta variedad de otras sales (Ahmed y Ahmaruzzaman, 2016).

Se ha determinado que las microalgas pueden remover de manera efectiva iones metálicos disueltos en soluciones multi-metálicas (Abdolali et al., 2018; Ferreira et al., 2011; Flouty y Estephane, 2012; Jain et al., 2016; Mohapatra y Gupta, 2005; Rodrigues et al., 2012).

Tabla 11. Industrias generadoras de contaminación con MP y los principales metales asociados en los efluentes del sector industrial

Industria	Metales	Contaminación derivada
Minería de metales ferrosos	Cd, Cu, Ni, Cr, Co, Zn	Drenaje ácido de mina, relaves, escombreras
Extracción de minerales	As, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Presencia en las menas como en los subproductos
Fundición	As, Cd, Pb, Tl	Procesado del mineral para obtención de metales
Metalúrgica	Cr, Cu, Mn, Pb, Sb, Zn	Procesado térmico de metales
Aleaciones y aceros	Pb, Mo, Ni, Cu, Cd, As, Te, U, Zn	Fabricación, eliminación y reciclaje de metales. Relaves y escoriales
Gestión de Residuos	Zn, Cu, Cd, Pb, Ni, Cr, Hg, Mn	Incineración de residuos o en lixiviados
Corrosión Metálica	Fe, Cr, Pb, Ni, Co, Zn	Inestabilidad de los metales expuestos al medio ambiente
Galvanoplastia	Cr, Ni, Zn, Cu	Los efluentes líquidos de procesos de recubrimiento
Pinturas y pigmentos	Pb, Cr, As, Ti, Ba, Zn	Residuos acuosos procedentes de la fabricación y el deterioro de la pintura vieja.
Baterías	Pb, Sb, Zn, Cd, Ni, Hg	Fluido de la pila de residuos, la contaminación del suelo y las aguas subterráneas.
Electrónica	Pb, Cd, Hg, Pt, Au, Cr, As, Ni, Mn	Residuos metálicos acuosa y sólida desde el proceso de fabricación y reciclaje
Agricultura y Ganadería	Cd, Cr, Mo, Pb, U, V, Zn, As, Mn, Cu	Contaminación de escorrentía, aguas superficiales y subterráneas, la bioacumulación planta

(Rubio et al., 2015)

El mecanismo del proceso de biosorción metálica resulta mucho más complejo de elucidar en proceso multimetales. Se ha reportado que la remoción de metal se favorece con el incremento del radio iónico, y las diferencias en las afinidades de adsorción pueden ser atribuidas a diferencias de la electronegatividad de los iones presentes en la solución (Al-Rub et al., 2006). Es por esto que, en soluciones multimetálicas, el ion que presente una mayor electronegatividad presentará una mayor afinidad hacia el sitio de unión presente en la biomasa (Rodrigues et al., 2012). Esto se puede observar en estudios de adsorción binaria de Zn (II) y Cu (II), a pH 4.0, llevado a cabo con la microalga *Oscillatoria angustissima* (Mohapatra y Gupta, 2005). Ambos iones presentan propiedades iónicas similares y el Cu (II) presenta una mayor electronegatividad que el Zn (II). Se determinó que sin la presencia de Cu (II) en el medio, la biosorción de Zn (II) resultante fue de 0,31 mmol/g, pero en presencia de 1 mM de Cu (II) la biosorción de Zn (II) disminuyó a 0,14 mmol/g, mientras que en presencia de 2 mM de Cu (II) la biosorción de Zn (II) alcanzó solo el valor de 0,07 mmol/g. Esto indica

que el efecto inhibitorio en la biosorción de Zn (II) es directamente proporcional a la concentración de Cu (II) presente en el medio. Por otro lado, la biosorción de Cu (II) no se ve influenciada mayormente por diferencias en la concentración de Zn (II) en el medio, con resultados de biosorción de Cu (II) de 0,28 mmol/g, 0,27 mmol/g y 0,25 mmol/g, en concentraciones de 0 mM, 1 mM y 2 mM de Zn (II) en el medio, como (Mohapatra y Gupta, 2005).

En otro estudio de biosorción llevado a cabo con una solución terciaria de Pb (II), Cu (II) y Zn (II), desarrollado con *Chlorella vulgaris*, se determinó el grado de interferencia que generaba la presencia de Pb (II) y Zn (II), en la biosorción de Cu (II). Los resultados demuestran que la capacidad de biosorción de Cu (II), que en un estudio monometálico fue de 60 mg/g, disminuye de manera importante en presencia de Pb (II) en el medio, llegando a un valor aproximado de 15 mg/g, mientras que en presencia de Zn (II) su disminución es mínima, alcanzando un valor final de 55 mg/g (Sulaymon et al., 2013). Si consideramos la electronegatividad de los iones estudiados, que presenta el orden de $Pb^{+2} > Cu^{+2} > Zn^{+2}$, se puede reafirmar la idea que la capacidad de interferencia de un ion es proporcional a la diferencia de electronegatividad que presenten los iones en solución (Al-Rub et al., 2006).

En relación con el incremento en la concentración inicial de un ion metálico específico en una solución binaria, la capacidad de biosorción en el equilibrio de este ion se verá aumentada si la concentración que presenta el otro metal que compite con el primero se mantiene estable. Esto se ve reflejado en un estudio de biosorción en solución de Zn (II) y Ni (II) mediante el uso de *Arthrospira platensis*, en donde a una concentración inicial de 0,5 (mM) para cada ion, la capacidad de biosorción alcanzó un valor de 0,138 mmol/g y 0,083 mmol/g, respectivamente. Al aumentar la concentración inicial del Zn (II) a 1,0 (mM) manteniendo la concentración de Ni (II) constante, la capacidad de adsorción del Zn (II) se ve aumentada a 0,282 mmol/g, mientras que la capacidad de adsorción del Ni (II) se mantiene en el constante, en el orden de 0,085 mmol/g (Rodrigues et al., 2012).

1.12. INMOVILIZACIÓN DE LA BIOMASA

El proceso de inmovilización se presenta como una solución óptima a las problemáticas asociadas a la etapa de separación y recuperación de la biomasa posterior al transcurso de la biosorción, el cual es considerado como una de las limitaciones prácticas más importantes en el desarrollo de nuevas tecnologías de remediación de aguas mediante el uso de microalgas (Uduman et al., 2010; Wu et al., 2018). Este es definido como la capacidad de impedir la movilidad de las células microalgales dentro de una fase acuosa mediante la acción de un agente inmovilizante, con el fin de imposibilitar la presencia de las células microalgales manera independiente (De-Bashan y Bashan, 2010).

Existen numerosas técnicas que permiten el confinamiento de las células mediante la unión de las microalgas a un material que ejerce de matriz de unión o soporte. Estas técnicas de inmovilización pueden dividirse en dos grupos, en función de su naturaleza: las técnicas pasivas y técnicas activas.

- Las técnicas pasivas se basan en la tendencia natural que presentan numerosos microorganismos a unirse a superficies y crecer en ellas como biopelículas (Fig. 8, Parte A). Presentan la característica de que son fácilmente reversibles. Dentro de estas técnicas se encuentran: La atracción por afinidad, la adsorción, el confinamiento por emulsión en mezclas líq-líq, la captura tras membranas semipermeables y el entrapamiento por polímeros (Zeng et al., 2015).
- Las técnicas activas se caracterizan por el uso de agentes externos para producir la captura de la biomasa de manera artificial y suelen ser más agresivas en cuanto al daño celular que producen a la superficie celular de las microalgas (Fig. 8, Parte B). Entre las técnicas activas que han presentado mayor éxito en el proceso de remoción de metales se encuentra el uso de agentes floculantes, la unión a la matriz biosorbente por el uso de reactivos químicos y el entrapamiento celular por gelificación (Moreno-Garrido, 2008).

La mayoría de las técnicas de inmovilización de microorganismos pueden ser fácilmente modificadas para su aplicación a las microalgas. La elección de la matriz de unión es relevante ya que ésta determina la fuerza mecánica y la resistencia química de las partículas que actuarán como biosorbente (Suresh Kumar et al., 2015b). Dicha matriz puede ser de origen natural, como por ejemplo las basadas el agar y diversos tipos de alginato y carragenano, o de origen sintético, como la sílica gel, la poliacrilamida y el poliuretano (Brinza et al., 2007; Rangsayatorn et al., 2004). A pesar de conocer la efectividad de ambos tipos de biosorbentes, debido a la toxicidad que presentan los componentes sintéticos a la biomasa, se aconseja en líneas generales, el uso de polímeros naturales sobre los sintéticos (De-Bashan y Bashan, 2010).

El método más comúnmente utilizado es la inmovilización en polímeros. En los sistemas de inmovilización en polímeros, los cuales son similares a otros sistemas de biofiltración, existe una separación física entre los microorganismos y el agua que se desea tratar. Las microalgas se inmovilizan al ser mezcladas con la matriz previa a la conformación del polímero, quedando encapsuladas en la estructura tridimensional del polímero y permaneciendo en el interior debido a que los poros del polímero presentan un tamaño menor al de las células de las microalgas, por lo que el fluido fluye a través de este. Las matrices que más se han utilizado para el desarrollo de la inmovilización de la biomasa de microalgas son: Alginato de sodio (Konig-Péter et al., 2014; Silva et al., 2012), polisulfona, poliacrilamida y poliuretano (Stoytcheva et al., 2018).

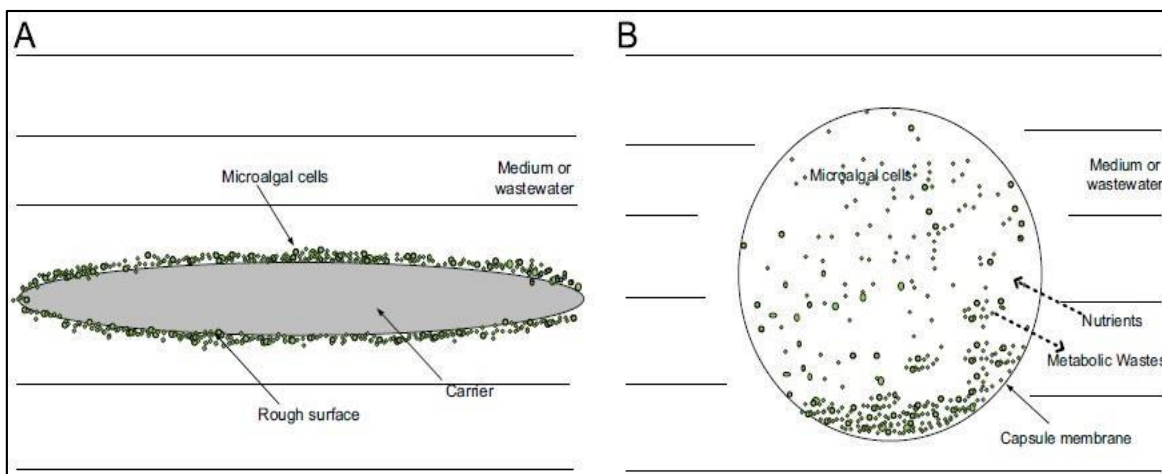


Figura 8. Diagrama esquemático del proceso de inmovilización de microalgas, en donde A, representa un proceso pasivo (adsorción) y B representa un proceso activo (encapsulación de células microalgales). (Zeng et al., 2015).

Se han reportado estudios del uso de diversas especies de microalgas inmovilizadas para el tratamiento de remoción de MP (Ahmad et al., 2018; Alvarenga et al., 2018; Cameron et al., 2018). En la Tabla 12 se presenta un resumen de los estudios más relevantes, incluyendo, además, información del tipo de material utilizado como matriz de unión para la biomasa.

La eficiencia de la inmovilización se evidencia en el aumento de la capacidad de biosorción que posee la microalga al estar inmovilizada, en comparación con el uso de biomasa libre (Vasilieva et al., 2018). Este tipo de estudio comparativo se ha reportado con *Chlorella sorokiniana* inmovilizada mediante adsorción natural a un material formado por esponja vegetal de luffa (*Luffa cylindrical*), en el cual se aprecia que la recuperación de Ni a partir de efluentes ligados a la industria galvánica aumenta en un 25,6% en comparación con el uso de la misma especie sin proceso de inmovilización (Akhtar et al., 2004). En otro estudio, la inmovilización de *Spirulina platensis* logró aumentar la capacidad de adsorción de iones de Cd en solución desde un 44,56 mg/g a un 47,89 mg/g (Murugesan et al., 2008). También se reportó que *Chlorella vulgaris* inmovilizada en perlas de alginato fue más eficiente en la remoción de MP que un cultivo de la misma especie con células libres, la capacidad de remoción de Fe, Ni y Zn aumentó en un 27%, 23% y 25% para cada metal, respectivamente (El-Sheekh et al., 2016). Estos resultados se pueden explicar debido a que el entrapamiento celular protege a la célula frente a las agresiones mecánicas y le confiere resistencia química y biológica (Wang y Chen, 2009), y además al hecho de que, al estar sujetas a una superficie estable tienden a formar colonias, maximizando el número de células y por lo tanto su densidad en el medio (Moreno-Garrido, 2008).

En otro estudio de inmovilización de la especie *Scenedesmus quadricauda* en perlas de alginato unidas a calcio, se comprobó su capacidad de remoción frente iones metálicos en un sistema multimetálico de Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Se determinó que la capacidad de adsorción para cada metal fue de 75,6; 55,2 y 30,4 mg/g respectivamente. Al estudiar las interacciones producidas entre ellos,

se determinó que el proceso de inmovilización favorece significativamente la adsorción de Cu (II), presentando una cinética de adsorción más rápida en comparación a los otros iones presentes en la solución (Bayramoglu et al., 2009).

Para que un sistema de inmovilización de microalgas sea efectivo, este debe ser estable y no debe perjudicar en ningún modo la estabilidad estructural, fisiológica ni metabólica de las células. Cambios en la estructura de la pared celular pueden disminuir la capacidad de sorción de la biomasa inmovilizada (Stoytcheva et al., 2018). En cuanto a su cinética de crecimiento, se ha demostrado que las células que forman parte de un proceso de inmovilización presentan un periodo de latencia mayor en comparación con las células libres, con una diferencia de hasta dos días en el periodo de crecimiento exponencial, diferencia que se mantiene hasta una vez que se alcanza la fase estacionaria de crecimiento en el cultivo de las microalgas (Moreno-Garrido, 2008).

Un factor importante que no debe ser despreciado es el tamaño que presenten las partículas biosorbentes. Si se desarrolla la inmovilización en formato de perlas, se considera que el rango de tamaño de la matriz adecuado para el proceso de remoción de metales en soluciones acuosas va de los 0,7 a 1,5 mm, rango que puede ser equiparable con el de las resinas de intercambio iónico. Un tamaño menor de las perlas podría generar problemas de obstrucción dentro de la columna y un tamaño superior a lo necesario generaría una baja transferencia de masa y de superficie (Zeng et al., 2015).

A pesar de existir información que respalda el aumento de la capacidad de biosorción para las microalgas inmovilizadas, es necesario considerar que el proceso de inmovilización implica un estrés celular significativo en los microorganismos, producto de las fuerzas químicas y las interacciones entre la matriz de soporte y la pared celular (de-Bashan y Bashan, 2010). El confinamiento en un espacio reducido también puede afectar el metabolismo de los organismos. (Rangsayatorn et al., 2004), reportó que en el caso de *Spirulina platensis* la inmovilización con alginato disminuyó la capacidad natural de biosorción de la microalga de un valor de 98 mg/g a un 71 mg/g, en remoción de Cd presente en solución. A pesar de lo anterior, la inmovilización se sigue considerando como una herramienta favorable para el uso en aplicaciones ambientales, en la remoción de contaminantes presentes en soluciones acuosas y/o residuos industriales, ya que, en comparación al uso de la biomasa libre, se mejoran las condiciones hidrodinámicas de los lechos (Wang y Chen, 2009).

Tabla 12. Recuento de estudios de remoción de MP y otros contaminantes mediante el uso de microalgas inmovilizadas

Pollutant	Immobilizing material	Microalgae species	Reference
Cadmium	Alginate	<i>Chlorella homosphaera</i> ; <i>C. vulgaris</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> ; <i>Oscillatoria</i> sp.; <i>Tetraselmis chuii</i>	Bayramoğlu et al. (2006), Cañizares-Villanueva et al. (2000), da Costa and Leite (1991), Katircioğlu et al. (2008) and Moreno-Garrido et al. (2005)
	κ-Carrageenan	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	Polyurethane foam	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	Surface of <i>Sargassum</i> sp.	<i>Spirulina maxima</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	da Costa and de França (1996)
	Surface of <i>Ulva</i> sp.	<i>Spirulina maxima</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	da Costa and de França (1996)
	Silica gel	<i>Spirulina platensis</i>	Rangsayatorn et al. (2004)
Cadmium and lead	Loofa cylindrical sponge	<i>Chlorella sorokiniana</i> ; <i>Synechococcus</i> sp.	Akhtar et al. (2003) and Saeed and Iqbal (2006)
	Milk casein + glutaraldehyde	<i>Heterosigma akashiwo</i>	Seki and Suzuki (2002)
Caesium	Alginate	<i>Chlorella salina</i>	Avery et al. (1993)
Chromium	Alginate; κ-carrageenan	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i> ; <i>S. obliquus</i> ; <i>Spirulina platensis</i>	Gokhale et al. (in press), Mallick and Rai (1993), Pellon et al. (2003), Tam et al. (2009) and Travieso et al. (1999)
	Agar	<i>Anacytis nidulans</i>	Khattar et al. (1999)
	Polyurethane foam	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	Loofa cylindrical sponge	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Akhtar et al. (2008)
Cobalt	Alginate	<i>Chlorella salina</i>	Granham et al. (1992)
	Polyurethane	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Travieso et al. (2002)
Copper	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Nannochloropsis gaditana</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i> ; <i>Tetraselmis chuii</i>	Bayramoğlu and Arica (2009), Lau et al. (1998c), Mehta and Gaur (2001), Moreno-Garrido et al. (2002, 2005), Rai and Mallick (1992) and Tam et al. (2009)
	Polyvinyl alcohol	<i>Sargassum baccularia</i>	Chu and Hashim (2001)
	Alginate	<i>Chlorella homosphaera</i>	da Costa and Leite (1991)
Gold	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i>	Rai and Mallick (1992)
Merous	Alginate	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Abdel Hameed (2006) and Bayramoğlu et al. (2006)
Lead	Loofa cylindrical sponge	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Akhtar et al. (2004a,b)
Manganese	Alginate	<i>Chlorella salina</i>	Granham et al. (1992)
Mercury	Silica gel	<i>Chlorella vulgaris</i>	Tajes-Martínez et al. (2006)
	Alginate	<i>Chlorella emersonii</i> ; <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Bayramoğlu et al. (2006) and Wilkinson et al. (1990)
	Agarose	<i>Chlorella emersonii</i>	Wilkinson et al. (1990)
Nickel	Alginate	<i>Anabaena doliolum</i> ; <i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Bayramoğlu and Arica (2009), Al-Rub et al. (2004), Lau et al. (1998c), Mallick and Rai (1993, 1994), Mehta and Gaur (2001) and Tam et al. (2009)
	Loofa sponges	<i>Chlorella sorokiniana</i>	Akhtar et al. (2004a,b)
Zinc	Alginate	<i>Chlorella homosphaera</i> ; <i>C. miniata</i> ; <i>C. salina</i> ; <i>Nannochloropsis gaditana</i> ; <i>Scenedesmus quadricauda</i>	Bayramoğlu and Arica (2009), da Costa and Leite (1991), Granham et al. (1992), Moreno-Garrido et al. (2002) and Tam et al. (2009)
	κ-Carrageenan	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
	Polyurethane foam	<i>Chlorella vulgaris</i> ; <i>Scenedesmus acutus</i>	Travieso et al. (1999)
Uranium	Polyacrylamide	<i>Chlorella regularis</i>	Nakajima et al. (1982)
Mixture of Cu, Fe, Ni, Zn	Polysulphone and epoxy resin	<i>Phormidium laminosum</i>	Blanco et al. (1999)
Other pollutants			
Hydrocarbons	Polyurethane foam	<i>Prototheca zopfii</i>	Ueno et al. (2006, 2008) and Yamaguchi et al. (1999)
	Alginate	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Tam et al. (2009)
Organotin compounds (biocides)	Alginate	<i>Chlorella emersonii</i> ; <i>C. vulgaris</i>	Luan et al. (2006), Tam et al. (2009) and Zhang et al. (1998)
LAS (surfactant)	Alginate	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Moreno-Garrido et al. (2007)
Mix of phenols, oil spill and heavy metals	Capron fibers (synthetic)	<i>Chlorella</i> sp.; <i>Phormidium</i> sp.; <i>Scenedesmus obliquus</i> ; <i>Stichococcus</i> sp.	Safonova et al. (2004)

(de-Bashan y Bashan, 2010)

1.12. APLICACIONES INDUSTRIALES DE LAS MICROALGAS

La efectividad del uso de microalgas para la remoción de MP ha sido demostrada por numerosos grupos de investigación (Bulgariu y Gavrilescu, 2015; Kumar et al., 2016; Sbihi et al., 2014; Yang et al., 2015). El desafío actual para la comunidad científica es el desarrollo necesario para su aplicación a escala real. Para llevar a cabo este escalamiento, es importante conocer y comprender el comportamiento de los biosorbentes en matrices de agua reales, esquematizar los tipos de tratamiento y considerar los costos involucrados en el proceso (Fomina y Gadd, 2014; Suresh Kumar et al., 2015a; Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b).

Para la aplicación industrial de la biosorción, parece ser indispensable preparar biosorbentes que mantengan la habilidad que posee la biomasa microalgal de adsorber los iones metálicos durante un proceso de tratamiento continuo (Yin et al., 2018). La mayoría de la investigación en esta área se ha ido enfocando en el uso de biosorbentes granulados operando en columnas, de una manera parecida a las resinas de intercambio iónico, aplicando técnicas de inmovilización y configuraciones de reactores en columnas de relleno, tradicionales en la ingeniería química (Stoytcheva et al., 2018).

Según lo indicado por (Wang y Chen, 2009), para el desarrollo del futuro de la biosorción en la remoción de MP, se presentan dos líneas de trabajo. Una tendencia es el uso de una tecnología híbrida que comprende varios procesos para tratar efluentes reales, como la bio-reducción y la bioprecipitación, usando especialmente células vivas (Quester et al., 2013). Otra es el desarrollo de biosorbentes comerciales, semejantes a las actuales resinas comerciales, con el fin de competir con los sistemas convencionales e ingresar al mercado en esta área (Li y Tao, 2015). La rentabilidad del proceso se ve influenciada principalmente por los costos implicados en obtención de la biomasa y el costo de la inmovilización. Para que sea competitiva la producción de biosorbentes usando microalgas, su producción debe ser considerablemente menos costosa que las resinas de intercambio iónico, carbón activado y otros agentes.

Durante los últimos años se han desarrollado numerosos intentos de comercialización del proceso de biosorción (Fomina y Gadd, 2014; Kumar et al., 2016) y un número significativo de procesos han sido patentadas para la aplicación comercial (Tabla 13). Uno de los primeros intentos de comercialización fue el desarrollo de AlgaSORB™, producido por Bio-recovery Systems Inc., en Las Cruces, Nuevo México. Este biosorbente está basado en el uso de *Chlorella vulgaris* inmovilizada en un polímero de sílica gel (Barkley, 1991). Este funciona dentro de un amplio rango de concentración de metal en la solución (1 – 100 mg/L), permitiendo reducir la concentración a valores menores de 1 mg/L, aún en la presencia de iones como el Ca^{2+} y Mg^{2+} . Existen muchas variaciones de AlgaSORB disponibles, una de ellas es AlgaSORB-scy, que está diseñada con células de la cianobacteria *Scytonema*, utilizada para la remoción de As (III) (Prasad et al., 2006).

Existen, además, otro tipo de biosorbentes, pero de no origen microalgal, como AMTBIOCLAIM que se basa en el uso de biomasa bacteriana de *Bacillus subtilis* inmovilizada en polietilamina, “Bio-Fix biosorbent” manufacturada por una variedad de fuentes incluido el uso de algas inmovilizadas en perlas porosas de polipropileno. También se ha diseñado algaSORBVVR, la cual ha sido utilizada como material adsorbente para remoción de metales desde efluentes industriales (Monteiro et al., 2012). Sin embargo, estos productos no han sido comercialmente exitosos de manera sustentable (Fomina y Gadd, 2014; Vijayaraghavan y Balasubramanian, 2015b).

Según lo expuesto, se requieren mayores esfuerzos de investigación para implementar el uso de la biomasa microalgal como adsorbente en procesos de tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados. Una alta capacidad de adsorción hacia los MP no es el único factor a tener en cuenta, sino que es necesario el desarrollo de pruebas en aguas reales y modelos matemáticos que ayuden a optimizar el proceso. (Abdolali et al., 2018; Rangabhashiyam et al., 2019).

Si se analiza el costo beneficio de la técnica, el mejor uso para la biosorción puede ser en sistemas modulares para compañías pequeñas, en un tratamiento residual específico (Kumar et al., 2016). El agua tratada puede ser usada para la agricultura o irrigación urbana y su reutilización ayudaría a reducir la creciente brecha entre el suministro y la demanda de agua, permitiendo disminuir la explotación de agua a partir de fuentes naturales, especialmente en zonas áridas como en el desierto de Atacama (Miksch et al., 2015).

Tabla 13. Lista de patentes de productos asociados a la biosorción

Year	Title of the invention	Number
1973	Apparatus for the biological treatment of waste water by the biosorption process	GB1324358
1973	Sorbent and method of manufacturing same	US3725291
1977	Process of treating mycelia of fungi for retention of metals	US4021368
1978	Method of treating a biomass	US4067821
1981	Microbiological recovery of metals	US4293333
1981	Process for recovering precious metals	US4289531
1982	Separation of uranium by biosorption	US4320093
1987	Process for the separation of metals from aqueous media	US4701261
1987	Treatment of microorganisms with alkaline solution to enhance metal uptake properties	US4690894
1987	Process for the separation of metals from aqueous media	US4701261
1988	Removal of contaminants	US4732681
1988	Biosorbent for gold	US4769223
1989	A process for the removal of thorium from raffinate	GB2228612A
1990	Metal recovery	US4898827
1990	Recovery of heavy and precious metals from aqueous solutions	WO9007468
1991	Removal of metal ions with immobilized metal ion-binding microorganisms	US5055402
1992	Process and apparatus for removing heavy metals from aqueous media by means of a bioadsorber	EP0475542
1992	Processes to recover and reconcentrate gold from its ores	US5152969
1992	Bioadsorption composition and process for production thereof	US5084389
1994	Ionic binding of microbial biomass	WO9413782
1994	Polymer beads containing an immobilized extractant for sorbing metals from solution	US5279745
1995	Method for adsorbing and separating heavy metal elements by using a tannin adsorbent and method of regenerating the adsorbent	US5460791
1996	Process for the removal of species containing metallic ions from effluents	US5538645
1996	Bead for removing dissolved metal contaminants	US5578547
1997	Polyaminosaccharide phosphate biosorbent	GB2306493
1997	Method for production of adsorption material	US5648313
1998	Biosorption system	WO9826851
1998	Biosorbent for heavy metals prepared from biomass	US5789204
1998	Bacteria expressing metallothionein gene into the periplasmic space, and method of using such bacteria in environment cleanup	US5824512
1998	Biosorption agents for metal ions and method for the production thereof	WO9848933
1998	Adsorption of PCBs using biosorbents	US5750065
1999	Hydrophilic urethane binder immobilizing organisms having active sites for binding noxious materials	US5976847
2000	Precipitating metals or degrading xenobiotic organic compounds with membrane immobilized microorganisms	US6013511
2000	Method for removing a heavy metal from sludge	US6027543
2001	Process for producing chitosan-glucan complexes, compounds producible therefrom and their use	US6333399
2002	Bioadsorption process for the removal of colour from textile effluent	WO0242228
2002	Biosorption system	US6395143
2002	Adsorption means for radionuclides	US6402953
2003	Biosorbents and process for producing the same	US6579977
2003	Biocomposite (Biocer) for biosorption of heavy metals comprises an inorganic gel containing immobilized dry-stable cellular products	DE10146375 A1
2004	Composite biosorbent for treatment of waste aqueous system(s) containing heavy metals	US6786336
2004	Heavy metal adsorbent composition	WO04022728
2006	A novel process for decolorization of colored effluents	WO06059348
2006	Process and plant for the removal of metals by biosorption from mining or industrial effluents	US20060070949
2007	Biosorption agents for metal ions and method for the production thereof	CA2282432 C
2007	Petroleum biosorbent based on strains of bacteria and yeast	US20070202588
2008	Process for the removal of metals by biosorption from mining or industrial effluents	US7326344
2008	Biosorption system produced from biofilms supported in faujasite (FAU) Zeolite, process obtaining it and its usage for removal of hexavalent chromium (Cr(VI))	US20080169238
2010	Use of <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenberg) Vuillemin in methods for treating industrial wastewaters containing dyes	US7658849
2010	Use of <i>Cunninghamella elegans</i> Lendner in methods for treating industrial wastewaters containing dyes	US7790031
2011	Use of <i>Rhizomucor pusillus</i> (Lindt) Schipper in methods for treating industrial wastewaters containing dyes	US7935257
2011	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> MBR and its application in bioreduction and biosorption	US0110269169
2011	Bacterial strain for a metal biosorption process	US7951578

(Fomina y Gadd, 2014)

CAPITULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DE ESTUDIO

2.1. PRESENTACIÓN DEL PROBLEMA

La contaminación del agua es una problemática que continúa calificándose como uno de los mayores retos ambientales actuales, el cual afecta la salud de millones de personas, en diversas áreas del planeta. En muchos casos, esta contaminación es debida a la presencia de compuestos tóxicos y/o de MP, los cuales producen serios daños celulares en los organismos, poseen características recalcitrantes y tienden a bioacumularse a lo largo de la cadena alimentaria, generando un enorme daño en los ecosistemas naturales (Wu et al., 2016).

Esta tesis toma como referencia la contaminación del río Loa, en la zona del desierto de Atacama, en Chile, cuya contaminación por metales es un problema histórico y que hasta nuestros días no ha podido ser resuelto con efectividad. Con el fin de estudiar y comprender el origen de la contaminación por MP en la cuenca hidrográfica del río Loa, se realizó una recopilación de antecedentes y de estudios de su problemática durante los últimos años. Esta recopilación fue gestionada en su mayoría mediante instituciones relacionadas con las regulaciones medioambientales de la región de Antofagasta, solicitadas bajo el amparo de la ley de transparencia del estado de Chile.

2.2. ANTECEDENTES GENERALES DEL ÁREA DE ESTUDIO

La región de Antofagasta es un área geográfica ubicada en la zona norte de Chile, que se extiende entre los paralelos 20° 56' y 26° 05' de latitud Sur y meridianos 65° 00' de longitud Oeste hasta el océano Pacífico. Presenta una longitud aproximada de 500 kilómetros y abarca un área de 126.049,10 kms² (Fig. 9). Su territorio forma parte del desierto de Atacama, una importante macrorregión sudamericana cuyas principales características son: una extrema aridez, con zonas donde las precipitaciones son prácticamente nulas; una alta radiación solar, con máximos de 7 – 7,5 kWh/m² y una gran oscilación térmica, la cual se acentúa a mayor altitud. La presencia de tres cordilleras en su territorio (Costa, Domeyko y de los Andes) produce que el territorio de la región de Antofagasta sea mayormente montañoso y con importantes diferencias de altitud. La altura media de esta región alcanza los 2552 m.s.n.m., siendo su máximo punto de altitud la cúspide del volcán Lullaillaco con 6739 m.s.n.m.

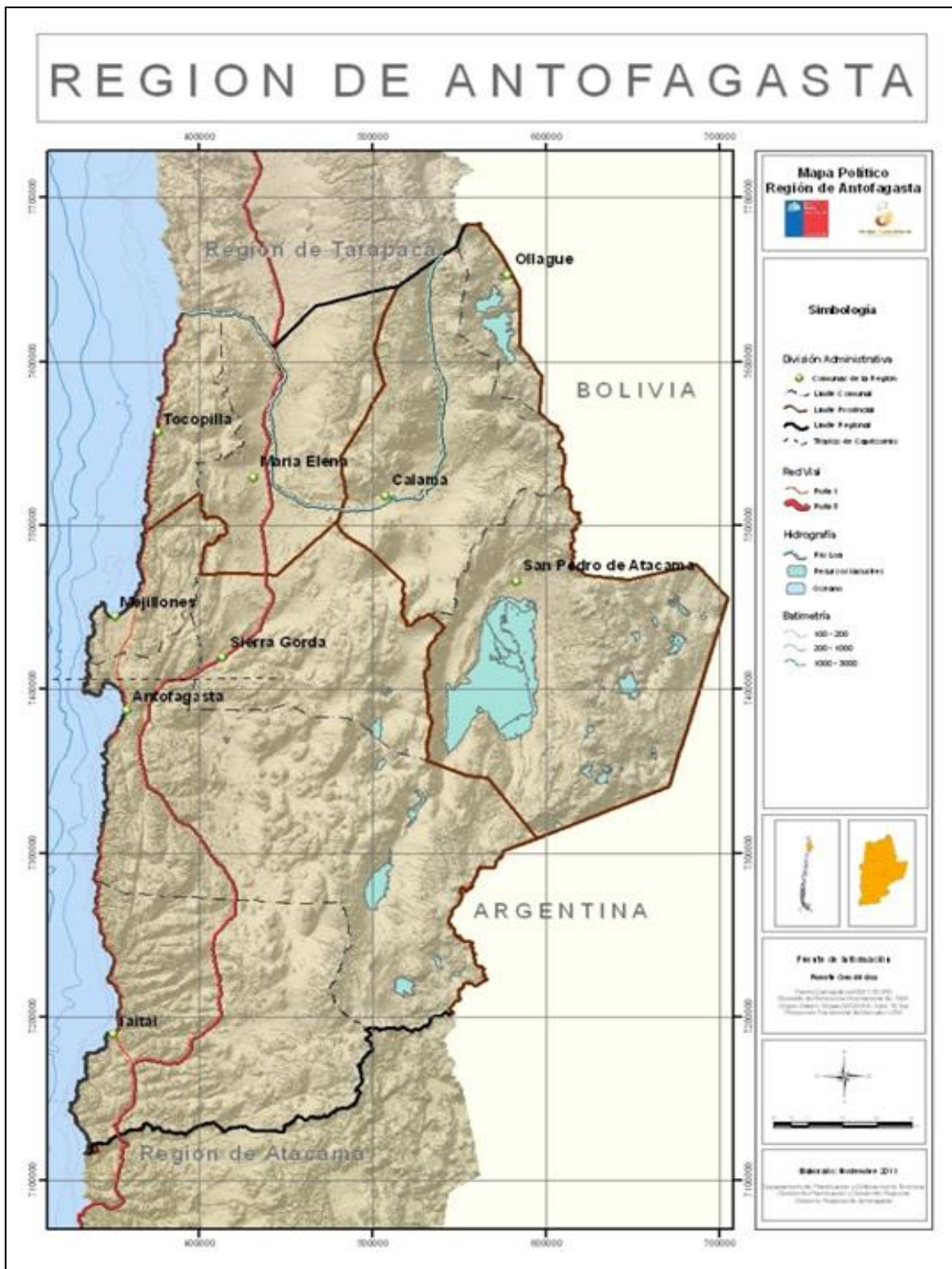


Figura 9. Mapa político de la región de Antofagasta, Chile.

Inserto en la región de Antofagasta se ubica el río Loa, el cual con sus 440 kms de longitud se erige como la única cuenca exorreica de agua dulce dentro de la región y se cataloga como el río más largo de Chile. Su cuenca se encuentra ubicada entre los paralelos 20° 51' y 22° 57' de latitud Sur y los meridianos 67° 48' y 70° 05' de longitud Oeste, presentando una extensión total de 33.570 km², siendo la mayor del país. A lo largo de su recorrido, el río Loa recibe el aporte de aguas tanto superficiales como subterráneas, siendo sus principales afluentes por orden de importancia, los ríos San Pedro, Salado y San Salvador (Fig. 10). El régimen del río Loa es pluvial y su caudal depende principalmente de un fenómeno climático denominado Invierno Altiplánico Boliviano, el cual se caracteriza por ser un corto periodo de lluvias producidas en la alta cordillera durante los meses de febrero y marzo.

La cuenca del río Loa es de vital importancia debido a que históricamente ha sido utilizada como fuente de abastecimiento para producir agua potable en las principales ciudades de la región: Antofagasta, Calama, Tocopilla, Mejillones y otras localidades aledañas. Asimismo, también existe el aprovechamiento del río Loa para actividades relacionadas con la actividad agrícola, pecuaria, industrial y minera presente en la región. La entrega de derechos de agua de la cuenca alcanza la cantidad de 1.543,6 L/s (DGA, 2014).

La actividad agrícola y pecuaria es trascendental para las comunidades indígenas, donde se desarrolla la agricultura en oasis de altura. En localidades como Chiu Chiu, Lasana, Calama y Quillagua, existen huertas dedicadas al cultivo de frutas y hortalizas, y praderas artificiales. Los poblados de Chiu Chiu y Lasana se dedican al cultivo de maíz y tubérculos, así como a la crianza de ganado bovino y camélidos domésticos. En sectores cercanos a la ciudad de Calama, principal centro urbano de la cuenca, las aguas son utilizadas para el cultivo de plantas forrajeras como la alfalfa y vegetales para consumo doméstico. En el sector de Quillagua, además de la actividad agrícola se realiza actividad forestal, con 190 Ha. de plantaciones de algarrobo, tamarugo y chañar, árboles nativos de la zona árida del norte de Chile que presentan importante interés comercial. En tanto, la actividad pecuaria en las zonas mencionadas se ve centrada en la crianza de ganado ovino, caprino, bovino y porcino.

La región de Antofagasta presenta una gran riqueza mineralógica en la composición de su corteza terrestre. Este hecho convierte a la industria minera en la principal actividad económica, abarcando el 57% de aporte económico total de la región (Cochilco, 2019). De las numerosas explotaciones minerales, la más importante es la extracción de cobre. Sólo en la región de Antofagasta, al año 2017 se exportó la suma de 2,88 millones toneladas de cobre fino, cifra que representa el 52% del total de cobre exportado a nivel nacional y las proyecciones de la actividad minera nacional esperan que la producción regional alcance los 3,7 millones de toneladas hacia el año 2029, corroborando el liderazgo nacional de la región en esta área (Cochilco, 2019). Además del cobre, la región de Antofagasta es líder en la producción de molibdeno, apatita, carbonato y cloruro de litio, nitratos, sulfato de sodio anhídrido y yodo, y posee importantes yacimientos de oro, plata, hierro, manganeso, plomo y zinc. El inicio de la actividad industrial en la zona se remonta al año 1915, fecha en que se produce la apertura del primer yacimiento de producción de cobre en la región. Luego de este hito, se han ido desarrollando numerosas explotaciones cupríferas asociadas a la

cuenca del río Loa, confiriéndole un carácter eminentemente minero. Las principales actividades mineras en esta área se asocian a la producción de las minas de El Abra, Radomiro Tomic y Chuquicamata (Fig. 10).

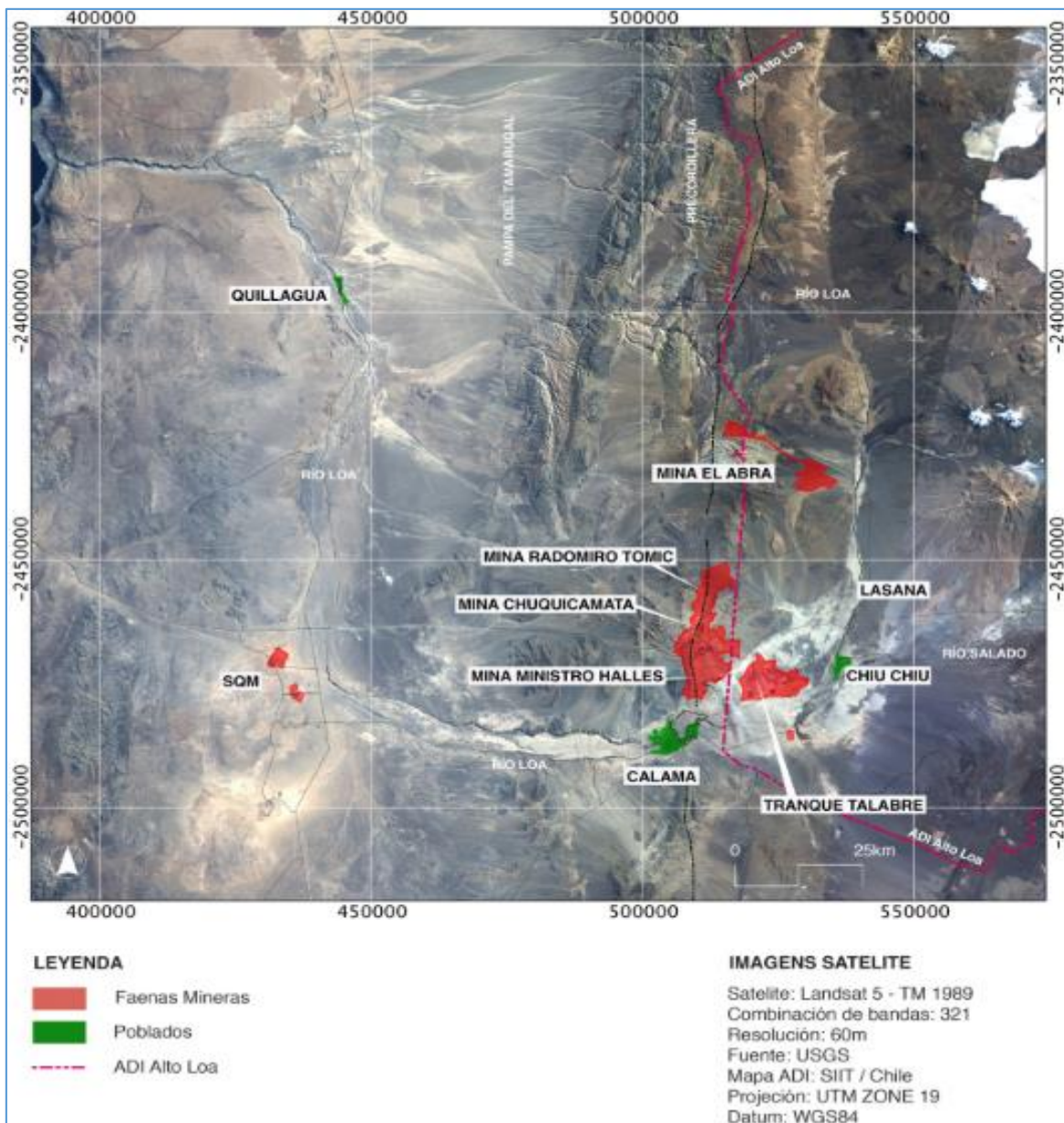


Figura 10. Cuenca del río Loa y sus principales afluentes, poblados y faenas mineras aledañas. Región de Antofagasta, Chile.

Para la obtención de esta enorme producción mineral, se deben realizar procesos industriales asociados a la exploración de estos recursos, así como también de los procesos de transformación pirometalúrgicos, hidrometalúrgicos y de refinación de las sustancias minerales. La obtención de mineral bruto produce una gran cantidad de relaves, los cuales son acumulados y pasan a formar parte de distintos tipos de depósitos. A pesar de que la forma y la técnica de construcción de los

Según el informe presentado por (Monardes, 2007); el 81% de las estaciones de muestreo no cumplen con el DS.90, que corresponde al límite máximo permitido de descarga de residuos líquidos a cuerpos de agua fluviales. Las estaciones de muestreo más afectadas por la contaminación corresponden al sector Tranque Sloman (E-18), Coya Sur (E-19) y Quillagua (E-20), ubicadas geográficamente en inicio del sector de Loa Bajo (Fig. 11).

Tabla 14. Selección y rango de concentración de los parámetros de estudio en sus valores mínimos y máximos alcanzados en los análisis de calidad del agua de la cuenca del río Loa.

Parámetros	Unidad	Fuente	Mínimo	Máximo	Valor permitido
I. Físicoquímicos					
Conductividad Eléctrica	μS/cm	DGA	645	21650	< 600
DBO ₅	mg/L	SAG	2	21	< 35
Oxígeno disuelto	mg/L	DGA	2,6	16,1	> 7,5
pH		DGA	6,3	8,9	6,5-8,5
RAS		DGA	2	30,4	< 2,4
Sólidos disueltos	mg/L	SAG	1200	6310	< 400
Sólidos suspendidos	mg/L	SAG	9,4	108	< 80
II. Inorgánicos					
Cloruro	mg/L	DGA	86,6	6381	< 400
Fluoruro	mg/L	SCM EL ABRA	0,33	0,78	< 1,5
Nitrito	mg/L	SAG	0,005	22,5	< 0,05
Sulfato	mg/L	DGA	20	2293,4	< 300
Sulfuro	mg/L	SAG	0,004	5	< 3
III. Metales					
Aluminio	mg/L	DGA	<0,01	9	< 5
Arsénico	mg/L	DGA	<0,04	14,5	< 0,5
Boro	mg/L	DGA	<1	103,1	< 0,75
Cadmio	μg/L	DGA	<10	<10	14
Cobre	mg/L	DGA	<10	1,5	< 1
Cromo total	mg/L	DGA	<10	140	< 100
Hierro	mg/L	DGA	<0,01	11,3	< 5
Manganeso	mg/L	DGA	<0,01	9,5	< 0,3
Mercurio	μg/L	DGA	<1	9	< 1
Molibdeno	mg/L	DGA	<0,01	0,14	< 1
Níquel	μg/L	DGA	<10	130	< 200
Plomo	mg/L	DGA	<0,01	0,07	< 0,05
Selenio	μg/L	DGA	0,04	85	< 100
Zinc	mg/L	DGA	<0,01	7,86	< 3

(Monardes, 2007)

Los resultados de este estudio fueron comparados con un análisis de aguas desarrollado por la Dirección General de Aguas (DGA), organismo institucional perteneciente al Ministerio de Obras Públicas (MOP) del gobierno de Chile, en donde se realizó un muestreo de 14 puntos de referencia, abarcando desde el nacimiento de río Loa en la zona del Loa Alto, hasta llegar a la desembocadura en el océano Pacífico. En este estudio, se consideró el factor interestacional en la composición fisicoquímica de las aguas, comparando la concentración de cada parámetro en diferentes estaciones de un mismo año.

Este estudio confirma una importante variabilidad interestacional en la composición fisicoquímica del agua. En la mayoría de los parámetros estudiados, se produce un fuerte aumento en las concentraciones de MP en el periodo de verano. Por ejemplo, la variación de la concentración de B en el agua ronda desde los 33,7 mg/L en la estación de otoño a los 90 mg/L en la estación de verano. Del mismo modo, la variación de Zn va de los 0,03 mg/L en la estación de invierno a los 7,85 mg/L en la estación primaveral. Esto puede asociarse al periodo de lluvias altiplánicas, las cuales favorecen la solubilización de estos elementos presentes en los suelos de la región. A partir de los datos obtenidos de los estudios anteriormente presentados, se puede concluir lo siguiente:

- Según las normas nacionales, las aguas del río Loa presentan una clasificación de regular a mala calidad. En su composición, se excede de manera relevante la concentración de metales como el As, B, Fe, Mn y Zn; además de factores como sólidos disueltos y conductividad eléctrica.
- En función de la calidad de las aguas, el segmento que presenta la peor clasificación abarca la zona desde el centro de la cuenca hacia la desembocadura del río, principalmente denominado sector Loa bajo.
- La parte media de la cuenca posee una importante actividad minera, que sumadas a las lixiviaciones naturales de las franjas metalogénicas presentes en la subcorteza terrestre han ocasionado presencia de metales como el Cu, Mn y Zn, cambiando la calidad natural del agua.
- Los factores incidentes en la calidad del agua de la cuenca se pueden dividir en tres zonas geomorfológicas: Altiplano, zona media y desierto. En el Altiplano la alta presencia de metales se asocia a factores climáticos y litológicos, en la zona media la asociación se produce por efectos de la franja metalogénica de la corteza terrestre, y en la zona de desierto por el efecto del suelo rico en componentes inorgánicos.
- Los afluentes tributarios de la parte media y alta de la cuenca presentan una gran cantidad de metales y los iones en solución. Estos son de origen natural y su origen está influenciado especialmente por la franja metalogénica presente en su subsuelo.
- El río Salado provoca una alteración importante en la calidad natural del río Loa debido a la existencia de suelos salinos y la surgencia de aguas geotermales.

2.4. SELECCIÓN DE ZONA DE ESTUDIO

La selección de un área particular de la cuenca hidrográfica del Loa tiene como objetivo designar una zona de estudio para obtener información con relación a la calidad del agua y la determinación de la concentración metales que serán estudiados a lo largo de la investigación de esta tesis doctoral. Por la información previamente planteada, se escogió la estación de Muestreo de Quillagua (Fig. 12). Este sector está ubicado a 280 kilómetros al norte de la ciudad de Antofagasta, en la región homónima ubicada en el norte de Chile. La justificación del área fue basa en los siguientes puntos:

1. **Alteración de su calidad de agua.** Según los informes previamente planteados, la estación de muestreo Quillagua presenta importantes alteraciones de la calidad del agua, en las cuales en al menos 7 de los estudios realizados, presenta concentraciones superiores a las establecidas por la norma chilena DS.90.
2. **Ubicación geográfica.** Quillagua está presente de una zona ubicada en la región del Bajo Loa. Los asentamientos ligados a actividad industrial se encuentran aguas arriba de este punto, parte media de la cuenca, por lo que cualquier efecto relacionado a la actividad industrial relacionado con la contaminación se podría detectar en esta área.
3. **Importancia económica y social.** Es una zona que presenta una importancia social y económica relevante, al presentar un asentamiento humano en el lugar desde hace siglos y cuya economía del lugar depende directamente de las aguas del río Loa. Toda la actividad ligada a la agricultura, agropecuaria y forestal se ve afectada por la contaminación de las aguas del río, ya que en esta zona no poseen ninguna otra fuente natural de agua.



Figura 12. Oasis de Quillagua, Zona Río Loa Bajo, Región de Antofagasta, Chile. (Original)

Con el fin de confirmar la presencia de contaminación por MP en la zona de estudio, se obtuvieron muestras de agua en el área seleccionada y se compararon con los resultados de análisis previos realizados en la zona. La toma del muestreo fue realizada en el punto que presenta las coordenadas geográficas de latitud $21^{\circ} 38' 0.07''$ S y longitud $69^{\circ} 33' 1.74''$ O. El volumen de muestra de agua superficial del Río Loa fue 5 L, siendo transportado en un recipiente sellado a T° ambiente. Posteriormente, la muestra fue filtrada (papel Whatman®, diámetro de poro 0,45 mm) y almacenada en oscuridad a 4°C hasta su determinación final. Los resultados confirman que los

elementos que más afectan la calidad de las aguas en esta zona son el B y el As con 64 mg B/L y 7,27 mg As/L. Resultados previos de calidad del agua, entregados por la DGA demuestran que en el 100% de las mediciones efectuadas entre 2006 y 2015 para ambos elementos presentan concentraciones sobre la norma, aunque estos valores varían sustancialmente entre cada muestreo. Si bien en la toma de muestra analizada no se apreció la presencia de otros elementos sobre la norma, a nivel histórico se habían hallado importantes picos de concentración de Cu, Mn y Zn. Por esta razón, se consideró la inclusión de estos tres MP para la elaboración de las actividades experimentales presentes en los capítulos 4, 5 y 6. No se hallaron concentraciones detectables de Al en la muestra analizada, ni se habían encontrado previamente valores elevados de este metal. En cuanto al Fe, este elemento fue descartado producto de su baja presencia en la zona de estudio y la menor toxicidad asociada a este metal.

2.5. OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

“Estudiar y optimizar el potencial de biorremediación de la biomasa microalgal con el fin de hacer frente a la contaminación asociada a la presencia de MP en cuerpos de agua”.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

Para conseguir el desarrollo del objetivo principal, el trabajo de investigación se enmarcó bajo los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de los principales factores de operación que afectan el proceso de biorremediación microalgal frente a la presencia de MP, empleando biomasa viva e inactiva.
2. Comparar el proceso de biosorción de MP con biomasa microalgal, trabajando con disoluciones monometálicas y multimetálicas.
3. Evaluar la posible integración del proceso de biorremediación microalgal con procesos de depuración de aguas, con el fin de conseguir tratar simultáneamente el contenido de MO y los MP presentes en las aguas.
4. Optimizar el proceso de biosorción/recuperación de los MP previamente adsorbidos por la biomasa microalgal.
5. Estudiar el proceso de biorremediación operando con biomasa muerta en sistemas de lecho fijo, analizando el efecto de las principales variables de operación sobre el equilibrio y la cinética de adsorción de MP.

El objetivo específico 1 se llevó a cabo dentro de los estudios experimentales desarrollados en el capítulo 4. Específicamente, se evaluaron factores como pH (Capítulo 4), tiempo de contacto (Capítulo 4, y 6), influencia del metabolismo microalgal (Capítulos 4 y 6), cinética e isotermas de equilibrio (Capítulo 6). Estos estudios también fueron complementados con estudios de

caracterización (Capítulo 4). De la misma manera, el objetivo específico 2 se llevó a cabo mediante la comparación de las capacidades de biosorción (Capítulo 4) y concentración de la solución multimetálica (Capítulo 6). Todos estos estudios permitieron profundizar los aspectos fundamentales del proceso de biosorción con el fin de entregar un soporte teórico para la validación de este proceso.

Los objetivos específicos 3 y 4 se desarrollaron en su totalidad en el Capítulo 5. Se estudió el proceso de biosorción multimetálico empleando variables típicas de los fotobiorreactores de tratamiento de aguas, como la concentración de la materia orgánica (MO) y el suministro de CO₂. En el objetivo 4, se consideraron como factores el uso de distintos tipos de eluyentes, las concentraciones de estos, el tiempo de contacto y la presencia de MO en el proceso.

Finalmente, el objetivo específico 5 se desarrolló en el capítulo 6, realizando un análisis preliminar de la biosorción de MP empleando sistemas de columnas trabajando en lecho fijo con biomasa inactiva. Este análisis se realizó mediante la evaluación de factores como la tasa de flujo y la concentración del afluente, y el análisis de curvas de ruptura del proceso. Así, los resultados experimentales y su análisis y discusión se recogen en los capítulos 4, 5 y 6 de esta tesis:

En el **Capítulo 4**, se dedica a estudiar la viabilidad del uso de la biomasa microalgal viva como agente biosorbente para la eliminación de MP del agua. Para ello, se comparó el proceso de biosorción de cuatro especies de microalgas verdes frente a soluciones de los cinco elementos tóxicos hallados en la zona seleccionada del río Loa. Se evaluó la influencia de factores operacionales, tales como el pH y el tiempo de contacto en los procesos de viabilidad celular, capacidad de crecimiento y capacidad de biosorción y se comparó la capacidad de biosorción de las diferentes especies de microalgas tanto en soluciones monometálicas como multimetálicas. Se analizaron, además, las posibles interacciones entre grupos funcionales de las microalgas y los iones metálicos que dan lugar a los procesos de biosorción.

En el **Capítulo 5**, se presenta un segundo estudio que investiga el efecto de la materia orgánica (MO) y el suministro de CO₂ en el proceso de biorremediación de dos especies de microalgas verdes, usadas comúnmente en los procesos de tratamiento de aguas residuales. Se trabaja con un agua residual sintética cuya composición presenta contaminación multimetálica del orden de la observada en la zona seleccionada del río Loa, en condiciones de operación similares a las empleadas en fotobiorreactores de tratamiento. El objetivo de este estudio es determinar la factibilidad de asociar el proceso de biorremediación de MP al proceso de tratamiento de aguas residuales. Se pretende estudiar las eliminaciones simultáneas de MO, nutrientes y MP de las aguas. Los nutrientes del agua residual constituyen el medio de crecimiento de las microalgas, optimizando el tratamiento y los costos de operación de ambos procesos. Se evaluó la capacidad de biosorción de cada especie frente a la solución multimetálica a distintas concentraciones de MO, monitoreando variables como el pH, el crecimiento celular y la concentración de TOC (Carbono Orgánico Total, por sus siglas en inglés) en cada sistema. Se estudió, además, el efecto del suministro de CO₂ habitualmente añadido en fotobiorreactores de los sistemas de tratamiento de aguas residuales.

Finalmente, se analizó la capacidad de recuperación de los metales biosorbidos por la biomasa, comparando la eficiencia de distintos tipos de eluyentes y concentraciones y se evaluó el efecto de la presencia de MO en el proceso de recuperación.

En el **Capítulo 6**, se presenta un tercer estudio que analiza el potencial de biorremediación de la biomasa microalgal de dos especies inactivadas mediante liofilización, evaluando su capacidad de biosorber una solución multimetálica asociada a la contaminación de la zona seleccionada del río Loa. Se realizan estudios tanto en modo batch como en columnas de lecho fijo. La finalidad de este estudio es comparar la capacidad de biosorción de ambas especies sin el efecto metabólico de la biomasa e iniciar el primer escalamiento para el sistema de tratamiento de MP en aguas contaminadas. En los estudios en modo batch, se evaluó en primera instancia el efecto de la presencia de los elementos constituyentes de la solución multimetálica en los procesos individuales de biosorción, comparándolas con la capacidad de biosorción multimetálica obtenida a diferentes tiempos de estudio. Posteriormente, se evaluó sobre la solución multimetálica el efecto de la concentración inicial, las isotermas de adsorción en el equilibrio y la cinética del proceso de biosorción. En los estudios en columna de lecho fijo se evaluó la capacidad de biosorción de la biomasa frente a la solución multimetálica mediante el análisis de curvas de ruptura, usando como variables la concentración del afluente y la tasa de flujo.

Esta tesis cuenta con el aporte de 2 artículos publicados en revistas Q1, indexados en JCR:

1. Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M. E., Vega, M., & Bolado, S. (2018). Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource technology*, 263, 49-57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
2. Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M. E., & Bolado, S. (2019). Influence of organic matter and CO₂ supply on bioremediation of heavy metals by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus almeriensis* in a multimetallic matrix. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109393>

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CULTIVO MICROALGAL Y REACTIVOS EMPLEADOS

Las especies de microalgas seleccionadas para esta investigación fueron: (CR) - *Chlamydomonas reinhardtii* 11-32b (Colección SAG, Alemania), (CV) - *Chlorella vulgaris* (Universidad de Antofagasta, Chile), (SA) - *Scenedesmus almeriensis* (Universidad de Almería, España) y (CS) - *Chlorophyceae* sp., aislada de la zona de estudio en el río Loa. La selección de las especies se basó debido al fuerte potencial de biorremediación encontrado por estas especies en investigaciones previas (sección 1.7). Mientras estas cuatro especies fueron estudiadas en la actividad experimental en el Capítulo 4, los Capítulos 5 y 6 se centraron en el uso de las especies CV y SA, que habían proporcionado los mejores resultados de adsorción y se utilizan habitualmente para el tratamiento de aguas residuales. El aislamiento y purificación de la especie CS se llevó a cabo mediante el proceso de dilución en serie y placas. El medio de cultivo utilizado fue medio Bristol (UTEX S.A) enriquecido con una solución de metales traza, obtenida a partir del medio F/2 de Guillard (UTEX). El pH del medio presentó un valor de $6,5 \pm 0,1$.

Para todos los estudios de los Capítulos 4 y 5 se realizaron cultivos microalgales de 1L para cada especie de estudio en botellas herméticas de 2,1L durante un período de 7 días, en condiciones axénicas. Las botellas fueron suministradas con un flujo constante de CO₂ (concentración en volumen > 99,9%, Abello Linde, España) y se mantuvieron en agitación magnética (250 rpm) a $23 \pm 2^\circ\text{C}$. El cultivo se desarrolló con iluminación LED a $1000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ usando un fotoperiodo de 12:12 h: h. Con el fin de verificar la viabilidad celular y la pureza de cada cultivo microalgal, cada cultivo fue analizado periódicamente por microscopía óptica.

Para los estudios del Capítulo 6, se utilizó biomasa liofilizada de las especies CV (AllMicroalgae®, Portugal) y SA (proporcionada por la Fundación Cajamar, Almería, España). Toda la biomasa empleada en estos experimentos fue previamente molida manualmente, tamizada a un tamaño de < 50 mm y almacenada en condiciones de oscuridad a 4°C hasta su uso.

Los elementos estudiados y los rangos de concentración seleccionados fueron determinados en función de los máximos valores de contaminación encontrada en las aguas superficiales del río Loa. A partir de una amplia recopilación de datos sobre la composición del río, se seleccionaron puntos de recolección representativos y se analizaron muestras de agua siguiendo el procedimiento analítico descrito posteriormente en la sección 3.5. Los máximos valores encontrados fueron: 64 mg B/L, 11,7 mg As/L, 1,5 mg Cu/L, 2,1 mg Mn/L y 3,4 mg Zn/L en condiciones de pH que oscilan dentro del rango de pH 6,85 y 8,49. Basado en estos datos, con el fin de armonizar los rangos de valor en el estudio de biosorción, se seleccionaron como concentraciones de estudio: 60 mg/L para B, 12 mg/L para As y 3 mg/L para Cu, Mn y Zn.

Para los estudios monometálicos se prepararon soluciones stock de cada elemento a un factor de concentración 50 (FC: 50), resultando finalmente en soluciones de As (600 mg/L), B (3000 mg/L) y Cu, Mn y Zn (150 mg/L). Cada preparación se realizó utilizando las sales Na₂HAsO₄ · 7H₂O, H₃BO₃, CuSO₄ · 5H₂O, MnCl₂ · 4H₂O y ZnCl₂ (Sigma Aldrich, Alemania) en agua ultra pura, respectivamente.

Para los experimentos multimetálicos, se preparó una única solución stock con todos los elementos estudiados: As (600 mg/L), B (3000 mg/L) y Cu, Mn y Zn (150 mg/L) en medio ácido (pH 3). Todas las soluciones stock se almacenaron en oscuridad a 4°C y fueron periódicamente analizadas para asegurar su calidad. Para el ajuste de pH, se empleó NaOH (0,1 M) y HCl (0,1 M). Todos los químicos empleados en este estudio fueron de grado analítico.

En el estudio de determinación de la influencia de la MO en los procesos de biosorción (Capítulo 5), se prepararon distintas soluciones de agua residual sintética (SSW, por sus siglas en inglés), simulando las condiciones típicas encontradas en las aguas residuales (Alcántara et al., 2015). Cada SSW presentó como composición base (por L de agua desionizada): 30 mg urea, 28 mg K₂HPO₄, 7 mg NaCl, 4 mg CaCl₂·2H₂O, y 2 mg MgSO₄·7H₂O. Como el interés del estudio fue conocer la influencia de la MO, a la solución base se le añadieron diferentes concentraciones de peptona y extracto de carne resultando cuatro tipos de SSW: C_{OM3} = con 160 mg de peptona y 110 mg de extracto de carne; C_{OM2} = con 80 mg de peptona y 55 mg de extracto de carne; C_{OM1} = 40 mg de peptona y 27,5 mg de extracto de carne y C_{OM0}, la cual no presentó ni peptona ni extracto de carne en su composición y se empleó como solución control en el estudio.

Finalmente, con el fin de eliminar interferencias por contaminación y asegurar una completa pureza de los materiales empleados, todos los recipientes de plástico y vidrio a lo largo de este estudio fueron lavados con HNO₃ (10% v/v) durante 24 h y enjuagados 3 veces con agua Milli-Q (R > 18 MΩ cm) antes de ser empleados en la experimentación. En el caso de los estudios realizados en lecho fijo (Capítulo 6), para corroborar una total limpieza del sistema de columna y evitar posibles interferencias con iones metálicos adheridos a lo largo del sistema, la columna fue previamente bombeada con un flujo ascendente de HCl 0,1 M por 20 min, seguido de un bombeo con agua Milli-Q hasta alcanzar en el efluente del sistema un valor de conductividad de < 3 μs/cm antes de cada experimento.

3.2. ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE BIOSORCIÓN DE As, B, Cu, Mn Y Zn DE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES MICROALGAS VERDES

3.2.1. ESTUDIO DE VIABILIDAD E INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO MICROALGAL

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de la concentración de cada uno de los elementos estudiados en la viabilidad y crecimiento de las cuatro microalgas de estudio con el fin de determinar cuáles son las máximas concentraciones que pueden ser utilizadas para asegurar la viabilidad de cada especie. Cada elemento fue estudiado a 3 concentraciones diferentes, alcanzando valores de As: 6, 9 y 12 mg/L; B: 60, 120 y 180 mg/L; Cu, Mn y Zn: 2, 4 y 6 mg/L, respectivamente. Los estudios fueron desarrollados en frascos de vidrio cerrados de 120 mL. En su interior, se le añadió una alícuota de cada solución stock individual a un cultivo monoalgal en fase de crecimiento exponencial (tiempo de cultivo previo: 7 días). La concentración inicial de microalgas en todos los

estudios fue de 0,025 g/L, alcanzados en una solución de 50 mL. Se realizaron pruebas de control para cada microalga, agregando agua destilada al inóculo en vez de solución monometálica. Una vez preparada la solución final, las botellas fueron cerradas y se le suministró al espacio de cabeza aéreo un 10% de CO₂.

El estudio se desarrolló durante 7 días monitoreando la densidad óptica a 540 nm (OD₅₄₀), el pH y la concentración de CO₂ en el espacio de cabeza, determinando estos parámetros a tiempo inicial y en los días 1, 4 y 7. Cada prueba se mantuvo en condiciones de fotoperiodo 12:12 h:h, a 1000 μE/m²/s, una temperatura de 23 ± 2°C y agitación magnética a 250 rpm durante todo el experimento. La inhibición del crecimiento de la biomasa de las microalgas (Gi: *Growth inhibition*, por sus siglas en inglés) se calculó comparando las densidades ópticas en términos de porcentaje, definido en la ecuación 1:

$$G_i = \left(\frac{OD_{540 \text{ control}} - OD_{540 \text{ muestra}}}{OD_{540 \text{ control}}} \right) 100 \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde OD_{540 muestra} es la densidad óptica del experimento específico analizado y OD_{540 control} la densidad óptica de la prueba de control respectiva.

3.2.2. ESTUDIOS DE BIOSORCIÓN EMPLEANDO BIOMASA VIVA

Las pruebas individuales de biosorción se realizaron con el fin de estudiar la capacidad de biosorción de las cuatro microalgas seleccionadas para cada elemento, a diferentes condiciones de pH y tiempos de contacto.

El efecto del pH en el proceso de biosorción monometálico fue estudiado mediante la comparación de la capacidad de biosorción a tres diferentes valores de pH iniciales (5,5, 7,0 y 9,5). El rango de pH se seleccionó en función del rango de viabilidad de la biomasa, debido a que condiciones de pH más extremas afectan significativamente el metabolismo de la microalga e inducen daño celular (Zeraatkar et al., 2016). La modificación del pH se realizó mediante la adición de HCl (0.1 M) o NaOH (0.1 M) según se requiera, antes de la adición del metal.

El tiempo de contacto fue estudiado en disoluciones monometálicas mediante la comparación de la capacidad de biosorción a 10 min y 180 min. Estos tiempos se seleccionaron con el fin de comparar la biosorción inicial desarrollada en la superficie de las microalgas con el proceso de biosorción en el equilibrio. Del mismo modo, el tiempo de equilibrio escogido (180 min) fue escogido en base a lo informado en investigaciones previas (Abdel-Ghani y El-Chaghaby, 2014; Bulgariu y Bulgariu, 2012).

En cada estudio monometálico, se añadió una alícuota de 1 mL de solución stock monometálica en 49 mL de cultivo microalgal, logrando una concentración inicial de 12 mg As/L, 60 mg B/L y 3 mg/L para los estudios de Cu, Mn y Zn, respectivamente. Con el fin de minimizar la influencia del metabolismo de las microalgas, las pruebas se realizaron en ausencia de iluminación y sin suministro de CO₂. Los estudios de biosorción multimetálica se llevaron a cabo a un único pH utilizando las

mismas concentraciones que en los estudios de biosorción monometálica, mediante el uso de la solución stock previamente mencionada en la sección 3.1. Con el fin de simular las condiciones existentes en los fotobiorreactores utilizados para el tratamiento de aguas residuales, el estudio se ajustó a un pH inicial de 7.0 (Posadas et al., 2015; Valdés et al., 2012) y se escogió un tiempo de incubación de 72 h por ser el tiempo de residencia hidráulico más comúnmente usado en estudios de tratamientos de aguas en fotobiorreactores (Acién et al., 2012). Para minimizar la influencia del metabolismo de las microalgas, durante las primeras 3 h las soluciones de estudio se mantuvieron sin iluminación ni suministro de CO₂. Solo a partir de este tiempo, los estudios fueron suministrados con CO₂ al interior de las botellas hasta alcanzar un 10% de concentración de CO₂ en el espacio de cabeza y se mantuvieron con iluminación LED a 1000 μE m⁻²s⁻¹, con un fotoperiodo de 12:12 h: h.

Todas las pruebas de biosorción se realizaron en sistema batch, utilizando un volumen total de 50 mL en frascos de vidrio de 120 mL operando a 23 ± 2°C y bajo agitación magnética (250 rpm). En todas las pruebas, la concentración inicial de biomasa (obtenida después de la centrifugación) fue de 1 g/L.

Una vez iniciado el experimento, se tomaron muestras de la solución mediante el uso de jeringas estériles, obteniendo 5 mL de solución a cada tiempo de contacto estudiado. Una vez obtenidas, cada muestra fue filtrada a través de filtros de membrana con diámetro de poro de 0,45 μm (Whatman), se acidificaron con 30 μl de HNO₃ (0,1 M) y se almacenaron a 4°C hasta su posterior cuantificación. Todas las muestras obtenidas en los estudios de esta investigación fueron enviadas a análisis para cuantificar la concentración de los elementos estudiados. Para ello, cada muestra fue filtrada a través de filtros de membrana con diámetro de poro de 0,45 μm (Whatman), acidificadas con 30 μl de HNO₃ (0,1 M) y almacenadas en oscuridad y a 4°C hasta su posterior cuantificación. Finalmente, se realizó la determinación de Sólidos Suspendedos Totales (SST), con el fin de cuantificar la concentración final de la biomasa microalgal.

La eliminación de los MP por la biomasa microalgal se calculó en términos de la capacidad de biosorción experimental ($q_{i,t}$) para el elemento (i) en el tiempo (t), definido en la ecuación 2:

$$q_{i,t} = \frac{V(C_{i,0} - C_{i,t})}{W} \quad \text{Ec. (2)}$$

Donde $q_{i,t}$ es la capacidad de biosorción de la biomasa frente al metal (i) al tiempo de contacto específico (t) (mg elemento tóxico/g de biomasa); $C_{i,0}$ y $C_{i,t}$ son las concentraciones iniciales y al tiempo de muestreo del MP estudiado (i), respectivamente (mg elemento tóxico/L), V es el volumen de suspensión (L) y W es el peso seco de la biomasa al final de proceso (g).

Por otro lado, la capacidad de biosorción molar total ($m_{q_{i,t}}$) de la biomasa de microalgas (mg/mmol) se obtuvo mediante la suma de las capacidades de biosorción molar individuales, calculada dividiendo el valor ($q_{i,t}$) entre la masa molecular de cada elemento, como se define en la ecuación 4:

$$mq_{i,t} = \sum \frac{q_{i,t}}{MW_i} \quad \text{Ec. (3)}$$

Donde $q_{i,t}$ es la capacidad de biosorción para el elemento (i) obtenida al tiempo (t) y MW es la masa molecular de cada elemento (i) estudiado.

Por otro lado, se evaluó la eficiencia de eliminación ($RE_{i,t}$) para cada elemento (i) al tiempo (t), expresada en porcentaje (%), definida en la ecuación 4:

$$RE_{i,t} = \left(\frac{c_{i,0} - c_{i,t}}{c_{i,0}} \right) 100 \quad \text{Ec. (4)}$$

3.2.3. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN

Los estudios de caracterización se desarrollaron con el objetivo de determinar los principales sitios de unión de los elementos estudiados en la biomasa microalgal. Con el fin de analizar las interacciones presentes entre los MP estudiados y reconocer los posibles efectos de la presencia de As y B en ellos, se realizaron estudios con soluciones individuales de Cu, Mn y Zn, soluciones multimetálicas cuaternarias [B + Cu + Mn + Zn], [As + Cu + Mn + Zn], y con todos los elementos estudiados [B + As + Cu + Mn + Zn]. Las concentraciones de cada elemento son las mismas que las presentes en el punto 3.1. Las pruebas fueron desarrolladas para la especie *C. reinhardtii* a dos tiempos de contacto: 10 min y 3h. Una vez finalizada la etapa de contacto, la biomasa fue centrifugada a 4500 rpm por 7 min, secada en una estufa a 45°C por 48 h y pulverizada para su posterior determinación por la técnica espectroscopía de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés). Del mismo modo, se desarrollaron estudios control usando biomasa sin previa adición metálica.

3.3. INFLUENCIA DE LA MO Y EL SUMINISTRO CO₂ EN LA BIORREMEDIACIÓN DE MP POR *CHLORELLA VULGARIS* Y *SCENEDESMUS ALMERIENSIS* EN UNA MATRIZ MULTIMETÁLICA

3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LA MO EN EL PROCESO DE BIOSORCIÓN MULTIMETÁLICA

Para determinar la influencia de la MO en el proceso de biosorción se realizaron experimentos en modo batch, utilizando como medio de crecimiento soluciones de SSW con distintas concentraciones de MO en su composición. Para ello, en una primera etapa se tomaron cultivos axénicos con un periodo de 7 días de incubación, de las especies *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus almeriensis*. Con el objetivo de remover el medio de cultivo para preparar la experimentación, el cultivo microalgal fue centrifugado a 4500 rpm por 7 min, lavado con agua Milli-Q por 5 min y nuevamente centrifugado a las mismas condiciones indicadas previamente. La fase acuosa fue

descartada y a la fase sólida se le determinó la concentración de la biomasa por análisis gravimétrico de los sólidos totales (TS).

Los ensayos se realizaron en un recipiente de vidrio de 500 mL. Para cada ensayo se emplearon 196 mL de cada una de las 4 soluciones SSW, previamente preparadas (sección 3.1) y 4 mL de solución multimetálica stock, para obtener 200 mL de solución con una concentración de biomasa inicial de 1 g/L y una concentración de 12 mg As/L, 60 mg B /L, y 3 mg/L de Cu, Mn y Zn. Las condiciones de operación a lo largo del estudio se mantuvieron a 25°C, 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ bajo un fotoperiodo de 12:12 h: h y agitación magnética a 250 rpm. Inicialmente, el pH de la solución fue ajustado a pH 7.0 con el objetivo de simular las condiciones presentadas en los estudios de tratamientos de aguas residuales en fotobiorreactores (Posadas et al., 2015). Se realizaron estudios control (sin biomasa) en paralelo, con el objetivo de chequear la solubilidad de la solución dentro del rango de pH alcanzado.

Una vez iniciado el experimento, se procedió a la obtención de muestras de 8 mL a los tiempos 0, 3, 24, y 72 h, determinando de inmediato el valor de pH para cada muestra. El experimento se extendió por un tiempo de 72 h debido a que representa al tiempo de residencia hidráulica mayormente usado en los estudios de tratamiento de aguas residuales en fotobiorreactores (Acién et al., 2012). Después de la determinación de pH, las muestras fueron filtradas a través de filtros de membrana de un diámetro de poro de 0.22 μm . De la muestra filtrada, 4 mL fueron acidificados con 30 μL de HNO_3 (0.1 M) y almacenado a 4°C hasta la cuantificación de los elementos, mientras que los otros 4 mL remanentes se utilizaron como muestreo para la determinación de la concentración de TOC.

Por otro lado, para determinar la influencia del suministro de CO_2 en los estudios de biosorción, se realizó una nueva serie de ensayos bajo las mismas condiciones empleadas anteriormente, pero con un constante suministro de CO_2 puro al interior de los ensayos ($v > 99.9\%$, Abello Linde, España). La medición del crecimiento celular se realizó mediante la determinación de la concentración de los sólidos suspendidos (TSS) del medio de crecimiento al tiempo 0 y 72h. La eliminación de TOC fue determinada en términos porcentuales, empleando la siguiente ecuación 5:

$$\text{TOC eliminado (\%)} = \frac{(\text{TOC}_0 - \text{TOC}_t)}{\text{TOC}_0} \times 100 \quad \text{Ec. (5)}$$

Donde TOC_0 y TOC_t son las concentraciones de TOC al tiempo inicial (0) y al tiempo de la muestra obtenida (t), respectivamente (mg/ L). Por otro lado, la eficiencia de la eliminación (%) de cada elemento (i) al tiempo t ($\text{RE}_{i,t}$) fue determinado por la ecuación 6:

$$\text{RE}_{i,t} = \frac{(C_{i,0} - C_{i,t})}{C_{i,0}} \times 100 \quad \text{Ec. (6)}$$

Donde $C_{i,0}$ y $C_{i,t}$ son las concentraciones de cada elemento estudiado (i) al tiempo inicial y al de la muestra obtenida (t), respectivamente (mg/ L). Finalmente, se determinó la capacidad de biosorción

de cada especie microalgal al final del estudio ($q_{i,72}$), este parámetro fue calculado mediante la ecuación 7:

$$q_{i,72} = \frac{v(C_{i,0} - C_{i,72})}{W_{72}} \quad \text{Ec. (7)}$$

Donde $q_{i,72}$ es la capacidad de biosorción de la biomasa a las 72h de estudio para cada elemento estudiado i : As, B, Cu, Mn y Zn (mg elemento /g de biomasa), V es el volumen del medio de crecimiento (L), $C_{i,0}$ y $C_{i,72}$ son las concentraciones iniciales y finales de cada elemento (mg/L) y W_{72} es el peso seco de la biomasa microalgal alcanzada a las 72h (g).

3.3.2. ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE METALES

Los estudios de recuperación constan de dos fases:

1. **Fase de carga:** Tiene el fin de cargar a la biomasa microalgal con los elementos de la solución multimetálica, mediante biosorción. Para ello, se prepararon ensayos de 200 mL que contenían una concentración microalgal de 1g/L y concentraciones de 12 mg As/L, 60 mg B/L, y 3 mg/L de Cu, Mn, y Zn. Estos ensayos se mantuvieron en agitación constante (250 rpm), a 25 ± 1 °C y en condiciones de oscuridad, por un periodo de 3 h. Una vez finalizado el tiempo estipulado, la solución fue centrifugada a 4500 rpm x 7 min. De la fase acuosa de la solución se recogió una muestra de 4 mL con el fin de realizar una cuantificación de todos los elementos estudiados en la fase final de la fase de carga, y la fase sólida fue recuperada en su totalidad para la siguiente fase de estudio.
2. **Fase de recuperación:** Esta fase tiene el objetivo de estudiar las tasas de recuperación de cada elemento mediante el proceso de desorción, evaluando tipos de eluyentes, concentración y tiempos de contacto. En esta etapa, la fase sólida que contiene la biomasa microalgal cargada con metales fue suspendida en 50 mL de cada uno de los eluyentes seleccionados (HCl 0.1 M y 0.2 M, NaOH 0.1 M y 0.2 M, CaCl₂ 0.1 M y 0.2 M), y se mantuvo en agitación a 250 rpm y a una temperatura de $25^\circ \text{C} \pm 0.1$, durante un tiempo de 60 min. Durante el transcurso del experimento se obtuvieron muestras de 4 mL a los tiempos 10, 20 y 60 min. Cada muestra fue debidamente preparada para la posterior cuantificación de cada componente de la solución multimetálica. Los experimentos fueron realizados en duplicado.

La eficiencia del proceso de recuperación ($Y_{R,i,t}$) de cada elemento (i) al tiempo (t) fue definida mediante la ecuación 8:

$$Y_{R,i,t} = \frac{(C_{R,i,t} \cdot V_e)}{(W_0 \cdot q_{i,3})} \times 100 \quad \text{Ec. (8)}$$

Donde $C_{R,i,t}$ (mg/L) es la concentración de cada elemento estudiado (i) en la solución al tiempo de muestreo (t), V_e es el volumen de la solución del eluyente (L), W_0 es el peso seco inicial de la biomasa

microalgal (g), y $q_{i,3}$ es la capacidad de biosorción de la biomasa microalgal obtenida al final de fase de carga (3 h) (mg/g).

Finalmente, con el fin de analizar el efecto de la presencia de MO en la fase de carga, en el proceso de global de recuperación, se repitió el experimento bajo las mismas condiciones de operación con el eluyente que presentó las mayores eficiencias de recuperación. En este caso, en la fase de carga inicial se utilizó C_{OM3} SSW en vez de agua Milli-Q como base para la solución multimetálica.

3.4. ESTUDIO DE BIOSORCIÓN DE UNA SOLUCIÓN MULTICOMPONENTE DE MPS POR BIOMASA LIOFILIZADA DE *CHLORELLA VULGARIS* Y *SCENEDESMUS ALMERIENSIS*: ESTUDIOS EN BATCH Y COLUMNAS DE LECHO FIJO

3.4.1. ESTUDIOS DE BIOSORCIÓN EMPLEANDO BIOMASA LIOFILIZADA

Se realizaron estudios de biosorción monometálicas y multimetálicas con el fin de evaluar la influencia del tiempo de contacto y la presencia de otros elementos en el proceso de biosorción sin la interferencia del metabolismo microalgal, comparando las eficiencias de eliminación alcanzadas para los componentes de la solución multimetálica (SMM) en las dos especies microalgales estudiadas (CV y SA).

En cada recipiente se preparó una solución de 200 mL compuesta por la adición de 4 mL de solución stock y 196 mL de agua Milli-Q, logrando una concentración final de 12 mg As/L, 60 mg B/L y 3 mg/L de Cu, Mn y Zn, respectivamente; y una concentración de biomasa de 1 g/L. Una vez iniciados estos experimentos, se recolectaron muestras de 5 mL a los 10 min y 180 min. La selección de los tiempos de estudio fue realizada con el fin de comparar la capacidad de biosorción en su etapa inicial y la biosorción alcanzada en el tiempo de equilibrio, siendo 180 min el tiempo elegido para este punto, según lo mencionado en el punto 3.2.2.

Para determinar los efectos de la concentración de la SMM, se estudió el proceso de biosorción bajo tres diferentes SMM: SMM_{1x} (As: 12 mg/L, B: 60 mg/L, Cu-Mn-Zn: 3 mg/L), SMM_{2x} (As: 24 mg/L, B: 120 mg/L, Cu-Mn-Zn: 6 mg/L) y SMM_{4x} (As: 48 mg/L, B: 240 mg/L, Cu-Mn-Zn: 12 mg/L). En estos experimentos, las muestras fueron tomadas a tres tiempos diferentes: 10 min, 60 min y 180 min. La muestra obtenida a 60 min fue realizada con el fin de analizar el tiempo intermedio en el proceso de biosorción multimetálica

Todos los ensayos fueron llevados a cabo en recipientes de vidrio de capacidad de 500 mL, trabajando a pH 7.0, a 25 ° C, con agitación magnética (250 rpm) y en condiciones de oscuridad. Cada muestra se preparó para su posterior cuantificación, según el procedimiento indicado en el apartado 3.2.2. La capacidad de eliminación de los MP fue calculada en términos de eficiencia de eliminación. Los resultados obtenidos se ajustaron empleando modelos de isoterma de equilibrio de Langmuir y Freundlich. La cinética de adsorción de la SMM fue evaluada usando dos modelos cinéticos: Los modelos de pseudo-primer orden y pseudo-segundo orden, según lo presentado en el apartado 1.9.

3.4.2. ESTUDIOS EN COLUMNAS DE LECHO FIJO

Los estudios en lecho fijo se realizaron en una columna de vidrio con un diámetro interno de 3.5 cm y una altura de 50 cm. El lecho fijo se compuso por 20 g de biomasa microalgal floculada mezclada con 60 g de anillos de vidrio (0,5 cm), usados como soporte para impedir la obstrucción de flujo (Bulgariu y Bulgariu, 2013). Con el fin de proveer de un flujo uniforme de la SMM al interior del lecho, se agregó una capa de 3 cm de perlas de vidrio (2mm) en el extremo inferior de la columna (Mishra et al., 2016). El largo total del lecho para todos los estudios fue de 43 cm.

El proceso de floculación fue realizado mediante la suspensión de 20 g de biomasa (CV y SA) previamente liofilizada en 16 L de agua Milli-Q. Una vez homogeneizada la solución, se añadieron 300 mL de una solución de 4 g/L del floculante Chemifloc CV-300 (Chemipol S.A.), logrando una separación total de la biomasa en forma de flóculos. La biomasa floculada fue recolectada mediante filtración y fue utilizada como relleno para formar el lecho fijo. El floculante Chemifloc CV-300 fue elegido para este estudio debido a que se emplea usualmente como espesante primario de biomasa microalgal en estudios con sistemas de fotobiorreactores (de Godos et al., 2011; Rodero et al., 2018). Todo el proceso de floculación fue llevado a 25°C y agitado magnéticamente a 600 rpm.

El desempeño de la columna fue evaluado a través de las curvas de ruptura, útiles para conocer los parámetros del proceso de la biosorción de los constituyentes de la SMM en el lecho de biomasa microalgal. Las curvas de ruptura se obtuvieron trazando una relación entre la concentración efluente/afluente (C_t/C_0) en función del tiempo (t). El efecto de la concentración inicial en las curvas de ruptura se determinó para las dos especies de microalgas estudiadas utilizando tres concentraciones de SMM diferentes como influente: SMM_{0,5x} (As: 6 mg/L, B:30 mg/L, Cu-Mn-Zn: 1.5 mg/L); SMM_{1x} (As: 12 mg/L, B: 60 mg/L, Cu-Mn-Zn: 3 mg/L); y SMM_{2x} (As: 24 mg/L, B: 120 mg/L, Cu-Mn-Zn: 6 mg/L), trabajando a una tasa de flujo de 3 mL/min.

Por otro lado, la influencia de la tasa de flujo en las curvas de ruptura fue analizada únicamente trabajando con biomasa de la especie *Chlorella vulgaris*. Se obtuvieron curvas de ruptura a las tasas de flujo: 3 mL/min, 6 mL/min y 9 mL/min, empleando la solución SMM_{2x} como afluente. No fue posible obtener curvas de ruptura con *Scenedesmus almeriensis* a flujos mayores de 3 ml/min, debido a la aparición de graves problemas hidrodinámicos.

Todos los experimentos en lecho fijo se realizaron en flujo ascendente, con el fin de evitar efectos de canalización y favorecer el flujo pistón (Mishra et al., 2016). El pH del afluente fue ajustado previamente a pH 7,0 con la adición de NaOH 0,1M, resultando estable a lo largo de los experimentos. Una vez iniciado el experimento, se recogieron muestras de efluentes de 5 mL a intervalos de tiempo fijos. Durante la primera hora de estudio se tomaron muestras a los 5, 10, 20, 30 y 60 min. A partir de los 60 min, se recolectaron muestras por intervalos de 1 h hasta completar el tiempo total del estudio (8 h). Una vez recogidas las muestras, se les determinó el pH y la conductividad para fines analíticos y se filtraron a través de filtros de membrana de 0,45 µm (papel Whatman), se acidificaron con 30 µl de HNO₃ (0,1 M) y se almacenaron a 4º C hasta su posterior análisis cuantitativo. Los tiempos de ruptura y agotamiento fueron considerados cuando la relación (C_t/C_0) alcanzó el rango de 0,1 y 0,9, respectivamente.

3.5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

La concentración de As, B, Cu, Mn y Zn en disoluciones acuosas en todos los estudios fue realizada por la técnica de espectrometría de emisión óptica de plasma por acoplamiento inductivo (ICP-OES) (HP 7500 cc, Agilent, USA), según procedimientos internos del Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid (LTI – UVa). Para asegurar la calidad y precisión de los resultados, se seleccionaron como control de calidad (CC) dos patrones de referencia dentro de los análisis ICP-OES: Una solución de calibración multielemental estándar, especializado para estudios en ICP, 100 mg/L *Scharlau* (con 26 elementos en HNO₃ 5%), y un material de referencia certificado (*Environment Canada* TMDA-64.2 LOT 0313, HNO₃: 0.2%).

Por otro lado, las concentraciones de TOC de disoluciones acuosas fueron medidas utilizando un analizador *Shimadzu* TOC-VCSH (Japón), según (Marín et al., 2018). El pH fue medido mediante el uso de un peachimetro Basic 20+ (*Crison*, España). El crecimiento celular en los estudios del apartado 3.2., fue monitoreado espectrofotométricamente mediante la determinación de la densidad óptica a 540 nm (OD₅₄₀) con el espectrofotómetro *Helios-Alpha* (*Thermo Scientific*, EEUU). La determinación de las concentraciones de TS y TSS fueron realizadas bajo “*Standard Methods*” (E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, 2017).

La concentración de CO₂ fue determinada mediante cromatografía de gases, usando el modelo *Bruker* 430 GC-TCD (Palo Alto, EEUU), según (Cantera et al., 2016). Las determinaciones de FTIR fueron desarrolladas en el rango de 400 y 4000 cm⁻¹ en un modelo *Tensor 27* acoplado al modelo *ATR Golden Gate Tecknokroma* (*Bruker*, EEUU). Finalmente, en los estudios de lecho fijo, la conductividad fue medida usando un conductímetro Basic 30 (*Crison*, España).

3.6. PROCEDIMIENTOS ESTADÍSTICOS

En los estudios del apartado 3.3., la influencia de la concentración de TOC, el pH, el suministro de CO₂ en la biosorción y el resultado cuantitativo de los análisis de ICP-OES fue analizado estadísticamente mediante análisis de interferencias y de correlación (ANOVA). Por otro lado, los resultados de los estudios de recuperación de metales (apartado 3.3) y los presentados en el apartado 3.4, fueron desarrollados en duplicado, siendo todos los valores expresados en función de su valor promedio. Estos resultados fueron analizados por estudios ANOVA de una vía y pruebas de t ($p < 0.05$), con un nivel de confianza de 95% ($\alpha = 0.05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados usando el *software* Minitab 18.

CAPÍTULO 4.

“ESTUDIO COMPARATIVO DEL PROCESO DE BIOSORCIÓN DE As, B, Cu, Mn Y Zn DE SOLUCIONES ACUOSAS MEDIANTE EL USO DE DIFERENTES MICROALGAS VERDES”

4.2. ESTUDIO DE VIABILIDAD E INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO MICROALGAL

Se estudió el crecimiento de biomasa y la evolución de pH y el consumo de CO₂ de las cuatro especies de microalgas en disoluciones a 3 concentraciones diferentes de los metales en estudio: As a 6, 9 y 12 mg/L; B a 60, 120 y 180 mg/L; Cu, Mn y Zn a 2, 4 y 6 mg/L. Se realizaron pruebas de control para cada alga, agregando agua destilada al inóculo en vez de solución monometálica. La concentración inicial de algas en todos los estudios fue de 0,025 g/L y la duración de los experimentos 7 días.

Los resultados evidenciaron una clara correlación entre el crecimiento de la biomasa, el cual está directamente asociado al aumento en la densidad óptica y el pH, con el consumo de CO₂. La Fig. 14 muestra la evolución de estos parámetros en cultivos de *C. reinhardtii* en presencia de B y Cu. Todas las pruebas de control (en ausencia de metales) presentaron una fase de retraso con valores constantes de densidad óptica y pH entre los días 0 y 1. A partir de entonces, la densidad óptica del cultivo presentó un drástico incremento quintuplicando su valor entre los días 1 y 4, mientras que el pH aumentó de 6.5 a > 10 durante el mismo periodo. La biomasa dejó de crecer el día 4 y se registró una reducción del 10% en la densidad óptica entre los días 4 y 7. En contraparte, se registró una ligera disminución en la concentración de CO₂ durante las primeras 24 h de incubación, seguido por su completo consumo dentro de los siguientes tres días.

Por otro lado, se demostró que todas las especies de microalgas estudiadas eran viables a los rangos de concentración observadas en el río Loa, independientemente del metal analizado. La tolerancia a los MP fue especie-específica. A pesar de eso, se apreció una inhibición parcial del crecimiento celular en las mayores concentraciones estudiadas de B y Cu, asociado principalmente a la alta toxicidad del Cu para el metabolismo microalgal y la mayor concentración de B utilizadas en este estudio.

Sorprendentemente, la especie aislada *Chlorophyceae* sp., fue la especie más sensible, con una importante inhibición del crecimiento que es posible apreciar incluso a 60 mg B/L (G_i: 36%). El crecimiento de *S. almeriensis* también se vio fuertemente afectado por la presencia de B. De hecho, el cultivo a 60 mg B/L alcanzó un G_i: 56%, disminuyendo hasta un 20% a 120 mg/L. *C. reinhardtii* presentó una pequeña disminución de su crecimiento a 60 mg/L de B, mientras que a 120 mg/L el valor de G_i alcanzó un 60%. Finalmente, *C. vulgaris* fue la especie más resistente a la presencia de B, presentando un crecimiento normal hasta los 120 mg/L, aunque a 180 mg B/L la inhibición fue completa para todas las especies.

En el estudio del Cu, nuevamente la especie más sensible fue *Chlorophyceae* sp., cuyo metabolismo se vio gravemente afectado en todas las concentraciones de Cu. En los estudios a 2 mg Cu/L el crecimiento celular presentó una fuerte fase de retraso (G_i: 70% en el día 4), aunque este efecto metabólico fue superado dentro del tiempo de estudio, alcanzando estándares similares a su control al día 7. El transcurso del pH y la concentración de CO₂ se correlacionaron directamente con el crecimiento de la biomasa, confirmando la inhibición total de *Chlorophyceae* sp., a mayores concentraciones de Cu. El crecimiento de *S. almeriensis* tuvo una leve disminución a 2 y 4 mg/L de Cu, reduciendo su crecimiento en un 10%, mientras que a 6 mg/L de Cu se obtuvo un G_i de 80% (al

día 7). Por otro lado, *C. vulgaris* no presentó inhibición del crecimiento celular a bajas concentraciones de Cu, aunque a 6 mg Cu/L el Gi para este metal alcanzó los 20% al día 4 y los 60% al día 7. Estos valores de tolerancia son similares a los informados en estudios de inhibición del crecimiento frente a Cu, con dosis sub-letales de Cu de 1,59 mg/L para *Chlorella sorokiniana* y de 3,18 mg/L para *Scenedesmus acuminatus* a los 7 días de exposición (Hamed et al., 2017). Estos resultados confirmaron el alto efecto inhibitorio del Cu, atribuido a la influencia de este metal en el metabolismo de las microalgas, provocando daños en la estructura de la pared celular y en el proceso de división celular (Torres et al., 2017). Solo la especie *C. reinhardtii* fue tolerante a todas las concentraciones de Cu analizadas.

Por otro lado, las pruebas en presencia de As, Mn y Zn no presentaron inhibición del crecimiento celular al rango de concentraciones analizado, manteniendo los mismos valores de densidad óptica, pH y concentración de CO₂ que los obtenidos en sus respectivos estudios control durante el transcurso del experimento. El único efecto apreciable fue una ligera fase de retraso en la evolución del pH y la densidad óptica en los estudios de *Chlorophyceae* sp., en presencia de 12 mg As/L (la mayor concentración de As estudiada), alcanzado un valor de OD₅₄₀ 20% más bajo al día 4, pero retomando los valores control al día 7.

Sorprendentemente, las especies en estudio mostraron una alta tolerancia al Zn en comparación con los resultados publicados en investigaciones previas. (X. Dong et al., 2014) habían reportado una reducción del crecimiento de *Nannochloropsis salina*, de un 50% en presencia de 2,64 mg Zn/L (Torres et al., 2017). Estas diferencias en la sensibilidad podrían estar relacionadas con la especie, pero también con la muy baja concentración de biomasa inicial (0,025 g/L) utilizada en ese trabajo (Nalimova et al., 2005; Napan et al., 2015).

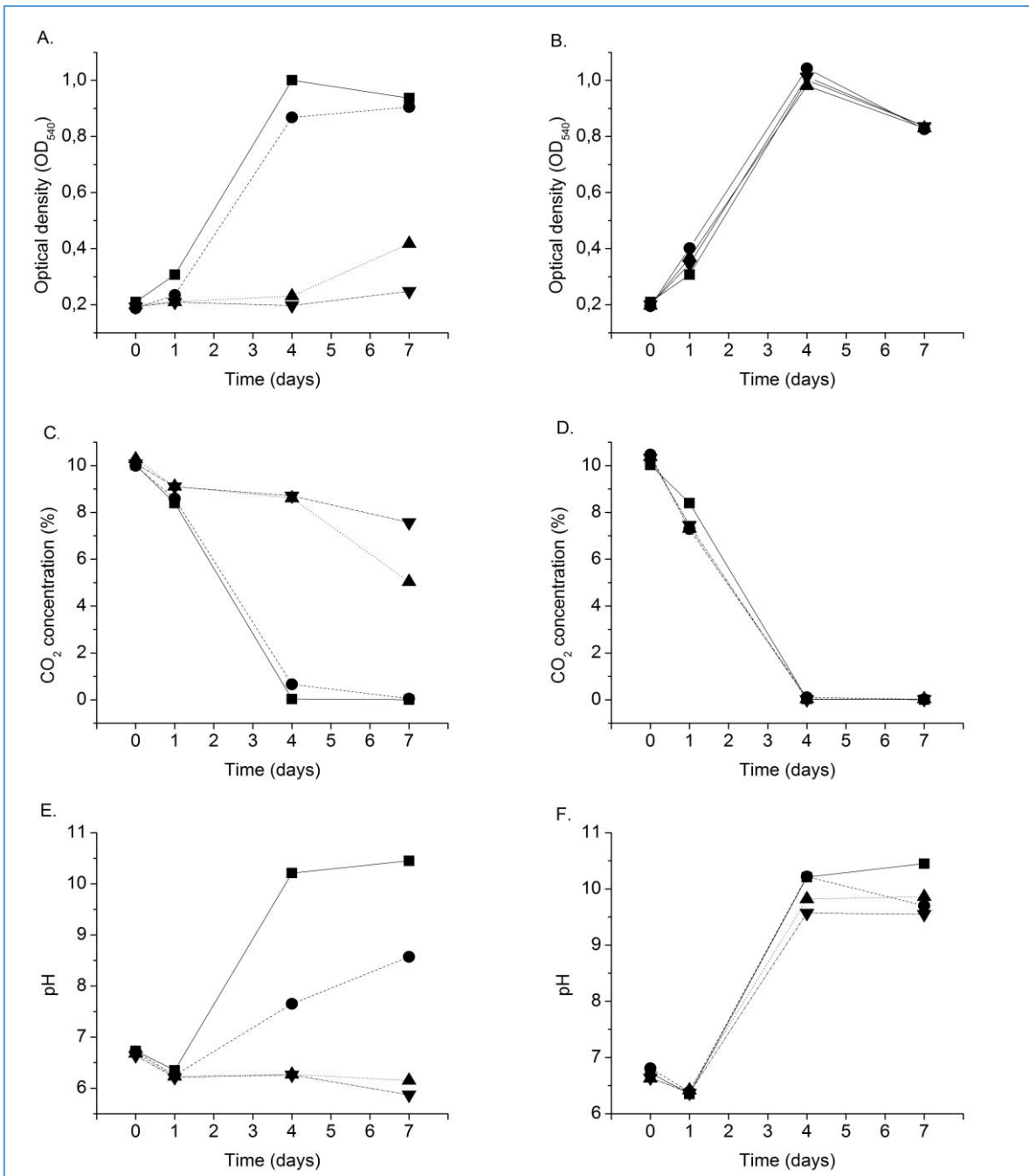


Figura 14. Evolución de la densidad óptica, la concentración de CO₂ en el espacio de cabeza y el pH en cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii* (concentración inicial: 0,025 g/L) en presencia de boro (A, C, E) y cobre (B, D, F). [■]: Control (0 mg/L), [●]: (B 60 mg/L, Cu 2 mg/L), [▲]: (B 120 mg/L, Cu 4 mg/L), and [▼]: (B 180 mg/L, Cu 6 mg/L).

4.3. ESTUDIOS DE BIOSORCIÓN MONOMETÁLICA

Los estudios de biosorción monometálica fueron llevados a cabo usando las cuatro especies de microalgas para cada elemento en estudio: As (12 mg/L); B (60 mg/L); Cu, Mn y Zn (3 mg/L), estudiando la influencia de factores operacionales como el pH (5,5; 7,0 y 9,5) y el tiempo de contacto (10 min – 180 min). Se realizaron pruebas de control para cada ensayo, agregando agua destilada al inóculo en vez de solución monometálica. La concentración inicial de la biomasa microalgal en todos los estudios fue de 1 g/L.

Los resultados demostraron que las capacidades de biosorción (180 min, pH 7) presentaron notables diferencias entre las especies microalgales frente a los MP analizados (Fig. 15). Las eficiencias de eliminación para As y B fueron bajas, con valores que oscilaron desde los 10,5% (As) y 21,4% (B) para *C. vulgaris* hasta los 20,1% (As) y 25,6% (B) para *C. reinhardtii*. A nivel general, las capacidades de biosorción fueron mucho más bajas para As (1.31 - 2.56 mg/g) que para B (12.40 - 14.84 mg/g), lo que podría explicarse por la mayor concentración inicial de B. Se aprecia una notable diferencia entre las eficiencias de eliminación para Cu, Mn y Zn, con las observadas en As y B, siendo mucho mayores las del primer grupo. *C. vulgaris* obtuvo las RE más altas, alcanzando los 87,9% para Cu, 99,4% para Mn y 88,8% para Zn. Las capacidades de biosorción para estos MP oscilaron entre los 1,51 y 2,65 mg Cu/g, 1,65 a 3,17 mg Mn/g y 0,88 a 2,68 mg Zn/g. A pesar del alto RE alcanzado en estas pruebas, las capacidades de biosorción para Cu, Mn y Zn fueron notablemente más bajas que las reportadas previamente en la literatura, debido principalmente a las bajas concentraciones de metales utilizadas en esta investigación (Suresh Kumar et al., 2015a; Zeraatkar et al., 2016).

4.3.1 EFECTO DEL PH

A nivel general, la influencia del pH en la capacidad de biosorción fue específica para cada metal (Fig. 15). En el caso del As, los valores más bajos de $RE_{As,180}$ se obtuvieron a pH 7,0. Por ejemplo, *C. reinhardtii* presentó valores de $RE_{As,180}$ de 20,1% a pH 7,0; menores que los 33,6% y 38,6% observados a pH 5,5 y 9,5. En el caso de *C. vulgaris*, estos valores resultaron desde los 10,5% a pH 7,0 hasta los 32,4% y 29,0% alcanzados a pH 5,5 y 9,5, respectivamente. La disminución en la biosorción de As a pH 7,0 fue probablemente mediada por la condición de inestabilidad iónica de la especie As (V) debido a la proximidad de su valor de pKa (pKa 6,8) en condiciones neutras (Álvarez-Benedí et al., 2005). No obstante, la mayor eficiencia de eliminación para As fue de 41,7%, obtenida a pH 9,5 con la especie *S. almeriensis*.

A nivel general, con los resultados obtenidos en los estudios de B no se observa un efecto claro del pH en la capacidad de biosorción para este elemento. Los rangos de eliminación de B alcanzan valores de $RE_{B,180}$ entre los 20,4% en *Chlorophyceae* sp., hasta los 33,5% en *C. reinhardtii*, siendo ambos resultados obtenidos en estudios desarrollados a pH 5,5. En el caso de Cu, a pH 7,0 se observa una leve disminución en la RE, aunque los estudios con *C. vulgaris* no presentan esta tendencia, alcanzando el mayor $RE_{Cu,180}$ en condiciones neutras, con un valor 87,9%.

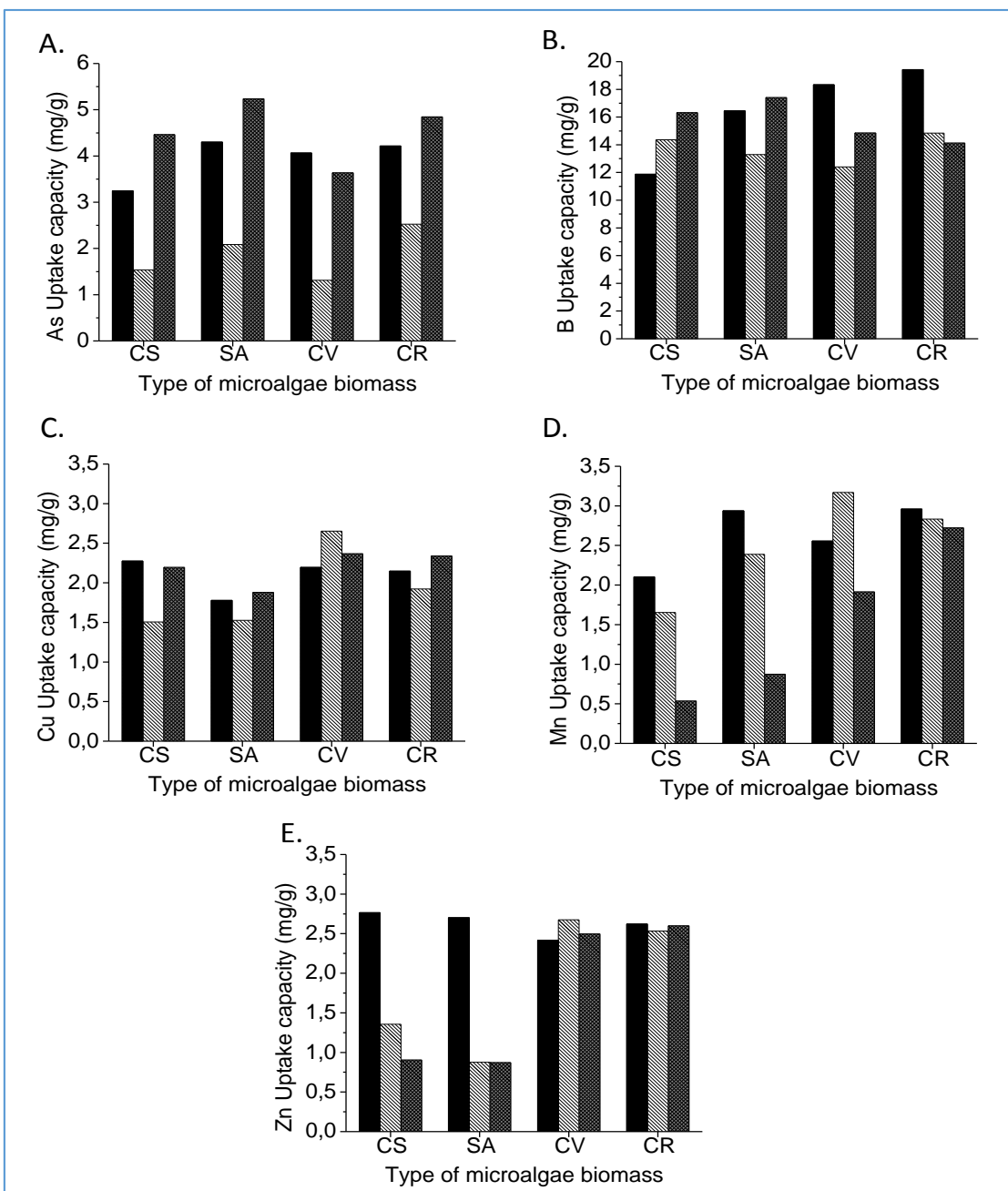


Figura 15. Influencia del pH en las capacidades de biosorción (mg/g) de cultivos de *Chlorophyceae* sp. (CS), *Scenedesmus almeriensis* (SA), *Chlorella vulgaris* (CV) y *Chlamydomonas reinhardtii* (CR) a 1 g/L y a un tiempo de 180 min, para soluciones monometálicas con concentraciones iniciales de A) arsénico 12 mg/L, B) boro 60 mg/L, C) cobre 3 mg/L, D) manganeso 3 mg/L y E) zinc 3 mg/L. pH 5,5: (■), pH 7,0: (▨) y pH 9,5: (▩).

Al igual que en resultados obtenidos en investigaciones previas, el pH óptimo para estudios de biosorción de Cu varía según la especie y las condiciones de las microalgas utilizadas. Previamente, las mayores capacidades de biosorción se obtuvieron dentro del rango de pH 4-5 para *C. vulgaris* en

estudios a concentraciones iniciales de 100 mg Cu/L (Al-Rub et al., 2006). Por otro lado, la máxima capacidad de biosorción de Cu en estudios de *C. reinhardtii* fue obtenida a pH 6 (Flouty y Estephane, 2012).

Finalmente, para los estudios de Mn y Zn, se aprecia una clara tendencia en la capacidad de biosorción a favor del uso del pH 5,5 para todas las microalgas analizadas, exceptuando *C. vulgaris*, cuya especie además alcanza alta capacidad a pH 7,0. Las especies *C. reinhardtii* y *S. almeriensis* alcanzaron un $RE_{Mn,180}$ de 92,8% y 92,1%, respectivamente. En el caso del Zn, este efecto se hace más evidente, con valores de $RE_{Zn,180}$ que varían desde los 91,9% y 89,7% a pH 5,5 hasta los 30,0% y 29,0% a pH 9,5, en las especies *S. almeriensis* y *Chlorophyceae* sp., respectivamente. Estos valores resultan similares a los publicados en investigaciones anteriores, donde el pH óptimo para la obtención de las máximas eficiencias de eliminación fue pH 6 para Mn (II) en *Chlorella minutissima* UTEX2341 (Yang et al., 2015) y para Zn en *Scenedesmus obliquus* (Monteiro et al., 2009).

4.3.2. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE CONTACTO

Los resultados demuestran una reducción significativa en la concentración de todos los elementos estudiados durante los primeros 10 min de tiempo de contacto. Esta disminución es directamente atribuida a la unión del metal a la superficie de la pared celular (Markou et al., 2015; Winters et al., 2017). La Fig. 16 muestra la diferencia entre las capacidades de adsorción (q) a los 10 min y a los 180 min de tiempo de contacto. En los estudios de As, la máxima capacidad de biosorción se produjo a los 10 minutos, disminuyendo posteriormente en la mayoría de las pruebas realizadas. Esto sugiere que el As produce cambios metabólicos dentro de las células microalgales y, producto del estrés generado, se produce una exudación de este elemento por parte de la biomasa (Wang et al., 2015). Esta reducción en la eliminación de As mucho más notoria a pH 7,0 donde la $RE_{As,180}$ disminuyó en un factor de 2 para todas las especies de microalgas estudiadas.

De la misma manera, la capacidad de eliminación del B también disminuyó con el transcurso del tiempo. La eficiencia de remoción de B por *S. almeriensis* presenta la disminución más notable a pH 5,5 ($RE_{B,10}$ de 38,6% a $RE_{B,180}$ de 28,3%). No se observó una correlación entre el pH y la disminución de RE_B con el tiempo, registrándose las mayores reducciones a pH 7,0 (de 36,6% a 21,4%) en *C. vulgaris* y a pH 9,5 en *C. reinhardtii* (de 38,2% a 24,3%). La única prueba que resultó en un aumento notable de la biosorción de B con el tiempo fue la de *Chlorophyceae* sp., a pH 5,5. En este contexto, estudios previos que utilizaron los hongos *Aspergillus versicolor* como biosorbente informaron la misma tendencia en los rendimientos de biosorción de B con el transcurso del tiempo, con el RE_B disminuyendo desde un 41,4% logrados en los primeros 15 min hasta un rango de 20% - 25% después de 1 h – 4 h de tiempo de contacto (Laçin et al., 2015).

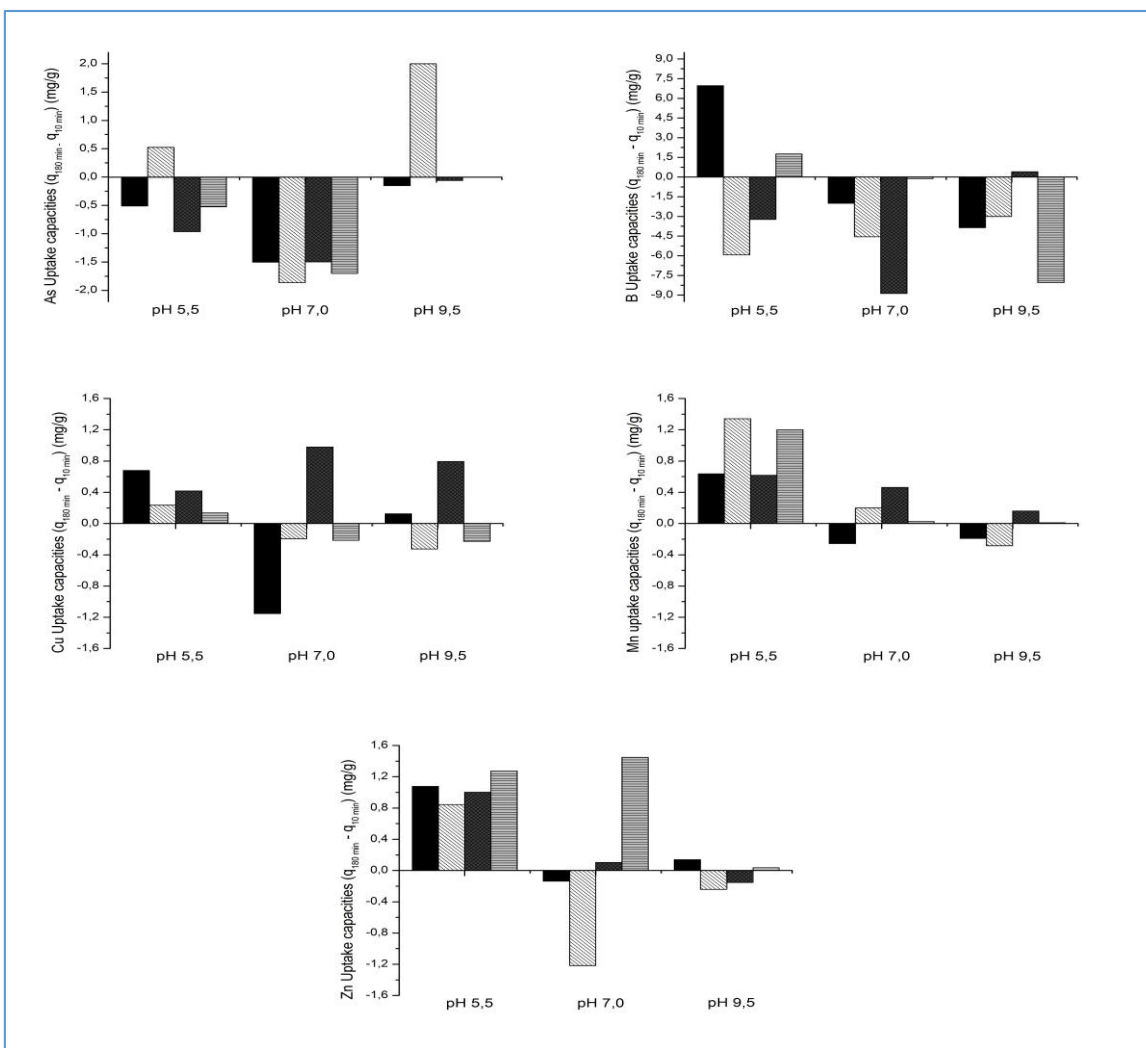


Figura 16. Diferencias entre las capacidades de biosorción (q) a los 10 min y 180 min de tiempo de contacto (mg / g) en suspensiones de 1 g/L de: ■: *Chlorophyceae* sp. (CS), ▨: *S. almeriensis* (SA), ▩: *C. vulgaris* (CV), ▨: *C. reinhardtii* (CR), para soluciones monometálicas con concentraciones iniciales de A) arsénico 12 mg/L, B) boro 60 mg/L, C) cobre 3 mg/L, D) manganeso 3 mg/L y E) zinc 3 mg/L.

Por otro lado, las capacidades de adsorción de Cu, Mn y Zn a pH 5,5 aumentaron con el tiempo de contacto para todas las especies estudiadas. Esta mejora en el rendimiento de la biosorción fue especialmente relevante para *S. almeriensis*. De hecho, esta microalga obtuvo aumentos en la eficiencia de remoción de Mn y Zn de 50,0% a 92,1%, y de 61,6% a 89,7% cuando el tiempo de contacto se incrementó de 10 min a 180 min. De manera similar, *C. reinhardtii* apoyó los aumentos en su RE de 55,1% y 44,7% (10 min) a 92,8% y 87,0% (180 min) para Mn y Zn, respectivamente. La eficiencia de eliminación de Cu y Mn con *C. vulgaris* aumentó con el transcurso del tiempo, independientemente del pH. Por ejemplo, el RE_{Cu} de esta microalga a pH 7,0 aumentó de 55,4% a 10 min a 87,9% a 180 min. Finalmente, la eficiencia de remoción de Zn aumentó de 36,0% a los 10 min a 84,2% a 180 min a pH 7,0 en *C. reinhardtii*.

4.4. ESTUDIOS DE BIOSORCIÓN MULTIMETÁLICA

Los estudios de biosorción multimetálica se llevaron a cabo con el fin de estudiar la interferencia de los MP en las capacidades de biosorción para cada elemento, en comparación con los resultados alcanzados en las pruebas monometálicas, y para determinar la viabilidad de las especies en esta condición. Para ello, se realizaron ensayos con una solución multimetálica cuya composición presentó todos los elementos estudiados (As: 12 mg/L, B: 60 mg/L, Cu, Mn y Zn: 3 mg/L) para las cuatro especies de estudio, en condiciones de pH 7,0 y a tiempos de contacto de 3 h, 24 h y 72 h. Los resultados del estudio demostraron que no hubo inhibición del crecimiento microalgal en ninguno de los experimentos. Sin embargo, el crecimiento medido resultó inferior al 15% (m/m) en todas las pruebas, tanto el control como las disoluciones multimetálicas.

Las capacidades de biosorción registradas en los estudios multimetálicos se muestran junto con los resultados de los procesos de biosorción monometálica (180 min, pH 7,0) con el fin de poder ser comparados e interpretados, en la Fig. 17. El RE más bajo obtenido a las 3 h se encontró en el proceso de biosorción de B, lo que sugiere que la presencia de los otros metales interfirió negativamente en la eliminación de este elemento. Esto fue observable en todas las microalgas analizadas a pesar de las altas concentraciones de B presentadas en la solución multimetálica. La única excepción se produjo en los estudios realizados con la especie *Chlorophyceae* sp. Asimismo, las eficiencias de eliminación de B disminuyeron desde un 21,4% en soluciones monometálicas hasta un 6,6% en *C. vulgaris*, del 25,6% al 0,2% en *C. reinhardtii* y del 22,9% al 3,6% en *S. almeriensis*. De manera similar, la biosorción de Mn también se vio afectada por la presencia de otras especies de metales en *C. vulgaris* y *C. reinhardtii*, disminuyendo la eficiencia de eliminación desde un 99,4% y un 88,8% hasta valores de \approx 60% en soluciones multimetálicas. Por el contrario, la capacidad de biosorción de As aumentó en un factor de 3 en *C. vulgaris*, 2,5 en *Chlorophyceae* sp., y 1,7 en *S. almeriensis*. Las eficiencias de eliminación más altas en sistemas multimetálicos se obtuvieron para Cu y Zn, con un RE superior al 78% para todas las microalgas analizadas. De hecho, la eliminación de Zn alcanzó el 96% con *C. reinhardtii*. Estos resultados demuestran que las capacidades de biosorción de MP con mayor masa atómica, tales como el As, Cu y Zn aumentan su eliminación a expensas de una reducción en la biosorción de elementos más ligeros como el B y en menor medida, el Mn. La misma tendencia se había informado en soluciones multimetálicas en *C. reinhardtii* y *Chlorella pyrenoidosa*, cuyas capacidades de adsorción de Cu y Zn eran dos veces más altas que las de Mn (Zhao et al., 2013). Sin embargo, estos resultados sugirieron que la interferencia registrada entre los metales no puede atribuirse a una competencia por sitios de unión. La capacidad total de biosorción molar y por lo tanto, el número de sitios ocupados en *S. almeriensis*, *C. vulgaris* y *C. reinhardtii* fue menor en soluciones multimetálicas que la capacidad de biosorción molar de B en soluciones monometálicas (Figura 19). La misma tendencia se observó comparando las capacidades de adsorción en unidades de masa. Este fenómeno no se presentó en *Chlorophyceae* sp., especie que incluso aumentó sus capacidades de biosorción de As, Cu, Zn y Mn manteniendo su potencial de biosorción frente a B. Esta especie, la única especie que proviene de un ambiente rico en B, consiguió las mejores RE dentro de las primeras 3 h, con una eficiencia de eliminación del 30,9% para As, 22% para B, 85,2% para Cu, 66,1% para Mn y 95,9 % para Zn.

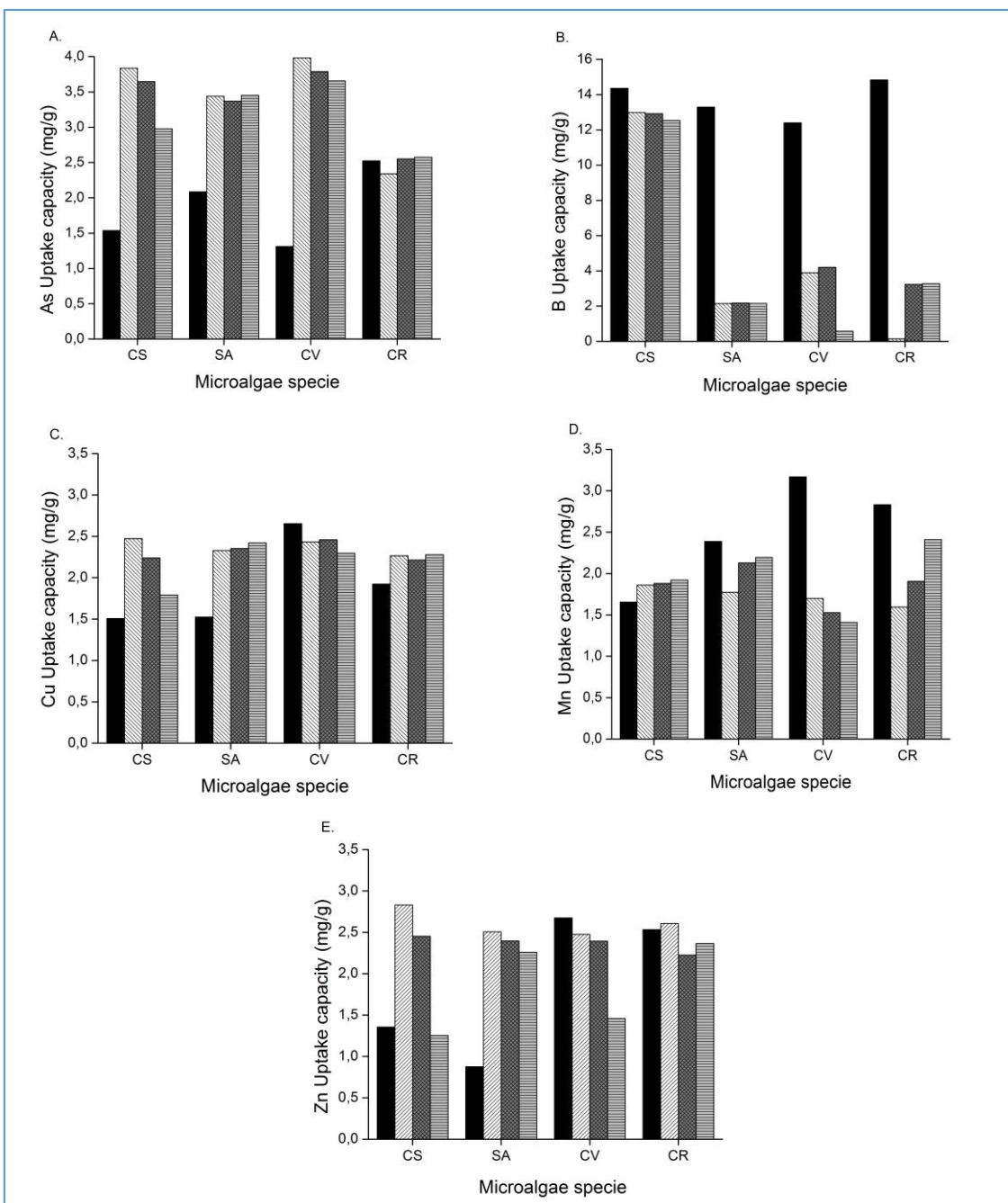


Figura 17. Capacidad de biosorción (mg/g) a pH 7 para A) arsénico, B) boro, C) cobre, D) manganeso y E) zinc, en suspensiones de 1 g/L de *Chlorophyceae* sp. (CS), *Scenedesmus almeriensis* (SA), *Chlorella vulgaris* (CV), *Chlamydomonas reinhardtii* (CR). Solución monometálica de B, 3h (■), SMM, 3h: (▨), SMM, 24h: (▩) y SMM, 72h: (▧).

Por otro lado, se observó un impacto limitado del tiempo de contacto en la adsorción de As y B en soluciones multimetálicas, independientemente de la especie microalgal (Fig. 17). La capacidad de biosorción de B de *C. vulgaris* disminuyó con el tiempo hasta alcanzar una $RE_{B,72}$ de solo un 1%. Un ligero aumento con el tiempo de la RE_B fue observado únicamente con la especie *C. reinhardtii*

($RE_{B,72}$ 5,5%). Las capacidades de biosorción de Mn de *S. almeriensis* y *C. reinhardtii* aumentaron con el tiempo al emplear soluciones multimetálicas, registrando un aumento de RE_{Mn} que va desde un 63,0% y 56,7% a las 3 h, hasta los 78,0% y 85,6% a las 72 h, respectivamente. En cuanto al Zn, Las eficiencias de eliminación de Zn disminuyeron con el tiempo para todas las especies. Esta reducción fue notable en la especie *Chlorophyceae* sp., y en *C. vulgaris* resultando en valores de $RE_{Zn,72}$ de 42,5% y 49,4%, respectivamente. Los resultados de este estudio sugieren la no existencia de competencia por los sitios libres presentes en la pared celular de las microalgas, ya que la reducción en la capacidad de biosorción con el tiempo de algunos metales no se vio compensada por el aumento de la biosorción de otros (Figura 18).

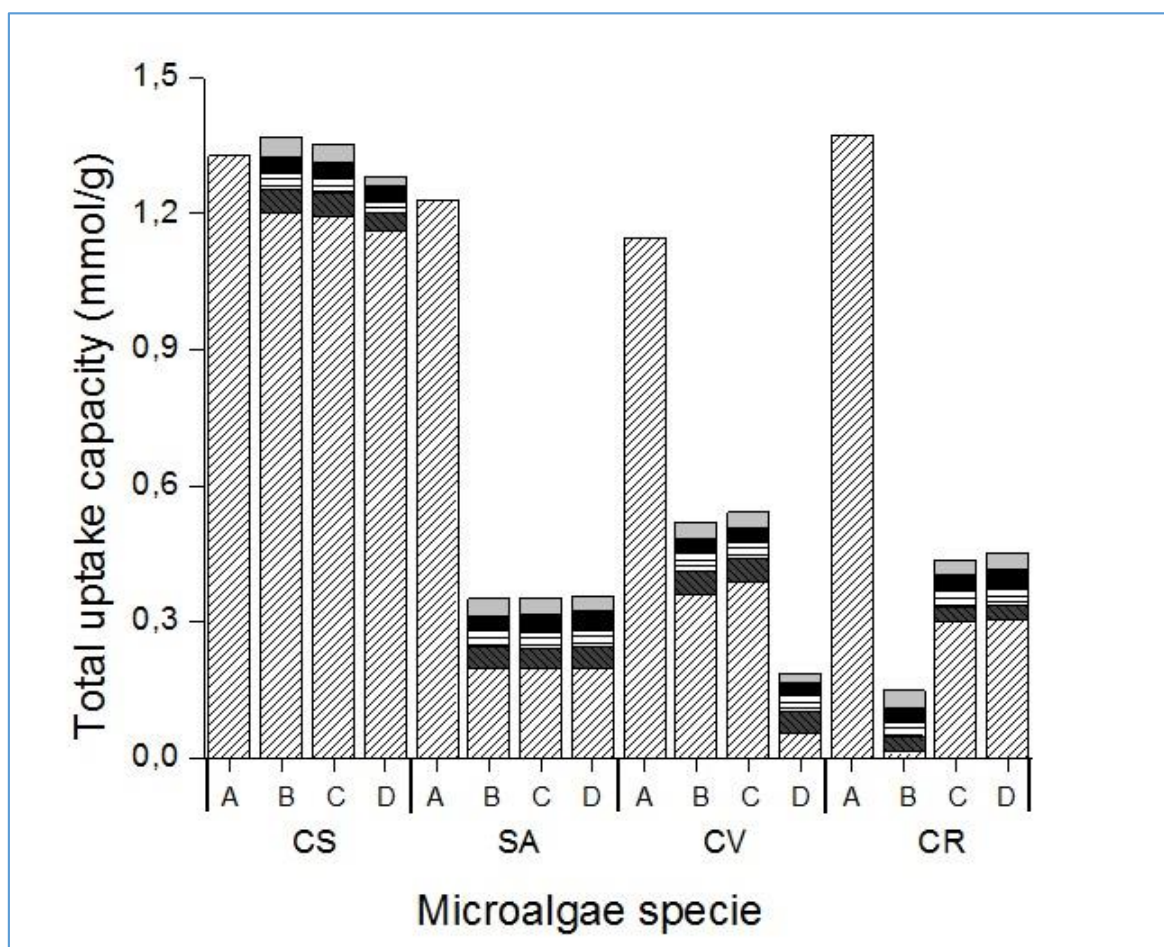


Figura 18. Comparación de las capacidades de adsorción molar (mmol/g biomasa) de solución individual de boro y soluciones multimetálicas a pH 7 en cultivos a 1 g/L de *Chlorophyceae* sp. (CS), *Scenedesmus almeriensis* (SA), *Chlorella vulgaris* (CV), *Chlamydomonas reinhardtii*, en A) Solución de boro individual - 3h, B) Multimetálico - 3h, C) Multimetálico - 24h y D) Multimetálico - 72h. Para boro (diagonal), arsénico (cross-hatch), cobre (horizontal), manganeso (solid black) y zinc (solid grey).

4.5. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN

Los estudios de caracterización se desarrollaron con el fin de determinar los principales sitios de unión de los elementos estudiados en la biomasa microalgal. Se realizaron estudios a soluciones monometálicas de Cu, Mn y Zn, soluciones multimetálicas cuaternarias [B + Cu + Mn + Zn], [As + Cu + Mn + Zn], y con todos los elementos estudiados [B + As + Cu + Mn + Zn]. Se seleccionó la especie *C. reinhardtii* como especie modelo para el análisis FTIR. La elección fue basada en que esta especie presentó las mayores diferencias entre las capacidades de biosorción alcanzadas en las soluciones monometálicas y en las multimetálicas.

Los espectros de FTIR de *C. reinhardtii* incubados durante 10 min y 3 h en diferentes soluciones metálicas se compararon con el estudio de biomasa control (Fig. 19). El espectro obtenido a los 10 min de exposición frente a la solución multimetálica de As, B, Cu, Mn y Zn mostró importantes modificaciones en los picos observables en los rangos $1150\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ (relacionados con el grupo éster fosfato $\text{P} = \text{O}$), $1350\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ (amida III), 1535 cm^{-1} (amida II), 1645 cm^{-1} (amida I) y 3300 cm^{-1} (estiramiento de OH y NH). Sin embargo, la intensidad de estos picos disminuyó en comparación con los observados en el espectro de la biomasa expuesta durante 3 h. La interferencia en la interacción de los cationes con los grupos carboxilo y amida se ha informado previamente en estudios de adsorción multimetálicos de Ni, Zn y Pb en *C. vulgaris* y *Arthrospira platensis* (Rodriguez et al., 2012), y de Zn en *C. vulgaris* (Ferreira et al., 2011).

Los espectros de *C. reinhardtii* obtenidos después de una exposición de 10 min a soluciones monometálicas mostraron una notable afinidad entre el ion Cu y la amida III, además de la zona $1000\text{-}1150\text{ cm}^{-1}$, que está relacionada con el modo de estiramiento C-C y C-O de los grupos hidroxilo de los polisacáridos. El Cu fue el único metal que afectó la zona de 3300 cm^{-1} , probablemente debido a la formación de complejos acuosos. Los picos de 1535 cm^{-1} y 1741 cm^{-1} (grupo $\text{C} = \text{O}$) también se vieron afectados por Cu. El impacto de Cu se redujo notablemente después de 3 h de exposición, aunque el cambio en la capacidad de biosorción con el tiempo de contacto no fue relevante para este metal (sección 4.3.2). Por último, los elementos Mn y Zn provocaron modificaciones menores dentro del espectro FTIR en comparación con la biomasa de control.

Por otro lado, se evaluó el impacto de As y B en la capacidad de interacción de los MP agregando estos elementos a una mezcla que contenía Cu, Mn y Zn, mostrando su respectivo espectro FTIR con el control (Fig. 19e, f). Se observaron modificaciones importantes en el espectro de bandas de [As-Cu-Mn-Zn] a 1153 cm^{-1} y 1228 cm^{-1} . Las modificaciones de las bandas, las cuales aumentaron con el tiempo de exposición, sugirieron que la adsorción de As estaba mediada por la presencia de los grupos $\text{P} = \text{O}$ en *C. reinhardtii*. Por otro lado, las principales diferencias en el espectro FTIR de la biomasa expuesta a mezclas cuaternarias [B-Cu-Mn-Zn] en comparación con el control de biomasa sin procesar se pueden explicar por la presencia de Cu y Mn en la solución. Se observó un efecto insignificante de boro. Estos resultados concuerdan con la baja capacidad de adsorción de B de *C. reinhardtii* en soluciones multimetálicas.

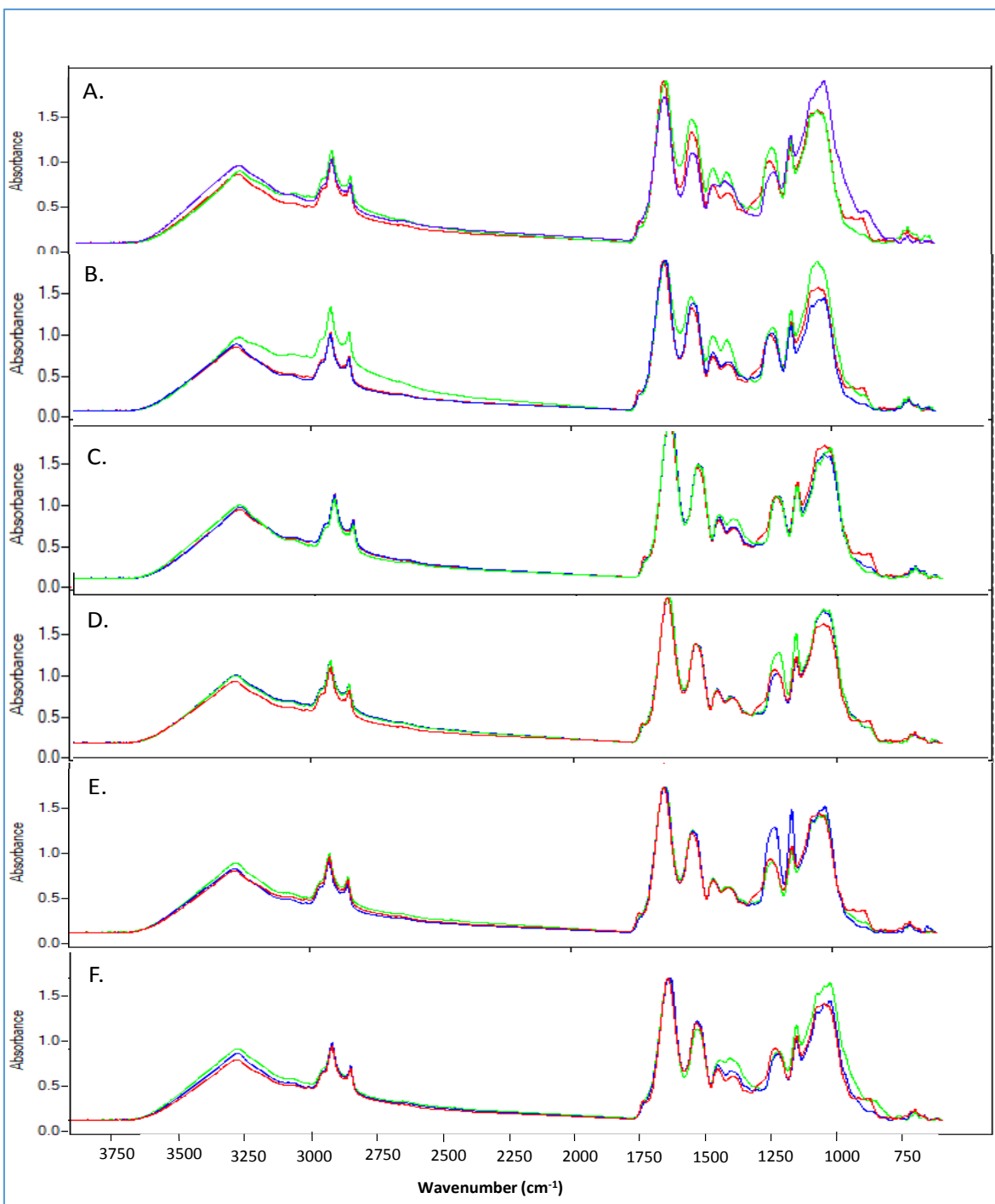


Figura 19. Análisis comparativo de los espectros de FTIR obtenidos entre biomasa de *C. reinhardtii* sin contacto con la solución multimetálica (Rojo) y biomasa de *C. reinhardtii* incubada con la solución multimetálica a 10 min (Verde) y 3 h (Azul). A) Solución multimetálica [As-B-Cu-Mn-Zn], B) Solución monometálica de Cu, C) Solución monometálica de Mn, D) monometálica de Zn, E) Solución cuaternaria de [As-Cu-Mn-Zn], F) Solución cuaternaria de [B-Cu-Mn-Zn].

CAPÍTULO 5.

**“INFLUENCIA DE LA MO Y LA ADICIÓN DE CO₂
EN LA BIORREMEDIACIÓN DE MP POR
CHLORELLA VULGARIS Y *SCENEDESMUS*
ALMERIENSIS EN UNA MATRIZ MULTIMETÁLICA”**

5.1. PRÓLOGO

Esta investigación combina los estudios de la influencia de la presencia de la materia orgánica (MO) y la adición de CO₂ en el proceso de biosorción de los metales contenidos en una SMM empleando biomasa microalgal y evalúa el proceso de recuperación de los metales adsorbidos usando diferentes eluyentes y concentraciones (Fig. 20). Para ello, se utilizaron como microorganismos modelo dos especies de microalgas verdes utilizadas actualmente en estudios de fotobiorreactores para tratamiento de aguas residuales (*Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus almeriensis*), previamente estudiadas en el estudio presentado en el Capítulo 4.

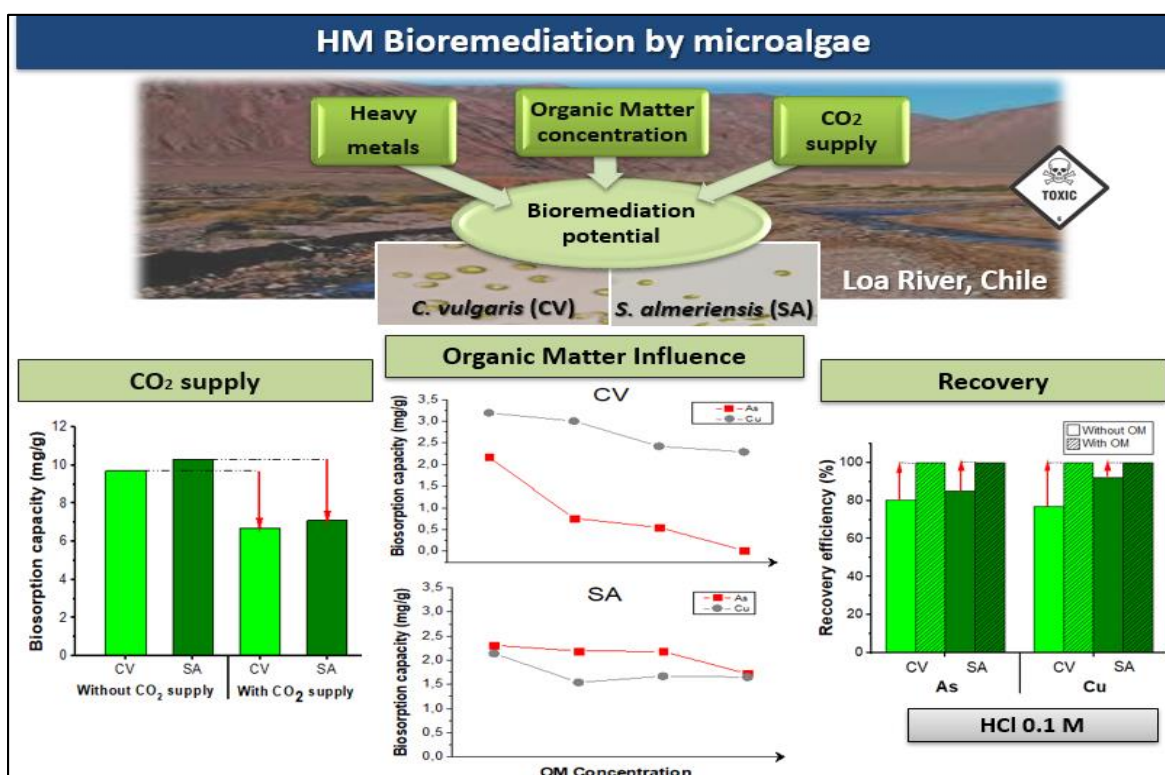


Figura 20. Diagrama resumen del estudio de la influencia de la materia orgánica y el adición de CO₂ en el proceso de biorremediación de una solución multimetálica mediante biomasa microalgal - Capítulo 5

En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración de MO en la biosorción de MP por microalgas, comparando los resultados con y sin adición de CO₂. De igual modo, se monitorearon las variables del crecimiento de microalgas, el pH y la concentración de TOC (carbono orgánico total, por sus siglas en inglés) soluble en el medio para una comprensión completa del efecto de la MO en el proceso de biorremediación. Posteriormente, se evaluó la recuperación de los metales retenidos por la biomasa. Para esto, se compararon las tasas de recuperación de tres eluyentes diferentes (HCl, NaOH, CaCl₂) a dos concentraciones diferentes (0.1 M y 0.2 M), analizando la recuperación del metal a lo largo del tiempo y el efecto de la MO en la desorción con HCl. Este trabajo contribuye a dilucidar el potencial de la biomasa microalgal para la eliminación de MP y el efecto de la

concentración de la MO y el adición de CO₂ en el proceso de biosorción, con el fin de proporcionar información valiosa sobre los mecanismos de biosorción aplicables al empleo de fotobiorreactores dedicados al tratamiento de aguas residuales y descontaminación de aguas.

5.2. EFECTO DE LA MO EN EL PROCESO DE BIOSORCIÓN DE MP DE UNA SOLUCIÓN MULTIMETÁLICA SIN ADICIÓN DE CO₂

Para la obtención de una visión global del efecto de la MO en el proceso de biosorción, se requiere previamente poder entender el comportamiento de las principales variables analizadas a lo largo del experimento en el sistema multimetálico. Por esta razón, en primera instancia se señalarán los principales resultados de las variables estudiadas: pH, crecimiento celular y concentración de TOC soluble; y posteriormente, los resultados implicados al proceso de biosorción de la SMM, incorporando en la discusión la influencia de todas las variables analizadas.

Los estudios de *C. vulgaris* presentaron un pH relativamente constante a lo largo del experimento, mostrando leves variaciones en las condiciones con mayor concentración de MO en la composición inicial de la SSW (pH C_{OM2}: 7.1 y pH C_{OM3}: 7.3, a las 72 h). Estos resultados tienen una directa relación con el crecimiento de biomasa registrado durante los experimentos, no observándose aumento de la biomasa en la solución control C_{OM0} y presentando una correlación lineal entre el crecimiento de la biomasa y la concentración inicial de MO en el sistema. Al final del estudio (72 h), el aumento de la biomasa alcanzó un 2.0% en C_{OM1}, 16.3% en C_{OM2} y un 27.6% en C_{OM3}. Sorprendentemente, los estudios de *C. vulgaris* presentaron un fuerte incremento en la concentración de TOC durante las primeras 3 h del experimento, en todas las condiciones, independientemente de la concentración inicial de MO (Fig. 21A). La concentración de TOC tendió a disminuir en todos los casos a las 24h de estudio, resultado finalmente en una eliminación de TOC de 15.9% y 76.9% a las 72 h, en las condiciones C_{OM2} y C_{OM3}, respectivamente.

Por otro lado, los estudios de *S. almeriensis* presentaron en su etapa inicial (3 h) un notable crecimiento de su valor y_{in} presencia de MP dentro del medio. Es sabido que las microalgas presentan diferentes procesos metabólicos que pueden ser usados para evitar la alta toxicidad generada por la presencia de MP. Entre ellos, el secuestro extracelular, el secuestro intracelular, la exportación activa y la desintoxicación enzimática son los principales mecanismos (Yin et al., 2018). La expresión de proteínas como las glutatión S-transferasas (GST) juegan un papel importante en el proceso de desintoxicación celular, contribuyendo a la protección contra el estrés oxidativo generado por la presencia de MP (Yin et al., 2016; J. Zhang et al., 2013). Estudios previos mostraron diferentes respuestas de crecimiento de especies de microalgas al estrés producido por MP. Por ejemplo, *Scenedesmus acuminatus* presentó una mayor capacidad antioxidante, un menor daño a la membrana y una mayor tolerancia que *Chlorella sorokiniana* al estrés inducido por los iones Cu⁺², demostrando una mejor tolerancia de este género a los efectos tóxicos del Cu (Hamed, 2017).

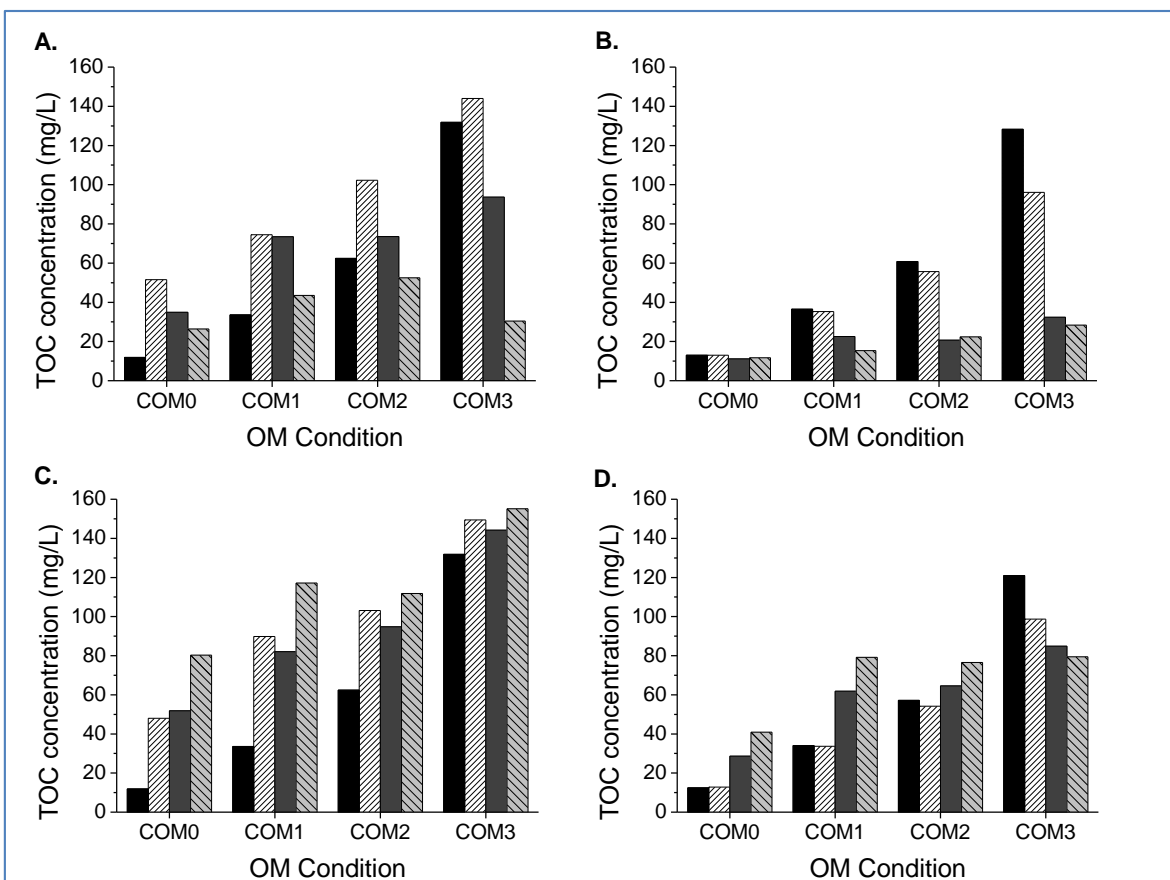


Figura 21. Evolución de la concentración de TOC (mg/L) en estudios de biosorción de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA), desarrollados en soluciones multimetálicas con distintas concentraciones iniciales de MO, a 1 g SST/L y pH 7.0. A) CV – sin adición de CO₂; B) SA – sin adición de CO₂; C) CV – con adición de CO₂; D) SA – con adición de CO₂. (■) t₀ (tiempo inicial), (▨) 3 h; (■) 24 h; (▨) 72 h

Contrariamente a los resultados observados en los estudios desarrollados con *C. vulgaris*, las pruebas de biosorción de *S. almeriensis* revelaron una disminución de la concentración de TOC desde el comienzo del experimento, alcanzando una mayor eliminación en las condiciones que presentaban las mayores concentraciones iniciales de MO (Fig. 21B). Pasadas las primeras 3 h de experimentación, la eliminación del TOC alcanzó un rango que abarca desde un 0,3% en COM₀ hasta un 25,1% en COM₃. La concentración de TOC aumenta considerablemente con el tiempo, hasta alcanzar a las 72 h valores del 10,4%, 57,9%, 63,2% y 77,9%, en las condiciones COM₀, COM₁, COM₂ y COM₃, respectivamente. La eliminación de TOC en el medio puede asociarse directamente con la capacidad de las microalgas para utilizar el carbono orgánico como fuente de energía para el crecimiento celular, basado en un metabolismo mixotrófico (Shen et al., 2015). El mayor crecimiento celular y las mayores tasas de eliminación de TOC obtenidos por la especie *S. almeriensis* permiten respaldar que esta especie presenta mejores condiciones que *C. vulgaris* para enfrentar el efecto producido por la presencia de MP durante el tratamiento de aguas residuales contaminadas.

Por otro lado, los estudios confirman una fuerte influencia de la MO en los procesos de biosorción basados en biomasa microalgal. Estos efectos se presentan de manera relevante en las dos especies estudiadas, aunque este efecto se presenta con mayor claridad en los estudios desarrollados con la especie *C. vulgaris*. La presencia de MO produjo una notoria disminución en la efectividad de remover As del medio, siendo observable este efecto desde la primera etapa del estudio y mucho más evidente en el caso de *C. vulgaris* (Fig. 22). En los estudios con esta especie, las eficiencias de eliminación presentan una notable diferencia entre la condición control ($RE_{As,3}$ 14.2% en C_{OM0}) y las otras condiciones estudiadas, con una máxima $RE_{As,3}$ de 3.7% en C_{OM1} . El efecto de la MO en el proceso de biosorción de As se mantuvo a lo largo del tiempo, afectando la eliminación de As durante todo el experimento. La influencia de la MO fue mayor en términos de capacidad de biosorción ($q_{As,72}$ de 2.2 mg/g, 0.8 mg/g, 0.5 mg/g, y 0.02 mg/g en C_{OM0} , C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3} , respectivamente) que en términos de eficiencia de eliminación. Esto se puede relacionar a que la presencia de MO presenta un efecto potenciador sobre el crecimiento de la biomasa, aumentando la concentración final de la biomasa a lo largo del tiempo, alcanzando una menor capacidad de biosorción al final del experimento.

En *S. almeriensis*, la mayor eficiencia de eliminación se obtuvo en la solución control C_{OM0} ($RE_{As,3}$: 32,4%), aunque la eficiencia en esta condición disminuyó durante el transcurso del tiempo hasta alcanzar un valor de $RE_{As,72}$ de 20%, asemejándose al rendimiento observado en las otras condiciones estudiadas (C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3}). Las diferencias en los valores de $q_{As,72}$ calculados en las pruebas de *S. almeriensis* se correlacionaron inversamente con el crecimiento celular, descendiendo de 2,3 mg/g en C_{OM0} a 1,7 mg/g en C_{OM3} . La menor influencia de la MO en la capacidad de biosorción de As observada en *S. almeriensis* en comparación con *C. vulgaris* podría estar fuertemente relacionada con su mayor capacidad de eliminación de TOC, alcanzando bajas concentraciones finales de MO, pero similares en todos los experimentos con esta especie.

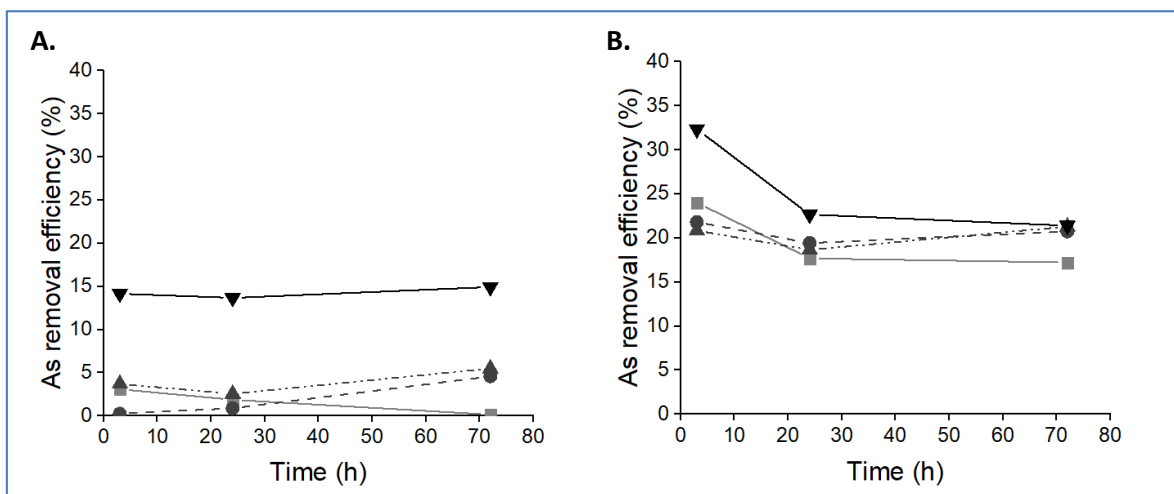


Figura 22. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de As en estudios de biosorción sin adición de CO_2 bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con cultivos de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B), a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. (—▼—): C_{OM0} (control); (-▲-): C_{OM1} (40 mg de peptona/L y 27,5 mg de extracto de carne/L); (· · ·): C_{OM2} (80

mg de peptona/L y 55 mg de extracto de carne /L), y (—■—): C_{OM3} (160 mg de peptona/L y 110 mg extracto de carne/L).

Las capacidades finales de biosorción de As obtenidas en el control de este estudio fueron menores que las obtenidas previamente en el estudio presentado en el apartado 4.2.3., realizado bajo las mismas condiciones de operación, pero sin la adición de minerales (tales como urea y fosfatos) en la composición del medio. Esta disminución podría relacionarse con que estos componentes, principalmente fosfato, pueden competir con los iones de As en el proceso de adsorción, adhiriéndose en los mismos sitios de unión de la biomasa, provocando finalmente una disminución de la capacidad total de biosorción de As en las especies estudiadas (Yamani et al., 2016).

Los estudios de biosorción de B presentaron bajas eficiencias de eliminación y valores relativamente estables a lo largo del tiempo. De todas las condiciones estudiadas, la máxima RE_B alcanzada fue RE_{B,24}: 8,6% en C_{OM1} empleando *S. almeriensis* (Fig. 23). En estudios de *C. vulgaris*, se observa una ligera relación entre la capacidad de biosorción de B y la concentración inicial de MO, alcanzando valores de q_{B,72} de 1,4 mg/g, 2,1 mg/g, 2,3 mg/g y 2,6 mg/g en C_{OM0}, C_{OM1}, C_{OM2} y C_{OM3}, respectivamente. Se han asociado valores similares en la capacidad de biosorción de B en la especie *Chlorella* sp. a pH 7.0, en donde se informó una capacidad de biosorción de 2,7 mg B/g usando esta especie (Taştan, B.E. et al., 2012a). Sin embargo, en el caso de *S. almeriensis* no es posible asociar claramente algún efecto de la concentración de MO sobre la capacidad de biosorción de B, cuyos q_{B,72} alcanzaron valores dentro del rango de 3,2 mg/g en C_{OM0} a 3,7 mg/g en C_{OM2}.

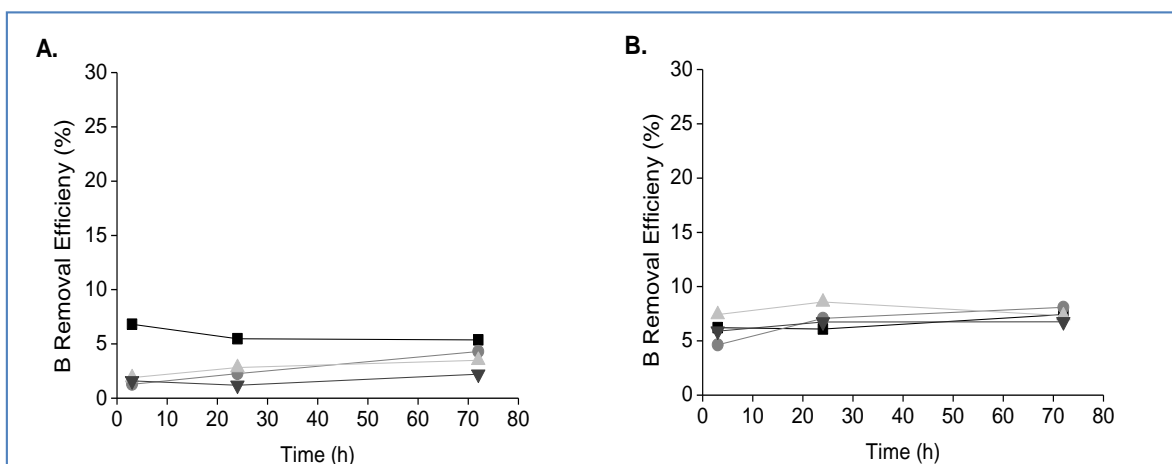


Figura 23. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de B en estudios de biosorción sin adición de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con cultivos de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. (—▼—): C_{OM0} (control); (—▲—): C_{OM1} (40 mg de peptona/L y 27,5 mg de extracto de carne/L); (—◆—): C_{OM2} (80 mg de peptona/L y 55 mg de extracto de carne /L), y (—■—): C_{OM3} (160 mg de peptona/L y 110 mg extracto de carne/L).

En el proceso de biosorción para los cationes metálicos, los estudios de *C. vulgaris* evidenciaron una clara correlación entre la RE de Cu, Mn y Zn; y la concentración inicial de MO, observándose una

relación inversamente proporcional en las primeras horas del estudio (Fig. 24A, C y D). A modo de ejemplo, la $RE_{Cu,3}$ alcanzó valores de 93,6%, 70,9%, 36,7% y 20,7% en C_{OM0} , C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3} , respectivamente. Sin embargo, esta correlación inversa entre RE y la MO no se mantuvo a lo largo del tiempo. En *C. vulgaris*, la RE_{Cu} aumentó con el tiempo de contacto, especialmente en las pruebas con mayor MO inicial ($RE_{Cu,72}$ en C_{OM2} y C_{OM3} > 88.6%). Analizando la capacidad de biosorción, los $q_{Cu,72}$ disminuyen desde los 3,2 mg/g en C_{OM0} hasta los 2,3 mg/g en C_{OM3} . Las RE en *C. vulgaris* también aumentaron con el tiempo en los estudios frente a Mn y Zn, especialmente en la condición C_{OM3} , alcanzando los $RE_{Mn,72}$ y $RE_{Zn,72}$ de 70.8% y 86.4%, respectivamente. El aumento observado en las eficiencias de eliminación para los tres cationes metálicos en condiciones de alta concentración de MO inicial fue probablemente debido a la disminución gradual en la concentración de TOC (Hussain et al., 2017), aunque también gracias al efecto del crecimiento celular, que conlleva el aumento de los sitios de adsorción. Finalmente, el crecimiento de *C. vulgaris* también produjo modificaciones en las capacidades de biosorción frente a Mn y Zn, obteniendo valores de $q_{Mn,72}$ de 2,4 mg/g en C_{OM0} y 1,5 mg/g en C_{OM2} ; y valores de $q_{Zn,72}$ entre los 2,7 mg/g en C_{OM0} hasta los 2,3 mg/g en C_{OM2} .

Del mismo modo, se registraron notables diferencias en las RE de Cu, Mn y Zn durante las primeras 3 h de los estudios con *S. almeriensis* (Fig. 24B, D y F). La RE_{Cu} más alta se obtuvo en las pruebas de control, con valores casi independientes del tiempo de contacto ($RE_{Cu,3}$: 90,1% y $RE_{Cu,72}$: 88%). Las RE_{Cu} obtenidas en C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3} alcanzaron valores similares y con una clara tendencia de aumentar su valor durante el transcurso del tiempo, abarcando valores desde los 39,8% obtenidos en C_{OM1} a las 3 h, hasta los 73% en C_{OM3} a las 72 h. De forma similar, la condición C_{OM0} alcanzó la mayor capacidad de biosorción para el Cu, resultando en un $q_{Cu,72}$ de 2,1 mg/g, mientras que las condiciones C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3} alcanzaron valores de 1,5 mg/g, 1,7 mg/g y 1,6 mg/g, respectivamente. Esta disminución demuestra que un efecto negativo de la MO en la eliminación de Cu, siendo independiente a la concentración inicial de MO agregada en cada condición de estudio.

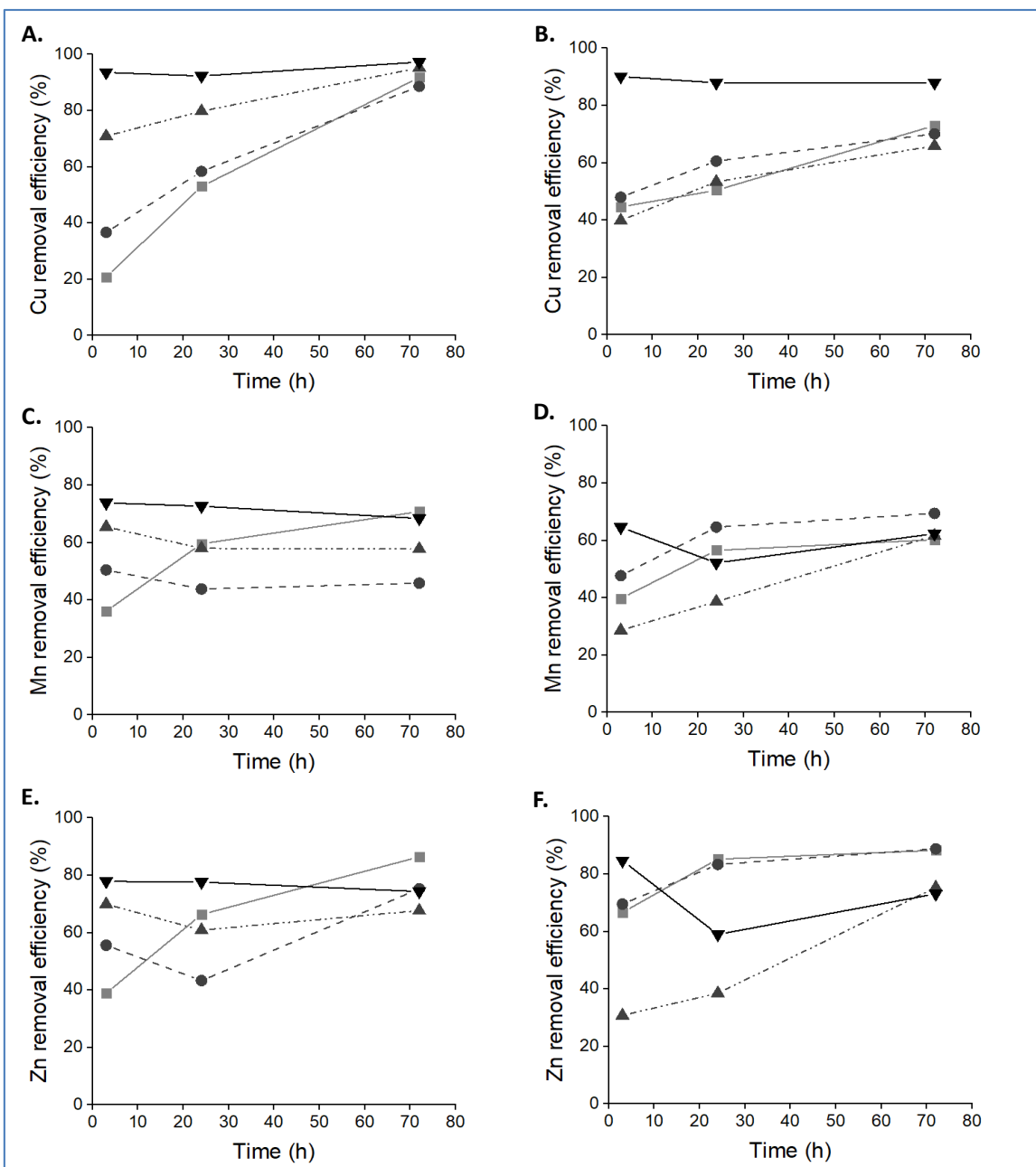


Figura 24. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn) en estudios de biosorción sin adición de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con biomasa de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA), a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. A) CV-Cu; B) SA-Cu; C) CV-Mn; D) SA-Mn; E) CV- Zn; F) SA-Zn. (—▼—): CoM₀ (control); (-▲-): CoM₁ (40 mg de peptona/L y 27,5 mg de extracto de carne/L); (-◆-): CoM₂ (80 mg de peptona/L y 55 mg de extracto de carne/L), y (-■-): CoM₃ (160 mg peptona/L y 110 mg de extracto de carne/L).

En los casos de biosorción de Mn y Zn, las RE_{Mn} y RE_{Zn} más bajas se obtuvieron en CoM₁, con valores de RE_{Mn,3} y RE_{Zn,3} de 28,6% y 30,7%, respectivamente. Aunque las RE_{Mn} y RE_{Zn} aumentaron con el

tiempo en las pruebas realizadas con presencia de MO, estas disminuyeron en las pruebas de control, finalizando el estudio con valores similares de RE_{Mn} y $q_{Mn,72}$ ($\approx 63\%$ y $1,6 \text{ mg/g}$) en todas las condiciones estudiadas. En el caso particular del Zn, el proceso de biosorción alcanzó valores de $RE_{Zn,72}$ de $\sim 74\%$ y $q_{Zn,72}$ de $\sim 2,0 \text{ mg/g}$ en las condiciones de baja MO inicial (C_{OM0} y C_{OM1}), mientras que en condiciones con alta MO (C_{OM2} y C_{OM3}) se obtuvieron $RE_{Zn,72}$ de $\sim 88\%$ y $q_{Zn,72}$ de $2,4 \text{ mg/g}$.

La nula presencia de precipitados en las muestras recogidas en todos los muestreos obtenidos a lo largo de este experimento descarta algún posible efecto de precipitación. El incremento de la solubilidad de los cationes metálicos observado en este estudio se puede asociar directamente con la alta concentración de borato presente en la SMM (Beckett, 2016; Graff et al., 2017).

Analizando las capacidades de biosorción en función de las masas totales de los componentes adsorbidos al final del experimento, se puede observar que ambas especies alcanzaron valores similares de biosorción. La máxima capacidad de biosorción se alcanzó en la prueba C_{OM0} , presentándose este efecto en ambas especies de microalgas. A las 72 h, la capacidad total de biosorción de *C. vulgaris* varió entre los $11,9 \text{ mg/g}$ en C_{OM0} y los $9,2 \text{ mg/g}$ en C_{OM3} , mientras que en los estudios de *S. almeriensis* esta capacidad alcanzó valores entre los $11,2 \text{ mg/g}$ en C_{OM0} y los $10,4 \text{ mg/g}$ en C_{OM3} . Los resultados mostraron claramente una influencia negativa de la concentración de la MO en la capacidad de biosorción de microalgas para la SMM estudiada. Sin embargo, la influencia de varios factores asociados al proceso de biosorción produjo un efecto combinado, modificando el alcance del efecto de la MO a lo largo del tiempo (Fig. 25). Los resultados demuestran que, a mayor concentración de MO en la SSW, el efecto tóxico de los MP en las microalgas disminuye. Esta disminución favoreció el crecimiento celular de las microalgas, lo cual trae consigo un ligero aumento del pH del medio y un importante consumo de TOC desde el medio. Por consiguiente, al producirse una disminución en la concentración TOC, el efecto negativo asociado con la concentración de MO en el proceso de biosorción también disminuye. Las diferencias finales observadas en la capacidad total de biosorción entre C_{OM0} y C_{OM3} a las 72 h pueden estar directamente relacionadas con el severo efecto que la MO indujo en la biosorción de As, debido a que este proceso de biosorción en particular resultó ser el único cuya interferencia por la presencia de la MO se mantuvo estable a lo largo del tiempo. Finalmente, Se recomienda abordar futuros estudios con el fin de analizar las posibles respuestas metabólicas que presentan las microalgas frente a los MP, con el fin de optimizar y escalar este proceso.

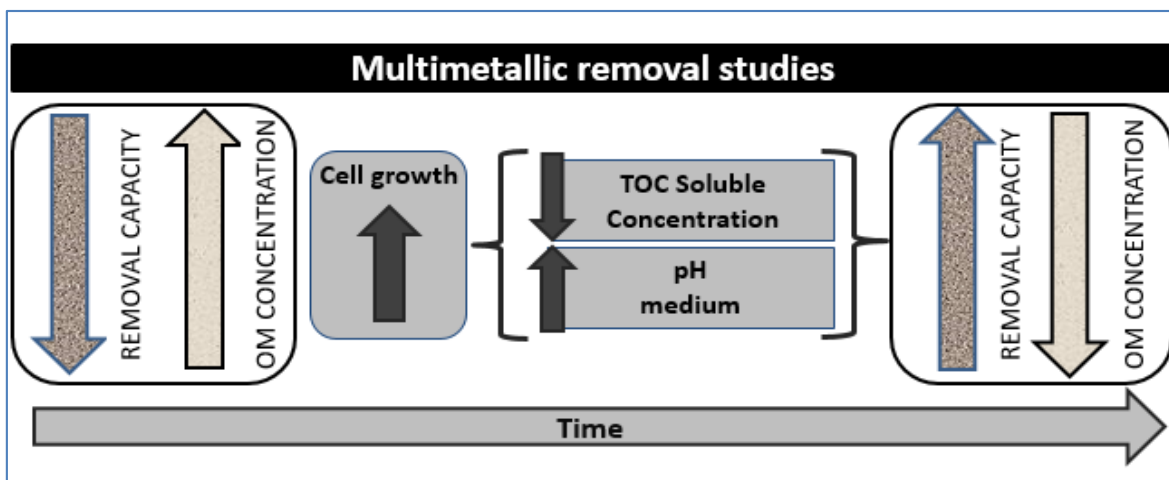


Figura 25. Correlación esquemática de la materia orgánica (MO), crecimiento celular, concentración de TOC y el pH del medio en la capacidad de eliminación de la biomasa microalgal para la solución multimetálica.

5.3. EFECTO DE LA MO EN EL PROCESO DE BIOSORCIÓN DE MP DESDE UNA SOLUCIÓN MULTIMETÁLICA CON ADICIÓN DE CO₂

Otra variable considerada en el estudio del efecto de la MO en el proceso de biosorción fue la incorporación de CO₂ al interior del sistema. La elección de esta variable fue producto del interés de direccionar el estudio de biorremediación a los sistemas de descontaminación de aguas empleando fotobiorreactores, en donde habitualmente se adiciona CO₂ en los procesos de depuración. De igual modo en el apartado 5.2, los resultados de las variables estudiadas: pH, crecimiento celular y concentración de TOC soluble, fueron incorporados en la discusión, considerando la influencia de estas variables en el proceso de biosorción del sistema multimetálico.

La adición de CO₂ en los experimentos de biosorción produjo una disminución del valor de pH en todos los estudios analizados, modificándose desde la neutralidad inicial hasta un valor de ≈ 5.2 a las 24 h de estudio, independientemente de la especie microalgal estudiada. Esta acidificación del medio puede ser directamente atribuida a la disolución de CO₂ dentro del medio de cultivo (Hu et al., 2012). Se observó una leve correlación entre el valor final de pH con la concentración inicial de MO, registrándose los valores de pH más altos en las pruebas cuyas concentraciones iniciales de MO fueron más altas. A las 72 h, estos valores fluctuaron dentro del rango de pH 5.1 – 5.5, en todas las condiciones planteadas.

Los estudios de *C. vulgaris* con adición de CO₂ presentaron una disminución de la concentración de la biomasa a lo largo del tiempo. Los resultados de las SST arrojaron una disminución de un 10,2% en C_{OM0}, 15,3% en C_{OM1}, 8% en C_{OM2} y 4,1% en C_{OM3}. Estos resultados sugieren un decaimiento celular producto de las altas concentraciones de CO₂ alcanzadas en el medio y al bajo pH del medio alcanzado (< 5.5) (Hussain et al., 2017). Por el contrario, los estudios desarrollados con *S. almeriensis* presentaron tasas de crecimiento positivas en todas las condiciones estudiadas, a pesar del bajo pH presentado. De hecho, los estudios de SST arrojaron un incremento en la concentración de la

biomasa que va desde un 19,4% en C_{OM0} hasta un 53,1% en C_{OM3} . Estos resultados confirman una capacidad de crecimiento mayor y una superior tolerancia de la especie *S. almeriensis* sobre *C. vulgaris*, encontrada también en los estudios sin adición de CO_2 .

Por otro lado, los estudios de *C. vulgaris* presentaron un sostenido y notable incremento en la concentración de TOC soluble en el medio. A las 72 h de iniciado el estudio, las concentraciones de TOC alcanzaron valores 676,4%, 348,4%, 179,1% y 117,7% más altos que los observados al tiempo inicial en las condiciones C_{OM0} , C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3} , respectivamente (Fig. 21C). Este elevado crecimiento puede estar asociado tanto a un decaimiento celular como a la activación de mecanismos de protección frente al estrés oxidativo, los cuales producen la exudación de metabolitos orgánicos con el fin de proteger la estructura celular, incrementando de esta forma la concentración de MO en el medio (Mohamed, 2008). Los estudios de *S. almeriensis* también presentaron un incremento en las concentraciones de TOC, aunque el aumento resultante presentó un menor alcance que los observados en *C. vulgaris*. A las 72 h, la concentración de TOC alcanzó valores sobre un 327,7%, 232,1% y 133,8% superior a la presentada al tiempo inicial en los estudios C_{OM0} , C_{OM1} y C_{OM2} , respectivamente (Fig. 21D). La excepción a esta regla se encontró en el estudio de C_{OM3} , donde al término del estudio esta condición alcanzó una eficiencia de eliminación de TOC del 34,4%. El aumento moderado en la concentración de TOC junto con el crecimiento celular observado de los estudios de *S. almeriensis* podría estar asociado a la excreción de metabolitos, aunque en un grado menor al observado en *C. vulgaris* (Wang et al., 2010a). Finalmente, las concentraciones finales de TOC en esta especie alcanzaron valores similares (~ 78 mg/L), independientemente de la condición inicial (C_{OM1} , C_{OM2} y C_{OM3}).

El proceso de biosorción de As fue severamente afectado por la adición de CO_2 , especialmente en los experimentos desarrollados con *C. vulgaris* (Fig. 26A). Se alcanzaron bajísimos rendimientos de eficiencia de eliminación (< 4 %) independientemente de las condiciones estudiadas. La máxima capacidad de biosorción para As alcanzó los 0,6 mg/g, obtenida en C_{OM1} , a las 72 h. En los estudios de *S. almeriensis*, la capacidad de biosorción de As también sufrió una importante disminución, especialmente a altos tiempos de contacto ($q_{As,72}$ de 0,06 mg/g en C_{OM1} , y 0,1 mg/g en C_{OM2} y C_{OM3}) (Fig. 26B). Solo el estudio control presentó una eficiencia de eliminación de As relevante, la cual alcanzó valores desde van desde los 25,4% a 3 h hasta los 15,6% a 24 h, resultando en una $q_{As,72}$ de 1.9 mg/g.

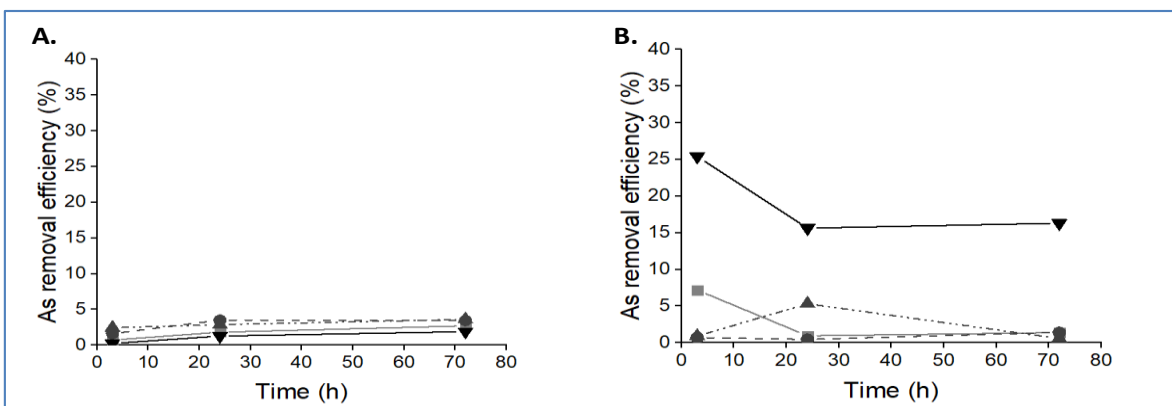


Figura 26. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de As en estudios de biosorción con adición de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. (—▼—): C_{0M0} (control); (---▲---): C_{0M1} (40 mg de peptona/L y 27,5 mg de extracto de carne/L); (—●—): C_{0M2} (80 mg de peptona/L y 55 mg de extracto de carne /L), y (—■—): C_{0M3} (160 mg de peptona/L y 110 mg extracto de carne/L).

Del mismo modo, la adición de CO₂ resultó en menores eficiencias de eliminación de B por *C. vulgaris*. Los valores de RE_{B,72} fueron del orden del \approx 3% y la máxima capacidad de biosorción alcanzó solo un q_{B,72} de 1,8 mg/g en C_{0M3} (Fig. 27). El efecto del CO₂ en la eliminación de B fue menor en los estudios de *S. almeriensis*, cuyas tasas de RE_B alcanzan valores que van entre los 4,0% en C_{0M2} a 3 h hasta los 6,4% en C_{0M0} a 72 h. Las capacidades finales de biosorción de B de *S. almeriensis* disminuyeron con la concentración de MO, desde los 3,3 mg/g alcanzados en C_{0M0} hasta los 2,4 mg/g en C_{0M3} (considerando el crecimiento celular). El menor efecto del adición de CO₂ sobre la captación de B podría asociarse con la alta solubilidad que presentan los complejos boratos en las soluciones moderadamente ácidas, como las obtenidas en esta tanda de experimentos (Guan et al., 2016). Por lo tanto, las diferencias en la eliminación de B pueden asociarse directamente con la competencia de H⁺ en los sitios activos en el proceso de adsorción en la biomasa microalgal.

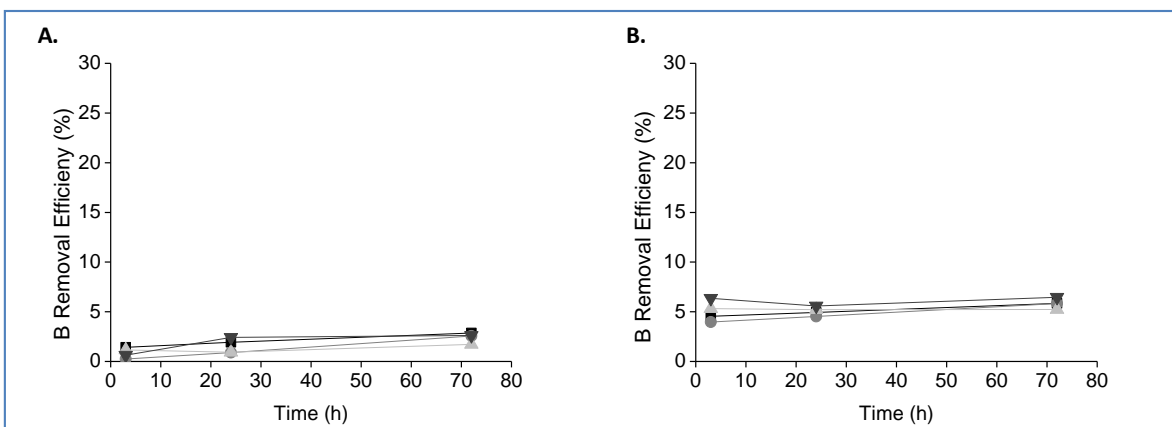


Figura 27. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de B en estudios de biosorción con adición de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. (▼): C_{0M0} (control); (▲): C_{0M1} (40 mg de peptona/L y 27,5 mg de extracto de carne/L); (●): C_{0M2} (80 mg de peptona/L y 55 mg de extracto de carne /L), y (■): C_{0M3} (160 mg de peptona/L y 110 mg extracto de carne/L).

La adición de CO₂ también redujo las RE para los procesos de biosorción de Cu, Mn y Zn, siendo C_{0M0} la condición más afectada en los estudios de *C. vulgaris* (Fig. 28 A, C, E). En esta condición, las RE_{Cu,3}, RE_{Mn,3} y RE_{Zn,3} alcanzaron los 83,5%, 43,4% y 40,1%, disminuyendo hasta alcanzar los valores de 55,2%, 9,3% y 0,6% a las 72 h, respectivamente. El efecto de la adición de CO₂ fue menos pronunciado en condiciones con concentraciones más altas de MO, donde las RE_{Cu}, RE_{Mn} y RE_{Zn} permanecieron más altas que las alcanzadas en la prueba de control, pero más bajas que las registradas en pruebas sin adición de CO₂. Esta reducción en la RE de Cu, Mn y Zn podría asociarse con la desintegración celular debida a la acidificación del pH causada por la adición de CO₂ en el medio. La eliminación de Cu a las 3h fue la única excepción a esta tendencia general, con eficiencias que disminuyeron con la concentración de MO de cada condición, alcanzando valores similares o incluso superiores a los obtenidos en estudios sin la adición de CO₂. Las tendencias obtenidas en las capacidades de biosorción fueron idénticas a las observadas en las eficiencias de eliminación (relación directa con la MO) producto de la disminución en la concentración de *C. vulgaris* en esta condición experimental. Las capacidades finales de biosorción oscilaron entre los 2,0 mg/g en C_{0M0} hasta los 2,8 mg/g en C_{0M3} para Cu; los 0,3 mg/g en C_{0M0} a los 1,8 mg/g en C_{0M3} para Mn; y a partir de los 0,03 mg/g en C_{0M0} hasta los 2,9 mg/g en C_{0M3} para Zn.

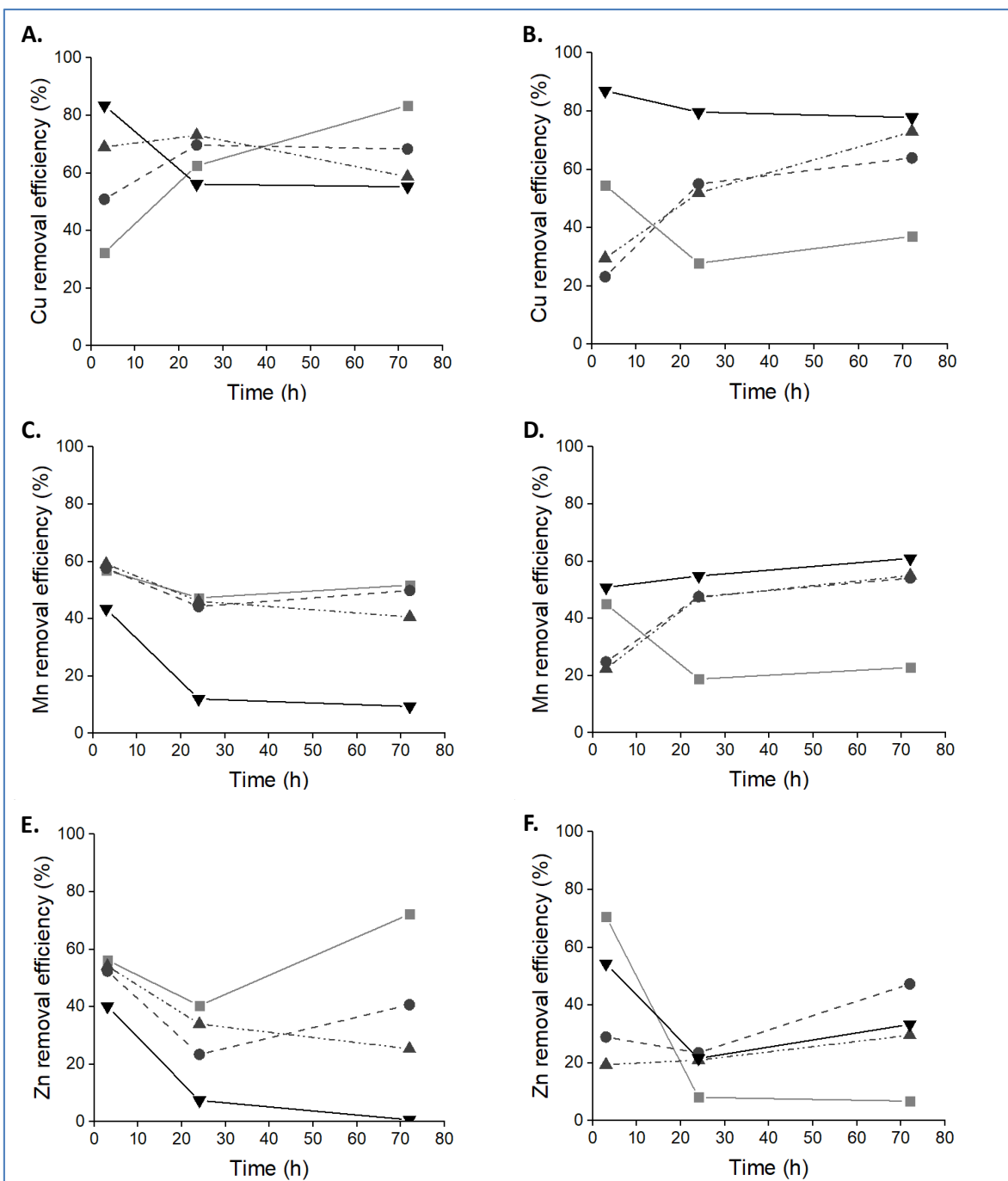


Figura 28. Evolución de la eficiencia de eliminación (%) de cobre (Cu), manganeso (Mn) y zinc (Zn) en estudios de biosorción con adición de CO₂ bajo diferentes concentraciones iniciales de MO, realizados con cultivos de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA) a una concentración de 1g SST/L y pH 7.0. A) CV-Cu; B) SA-Cu; C) CV-Mn; D) SA-Mn; E) CV- Zn; F) SA-Zn. (—▼—): COM0 (control); (---▲---): COM1 (40 mg de peptona/L y 27,5 mg de extracto de carne/L), (---●---): COM2 (80 mg de peptona/L y 55 mg de extracto de carne/L), y (—■—): COM3 (160 mg peptona/L y 110 mg de extracto de carne/L).

Por otro lado, la reducción en la eficiencia de eliminación obtenida en los estudios de *S. almeriensis* con adición de CO₂ se vio incrementada con la concentración inicial de MO (Fig. 28 B, D, y F). Los resultados a 3 h presentaron la única excepción a esta regla, alcanzando tasas de RE más altas para Cu, Mn y Zn en la condición C_{OM3}. En estas pruebas, las eficiencias de eliminación disminuyeron de 54,6%, 45,0% y 70,6% a las 3 h al 27,8%, 18,8% y 8,0% a las 24 h, respectivamente. El proceso de biosorción más afectado por la adición de CO₂ fue el asociado al Zn, el cual vio fuertemente afectada sus tasas de RE independientemente de la concentración inicial de MO. Las capacidades de biosorción de Cu, Mn y Zn en *S. almeriensis* mostraron una correlación inversa con la concentración inicial de MO, con valores que disminuyeron desde los 2,1 mg/g en C_{OM0} a 0,8 mg/g en C_{OM3} para Cu, de 1,7 mg/g en C_{OM0} a 0,5 mg/g en C_{OM3} para Mn, y de 1,0 mg/g en C_{OM0} a 0,2 mg/g en C_{OM3} para Zn. Estos valores fueron más bajos que los obtenidos sin adición de CO₂, registrándose la mayor disminución en las pruebas con C_{OM3}.

De manera contraria a lo esperado (estimulación del crecimiento microalgal y por tanto de la eliminación con la adición de CO₂) los resultados evidenciaron una negativa influencia de la adición de CO₂ en los procesos de biosorción de los MP, tanto con *C. vulgaris* como con *S. almeriensis*. Previamente, tampoco se habían encontrado efectos positivos sobre el crecimiento de la biomasa o la eliminación de nutrientes mediante la adición de CO₂ en estudios de *Chlorella* sp., cultivadas en aguas residuales que contienen altas concentraciones de MO en un sistema de fotobiorreactor cerrado (Min et al., 2011). De hecho, estudios previos han determinado que la concentración óptima de CO₂ en estudios con *Chlorella vulgaris* P12 es de un 6.5% (Anjos et al., 2013), difiriendo en gran parte con las altas tasas de crecimiento encontradas en los cultivos de *Scenedesmus* sp., a una concentración de 20% de CO₂ (Tang et al., 2011). Los estudios presentados sugieren que las altas concentraciones de CO₂ pueden inducir diferentes vías metabólicas entre las especies, afectando importantemente la influencia de la MO en los procesos de biosorción de MP en general. Esto se refleja directamente en la importante diferencia observada entre las capacidades totales de biosorción para cada especie microalgal, presentando un efecto opuesto en el alcance total del proceso. Al final del experimento, la capacidad total de biosorción de *C. vulgaris* aumentó linealmente con las concentraciones iniciales de MO, abarcando una capacidad que va desde los 4,4 mg/g en C_{OM0} hasta los 9,7 mg/g en C_{OM3}, mientras que en los estudios de *S. almeriensis*, la capacidad de biosorción total disminuyó de 9,7 mg/g en C_{OM0} a 3,9 mg/g en C_{OM3}. Las contrarias respuestas observadas en el crecimiento microalgal frente a la adición de CO₂ en el medio, producto de los diferentes mecanismos de tolerancia de cada especie, podrían explicar este efecto.

Las diferencias encontradas entre las dos especies de microalgas puras en este estudio advierten sobre el riesgo de extrapolar los resultados de biosorción de especies puras en estudios de consorcios microalga-bacterias, como las que crecen en los fotobiorreactores para estudios de tratamientos de aguas residuales. Aun así, estos resultados indican que las microalgas podrían eliminar de manera eficiente los MP presentes en el agua, siempre y cuando este se encuentre con un bajo contenido de MO, como el caso del agua del río Loa. Sin embargo, su efectividad podría disminuir en tratamientos con fotobiorreactores con un alto contenido de MO, y que generalmente son mantenidos con adición de CO₂. Se requieren más experimentos in situ que estudien la

biosorción de MP en fotobiorreactores con aguas residuales, a fin de comprender completamente el proceso real de la biosorción de MP en este sistema. Sin embargo, la biomasa microalgal sería un efectivo complemento de bajo costo para la etapa de purificación, presentada en la etapa final del proceso de descontaminación de aguas residuales.

5.4. RECUPERACIÓN DE MP ADSORBIDOS POR LA BIOMASA MICROALGAL

El proceso de recuperación de los metales es considerado como un factor clave para brindar sustentabilidad al proceso global de la biorremediación, mejorando la viabilidad económica y valorización al proceso. En este apartado se analizó la capacidad de recuperación de los metales biosorbidos por la biomasa, comparando la eficiencia de tres tipos de eluyentes (HCl, NaOH y CaCl₂) a dos concentraciones distintas (0.1 M y 0.2 M) y se evaluó el efecto de la MO en la recuperación.

En los estudios empleando *C. vulgaris*, las tasas de recuperación más altas se alcanzaron usando como eluyente HCl, independientemente de los tiempos de muestreo y sin presentar diferencias significativas ($P > 0.05$) entre las concentraciones 0.1 M y 0.2 M (Fig. 29A). La máxima tasa de eficiencia se logró para la recuperación de As, usando como eluyente HCl 0,1 M ($Y_{R,As,60}$: 89%). De igual forma, las máximas tasas de eficiencia de recuperación de Cu, Mn y Zn se obtuvieron usando HCl 0,2 M, alcanzando máximas Y_R de 81%, 80% y 78%, para Cu, Mn y Zn respectivamente, a los 60 min. La recuperación de B con HCl desde la biomasa de *C. vulgaris* resultó baja, con un rango de Y_R de 15-20%, independientemente del tiempo de contacto. Estos resultados concuerdan con los previamente encontrados en estudios de recuperación con la especie *Halimeda gracilis*, en donde se observaron altas tasas de recuperación de $Y_{R,Cu}$ que van desde 80% a 88%, cuando se aumentó la concentración del eluyente HCl de 0,1 M a 0,2 M con un tiempo de contacto de 60 min (Jayakumar et al., 2015).

En estudios usando *S. almeriensis*, el HCl 0,1 M consiguió las recuperaciones más altas para los MP: As, Cu, Mn y Zn, destacándose una casi absoluta recuperación de Mn y Zn ($Y_R > 99\%$) en los primeros 10 minutos de estudio (Fig. 29B). Por el contrario, la recuperación de B usando HCl de *S. almeriensis* fue baja, aunque mayor en HCl 0,2 M. Sin embargo, exceptuando el proceso de recuperación del B, el aumento de la concentración de HCl de 0,1 M a 0,2 M disminuyó en un 50% las eficiencias de recuperación para todos los MP de la SMM, siendo diferencias estadísticamente significativas ($P = 0.001$). Esto se debió probablemente al daño estructural que sufre la pared celular en presencia de una alta concentración de un ácido fuerte (Abdolali et al., 2015b; Kołodzyńska et al., 2017).

En este contexto, en un estudio de selección de eluyentes desarrollado para la recuperación de Co⁺², Cu⁺² y Zn⁺² a partir de biomasa de *Spirulina platensis*, se comparó el rendimiento de ácidos inorgánicos, sales inorgánicas, agentes quelantes y ácidos orgánicos. Los resultados de este estudio determinaron que las mayores eficiencias de recuperación de metales se obtuvieron utilizando ácidos inorgánicos como eluyente, con tasas de recuperación mayores de 95% para cada metal, empleando HCl 0,1 M como agente de elución (Vannela y Verma, 2006).

Por otro lado, el eluyente NaOH (0,1 M) proporcionó la mayor eficiencia de recuperación de As en estudios con biomasa de *C. vulgaris* ($Y_{R,As,20}$: 93%), una recuperación moderada de Zn ($Y_{R,Zn}$: 40%) y una baja eficiencia de recuperación para el resto de los elementos estudiados (Fig. 29C). En estudios con *C. vulgaris*, el aumento en la concentración de NaOH a 0,2 M mejoró la recuperación de Zn ($Y_{R,Zn,10}$: 55%) aunque disminuyó ligeramente la recuperación de As. Los estudios con *S. almeriensis* proporcionaron menores eficiencias de recuperación que con *C. vulgaris*, presentando sus mayores tasas de recuperación para As ($Y_{R,As,20}$: 70%) usando NaOH 0,1 M y para Cu ($Y_{R,Cu,20}$: 51%) usando NaOH 0,2 M (Fig. 29D). No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en las tasas de recuperación de metales entre las concentraciones de NaOH, por lo que no se puede asociar ningún efecto relacionado con la concentración de NaOH en los estudios con *S. almeriensis*. Por otro lado, las tasas de recuperación de Mn presentan una sustancial diferencia al emplear NaOH como eluyente, resultando ser extremadamente bajas en comparación con los otros eluyentes estudiados. Las tasas de recuperación se encontraron dentro del rango de $Y_{R,Mn} < 8\%$, siendo igual para ambas especies de microalgas y en todas las condiciones analizadas.

Finalmente, el empleo del eluyente $CaCl_2$ resultó en una importante evolución temporal de las eficiencias de recuperación, que aumentaron con el tiempo para todos los elementos estudiados, excepto en el caso del B (Fig. 29E, F). El aumento de la concentración de $CaCl_2$ a 0.2 M logró aumentar las recuperaciones de As y Mn de *C. vulgaris*, alcanzando valores de $Y_{R,As,60}$ y $Y_{R,Mn,60}$ de 77% y 72%, respectivamente. Por otro lado, *S. almeriensis* presentó bajas tasas de recuperación en todos los elementos, aunque la $Y_{R,B,10}$ alcanzada empleando $CaCl_2$ 0.2 M alcanzó un destacable valor de 38%, la máxima eficiencia alcanzada para este elemento a lo largo de este estudio.

En conclusión, los resultados anteriormente mencionados confirman a HCl como el mejor agente eluyente para los estudios de recuperación de la SMM estudiada desde biomasa microalgal, alcanzando elevadas tasas de recuperación en ambas especies de microalgas. Con el objetivo de disminuir los daños causados en la biomasa producto de la acidificación por parte del agente eluyente y fomentar la reutilización de la biomasa en un posterior ciclo de adsorción, se recomienda el empleo de HCl usando una baja concentración y cortos tiempos de contacto (0.1 M, 10 min).

Según los resultados anteriores, se seleccionó a HCl 0.1 M como agente eluyente para la evaluación del efecto de la MO en la recuperación de MP desde la SMM estudiada. La presencia de MO en la SMM dentro de la fase de carga inicial provocó que tanto en los estudios de *C. vulgaris* como *S. almeriensis* se lograra una completa recuperación de As, Cu, Mn y Zn. Cabe destacar que la cinética de la recuperación fue más rápida que la observada en el estudio previo de selección de eluyentes, permitiendo una total recuperación (Y_R : $\sim 100\%$) de As, Cu, Mn y Zn en solo 10 min de tiempo de contacto. En el caso del B, la tasa de recuperación aumentó en *C. vulgaris* ($Y_{R,B,10}$: 26%), aunque disminuyó ligeramente para *S. almeriensis* ($Y_{R,B,10}$: 18%). Por lo tanto, la presencia de MO en el medio facilitó sustancialmente el proceso de recuperación de los MP, favoreciendo así el uso de la biomasa en nuevos ciclos de adsorción/desorción.

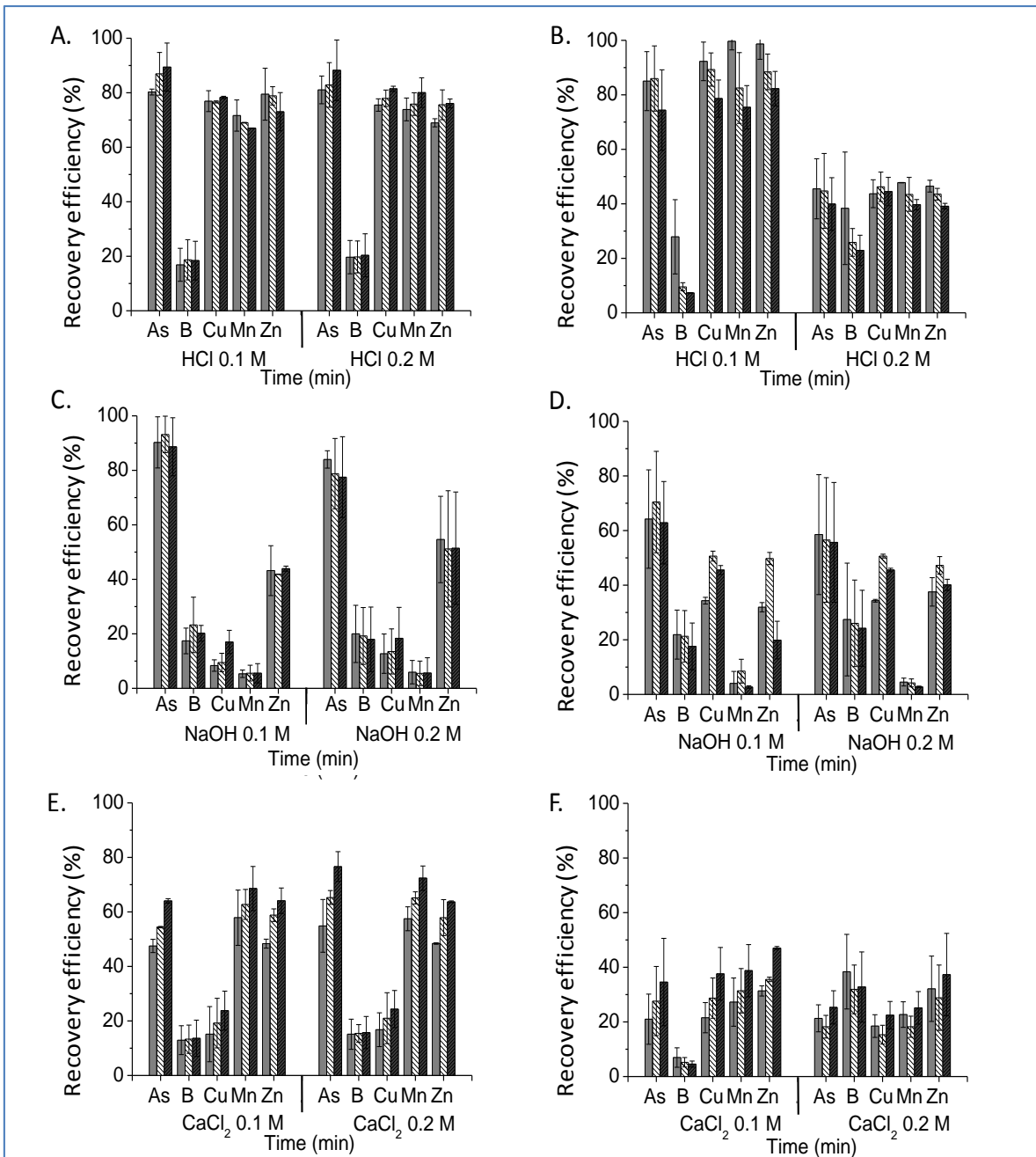


Figura 29. Evolución de la eficiencia de recuperación de los metales pesados de una solución multimetálica (%) en estudios de *C. vulgaris* (CV) y *S. almeriensis* (SA) a una concentración de 1 g SST/L y pH 7.0, usando eluyentes (HCl, NaOH y CaCl₂) a dos concentraciones (0.1 M, 0.2 M). A) CV - HCl, B) SA - HCl, C) CV - NaOH, D) SA - NaOH, E) CV - CaCl₂, F) SA - CaCl₂. (■): 10 min, (▨): 20 min, (■): 60 min.

CAPÍTULO 6.

“ESTUDIO DE BIOSORCIÓN DE UNA SOLUCIÓN MULTIMETÁLICA DE MP POR BIOMASA LIOFILIZADA DE *CHLORELLA VULGARIS* Y *SCENEDESMUS ALMERIENSIS* OPERANDO EN BATCH Y EN COLUMNAS DE LECHO FIJO”

6.1. PRÓLOGO

Los resultados presentados en el capítulo anterior muestran la importante reducción de las eficiencias de eliminación de MP empleando microalgas por la presencia de MO en el medio. Estos resultados llevan a plantearse la conveniencia de utilizar la biomasa microalgal como tratamiento terciario para la purificación de aguas residuales ya tratadas o para la descontaminación de aguas superficiales conteniendo MP, como las aguas del río Loa. El método de contacto más eficiente para un tratamiento únicamente de eliminación de metales por adsorción son las columnas de lecho fijo. Este modo de operación permite tratar importantes caudales de agua, alcanzando porcentajes de eliminación muy elevados. Estas condiciones, sin embargo, no son adecuadas para el crecimiento de las microalgas, por esta razón este estudio se realiza con biomasa muerta. En este contexto, la presente investigación presenta una evaluación de la capacidad de biosorción de biomasa liofilizada proveniente de dos especies de microalgas previamente estudiadas en los Capítulos 4 y 5, *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA), desarrollándose estudios previos en modo batch que proporcionen información para la operación posterior en columnas de lecho fijo.

En los estudios en modo batch, se comparó la capacidad total de biosorción multimetálica de las biomazas muertas, con la sumatoria de los procesos de biosorción monometálica, evaluando la capacidad de eliminación y el efecto del tiempo de contacto. Asimismo, se analizó el efecto de la concentración inicial de la solución multimetálica, y se realizaron estudios cinéticos y de equilibrio. El proceso de biosorción en la columna de lecho fijo se evaluó mediante análisis de curvas de ruptura. Se estudiaron variables como la concentración del afluente y la tasa de flujo. Este estudio permite consolidar el estudio del proceso de biorremediación para una posible aplicación in situ, consiguiendo darle continuidad y aplicabilidad al proceso.

6.2. ESTUDIOS DE EQUILIBRIO CON BIOMASA LIOFILIZADA EN BATCH

Los estudios de biosorción desarrollados con biomasa liofilizada de *C. Vulgaris* y *S. almeriensis* demuestran una importante reducción en la capacidad total de biosorción cuando la determinación se realiza bajo la SMM estudiada. La suma de las capacidades de biosorción individuales obtenidas en soluciones monometálicas alcanzó el valor de 16,6 mg/g y 17,2 mg/g usando *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente. Estos valores resultan notablemente superiores a los 9,46 mg/g y 9,09 mg/g obtenidos cuando se adsorben metales de la solución multimetálica (SMM_{1x}). Si bien las reducciones más relevantes son las observadas en las capacidades de biosorción frente a As y B, la influencia asociada a la presencia de los otros componentes del sistema produce variaciones en todos los procesos, resultando en variaciones específicas para cada constituyente de la SMM (Fig. 30).

Por otro lado, los estudios monometálicos evidenciaron un claro efecto del tiempo sobre la capacidad de biosorción, observándose un aumento a lo largo del proceso para todos los metales estudiados, con excepción del B. Estos incrementos fueron mayores en *C. vulgaris*. La máxima

diferencia alcanzada en esta especie se observó en la eliminación de As, aumentando su RE_{As} desde los $RE_{As,10}$: 18,2% y 12,2%, hasta los $RE_{As,180}$: 29,6% y 21,9%, empleando *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente. Por el contrario, los estudios multimetálicos no observaron variaciones significativas entre las capacidades de biosorción a lo largo del tiempo ($P > 0,35$). En el caso particular del As, esta invariabilidad de la capacidad de biosorción a lo largo del tiempo difiere sustancialmente de la tendencia observada en los estudios realizados con microalgas metabólicamente activas, cuya capacidad de biosorción de As disminuye a las 3 h (sección 3.2.2).

Del mismo modo, los estudios monometálicos presentaron las máximas capacidades de biosorción frente al B, con valores de $RE_{B,10}$ de 14,9% y 15,6%, para *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente. No obstante, a diferencia de los otros elementos estudiados, las capacidades de biosorción de B disminuyeron con el tiempo. Esta disminución fue mayor en *C. vulgaris*, cayendo hasta un $RE_{B,180}$ de 7,4%, en vez de los 11,8% observados en los estudios realizados con *S. almeriensis*. Además, de manera similar al As, la biosorción de B se vio notablemente afectada al realizarse en la SMM. Los valores de RE_B obtenidos en estudios multimetálicos disminuyeron desde una $RE_{B,10}$ de 5,8% y 4,9%, hasta las $RE_{B,180}$ de 2,8% y 4,1%, para las pruebas realizadas con *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente.

Por otro lado, a pesar de continuar presentando mayores capacidades de eliminación en soluciones individuales, el proceso de biosorción multimetálica presenta importantes rendimientos de biosorción frente a Cu, Mn y Zn. En los estudios de Cu, se obtuvieron $RE_{Cu,180}$ de 69,8% y 65,5% en estudios multimetálicos, aunque inferiores a los 86,6% y 77,2% obtenidos en solución individuales, para *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente. La reducción más importante ocurrió en el proceso de biosorción del Mn, donde la interferencia produjo una disminución de casi la mitad de la capacidad presentada en estudios individuales, pasando de un $RE_{Mn,180}$ de 73,8% a un 37,8% empleando *C. vulgaris*. En *S. almeriensis* este efecto también se observó aunque con menor fuerza, reduciendo su $RE_{Mn,180}$ de un 57,8% a un 49,3%. Finalmente, la $RE_{Zn,180}$ disminuyó de los 85,7% y el 85,1% obtenidos en la solución individual de Zn, a los 78,1% y el 77,5% alcanzados en estudios con la SMM, para *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente.

Estos resultados muestran la competencia entre los diferentes metales por los limitados sitios activos encontrados en la superficie del biosorbente (Rodríguez et al., 2012). Otros estudios también han demostrado efectos similares entre MP. Por ejemplo, se demostró una fuerte disminución en la capacidad de biosorción de Zn empleando biomasa seca de las especies *Chara aculeolata* y *Nitella opaca*, reduciéndose desde un 15,2 y 13,4 mg/g obtenidos en una solución monometálica de Zn, hasta los 7,8 y 3,9 mg/g alcanzadas en una solución multimetálica compuesta por [Zn - Cd - Pb] (Sooksawat et al., 2017). El detrimento de la capacidad de biosorción asociada a la interferencia por otros elementos obtuvo diferentes magnitudes para cada componente de la SMM, clasificándose en este estudio en particular con un orden descendente, en: As > B > Mn > Cu > Zn.

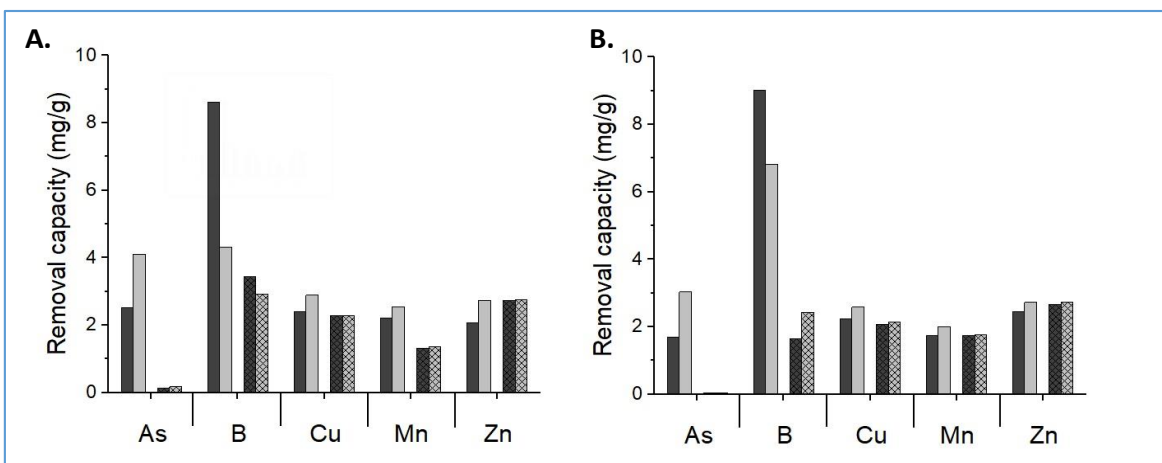


Figura 30. Comparación de capacidades de biosorción (mg/g) entre soluciones individuales y obtenidas en solución multimetálica (SMM), en estudios empleando biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B), a una concentración de 1 g/L y pH 7.0. (■): Solución individual, 10 min; (▒): Solución individual, 180 min; (■): Solución multimetálica, 10 min; (▒): Solución multimetálica, 180 min

El proceso de biosorción fue significativamente influenciado por la concentración inicial de la SMM, aumentando exponencialmente la capacidad total de biosorción al aumentar la concentración de SMM_{1x} a SMM_{4x} (Fig. 31). En los estudios desarrollados con *C. vulgaris*, la capacidad de biosorción total alcanzó los 9,46 mg/g para SMM_{1x}, 16,82 mg/g para SMM_{2x} y 56,05 mg/g para SMM_{4x}, con similares magnitudes a los obtenidos en los estudios con *S. almeriensis*, cuyas capacidades de biosorción alcanzaron los 9,09 mg/g, 17,39 mg/g y 56,27 mg/g a las concentraciones SMM_{1x}, SMM_{2x} y SMM_{4x}, respectivamente.

Este importante aumento en la capacidad de biosorción se puede relacionar directamente con la fuerza motriz producida por las altas concentraciones iónicas de las soluciones estudiadas, las cuales prevalecen sobre los efectos de transferencia de resistencia de masa producidas por los iones de los MP implicados en el proceso general de biosorción (Abdulaziz y Musayev, 2017). Asimismo, se observan notables diferencias en la composición fraccional (asociada a la capacidad de biosorción sobre cada componente de la SMM) en las diferentes concentraciones de SMM. Estas diferencias presentadas en las composiciones totales resultaron similares en ambas especies de microalgas (Fig. 31).

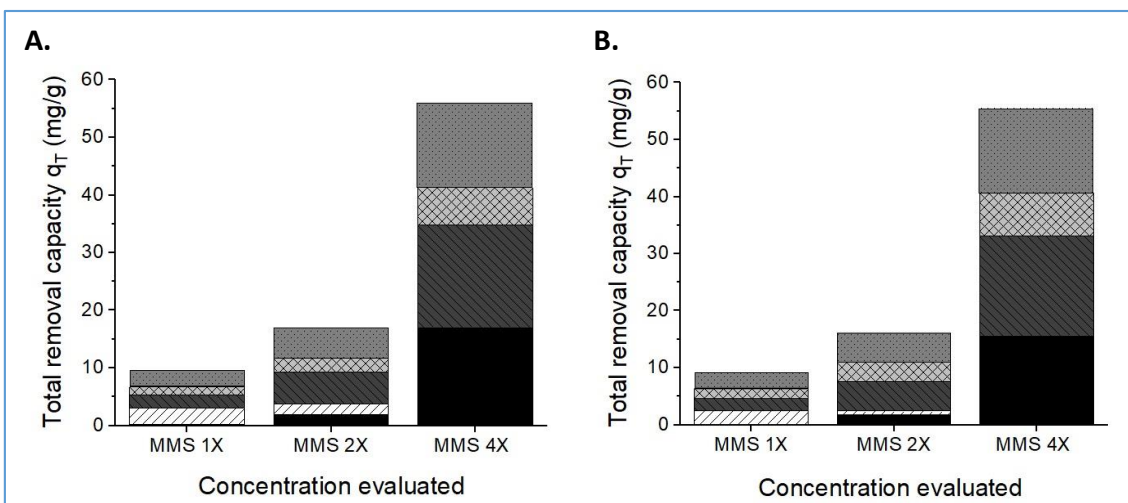


Figura 31. Capacidad total de biosorción (mg/g) de la biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B) a diferentes concentraciones de una solución multimetálica, desarrollado a una concentración de 1 g/L, a pH 7.0 y un tiempo de contacto de 180 min. (■): Arsénico, (▨): boro, (■): cobre, (▩): manganeso y (▤): zinc.

La biosorción de As mostró una correlación directa con la concentración de SMM, aumentando extraordinariamente su RE_{As} a mayor concentración de la SMM utilizada. En la menor concentración estudiada (SMM_{1X}), la fracción asociada a As fue insignificante, con valores de $RE_{As,180}$ de 1,2% y 0,3%. Sin embargo, esta fracción aumentó a 6,6% y 6,1% en SMM_{2X} , y alcanzó su máximo valor en SMM_{4X} , con $RE_{As,180}$ de 27,8% y 25,5% y valores de $q_{As,180}$ de 16,83 mg As/g y 15,40 mg As/g, en estudios desarrollados con *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente. Este aumento convierte al As en el segundo elemento más eliminado en los estudios de SMM_{4X} , representando el 30% y el 28% de la capacidad total de biosorción, respectivamente (Fig. 31).

Por el contrario, cuando las concentraciones de la SMM se hicieron mayores, el proceso de biosorción de B mostró una drástica disminución. En los estudios con SMM_{1X} , el $q_{B,180}$ alcanzó valores de 2,92 mg B/g para *C. vulgaris* y de 2,43 mg B/g para *S. almeriensis*, representando la fracción más alta entre los constituyentes de la SMM_{1X} (Fig. 32). Sin embargo, el B captado disminuyó a 1,92 mg B/g y 1,93 mg B/g en SMM_{2X} y resultó casi nulo en SMM_{4X} , alcanzando una capacidad de solo un 0,17 mg B/g y 0,89 mg B/g en los estudios con *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente.

El crecimiento de la capacidad total de biosorción también afectó a los procesos de eliminación de Cu, Mn y Zn. En *C. vulgaris*, el $RE_{Cu,180}$ aumentó de 69,8% en SMM_{1X} a 77,6% en SMM_{2X} , y se posicionó con el máximo rendimiento en SMM_{4X} , con un notable 96,2%. Este valor fue el máximo alcanzado entre los componentes de la SMM en todas condiciones estudiadas. La misma tendencia se observó en los estudios de *S. almeriensis*, aunque con capacidades ligeramente más bajas que las obtenidas por *C. vulgaris*. Los valores finales de $q_{Cu,180}$ alcanzaron los 2,28 mg/g, 5,55 mg/g y 17,77 mg/g obtenidos con *C. vulgaris*; y los 2,13 mg/g, 5,20 mg/g y 17,51 mg/g alcanzados con *S. almeriensis*, en las concentraciones SMM_{1X} , SMM_{2X} y SMM_{4X} , respectivamente.

De manera similar, la biosorción de Mn y Zn aumentó linealmente con la concentración de la SMM, aunque alcanzando menores rendimientos que los observados en el proceso de biosorción de Cu. En el caso del Mn, los rendimientos más altos se encontraron en los estudios de *S. almeriensis*, cuyos valores de $q_{Mn,180}$ alcanzaron los 1,76 mg/g, 3,33 mg/g y 7,57 mg/g empleando SMM_{1x}, SMM_{2x} y SMM₄, mientras que en *C. vulgaris* se obtuvieron capacidades de 1,35 mg/g, 2,31 mg/g y 6,55 mg/g, respectivamente.

Estos menores aumentos de capacidad de eliminación de Mn y Zn, llevaron a eficiencias de eliminación de estos elementos menores en SMM_{2x} que en SMM_{1x}, aunque volvieron a aumentar para SMM_{4x} alcanzando valores de $RE_{Mn,180}$ y $RE_{Zn,180}$ de 32,7% y 72,8% en *C. vulgaris* y 47,2% y 73,5% en *S. almeriensis*, respectivamente. A pesar de esto, el fuerte incremento observado en la capacidad total de eliminación en SMM_{4x} favoreció el aumento de los valores de RE_{Mn} y RE_{Zn} en SMM_{4x}, alcanzando sus máximas RE de 44,2% y 51,1% para *C. vulgaris*, y 86,8% y 87,8% para *S. almeriensis*.

Los resultados demuestran que la concentración inicial de la SMM es un factor determinante en el proceso de biosorción, pudiendo modificar la capacidad total y fraccional producida por la biomasa microalgal para los sistemas multimetálicos. Las interacciones entre los sitios de unión entre la superficie de la biomasa y las especies iónicas dependen directamente de las propiedades fisicoquímicas de cada ion metálico, en donde el radio iónico y la electronegatividad de cada elemento juegan un rol preponderante en el proceso de biosorción general (Mendoza-castillo et al., 2018). Los resultados presentados permiten concluir que en los procesos de biosorción multimetálica, los iones con bajo radio iónico consiguen mayores tasas de biosorción en soluciones con baja concentración, favoreciéndose en este estudio la captación de elementos como el B y el Mn. Sin embargo, cuando el proceso de biosorción se desarrolla con una elevada fuerza iónica, los iones con mayor peso atómico son favorecidos, siendo en este caso los MP As, Cu y Zn.

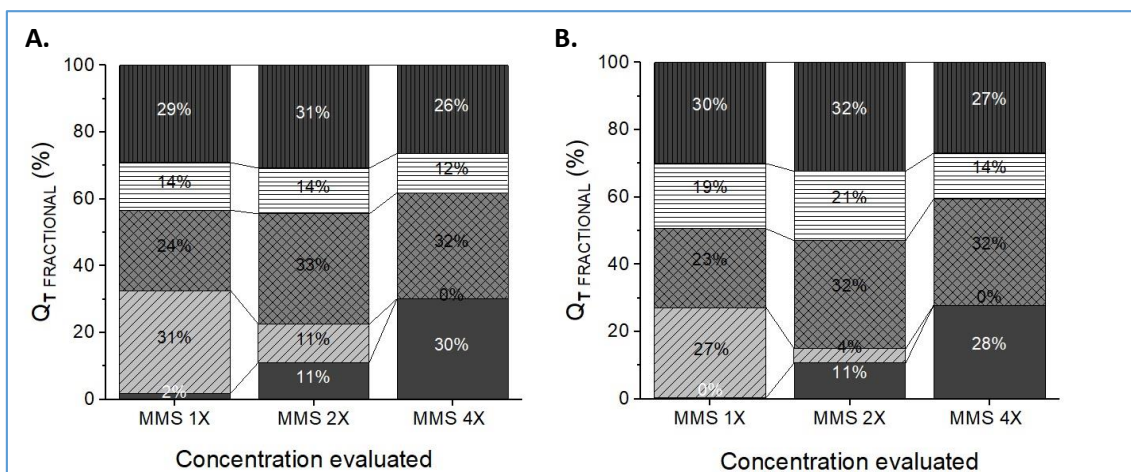


Figura 32. Comparación de la relación fraccional (%) en la capacidad de biosorción multimetálica total (Q_T) a diferentes concentraciones de la SMM, empleando biomasa liofilizada de *Chlorella vulgaris* (A) y *Scenedesmus almeriensis* (B), a 1 g/L, pH 7.0 y a 180 min de tiempo de contacto. (■): As, (▨): B, (▩): Cu, (▧): Mn, and (▦): Zn.

6.3. ESTUDIOS CINÉTICOS DEL PROCESO DE BIOSORCIÓN

Los datos experimentales del proceso de biosorción de la SMM no se ajustaron al modelo cinético de pseudo-primer orden (datos no mostrados). Sin embargo, el ajuste al modelo cinético de pseudo-segundo orden proporcionó muy buenos resultados (Fig. 33). Los valores de los parámetros cinéticos ajustados y sus respectivos coeficientes de regresión se muestran en la Tabla 15.

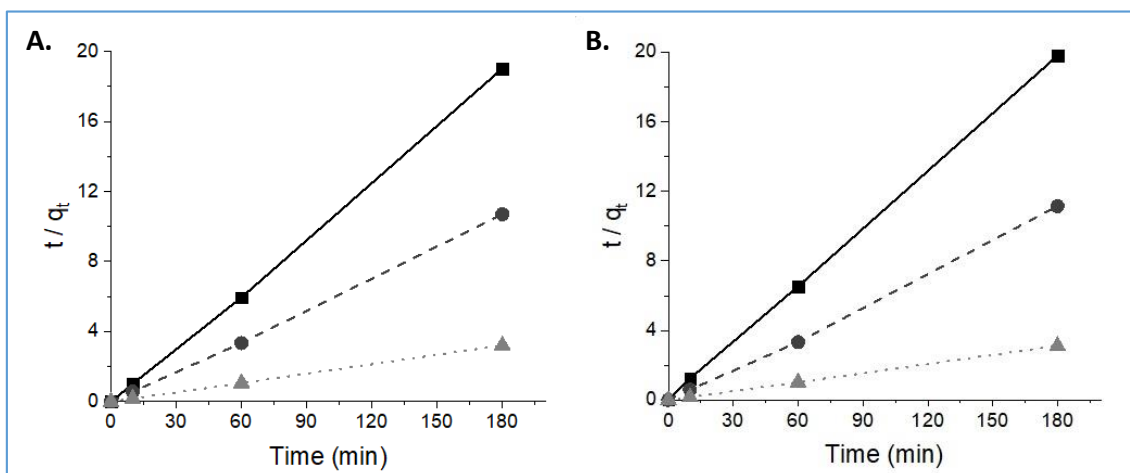


Figura 33. Aplicación del modelo cinético de pseudo-segundo orden en el proceso de biosorción de una solución multimetálica a diferentes concentraciones empleando biomasa liofilizada de A) *Chlorella vulgaris* y B) *Scenedesmus almeriensis*. (■): SMM_{1x}, (●): SMM_{2x}, (▲): SMM_{4x}.

Tabla 155. Parámetros de ajuste y coeficiente de correlación del modelo de pseudo segundo orden en el proceso de biosorción de una solución multimetálica realizadas a diferentes concentraciones mediante el uso de biomazas liofilizadas de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA).

Especie	C ₀	q _{exp}	h	q _e	k ₂	R ²
		mg/g	mg/g*min	mg/g	g/mg*min	
CV	SMM _{1x}	9.46	8.32	9.45	0.09	0.9995
CV	SMM _{2x}	16.82	14.66	16.78	0.05	0.9995
CV	SMM _{4x}	56.05	294.12	56.18	0.09	1
SA	SMM _{1x}	9.09	2.89	9.13	0.03	0.9963
SA	SMM _{2x}	16.16	13.72	16.18	0.05	0.9984
SA	SMM _{4x}	57.77	133.33	55.56	0.04	0.9999

La calidad del ajuste del modelo cinético se puede evaluar mediante los elevados valores del coeficiente de correlación R^2 . La proximidad entre la capacidad máxima experimental y ajustada corrobora la bondad de estos resultados y confirma que el tiempo de 180 horas es suficiente para alcanzar el equilibrio. El modelo de pseudo-segundo orden asume que el control de la velocidad de la cinética de la biosorción se produce por efecto de la quimiosorción (Soto et al., 2017). Este mecanismo involucra fuerzas de valencia a través del reparto o intercambio de electrones entre el adsorbente y el adsorbato (Ali et al., 2016).

La aplicación del modelo de adsorción de Langmuir en el proceso de biosorción de la SMM arrojó un limitado valor en el coeficiente de correlación (R^2), por lo que se podría considerar la invalidez de este modelo para el proceso estudiado (Tabla 16). Sin embargo, el ajuste realizado con el modelo de adsorción de Freundlich, resultó aceptable ($R^2 > 0,95$). Por lo tanto, es posible asumir que el modelo más adecuado para describir los valores de equilibrio alcanzados en el proceso de biosorción de la SMM es el modelo de Freundlich (Fig. 34). Por otro lado, el valor de parámetro $n > 1$ alcanzado en los estudios de *C. vulgaris* permite indicar que este proceso fue fuertemente favorecido, mientras que la obtención del parámetro $n < 1$ en el caso de *S. almeriensis*, considera que el proceso de biosorción bajo esta especie se desarrolló bajo el mecanismo de quimiosorción (Soto et al., 2017). En consecuencia, la biosorción de la SMM bajo estas dos especies microalgales se pueden considerar como un proceso de adsorción no homogénea, lo cual se puede justificar por la desigualdad en la concentración que los sitios de unión presentan en la superficie microalgal, los diferentes tipos de grupos funcionales involucrados en el proceso de biosorción y la diferente afinidad de cada sitio de unión con los componentes de la SMM (Negm et al., 2018).

Tabla 16. Constantes y coeficiente de correlación del modelo de pseudo segundo orden en el proceso de biosorción de una solución multimetálica realizadas a diferentes concentraciones mediante el uso de biomasa liofilizadas de *Chlorella vulgaris* (CV) y *Scenedesmus almeriensis* (SA).

Especie microalgal	Isotermas de Adsorción			
	Langmuir		Freundlich	
	R^2	N	K_F	R^2
CV	0.6722	1.405	3.407	0.9496
SA	0.8321	0.749	4.806	0.9626

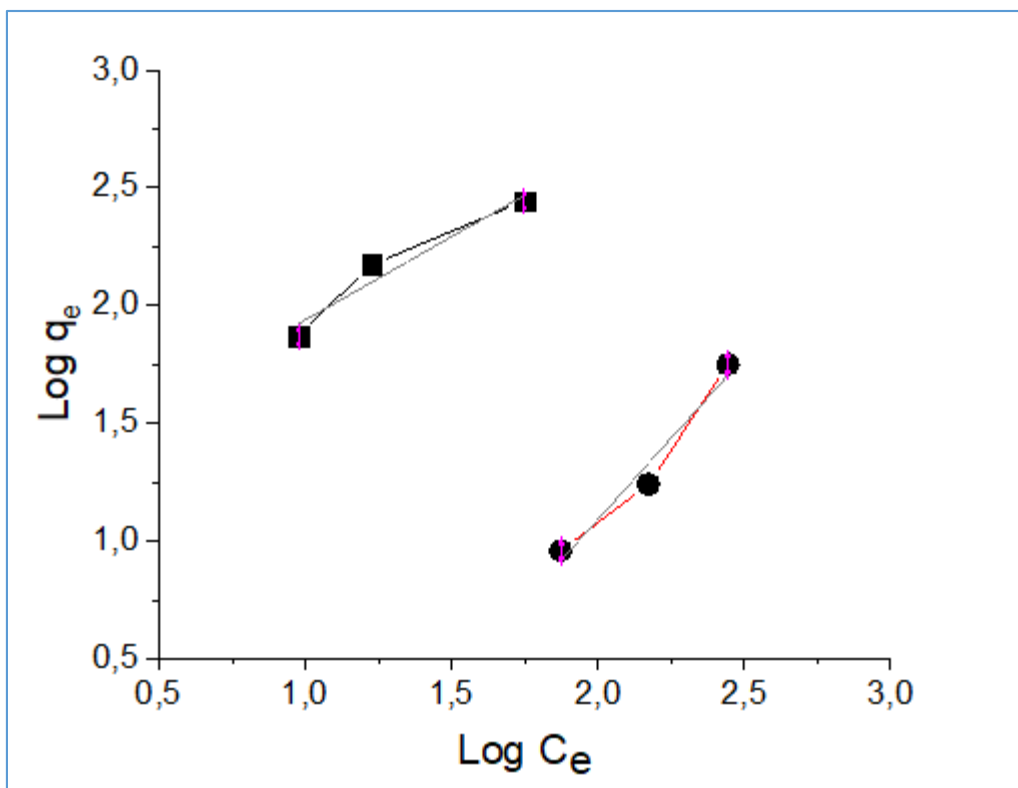


Figura 34. Perfiles de las isothermas de adsorción de Freundlich implicadas en el proceso de biosorción de una solución multimetálica, usando biomasa microalgal liofilizada. (—■—): *Chlorella vulgaris* y (—●—): *Scenedesmus almeriensis*.

6.4. ESTUDIOS PRELIMINARES EN COLUMNAS DE LECHO FIJO

Los resultados del estudio parecen demostrar que no es posible observar una correlación entre el tiempo de ruptura y la concentración del afluente en los estudios multimetálicos desarrollados con biomasa de *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, presentando notables diferencias entre ellas (Fig. 35). Los tiempos de ruptura obtenidos en *C. vulgaris* fueron de 36 min para SMM_{0,5x}, 26 min en SMM_{1x} y 66 min en SMM_{2x}. Sin embargo, el tiempo de agotamiento fue de 180 min, resultando ser independiente de la concentración inicial de la SMM en el afluente. En *S. almeriensis*, los tiempos de ruptura fueron de 11 min en SMM_{0,5x}, 23 min en SMM_{1x} y 20 min en SMM_{2x}, mientras que el tiempo de agotamiento se alcanzó solo en el estudio empleando la SMM_{1x}, a los 210 min. Los menores tiempos de ruptura alcanzados en los estudios empleando *S. almeriensis* están de acuerdo con los menores valores de k₂ encontrados en la Tabla 17, para valores idénticos de q_e. Las dificultades para determinar el efecto de la concentración de la SMM pueden relacionarse directamente con las mayores tasas de biosorción encontradas en el equilibrio en los estudios desarrollados en sistema batch, las cuales aumentan directamente con la concentración del afluente y a las importantes interferencias presentadas en el proceso de adsorción entre los elementos de la SMM, en donde posiblemente el aumento de la concentración modifique el orden de preferencia

de adsorción de cada elemento en la columna de lecho fijo, modificando las tasas de adsorción, y su respectiva cinética, en el proceso general de la SMM.

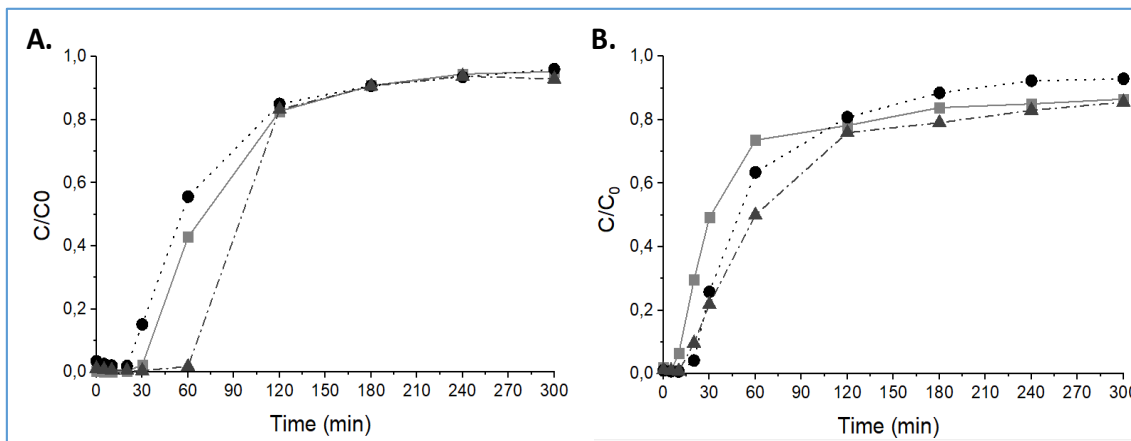


Figura 35. Efecto de la concentración total del afluente de las curvas de ruptura implicadas en el proceso de biosorción de una solución multimetálica usando biomasa microalgal floculada a una tasa de flujo de 3 mL/min A) *Chlorella vulgaris*, B) *Scenedesmus almeriensis*. (—■—): SMM_{0.5X}, (····●····): SMM_{1X}, (---▲---): SMM_{2X}.

Los resultados demuestran una relación inversamente proporcional entre los tiempos de ruptura y agotamiento con las tasas de flujo (Fig. 36). En *C. vulgaris*, el tiempo de ruptura disminuyó desde los 66 min obtenidos en estudios desarrollados a 3 ml/min, hasta los 33 min y 22 min empleando tasas de flujo de 6 ml/min y 9 ml/min, respectivamente. Estos datos son comparables a los reportados para la biosorción de Cu (II) utilizando biomasa de *Spirogyra neglecta* en columnas, en los que el tiempo de ruptura se redujo de 1,5 h a 0,6 h cuando el caudal aumentó de 3 ml/min a 5 ml/min (Singh et al., 2012). La fuerte disminución de la eficiencia producida por el uso de mayores caudales en el proceso de biosorción está relacionada con una importante resistencia del proceso de adsorción haciendo necesario operar con bajas tasas de flujo en este tipo de proceso (Mishra, et al 2016).

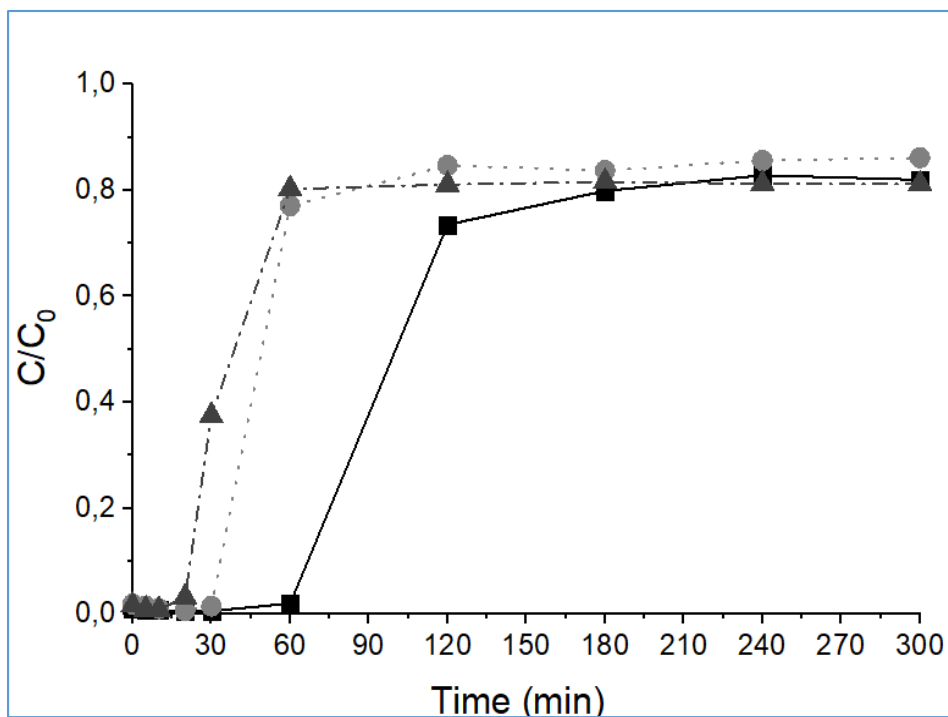


Figura 36. Efecto de la tasa de flujo en las curvas de ruptura implicadas en el proceso de biosorción de una solución multimetálica usando biomasa floculada de *Chlorella vulgaris*, a pH 7.0 y una concentración del afluente de SMM_{2x} . (—■—): 3 ml/min, (···●···): 6 ml/min y (-▲-): 9 ml/min.

CAPITULO 7. CONCLUSIONES

7.1. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados en la presente tesis doctoral demuestran la factibilidad del uso de la biomasa microalgal como agente de biorremediación para la depuración de aguas contaminadas con MP. En particular, se ha demostrado la efectividad de cuatro especies microalgales verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* y *Chlorophyceae* sp., aislada de la zona de estudio en el río Loa) en procesos de depuración biológica sobre los elementos: As, B, Cu, Mn y Zn presentes en soluciones acuosas; analizando factores de operación, procesos de integración y entregando directrices que permitirían brindarle viabilidad a este sistema.

Con los resultados alcanzados en el **Capítulo 4** se sustenta la factibilidad del uso de la biomasa microalgal como agente de biorremediación para la depuración de aguas contaminadas con MP y se define la influencia de los principales parámetros dentro del proceso de biosorción, proyectando una aproximación inicial sobre el mecanismo que debería presentar el tratamiento de las aguas del río Loa. Las pruebas de viabilidad demostraron la tolerancia de las cuatro especies microalgales frente a las máximas concentraciones estudiadas de As (12 mg/L), Mn (6 mg/L) y Zn (6 mg/L). Sin embargo, en los estudios frente a B y Cu se alcanzaron distintos rangos de tolerancia en función de la especie y concentración del elemento. Sorprendentemente, la especie *Chlorophyceae* sp., aislada desde la zona de estudio, resultó ser la especie más sensible frente a B y Cu, con una inhibición del 36% a partir de los 60 mg B/L y un retraso en el crecimiento a 2 mg Cu/L e inhibición total desde los 4 mg Cu/L. *S. almeriensis* presentó inhibiciones de 80% a 120 mg B/L y a 6 mg Cu/L, convirtiendo a *C. vulgaris* y *C. reinhardtii* como las especies más resistentes para B y Cu, respectivamente. Esta variación se asocia principalmente a la alta toxicidad del Cu para el metabolismo microalgal y la elevada concentración de B utilizada en este estudio.

Por otro lado, las pruebas de biosorción lograron demostrar altas tasas de eliminación para todos los elementos estudiados, destacándose los procesos frente a Cu, Mn y Zn. En estudios con concentraciones iniciales de 3 mg/L, las mayores eficiencias de eliminación fueron de un 99,4% para Mn (*C. vulgaris*, pH 7,0, 180 min), 91,9% para Zn (*Chlorophyceae* sp., pH 5,5, 180 min) y 88% para Cu (*Chlorophyceae* sp., pH 7,0, 10 min). Para As, se alcanzó un máximo de 40,7% de eliminación (*S. almeriensis*, pH 9,5, 180 min) desde una concentración inicial de 12 mg As/L, y en el caso del B se alcanzó un 38,6% (*S. almeriensis*, pH 5,5, 10 min) a partir de 60 mg B/L. Además, se determinó que el pH influye individualmente frente a cada elemento, destacándose una mayor eliminación de Mn y Zn a pH 5,5 (*Chlorophyceae* sp., y *S. almeriensis*), y la eliminación de Cu a pH 7,0 (*Chlorophyceae* sp). Los procesos de eliminación de As y B alcanzaron su mayor capacidad de biosorción al menor tiempo de contacto (10 min), demostrando una rápida cinética del mecanismo de adsorción de estos elementos, mientras que el tiempo de contacto favoreció una mayor capacidad de eliminación en los procesos de Cu, Mn y Zn, alcanzando un mejor desempeño a los 180 min de iniciado el experimento.

Por otro lado, la especie *Chlorophyceae* sp., presentó un notable desempeño en los ensayos de biosorción multimetálica (As: 12 mg/L, B: 60 mg/L, Cu, Mn y Zn: 3 mg/L; pH 7,0), aumentando su capacidad de eliminación frente a los elementos estudiados, sin perder la capacidad de biosorber B.

Comparado con los estudios monometálicos, en todas las otras especies la biosorción multimetálica produjo drásticas caídas en la capacidad de eliminar B, alcanzando mínimos de hasta un 0,2% en el caso de *C. reinhardtii*. El hecho que *Chlorophyceae* sp., sea la única especie aislada de la zona contaminada sugiere la presencia de importantes modificaciones metabólicas en esta especie para enfrentar el estrés producido por desarrollarse en medioambientes contaminados. Los estudios de caracterización realizados mediante la técnica de FTIR confirmaron que las mayores interacciones producidas entre la biomasa microalgal y los elementos estudiados se alcanzaron frente a As ($1150-1300\text{ cm}^{-1}$) asociado a los grupos P = O, y a Cu ($3300, 1741, 1535, 1350-1400\text{ cm}^{-1}$) relacionados con los grupos carboxilo y amidas de la superficie microalgal.

Los resultados de este estudio sugieren la no existencia de competencia por los sitios libres presentes en la pared celular de las microalgas, ya que la reducción en la capacidad de biosorción con el tiempo de algunos metales no se vio compensada por el aumento de la biosorción de los otros elementos. De igual modo, confirman la factibilidad del uso de la biomasa microalgal como agente biosorbente para la eliminación de MP del agua.

Posteriormente, con el fin de optimizar y reducir el costo de operación de la técnica de biorremediación microalgal, se estudió la factibilidad de asociar esta técnica al proceso de tratamiento de aguas residuales. Para ello, se estudió la capacidad de biosorción de las especies *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, las cuales fueron previamente analizadas con buenos resultados de biorremediación y son comúnmente utilizadas para tratamiento de aguas residuales, frente a una solución multimetálica compuesta por As: 12, B: 60, Cu, Mn y Zn: 3 mg/L, estudiándose a diferentes concentraciones de MO y CO₂.

Los resultados obtenidos en el **Capítulo 5** evidenciaron que la presencia de MO produce una fuerte disminución en la capacidad de eliminación de los componentes de la solución multimetálica. Los resultados demuestran una disminución de un 22,7% y un 11,1% en las capacidades finales de biosorción por efecto de la presencia de MO, en estudios desarrollados con *C. vulgaris* y *S. almeriensis*, respectivamente. El monitoreo de las variables del sistema (pH, concentración del TOC y crecimiento celular) demostró la presencia de una correlación directa entre la concentración inicial de la MO del sistema con el crecimiento celular y el consumo de TOC. Por esta razón, el efecto negativo asociado con la concentración de MO en el proceso de biosorción se redujo durante el transcurso del experimento. Los procesos específicos más fuertemente afectados por la presencia de MO en el sistema fueron los implicados a la eliminación de As (desde 2,2 a 0,0 mg/g usando *C. vulgaris* y desde 2,3 a 1,7 mg/g usando *S. almeriensis*) y Cu (de 3,2 a 2,3 mg/g en *C. vulgaris* y de 2,1 a 1,6 mg/g usando *S. almeriensis*). Esta variación responde a una respuesta metabólica de las especies, ya que una alta concentración de MO debilita el efecto tóxico de los MP, favoreciendo el crecimiento celular. En consecuencia, la MO es consumida por la biomasa celular, disminuyendo así su concentración en el medio y su efecto negativo asociado al proceso de biosorción.

Del mismo modo, el suministro de CO₂, habitualmente empleado en fotobiorreactores, produjo una disminución de la capacidad total de biosorción en ambas especies de microalgas, reduciendo su capacidad en un 27% (desde 10,1 mg/g a 7,1 mg/g) en estudios desarrollados con *C. vulgaris* y en un 35% (desde 11,0 mg/g a 6,6 mg/g) empleando *S. almeriensis*. El suministro de CO₂ produjo un

severo efecto en el crecimiento celular de la especie *C. vulgaris*, inhibiendo su desarrollo en todas las condiciones estudiadas. Esta inhibición sería un efecto combinado entre la acidificación del medio producto del suministro directo de CO₂ y las condiciones de estrés generadas por la presencia de los MP constituyentes de la solución multimetálica. La alteración de parámetros del medio de cultivo, tales como el pH y la concentración de CO₂, produjo variaciones especie-específicas producto de la natural diferencia presente entre los metabolismos de cada especie microalgal. Entre las dos especies estudiadas, *S. almeriensis* presentó una mayor capacidad de tolerancia frente a la toxicidad producida por la presencia de MP, alcanzando mejores rendimientos en los procesos de biosorción de As y un mayor consumo de TOC dentro del sistema multimetálico.

Esto hace concluir que el uso de microalgas para tratamientos de contaminación puede ser útil en cuerpos de aguas cuya concentración de carga orgánica sea baja, o que requiera de un proceso de dilución previo. Según la naturaleza del río Loa, cuyas aguas presentan una baja concentración de MO, el uso de un sistema basado en microalgas puede ser útil para la depuración de la contaminación en la etapa final del proceso de depuración. Esta técnica brinda una oportunidad importante para el desarrollo de tecnologías de depuración en campo para poblaciones aisladas, confirmando que es posible utilizar el proceso de biorremediación microalgal en las condiciones de operación que normalmente trabajan los fotobiorreactores.

Por otro lado, la evaluación del proceso de recuperación de metales demostró que entre los eluyentes estudiados (HCl 0.1 M, HCl 0.2 M, NaOH 0,1 M, NaOH 0,2 M, CaCl₂ 0.1M y CaCl₂ 0.2 M) el agente eluyente HCl 0.1 M alcanzó las mejores eficiencias de recuperación, alcanzando tasas que van sobre el 85% para el caso del As, 92% para Cu, y casi una completa recuperación ($\approx 100\%$) para Mn y Zn. La presencia de MO durante la fase de carga repercutió positivamente en las posteriores tasas de recuperación, produciendo la desorción completa de los elementos As, Cu, Mn y Zn desde la biomasa de ambas especies, al usar HCl 0.1 M como agente eluyente.

Finalmente, ante la reducción de la adsorción de MP en presencia de MO y CO₂, se decidió estudiar el potencial de adsorción de microalgas muertas. Por esta razón, en el Capítulo 6 se evaluó la capacidad de adsorción de MP con microalgas liofilizadas tanto en modo batch como en columna de lecho fijo.

Los resultados de los estudios en modo batch desarrollados en el **Capítulo 6** evidenciaron una fuerte interferencia entre los elementos en la capacidad de biosorción en el sistema multimetálico. La disminución de la capacidad de biosorción asociada a la interferencia por presencia de los otros constituyentes del sistema multimetálico presentó diferentes magnitudes para cada elemento estudiado, resultando en un orden de magnitud: As > B > Mn > Cu > Zn. El orden de estas interferencias permite inferir una fuerte influencia de la densidad atómica de cada elemento, a excepción del As. La especiación de este elemento hace que su comportamiento difiera del de los otros constituyentes de la solución multimetálica.

Por otro lado, la capacidad de biosorción total resultó ser fuertemente dependiente de la concentración del sistema multimetálico (SMM). Las máximas capacidades de biosorción fueron obtenidas empleando la SMM_{4x} (As: 48 mg/L, B: 240 mg/L, Cu-Mn-Zn: 12 mg/L), con valores de 56,0

mg/g en *C. vulgaris* y 56,3 mg/g en *S. almeriensis*, siendo valores 6 y 3,5 veces superiores a los observados en SMM_{1x} (As: 12 mg/L, B: 60 mg/L, Cu-Mn-Zn: 3 mg/L) y SMM_{2x} (As: 24 mg/L, B: 120 mg/L, Cu-Mn-Zn: 6 mg/L). De igual forma, SMM_{4x} presentó las mayores eficiencias de eliminación con esta concentración, con un máximo de RE_{Cu} de 96,2% empleando *C. vulgaris*. Este aumento se asocia con la fuerza motriz producida por las altas concentraciones iónicas de las soluciones estudiadas. Se observó que, mientras el aumento en la concentración de SMM favorece directamente la eliminación de As, Cu, Mn y Zn, la eliminación de B se vio dramáticamente afectada. Esta disminución en las tasas de eliminación de B ocurre tanto en estudios con microalgas vivas como en microalgas muertas.

Por otro lado, los estudios cinéticos en modo Batch demostraron que el proceso de biosorción multimetálico se ajustó a un modelo cinético de Pseudo-segundo orden. Aun así, se presentaron diferencias en cuanto a la rapidez del proceso entre las especies estudiadas, observándose una cinética considerablemente más rápida en el estudio realizado con *C. vulgaris* por sobre los observados con *S. almeriensis*.

Finalmente, los estudios preliminares de biosorción en columnas de lecho fijo demuestran la necesidad de operar con bajas tasas de flujo (3 mL/min), aunque no se observó una tendencia clara respecto a la concentración del afluente. Los estudios de equilibrio y de cinética de biosorción presentaron efectos contrapuestos al aumentar la concentración de las soluciones, posiblemente por las contribuciones monometálicas de los elementos constituyentes de la solución estudiada. Aun así, los resultados permiten evidenciar un mayor desempeño empleando biomasa de la especie *C. vulgaris*. Con esta contribución, es posible validar que al sistema de columnas de lecho fijo como un sistema apto para el proceso de biorremediación de aguas basado en biomasa microalgal, marcando un real antecedente para un futuro escalamiento del proceso.

7.2. RECOMENDACIONES PARA FUTUROS TRABAJOS

Considerando todos los resultados aportados en esta investigación, así como también sus limitaciones asociadas, los próximos estudios que se desarrollen sobre la temática de tratamiento de aguas basado en el uso de biomasa microalgal deben considerar los siguientes aspectos:

- Con el fin de llevar a cabo una aplicación práctica de los resultados obtenidos, resulta necesario ensayar con muestras reales provenientes del área que se pretende tratar, con el fin de evaluar el uso de la biomasa microalgal in situ. Se recomienda considerar el efecto de otros componentes presentes en la composición fisicoquímica del río Loa, que producto de la estructura del estudio propuesto en el **Capítulo 4** no pudieron ser considerados, como la dureza del agua, la carga iónica y la variabilidad inter-estacional. De este modo, se podrá conseguir la sistematización y así, brindar un real aporte para la descontaminación del río Loa en esta área de estudio.

- Considerando los resultados de los **capítulos 4 y 5**, resulta relevante conocer aspectos cinéticos del proceso de biorremediación, diferenciando cuantitativamente la influencia de los procesos de biosorción y bioacumulación dentro el proceso total de biorremediación, con el fin de intentar el desarrollo de ambos procesos con los parámetros de operación. Del mismo modo, resultaría conveniente discernir posibles procesos de precipitación fácilmente reversibles, como posibles mecanismos de recuperación de MP, especialmente en sistemas multicomponentes complejos como el analizado en esta investigación.
- Las diferencias metabólicas asociadas a los resultados obtenidos en los estudios presentado en los **Capítulos 4 y 5** plantean la necesidad de conocer más allá sobre los principales mecanismos metabólicos presentes en las especies microalgales para hacer frente a la toxicidad de los MP. El rol del metabolismo microalgal podría ser clave para desarrollar una posible línea de investigación asociada a la modificación metabólica de una especie para conseguir una mayor producción de proteínas implicadas en la protección frente al proceso de estrés oxidativo. Resulta también de gran interés conocer como esas modificaciones afectan a la composición de las microalgas, estudiando la posible acumulación de productos de alto valor comercial como respuesta al estrés en presencia de MP. El conocimiento de los metabolismos de las algas en presencia de MP permitiría también variar las condiciones de operación, para conseguir los resultados requeridos.
- Con relación al **Capítulo 5**, se recomienda continuar los estudios de biorremediación trabajando con consorcios de especies, con el fin de considerar la interacción interespecie en los mecanismos de remediación y conseguir un tratamiento sustentable que brinde una disminución en la variabilidad de los resultados a lo largo del tiempo. El estudio de consorcios microalga-bacteria presenta un especial interés debido a su presencia en los fotobiorreactores de tratamiento de aguas, la sinergia entre los organismos y a la importante capacidad de adsorción de las bacterias, ampliamente mencionada en la literatura.
- El estudio de recuperación realizado en el **Capítulo 5** brinda importantes resultados en función de la capacidad de recuperar los metales que habían sido previamente capturados por la biomasa microalgal, resultando ser un proceso simple y de fácil aplicación. Esto brinda una oportunidad de que una vez producido el proceso de separación, la biomasa pueda ser utilizada como materia prima para nuevos procesos de valorización. En función de los resultados obtenidos, se recomienda probar la viabilidad de la biomasa al final del proceso de recuperación. En el caso de presentar altas tasas de viabilidad, la biomasa podría ser considerada para ingresar a un nuevo ciclo de depuración mediante un proceso de recirculación dentro del sistema. En caso contrario, se requeriría caracterizar la biomasa con el propósito de evaluar posibles modificaciones estructurales en las células microalgales y definir una nueva línea de investigación con el fin de utilizar la biomasa resultante para la generación de bioproductos de alto valor agregado.

- Los resultados obtenidos en los **Capítulos 4, 5 y 6** demostraron una baja capacidad de eliminación del B en los estudios de biosorción. A pesar de ser el elemento con la menor toxicidad dentro de los constituyentes de la SMM, el B es actualmente uno de los mayores agentes de contaminación en la zona de estudio. Se requeriría continuar investigando el uso de otros sistemas con el fin de disminuir la concentración de B en el agua. Sin embargo, la misma presencia de este elemento puede resultar favorable para el tratamiento de otros metales más tóxicos, debido a que la presencia del B en la solución favorece un aumento en la solubilidad de los complejos metálicos, lo cual puede ser muy útil para desarrollar estudios de descontaminación en sistemas multimetálicos en fotobiorreactores.
- En el **Capítulo 5** se alcanzaron altas tasas de recuperación para As, Cu, Mn y Zn. La recuperación se debe a que los metales están principalmente retenidos en la superficie microalgal por lo que el proceso es altamente reversible, pero ¿qué ocurre con el B, que aunque presenta bajas tasas de biosorción su recuperación también es baja? Para resolver esta interrogante se requeriría realizar estudios que determinen la presencia de este elemento tanto al interior como al exterior, para así determinar porcentajes específicos de adsorción/bioacumulación y elucidar posibles mecanismos de recuperación para este elemento.
- El **Capítulo 6** nos brinda los primeros estudios preliminares del uso de columnas de lecho fijo en procesos de biorremediación microalgal, permitiendo demostrar su utilidad para un posible escalamiento de este sistema. Sin embargo, el alcance de estos estudios continúa siendo bajo y se requiere continuar desarrollando estudios en esta área para comprender con más profundidad los parámetros implicados del sistema. De igual modo, se recomienda comparar distintos mecanismos de inmovilización microalgal con el fin de determinar el grado de influencia de este factor en el rendimiento global del proceso de depuración de MP empleando biomasa microalgal y hacer análisis económicos del mismo.

CAPITULO 8. REFERENCIAS

8.1. REFERENCIAS

- Abdel-Ghani, N., El-Chaghab, G., 2014. Biosorption for Metal Ions Removal From Aqueous Solutions: a Review of Recent Studies. *Mnkjournals.Com* 3, 24–42. ISSN:2278-5299
- Abdolali, A., Hao, H., Guo, W., Zhou, J.L., Du, B., Wei, Q., Wang, X.C., Dan, P., 2015a. Bioresource Technology Characterization of a multi-metal binding biosorbent : Chemical modification and desorption studies. *Bioresour. Technol.* 193, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.123>
- Abdolali, A., Hao, H., Guo, W., Zhou, J.L., Du, B., Wei, Q., Wang, X.C., Dan, P., Ngo, H.H., Guo, W., Zhou, J.L., Du, B., Wei, Q., Wang, X.C., Nguyen, P.D., 2015b. Characterization of a multi-metal binding biosorbent: Chemical modification and desorption studies. *Bioresour. Technol.* 193, 477–487. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.123>
- Abdolali, A., Ngo, H.H., Guo, W.S., Lee, D.J., Tung, K.L., Wang, X.C., 2014. Development and evaluation of a new multi-metal binding biosorbent. *Bioresour. Technol.* 160, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.038>
- Abdolali, A., Ngo, H.H., Guo, W.W., Zhou, J.L., Zhang, J., Liang, S., Chang, S.W., Nguyen, D.D., Liu, Y. (2018). Application of a breakthrough biosorbent for removing heavy metals from synthetic and real wastewaters in a lab-scale continuous fixed-bed column. *Bioresour. Technol.* 160, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.08.072>
- Abdulaziz, M., Musayev, S., 2017. Multicomponent biosorption of heavy metals from aqueous solutions: A review. *Polish J. Environ. Stud.* 26, 1433–1441. <https://doi.org/10.15244/pjoes/67975>
- Abinandan, S., Shanthakumar, S., 2015. Challenges and opportunities in application of microalgae (*Chlorophyta*) for wastewater treatment: A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 52, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.086>
- Abinandan, S., Subashchandrabose, S.R., Pannerselvan, L., Venkateswarlu, K., Megharaj, M., 2019. Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus* sp. MAS1 and *Heterochlorella* sp. MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. *Bioresour. Technol.* 278, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.053>
- Abou-Shanab, R.A.I., Ji, M.K., Kim, H.C., Paeng, K.J., Jeon, B.H., 2013. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *J. Environ. Manage.* 115, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>
- Ación, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30, 1344–1353. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
- Ahmad, A., Bhat, A.H., Buang, A., 2018. Biosorption of transition metals by freely suspended and Ca-alginate immobilised with *Chlorella vulgaris*: Kinetic and equilibrium modeling. *J. Clean. Prod.* 171, 1361–1375. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.252>
- Ahmaruzzaman, M., 2011. Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals. *Adv. Colloid Interface Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.04.005>

- Ahmed, M.J.K., Ahmaruzzaman, M., 2016. A review on potential usage of industrial waste materials for binding heavy metal ions from aqueous solutions. *J. Water Process Eng.* 10, 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2016.01.014>
- Akhtar, N., Iqbal, J., Iqbal, M., 2004. Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: Characterization studies. *J. Hazard. Mater.* 108, 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.002>
- Aksu, Z., Dönmez, G., 2006. Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. *Process Biochem.* 41, 860–868. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.025>
- Akunwa, N.K., Muhammad, M.N., Akunna, J.C., 2014. Treatment of metal-contaminated wastewater: A comparison of low-cost biosorbents. *J. Environ. Manage.* 146, 517–523. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.08.014>
- Al-Rub, F.A.A., El-Naas, M.H., Ashour, I., Al-Marzouqi, M., 2006. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *Process Biochem.* 41, 457–464. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.07.018>
- Alcántara, C., Muñoz, R., Norvill, Z., Plouviez, M., Guieysse, B., 2015. Nitrous oxide emissions from high rate algal ponds treating domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 177, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.134>
- Ali, R.M., Hamad, H.A., Hussein, M.M., Malash, G.F., 2016. Potential of using green adsorbent of heavy metal removal from aqueous solutions: Adsorption kinetics, isotherm, thermodynamic, mechanism and economic analysis. *Ecol. Eng.* 91, 317–332. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.03.015>
- Alvarenga, P., Ferreira, C., Mourinha, C., Palma, P., de Varennes, A., 2018. Chemical and ecotoxicological effects of the use of drinking-water treatment residuals for the remediation of soils degraded by mining activities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 161, 281–289. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.05.094>
- Álvarez-Benedí, J., Bolado, S., Cancillo, I., Calvo, C., García-Sinovas, D., 2005. Adsorption–Desorption of Arsenate in Three Spanish Soils. *Vadose Zo. J.* 4, 282. <https://doi.org/10.2136/vzj2004.0095>
- Anastopoulos, I., Kyzas, G.Z., 2015. Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. *J. Mol. Liq.* 209, 77–86. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.05.023>
- Anjos, M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Dragone, G., 2013. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 139, 149–154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032>
- Apiratikul, R., Pavasant, P., 2008. Batch and column studies of biosorption of heavy metals by *Caulerpa lentillifera* 99, 2766–2777. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.06.036>
- Arunakumara, K.K.I.U., Zhang, X., 2007. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *J. Ocean Univ. China* 7, 60–64. <https://doi.org/10.1007/s11802-008-0060-y>

- Atar, N., Olgun, A., Wang, S., 2012. Adsorption of cadmium (II) and zinc (II) on boron enrichment process waste in aqueous solutions: Batch and fixed-bed system studies. *Chem. Eng. J.* 192, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.03.067>
- Athanasiadis, K., Helmreich, B., 2005. Influence of chemical conditioning on the ion exchange capacity and on kinetic of zinc uptake by clinoptilolite. *Water Res.* 39, 1527–1532. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.01.024>
- Ayangbenro, A.S., Babalola, O.O., 2017. A new strategy for heavy metal polluted environments: A review of microbial biosorbents. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14.(1) <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>
- Bădescu, I.S., Bulgariu, D., Ahmad, I., Bulgariu, L., 2018. Valorisation possibilities of exhausted biosorbents loaded with metal ions – A review. *J. Environ. Manage.* 224, 288–297. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.066>
- Bahar, M.M., Megharaj, M., Naidu, R., 2013. Toxicity, transformation and accumulation of inorganic arsenic species in a microalga *Scenedesmus* sp. isolated from soil. *J. Appl. Phycol.* 25, 913–917. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9923-0>
- Barkley, N.P., 1991. Extraction of mercury from groundwater using immobilized algae. *J. Air Waste Manag. Assoc.* 41, 1387–1393. <https://doi.org/10.1080/10473289.1991.10466935>
- Barros, A., Pereira, G., 2013. El impacto del tranque de Talabre en la comunidad lickanantai de San Francisco de Chiu-chiu. Atacama desert Proj. Proyecto FONDECYT N°11060534 “Discriminación, identidad y desigualdad en períodos de crisis: etnohistoria jurídica-política de San Pedro de Atacama y Chiu-Chiu (s. 19-21)”
- Batool, S., Hussain, A., Iqbal, M.A., Javid, A., Ali, W., Bukhari, S.M., Akmal, M., Qazi, J.I., 2018. Implication of highly metal-resistant microalgal-bacterial co-cultures for the treatment of simulated metal-loaded wastewaters. *International Microbiology*, 22(1), 41-48. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0025-y>
- Bayramoglu, G., Gursel, I., Tunali, Y., Arica, M.Y., 2009. Biosorption of phenol and 2-chlorophenol by *Funalia trogii* pellets. *Bioresour. Technol.* 100, 2685–2691. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.042>
- Beckett, M.A., 2016. Recent advances in crystalline hydrated borates with non-metal or transition-metal complex cations. *Coord. Chem. Rev.* 323, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.12.012>
- Bilal, M., Rasheed, T., Sosa-Hernández, J.E., Raza, A., Nabeel, F., Iqbal, H.M.N., 2018. Biosorption: An interplay between marine algae and potentially toxic elements—A review. *Mar. Drugs* 16, 1–16. <https://doi.org/10.3390/md16020065>
- Bishnoi, N.R., Kumar, R., Kumar, S., Rani, S., 2007. Biosorption of Cr (III) from aqueous solution using algal biomass *spirogyra* spp. *J. Hazard. Mater.* 145, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.10.093>
- Brinza, L., Dring, M.J., Gavrilescu, M., 2007. Marine Micro and Macro Algal Species As Biosorbents for Heavy Metals. *Environ. Eng. Manag. J.* May 6, 237–251. <http://omicron.ch.tuiasi.ro/EEMJ>

- Bulgariu, D., Bulgariu, L., 2013. Sorption of Pb (II) onto a mixture of algae waste biomass and anion exchanger resin in a packed-bed column. *Bioresour. Technol.* 129, 374–380.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.142>
- Bulgariu, D., Bulgariu, L., 2012. Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresour. Technol.* 103, 489–493.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.016>
- Bulgariu, L., Gavrilesco, M., 2015. Bioremediation of Heavy Metals by Microalgae, *Handbook of Marine Microalgae*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800776-1.00030-3>
- Burakov, A.E., Galunin, E. V, Burakova, I. V, Kucherova, A.E., Agarwal, S., Tkachev, A.G., Gupta, V.K., 2018. Adsorption of heavy metals on conventional and nanostructured materials for wastewater treatment purposes : A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 702–712.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.034>
- Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresour. Technol.* 181, 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>
- Cameron, H., Mata, M.T., Riquelme, C., 2018. The effect of heavy metals on the viability of *Tetraselmis marina* AC16-MESO and an evaluation of the potential use of this microalga in bioremediation . *PeerJ* 6, e5295. <https://doi.org/10.7717/peerj.5295>
- Cantera, S., Lebrero, R., Sadornil, L., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2016. Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement. *J. Environ. Manage.* 182, 160–165.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.07.064>
- Carolin, C.F., Kumar, P.S., Saravanan, A., Joshiba, G.J., Naushad, M., 2017. Efficient techniques for the removal of toxic heavy metals from aquatic environment : A review. *J. Environ. Chem. Eng.* 5, 2782–2799. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.05.029>
- Cechinel, M.A.P., Mayer, D.A., Mazur, L.P., Silva, L.G.M., Girardi, A., Vilar, V.J.P., de Souza, A.A.U., Selene, S.M.A., 2018. Application of ecofriendly cation exchangers (*Gracilaria caudata* and *Gracilaria cervicornis*) for metal ions separation and recovery from a synthetic petrochemical wastewater: Batch and fixed bed studies. *J. Clean. Prod.* 172, 1928–1945.
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.11.235>
- Cechinel, M.A.P., Mayer, D.A., Pozdniakova, T.A., Mazur, L.P., Boaventura, R.A.R., de Souza, A.A.U., de Souza, S.M.A.G.U., Vilar, V.J.P., 2016. Removal of metal ions from a petrochemical wastewater using brown macro-algae as natural cation-exchangers. *Chem. Eng. J.* 286, 1–15.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.10.042>
- Chekroun, K. Ben, Baghour, M., 2013. The role of algae in phytoremediation of heavy metals: A review. *J. Mater. Environ. Sci.* 4 (6), 873-880. ISSN: 2028-2508.
- Chen, B.Y., Chen, C.Y., Guo, W.Q., Chang, H.W., Chen, W.M., Lee, D.J., Huang, C.C., Ren, N.Q., Chang, J.S., 2014. Fixed-bed biosorption of cadmium using immobilized *Scenedesmus obliquus* CNW-N cells on loofa (*Luffa cylindrica*) sponge. *Bioresour. Technol.* 160, 175–181.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.006>

- Chen, Y.E., Cui, J.M., Yang, J.C., Zhang, Z.W., Yuan, M., Song, C., Yang, H., Liu, H.M., Wang, C.Q., Zhang, H.Y., Zeng, X.Y., Yuan, S., 2015. Biomonitoring heavy metal contaminations by moss visible parameters. *J. Hazard. Mater.* 296, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.04.060>
- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H., 2005. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: Kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere* 59, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.005>
- Cochilco, 2019. ANUARIO DE ESTADÍSTICAS DEL YEARBOOK: COPPER AND OTHER MINERAL STATISTICS COBRE Y OTROS MINERALES. Com. Chil. del Cobre, Minist. Minería, Gob. Chile.
- Craggs, R., Park, J., Heubeck, S., Sutherland, D., 2014. High rate algal pond systems for low-energy wastewater treatment, nutrient recovery and energy production. *New Zeal. J. Bot.* 52, 60–73. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2013.861855>
- Cuizano, N. a, Navarro, A.E., 2008. Biosorción de metales pesados por algas marinas : posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *An. Quím.* 104, 120–125. ISSN: 1575-3417.
- de-Bashan, L.E., Bashan, Y., 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.043>
- de Godos, I., Guzman, H.O., Soto, R., Becares, E., García-Encina, Pedro. Muñoz, R., A.Vargas, V., 2011. Coagulation/flocculation-based removal of algal–bacterial biomass from piggery wastewater treatment. *Bioresour. Technol.* 102, 923–927. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.036>
- Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, Á., Lubián, L.M., 2009. Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1503–1513. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.04.006>
- DGA, S.A, K.P., 2014. Sectorización de los Acuíferos de la Cuenca del Río Loa. Informe Final. SIT N° 358.
- Dong, B., Ho, N., Ogden, K.L., Arnold, R.G., 2014. Cultivation of *Nannochloropsis salina* in municipal wastewater or digester centrate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103, 45–53. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.001>
- Dong, X., Wang, C., Li, H., Wu, M., Liao, S., Zhang, D., Pan, B., 2014. The sorption of heavy metals on thermally treated sediments with high organic matter content. *Bioresour. Technol.* 160, 123–128. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.006>
- Doshi, H., Seth, C., Ray, A., Kothari, I.L., 2008. Bioaccumulation of heavy metals by green algae. *Curr. Microbiol.* 56, 246–255. <https://doi.org/10.1007/s00284-007-9070-z>
- Dueñas, A., Huarachi, R., Yapó, U., Apfata, P., González, R., 2014. Bioacumulación de arsénico en *Chlorella Vulgaris* (Chlorophyta: *Chlorellaceae*) en efluente de Parque Industrial Rio Seco (PIRS) y toxicidad aguda sobre *Daphnia Magna* (Crustacea: Daphniidae), Arequipa, Perú. *Biol.* 12, 9–22. ISSN 1816-0719.
- Dwivedi, S., 2012. Bioremediation of heavy metal by algae: current and future perspective. *J. Adv. Lab. Res. Biol.* III, 195–199.

- E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, editors, 2017. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition, American Water Works Association.
- El-Sheekh, M.M., Farghl, A.A., Galal, H.R., Bayoumi, H.S., 2016. Bioremediation of different types of polluted water using microalgae. *Rend. Lincei* 27, 401–410.
<https://doi.org/10.1007/s12210-015-0495-1>
- Fawaz, E.G., Salam, D.A., Kamareddine, L., 2018. Evaluation of copper toxicity using site specific algae and water chemistry: Field validation of laboratory bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 155, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.02.054>
- Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., de Carvalho, J.C.M., Lodi, A., Finocchio, E., Perego, P., Converti, A., 2011. Adsorption of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systems. *Chem. Eng. J.* 173, 326–333.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.039>
- Flouty, R., Estephane, G., 2012. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *J. Environ. Manage.* 111, 106–114.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.042>
- Fomina, M., Gadd, G.M., 2014. Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour. Technol.* 160, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>
- Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>
- Gani, P., Sunar, N.M., Matias-peralta, H., Latiff, A.A.A., Parjo, U.K., Oyekanmi, A.A., Abdul, A.A., Parjo, U.K., Oyekanmi, A.A., 2017. Green Approach in the Bio-removal of Heavy Metals from wastewaters. *MATEC Web Conf.* 06007, 1–8. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201710306007>
- Graff, A., Barrez, E., Baranek, P., Bachet, M., Bénézeth, P., 2017. Complexation of Nickel Ions by Boric Acid or (Poly)borates. *J. Solution Chem.* 46, 25–43. <https://doi.org/10.1007/s10953-016-0555-x>
- Guan, Z., Lv, J., Bai, P., Guo, X., 2016. Boron removal from aqueous solutions by adsorption - A review. *Desalination* 383, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.12.026>
- Gupta, V.K., Rastogi, A., 2008. Sorption and desorption studies of chromium (VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. *J. Hazard. Mater.* 154, 347–354.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.032>
- Hamed, S.M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H., 2017. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.048>
- Hashim, M.A., Mukhopadhyay, S., Sahu, J.N., Sengupta, B., 2011. Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater. *J. Environ. Manage.* 92, 2355–88.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.06.009>
- He, J., Chen, J.P., 2014. A comprehensive review on biosorption of heavy metals by algal biomass: Materials, performances, chemistry, and modeling simulation tools. *Bioresour. Technol.* 160.

67-78. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.068>

- Henriques, B., Teixeira, A., Figueira, P., Reis, A.T., Almeida, J., Vale, C., Pereira, E., 2019. Simultaneous removal of trace elements from contaminated waters by living *Ulva lactuca*. *Sci. Total Environ.* 652, 880–888. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.282>
- Hlihor, R.-M., Apostol, L.-C., Gavrilesco, M., 2017. Environmental Bioremediation by Biosorption and Bioaccumulation: Principles and Applications, in: Anjum, N.A., Gill, S.S., Tuteja, N. (Eds.), *Enhancing Cleanup of Environmental Pollutants: Volume 1: Biological Approaches*. Springer International Publishing, Cham, pp. 289–315. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55426-6_14
- Hu, B., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Mohr, M., Cheng, Y., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Chen, P., Ruan, R., 2012. Influence of exogenous CO₂ on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 1661–1673. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9566-2>
- Hussain, F., Shah, S.Z., Zhou, W., Iqbal, M., 2017. Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micro-nutrients removal efficiency. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 170, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.021>
- Ibrahim, W.M., 2011. Biosorption of heavy metal ions from aqueous solution by red macroalgae. *J. Hazard. Mater.* 192, 1827–1835. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.07.019>
- Ismail, M.H.S., Zhang, X.T., Lazim, M.F.M., 2013. Removal of boron and arsenic from petrochemical wastewater by using aquatic booster as adsorbent. *Polish J. Environ. Stud.* 22, 403–408. https://doi.org/10.1007/978-981-4560-70-2_79
- Iupac Technical Report, 2002. “HEAVY METALS” — A MEANINGLESS TERM ? Prepared for publication by “Heavy metals” — a meaningless term ? (IUPAC Technical Report) 74, 793–807.
- Jain, M., Garg, V.K., Kadirvelu, K., Sillanpää, M., 2016. Adsorption of heavy metals from multi-metal aqueous solution by sunflower plant biomass-based carbons. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 13, 493–500. <https://doi.org/10.1007/s13762-015-0855-5>
- Jayakumar, R., Rajasimman, M., Karthikeyan, C., 2015. Optimization, equilibrium, kinetic, thermodynamic, and desorption studies on the sorption of Cu (II) from an aqueous solution using marine green algae: *Halimeda gracilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 121, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.040>
- Jiang, Y., Purchase, D., Jones, H., Garelick, H., 2011. Technical note: Effects of arsenate (as⁵⁺) on growth and production of glutathione (GSH) and phytochelatin (PCS) in *Chlorella vulgaris*. *Int. J. Phytoremediation* 13, 834–844. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.525560>
- Kang, K.C., Kim, S.S., Choi, J.W., Kwon, S.H., 2008. Sorption of Cu²⁺ and Cd²⁺ onto acid- and base-pretreated granular activated carbon and activated carbon fiber samples. *J. Ind. Eng. Chem.* 14, 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2007.08.007>
- Kaplan, D., 2013. Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. *Handb. Microalgal Cult. Appl. Phycol. Biotechnol.* 602–611. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch32>
- Kołodźńska, D., Krukowska, J., Thomas, P., 2017. Comparison of sorption and desorption studies of heavy metal ions from biochar and commercial active carbon. *Chem. Eng. J.* 307, 353–363.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.08.088>

- Konig-Péter, A., Csudai, C., Felinger, A., Kilár, F., Pernyeszi, T., 2014. Potential of various biosorbents for Zn(II) removal. *Water. Air. Soil Pollut.* 225:2089.
<https://doi.org/10.1007/s11270-014-2089-4>
- Kumar, D., Pandey, L.K., Gaur, J.P., 2016. Metal sorption by algal biomass: From batch to continuous system. *Algal Res.* 18, 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.026>
- Kurniawan, T.A., Chan, G.Y.S., Lo, W.H., Babel, S., 2006. Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chem. Eng. J.* 118 (1-2), 83-98.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.01.015>
- Laçın, B., Tastan, B.E., Dönmez, G., 2015. Detection of boron removal capacities of different microorganisms in wastewater and effective removal process. *Water Sci. Technol.* 72, 1832–1839. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.409>
- Larsdotter, K., 2006. Wastewater treatment with microalgae - A literature review. *Vatten* 62, 31–38.
- Lata, S., Singh, P.K., Samadder, S.R., 2015. Regeneration of adsorbents and recovery of heavy metals: a review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 12, 1461–1478.
<https://doi.org/10.1007/s13762-014-0714-9>
- Lee, Y.C., Chang, S.P., 2011. The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora filamentous* macroalgae. *Bioresour. Technol.* 102, 5297–5304.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.12.103>
- Lesmana, S.O., Febriana, N., Soetaredjo, F.E., Sunarso, J., Ismadji, S., 2009. Studies on potential applications of biomass for the separation of heavy metals from water and wastewater. *Biochem. Eng. J.* 44, 19–41. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.12.009>
- Levy, J.L., Stauber, J.L., Jolley, D.F., 2007. Sensitivity of marine microalgae to copper: The effect of biotic factors on copper adsorption and toxicity. *Sci. Total Environ.* 387, 141–154.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.07.016>
- Li, P.S., Tao, H.C., 2015. Cell surface engineering of microorganisms towards adsorption of heavy metals. *Crit. Rev. Microbiol.* 41, 140–149. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813898>
- Li, Y., Yang, X., Geng, B., 2018. Preparation of Immobilized Sulfate-Reducing Bacteria-Microalgae Beads for Effective Bioremediation of Copper-Containing Wastewater. *Water. Air. Soil Pollut.* 229. 54. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3709-1>
- Liu, F., Zhang, G., Zhang, H., Mo, J., 2008. Performance evaluation of electrodeionization process based on ionic equilibrium with plate and frame modules. *Desalination* 221, 425–432.
<https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.01.102>
- Liu, G., Chai, X., Shao, Y., Hu, L., Xie, Q., Wu, H., 2011. Toxicity of copper, lead, and cadmium on the motility of two marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis chui*. *J. Environ. Sci.* 23, 330–335. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60410-X](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60410-X)
- Lo, Y.C., Cheng, C.L., Han, Y.L., Chen, B.Y., Chang, J.S., 2014. Recovery of high-value metals from geothermal sites by biosorption and bioaccumulation. *Bioresour. Technol.* 160, 182–190.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.008>

- Maldonado-Reyes, A., Montero-Ocampo, C., Medina-Garcia, J., Bolado-Rodríguez, S., Álvarez-Benedí, J., Herrera-Vazquez, A., Castaño, V.M., 2015. Electro Coagulation Removal of As from Water: the Role of Phases Formation. *Water. Air. Soil Pollut.* 226, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2398-2>
- Mansa, R.F., Tahir, A., Hua, L.M., Dayou, J., Sipaut, C.S., 2012. Design of a Pilot Scale Outdoor Photobioreactor for Mass Cultivation of Local Microalga. *Int. J. Eng. Phys. Sci.* 6 6, 348–352.
- Marín, D., Posadas, E., Cano, P., Pérez, V., Lebrero, R., Muñoz, R., Blanco, S., 2018. Seasonal variation of biogas upgrading coupled with digestate treatment in an outdoors pilot scale algal-bacterial photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 258, 58-66. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.117>
- Markou, G., Mitrogiannis, D., Çelekli, A., Bozkurt, H., Georgakakis, D., Chrysikopoulos, C. V., 2015. Biosorption of Cu²⁺ and Ni²⁺ by *Arthrospira platensis* with different biochemical compositions. *Chem. Eng. J.* 259, 806–813. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.08.037>
- Masindi, V., Muedi, K.L., 2018. Environmental Contamination by Heavy Metals. *IntechOpen i*, 13. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- Mata, Y.N., Blázquez, M.L., Ballester, A., González, F., Muñoz, J.A., 2010. Studies on sorption, desorption, regeneration and reuse of sugar-beet pectin gels for heavy metal removal. *J. Hazard. Mater.* 178, 243–248. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.069>
- Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2005. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25, 113–152. <https://doi.org/10.1080/07388550500248571>
- Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2001a. Removal of Ni and Cu from single and binary metal solutions by free and immobilized *Chlorella vulgaris*. *Eur. J. Protistol.* 37, 261–271. <https://doi.org/10.1078/0932-4739-00813>
- Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2001b. Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecol. Eng.* 18, 1–13. [https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00174-9](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00174-9)
- Mendoza-castillo, D.I., Reynel-ávila, H.E., Sánchez-ruiz, F.J., Trejo-valencia, R., 2018. Insights and pitfalls of artificial neural network modeling of competitive multi-metallic adsorption data. *J. Mol. Liq.* 251, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.12.030>
- Miazeck, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2015. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23929–23969. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
- Michalak, I., Chojnacka, K., 2010. Interactions of metal cations with anionic groups on the cell wall of the macroalga *Vaucheria* sp. *Eng. Life Sci.* 10, 209–217. <https://doi.org/10.1002/elsc.200900039>
- Miksch, K., Cema, G., Corvini, P.F.X., Felis, E., Sochacki, A., Surmacz-Górska, J., Wiszniowski, J., Zabczynski, S., 2015. R&D priorities in the field of sustainable remediation and purification of agro-industrial and municipal wastewater. *N. Biotechnol.* 25; 32(1) 128-132. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2013.11.002>

- Min, M., Wang, L., Li, Y., Mohr, M.J., Hu, B., Zhou, W., Chen, P., Ruan, R., 2011. Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165, 123–137. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9238-7>
- Mirghaffari, N., Moeini, E., Farhadian, O., 2014. Biosorption of Cd and Pb ions from aqueous solutions by biomass of the green microalga, *Scenedesmus quadricauda*. *J. Appl. Phycol.* 27, 311–320. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0345-z>
- Mishra, A., Tripathi, B.D., Rai, A.K., 2016. Packed-bed column biosorption of chromium (VI) and nickel (II) onto Fenton modified *Hydrilla verticillata* dried biomass. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 132, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.06.026>
- Mohamed, Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology* 17, 504–516. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0204-2>
- Mohapatra, H., Gupta, R., 2005. Concurrent sorption of Zn (II), Cu (II) and Co (II) by *Oscillatoria angustissima* as a function of pH in binary and ternary metal solutions. *Bioresour. Technol.* 96, 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.11.004>
- Montazer-Rahmati, M.M., Rabbani, P., Abdolali, A., Keshtkar, A.R., 2011. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of cadmium, lead, and nickel ions from aqueous solutions by intact and chemically modified brown algae. *J. Hazard. Mater.* 185, 401–407. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.047>
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Malcata, F.X., 2011. Capacity of simultaneous removal of zinc and cadmium from contaminated media, by two microalgae isolated from a polluted site. *Environ. Chem. Lett.* 9, 511–517. <https://doi.org/10.1007/s10311-011-0311-9>
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Malcata, F.X., Instituto, I., Carlos, A., Campos, O., Maia, C., Pedro, P.–A.S., 2012. Metal uptake by microalgae. Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress.* 28(2) 299–311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>
- Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Xavier Malcata, F., 2009. Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environ. Chem. Lett.* 9, 169–176. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0258-2>
- Monteiro, C.M., Fonseca, S.C., Castro, P.M.L., Malcata, F.X., 2011b. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *J. Appl. Phycol.* 23, 97–103. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9542-6>
- Moreno-Garrido, I., 2008. Microalgae immobilization: Current techniques and uses. *Bioresour. Technol.* 99, 3949–3964. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.05.040>
- Murugesan, A.G., Maheswari, S., Bagirath, G., 2008. Biosorption of cadmium by live and immobilized cells of *Spirulina platensis*. *Int. J. Environ. Res.* 2, 307–312. DOI: 10.22059/IJER.2010.209.
- Naja, G., Volesky, B., 2006. Multi-metal biosorption in a fixed-bed flow-through column. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 281, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.02.040>

- Nalimova, A.A., Popova, V. V., Tsoglin, L.N., Pronina, N.A., 2005. The effects of copper and zinc on *Spirulina platensis* growth and heavy metal accumulation in its cells. Russ. J. Plant Physiol. 52, 229–234. <https://doi.org/10.1007/s11183-005-0035-4>
- Napan, K., Hess, D., McNeil, B., Quinn, J.C., 2015. Quantification of Heavy Metals and Other Inorganic Contaminants on the Productivity of Microalgae. J. Vis. Exp. e52936. <https://doi.org/10.3791/52936>
- Negm, N.A., Abd El Wahed, M.G., Hassan, A.R.A., Abou Kana, M.T.H., 2018. Feasibility of metal adsorption using brown algae and fungi: Effect of biosorbents structure on adsorption isotherm and kinetics. J. Mol. Liq. 264, 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.05.027>
- Parga, J.R., Cocke, D.L., Valenzuela, J.L., Gomes, J.A., Kesmez, M., Irwin, G., Moreno, H., Weir, M., 2005. Arsenic removal via electrocoagulation from heavy metal contaminated groundwater in la Comarca Lagunera México. J. Hazard. Mater. 124, 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.05.017>
- Park, D., Yun, Y., Park, J.M., 2010. The Past , Present , and Future Trends of Biosorption. Biotechnol. Bioprocess Eng. 15, 86–102. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0199-4>
- Perales-Vela, H.V., Peña-Castro, J.M., Cañizares-Villanueva, R.O., 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. Chemosphere 64, 1–10. <https://doi.org/doi:10.1016/j.chemosphere.2005.11.024>
- Piccini, M., Raikova, S., Allen, M.J., Chuck, C.J., 2019. A synergistic use of microalgae and macroalgae for heavy metal bioremediation and bioenergy production through hydrothermal liquefaction. Sustain. Energy Fuels 3, 292–301. <https://doi.org/10.1039/c8se00408k>
- Podder, M.S., Majumder, C.B., 2016. Toxicity and bioremediation of As (III) and As (V) in the green microalgae *Botryococcus braunii*: a laboratory study. Int. J. Phytoremediation 6514, 0. 157-173. <https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1207601>
- Ponce, S.C., Prado, C., Pagano, E., Prado, F.E., Rosa, M., 2015. Effect of solution pH on the dynamic of biosorption of Cr (VI) by living plants of *Salvinia minima*. Ecol. Eng. 74, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.09.117>
- Posadas, E., Morales, M. del M., Gomez, C., Ación, F.G., Muñoz, R., 2015. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. Chem. Eng. J. 265, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.059>
- Prasad, B.B., Banerjee, S., Lakshmi, D., 2006. An AlgaSORB column for the quantitative sorption of arsenic (III) from water samples. Water Qual. Res. J. Canada 41, 190–197. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2006.022>
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., Campos, A., 2006. Contaminación Por Metales Pesados En Suelo Provocada Por La Industria Minera. Ecol. Apl. 5.(1,2). ISSN: 1726-2216.
- Qdais, H.A., Moussa, H., 2004. Removal of heavy metals from wastewater by membrane processes: A comparative study. Desalination 164, 105–110. [https://doi.org/10.1016/S0011-9164\(04\)00169-9](https://doi.org/10.1016/S0011-9164(04)00169-9)

- Quester, K., Avalos-Borja, M., Castro-Longoria, E., 2013. Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron* 54–55, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>
- Rangabhashiyam, S., Jayabalan, R., Rajkumar, M.A., 2019. Elimination of Toxic Heavy Metals from Aqueous Systems Using Potential Biosorbents: A Review. In *Green Buildings and Sustainable Engineering* (pp. 291-311). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1202-1_26.
- Rangsayatorn, N., Pokethitiyook, P., Upatham, E.S., Lanza, G.R., 2004. Cadmium biosorption by cells of *Spirulina platensis* TISTR 8217 immobilized in alginate and silica gel. *Environ. Int.* 30, 57–63. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00146-6)
- Rayson, G.D., Williams, P., 2011. Comparative Metal Ion Binding to Native and Chemically Modified *Datura innoxia* Immobilized Biomaterials. *Biomater. - Phys. Chem.* 141–158.
- Rodero, M. del R., Posadas, E., Toledo-Cervantes, A., Lebrero, R., Muñoz, R., 2018. Influence of alkalinity and temperature on photosynthetic biogas upgrading efficiency in high rate algal ponds. *Algal Res.* 33, 284–290. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.06.001>
- Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Carvalho, J.C.M. de, Lodi, A., Finocchio, E., Converti, A., 2012. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: Multi-metal systems. *J. Hazard. Mater.* 217–218, 246–255. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.03.022>
- Romera, E., González, F., Ballester, a, Blázquez, M.L., Muñoz, J. a, 2006. Biosorption with algae: a statistical review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 26, 223–235. <https://doi.org/10.1080/07388550600972153>
- Romera, E., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., González, F., Ballester, A., Blázquez, M.L., Muñoz, J.A., 2007. Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresour. Technol.* 98, 3344–3353. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.026>
- Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., Keegan, T., Thornton, I., Farago, M., 2003. Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). *Appl. Geochemistry* 18, 1399–1416. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(03)00059-3)
- Rubio, D.I.C., Calderón, R.A.M., Gualtero, A.P., Acosta, D.R., Rojas, I.J.S., 2015. Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión. *Rev. Ing. y Región* 13, 73–90. ISSN 1657-6985.
- Rugini, L., Ellwood, N.T.W., Costa, G., Falsetti, A., Congestri, R., Bruno, L., 2019. Scaling-up of wastewater bioremediation by *Tetrademus obliquus*, sequential bio-treatments of nutrients and metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.059>
- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Bolado, S., 2019. Influence of organic matter and CO₂ supply on bioremediation of heavy metals by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus almeriensis* in a multimetallic matrix. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 182, 109393. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109393>
- Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Vega, M., Bolado, S., 2018. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae.

- Bioresour. Technol. 263, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
- Sahu, A.K., Siljudalen, J., Trydal, T., Rusten, B., 2013. Utilisation of wastewater nutrients for microalgae growth for anaerobic co-digestion. *J. Environ. Manage.* 122, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.02.038>
- Salama, E.S., Kurade, M.B., Abou-Shanab, R.A.I., El-Dalatony, M.M., Yang, I.S., Min, B., Jeon, B.H., 2017. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 1189–1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>
- Sbihi, K., Cherifi, O., Bertrand, M., Gharmali, A. EL, 2014. Biosorption of metals (Cd, Cu and Zn) by the freshwater diatom *Planothidium lanceolatum*: a laboratory study. *Diatom Res.* 29, 55–63. <https://doi.org/10.1080/0269249X.2013.872193>
- Shafaei, A., Rezayee, M., Arami, M., Nikazar, M., 2010. Removal of Mn²⁺ ions from synthetic wastewater by electrocoagulation process. *Desalination* 260, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.05.006>
- Shanab, S., Essa, A., Shalaby, E., 2012. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signal. Behav.* 7, 392–399. <https://doi.org/10.4161/psb.19173>
- Shen, Q.H., Jiang, J.W., Chen, L.P., Cheng, L.H., Xu, X.H., Chen, H.L., 2015. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresour. Technol.* 190, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.053>
- Sheng, P., Ting, Y., Chen, J., 2007. Biosorption of heavy metal ions (Pb, Cu, and Cd) from aqueous solutions by the marine alga *Sargassum* sp. in single-and multiple-metal systems. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 46(8), 2438–2444.
- Sibi, G., Biodeg, J.B., Sibi, G., 2014. Biosorption of Arsenic by Living and Dried Biomass of Fresh Water Microalgae - Potentials and Equilibrium Studies. *J. Bioremediation Biodegrad.* 5(6). <https://doi.org/10.4172/2155-6199.1000249>
- Silva, T.H., Alves, A., Ferreira, B.M., Oliveira, J.M., Reys, L.L., Ferreira, R.J.F., Sousa, R.A., Silva, S.S., Mano, J.F., Reis, R.L., 2012. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int. Mater. Rev.* 57, 276–306. <https://doi.org/10.1179/1743280412Y.0000000002>
- Singh, A., Kumar, D., Gaur, J.P., 2012. Continuous metal removal from solution and industrial effluents using *Spirogyra* biomass-packed column reactor. *Water Res.* 46, 779–788. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.050>
- Sooksawat, N., Meetam, M., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Inthorn, D., 2017. Performance of packed bed column using *Chara aculeolata* biomass for removal of Pb and Cd ions from wastewater. *J. Environ. Sci. Heal. Part A* 52, 539–546. <https://doi.org/10.1080/10934529.2017.1282774>
- Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2017. Batch and fixed bed column studies on phenolic adsorption from wine vinasses by polymeric resins. *J. Food Eng.* 209, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.04.008>

- Stoytcheva, M., Kostadinova, S., Todorova, K., 2018. Immobilized microbial biosorbents for heavy metals removal. *Eng. Life Sci.* 871–881. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800017>
- Sulaymon, A.H., Mohammed, A.A., Al-Musawi, T.J., 2013. Competitive biosorption of lead, cadmium, copper, and arsenic ions using algae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 3011–3023. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1208-2>
- Suresh Kumar, K., Dahms, H.U., Won, E.J., Lee, J.S., Shin, K.H., 2015. Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
- Tabaraki, R., Nateghi, A., 2014. Multimetal biosorption modeling of Zn²⁺, Cu²⁺ and Ni²⁺ by *Sargassum ilicifolium*. *Ecol. Eng.* 71, 197–205. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.031>
- Tang, D., Han, W., Li, P., Miao, X., Zhong, J., 2011. CO₂ biofixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. *Bioresour. Technol.* 102, 3071–3076. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.047>
- Taştan, B.E., B., Duygu, E., Dönmez, G., 2012. Boron bioremoval by a newly isolated *Chlorella* sp. and its stimulation by growth stimulators. *Water Res.* 46, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.045>
- Taty-costodes, V.C., Fauduet, H., Porte, C., Ho, Y., 2005. Removal of lead (II) ions from synthetic and real effluents using immobilized *Pinus sylvestris* sawdust : Adsorption on a fixed-bed column. *J. Hazard. Mater.* 123, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.032>
- Tchounwou, P., Yedjou, C., Patlolla, A., Sutton, D., 2012. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS* 101, 133–164. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Torres, E.M., Hess, D., McNeil, B.T., Guy, T., Quinn, J.C., 2017. Impact of inorganic contaminants on microalgae productivity and bioremediation potential. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 367–376. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.034>
- Toumi, A., Nejmeddine, A., El Hamouri, B., 2000. Heavy metal removal in waste stabilisation ponds and high rate ponds. *Water Sci. Technol.* 42, 17–21. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0599>
- Uduman, N., Qi, Y., Danquah, M.K., Forde, G.M., Hoadley, A., 2010. Dewatering of microalgal cultures: A major bottleneck to algae-based fuels. *J. Renew. Sustain. Energy* 2 (1), 012701. <https://doi.org/10.1063/1.3294480>
- Ugwu, C.U., Aoyagi, H., Uchiyama, H., 2008. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresour. Technol.* 99, 4021–4028. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.046>
- Valdés, F.J., Hernández, M.R., Catalá, L., Marcilla, A., 2012. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture. *Bioresour. Technol.* 119, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.120>
- Vannela, R., Verma, S.K., 2006. Co²⁺, Cu²⁺, and Zn²⁺ accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Prog.* 22, 1282–1293. <https://doi.org/10.1021/bp060075s>
- Vasilieva, S., Shibzukhova, K., Morozov, A., Solovchenko, A., Bessonov, I., Kopitsyna, M., Lukyanov, A., Chekanov, K., Lobakova, E., 2018. Immobilization of microalgae on the surface of new cross-linked polyethylenimine-based sorbents. *J. Biotechnol.* 281, 31–38.

<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.03.011>

- Veena, K., Begum, A., Harikrishna, Ramaiah, M., Khan, I., 2012. Heavy Metal Pollution and Chemical Profile of Cauvery River Water. E-Journal Chem. 6, 47–52.
<https://doi.org/10.1155/2009/154610>
- Vijayaraghavan, K., Balasubramanian, R., 2015. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. J. Environ. Manage. 160, 283–296.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.030>
- Vijayaraghavan, K., Jegan, J., Palanivelu, K., Velan, M., 2005. Biosorption of cobalt (II) and nickel (II) by seaweeds: Batch and column studies. Sep. Purif. Technol. 44, 53–59.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2004.12.003>
- Vijayaraghavan, K., Yun, Y.S., 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. Biotechnol. Adv. 26, 266–291. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.02.002>
- Wan Ngah, W.S., Teong, L.C., Hanafiah, M.A.K.M., 2011. Adsorption of dyes and heavy metal ions by chitosan composites: A review. Carbohydr. Polym. 83, 1446–1456.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.004>
- Wang, J., Chen, C., 2014. Chitosan-based biosorbents: Modification and application for biosorption of heavy metals and radionuclides. Bioresour. Technol. 160, 129–141.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.110>
- Wang, J., Chen, C., 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. Biotechnol. Adv. 27, 195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>
- Wang, L., Min, M., Li, Y., Chen, P., Chen, Y., Liu, Y., Wang, Y., Ruan, R., 2010a. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 1174–1186. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>
- Wang, L., Wang, Y., Chen, P., Ruan, R., 2010b. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. Appl. Biochem. Biotechnol. 162, 2324–2332. <https://doi.org/10.1007/s12010-010-9005-1>
- Wang, Ya, Wang, S., Xu, P., Liu, C., Liu, M., Wang, Yulan, Wang, C., Zhang, C., Ge, Y., 2015. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14, 427–451. <https://doi.org/10.1007/s11157-015-9371-9>
- Winters, C., Guéguen, C., Noble, A., 2017. Equilibrium and kinetic studies of Cu (II) and Ni (II) sorption on living *Euglena gracilis*. J. Appl. Phycol. 29, 1391–1398.
<https://doi.org/10.1007/s10811-016-1040-z>
- Won, S.W., Kotte, P., Wei, W., Lim, A., Yun, Y.S., 2014. Biosorbents for recovery of precious metals. Bioresour. Technol. 160, 203–212. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.121>
- Wu, D., Yu, X., Chu, S., Jacobs, D.F., Wei, X., Wang, C., Long, F., Chen, X., Zeng, S., 2018. Alleviation of heavy metal phytotoxicity in sewage sludge by vermicomposting with additive urban plant litter. Sci. Total Environ. 633, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.167>
- Wu, Q., Zhou, H., Tam, N.F.Y., Tian, Y., Tan, Y., Zhou, S., Li, Q., Chen, Y., Leung, J.Y.S., 2016. Contamination, toxicity and speciation of heavy metals in an industrialized urban river:

- Implications for the dispersal of heavy metals. *Mar. Pollut. Bull.* 104, 153–161.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.043>
- Xiao, R., Zheng, Y., 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (EPS) and their applications. *Biotechnol. Adv.* 34, 1225–1244.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.08.004>
- Yamani, J.S., Lounsbury, A.W., Zimmerman, J.B., 2016. Towards a selective adsorbent for arsenate and selenite in the presence of phosphate: Assessment of adsorption efficiency, mechanism, and binary separation factors of the chitosan-copper complex. *Water Res.* 88, 889–896.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.017>
- Yang, J.S., Cao, J., Xing, G.L., Yuan, H.L., 2015. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresour. Technol.* 175, 537–544.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.124>
- Yin, K., Lv, M., Wang, Q., Wu, Y., Liao, C., Zhang, W., Chen, L., 2016. Simultaneous bioremediation and biodetection of mercury ion through surface display of carboxylesterase E2 from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Water Res.* 103, 383–390.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.053>
- Yin, K., Wang, Q., Lv, M., Chen, L., 2018. Microorganism remediation strategies towards heavy metals. *Chem. Eng.* 360, 1553–1563. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>
- Yuan, X.Z., Meng, Y.T., Zeng, G.M., Fang, Y.Y., Shi, J.G., 2008. Evaluation of tea-derived biosurfactant on removing heavy metal ions from dilute wastewater by ion flotation. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 37, 256–261.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.10.024>
- Zeng, X., Guo, X., Su, G., Danquah, M.K., Zhang, S., Lu, Y., Sun, Y., Lin, L., 2015. Bioprocess considerations for microalgal-based wastewater treatment and biomass production. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 42, 1385–1392. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.033>
- Zeraatkar, A.K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A.F., Moheimani, N.R., McHenry, M.P., 2016. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *J. Environ. Manage.*
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.059>
- Zhang, J., Ding, T., Zhang, C., 2013. Biosorption and toxicity responses to arsenite (As[III]) in *Scenedesmus quadricauda*. *Chemosphere* 92, 1077–1084.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.002>
- Zhang, W., Chen, L., Liu, D., 2012. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93, 1305–1314. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3454-5>
- Zhang, W., Yin, K., Li, B., Chen, L., 2013. A glutathione S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistance and its potential application in removal of Hg²⁺. *J. Hazard. Mater.* 261, 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.023>
- Zhao, Y., Wang, B., Liu, C., Wu, Y., 2013. Biosorption of trace metals from aqueous multimetal solutions by green microalgae. *Chinese J. Geochemistry* 32, 385–391.
<https://doi.org/10.1007/s11631-013-0646-y>

ANEXOS

Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae

Ricardo Saavedra^{a,b}, Raúl Muñoz^a, María Elisa Taboada^b, Marisol Vega^c, Silvia Bolado^{a*}

^a Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, Valladolid University, Dr. Mergelina, s/n, 47011, Valladolid, Spain.

^b Department of Chemical Engineering, Antofagasta University, Universidad de Antofagasta Avenue 02800, CP 1240000, Antofagasta, Chile

^c Department of Analytical Chemistry, Valladolid University, Campus Miguel Delibes, Paseo Belén 7, 47011, Valladolid, Spain.

*Corresponding author: silvia@iq.uva.es

ABSTRACT

This work represents a comparative uptake study of the toxic elements arsenic, boron, copper, manganese and zinc in monometallic and multimetallic solutions by four green microalgae species (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* and an indigenous *Chlorophyceae* spp.), evaluating the effect of pH and contact time. Maximum removal efficiencies for each toxic element were 99.4% for Mn (*C. vulgaris*, pH 7.0, 3h), 91.9% for Zn (*Chlorophyceae* spp., pH 5.5, 3h), 88% for Cu (*Chlorophyceae* spp., pH 7.0, 10 min), 40.7% for As (*S. almeriensis*, pH 9.5, 3h) and 38.6% for B (*S. almeriensis*, pH 5.5, 10 min).

B removal efficiencies decreased remarkably in multimetallic solutions (down to 0.2% in *C. reinhardtii*), except for *Chlorophyceae* spp., the only species isolated from a polluted environment. FTIR spectra shown the highest interactions for As (1150-1300 cm^{-1}) and Cu (3300, 1741, 1535, 1350-1400 cm^{-1}). Results confirms microalgae biomass as a potential biosorbent for toxic elements.

Keywords: adsorption, bioremediation, heavy metals, microalgae, toxic elements

1. Introduction

Water pollution is considered a top environmental problem that currently affects millions of people in various parts of the world. In this context, heavy metals (HM) entail a severe negative impact on human health and biota due to their toxic nature, recalcitrance and bioaccumulation (Fu and Wang, 2011; P. B. Tchounwou et al., 2012). HM are considered stable and non-biodegradable elements that can be bioaccumulated throughout the food chain, thus causing a serious damage to natural ecosystems (Wu et al., 2016).

Technologies based on physicochemical processes, such as chemical precipitation, oxidation, adsorption, ionic exchange, electrochemical treatment and reverse osmosis, are currently available for HM removal in water bodies and wastewaters. Nevertheless, these methods are expensive and inefficient for metal removal from dilute solutions containing less than 100 mg/L of dissolved metal and some of them entail remarkable environmental impacts (Montazer-Rahmati et al., 2011). In this context, bioremediation has emerged as a promising alternative to compete with conventional physical/chemical treatment processes for the removal of toxic minerals and HM. The high affinity and fast kinetics of biological materials make bioremediation cost-effective for the removal of inorganic pollutants at low concentrations (Fu and Wang, 2011). Indeed, algae, bacteria, fungi and plants have been successfully used for HM removal from wastewaters (Akunwa et al., 2014; Konig-Péter et al., 2014).

Among these potential bioadsorbents, microalgae have attracted recent attention based on their large surface area and the presence of multiple binding groups on the microalgal cell surface (Zeraatkar et al., 2016). Cell wall of green microalgae contains heteropolysaccharides composed of carboxylic and sulfate groups for metal sequestration (Kumar et al., 2016). Biosorption and bioaccumulation constitute the most studied mechanisms of microalgae to remove HM from water bodies (Lo et al., 2014; Vijayaraghavan and Balasubramanian, 2015b). In this context, multiple microalgae species have been effectively reported as

bioremediation agents. In monometallic adsorption studies, *Spirogyra* spp. presented an uptake capacity for Cu (II) of 38.2 mg/g in studies at 100 mg Cu/L (Lee and Chang, 2011), while *Scenedesmus obliquus* supported an uptake of Zn (II) of 22.3 mg/g in studies at 150 mg Zn/L (Monteiro et al., 2011b). The Cu (II) sorption capacity of *Chlorella vulgaris* decreased remarkably in the presence of other metals into the medium, resulting in a loss of 75% and 10% in the Cu uptake efficiency in the presence of Pb (II) and Zn(II), respectively (Rodrigues et al., 2012). Nevertheless, adsorption in multimetallic systems is a very complex process whose mechanisms are not yet fully understood and which requires further studies.

The purpose of this work was to study possible treatments based on microalgae for the highly polluted water of the Loa River, the only watercourse located in the Antofagasta region, Chile. The water of this river contains high concentration of HM, such as copper (Cu), manganese (Mn) and zinc (Zn), but also other toxic elements, including arsenic (As) and boron (B). The origin of this pollution is associated to both, natural causes, and human activity, mainly because the development of industrial mining processes. Water pollution in this area is especially relevant due to the geographic and climatic particularity of the Atacama Desert region. Loa River is the only water supply for indigenous communities and it is an essential resource for industrial and economic activities.

Four microalgae species with promising potential in biosorption (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus almeriensis* and an indigenous *Chlorophyceae* spp. isolated from the study area) were tested for the removal of HM, As and B. Adsorption of As and B in microalgae biomass has been scarcely studied and no information about interferences of these elements in HM adsorption has been previously reported. Microalgal viability, growth and uptake capacity tests were conducted for the four microalgae species in monometallic and multimetallic solutions, evaluating the influence of operational factors such as pH and contact time on HM, As and B removal. Finally, FTIR studies were performed to understand the main contact sites between biomass and HM ions and to identify the interferences among the ions in all studies presented.

2. Materials & Methods

2.1. Microalgae cultures and reagents

The microalgae species selected in this study were *Chlamydomonas reinhardtii* 11-32b (SAG Culture Collection of algae), *Chlorella vulgaris* (University of Antofagasta, Chile), *Scenedesmus almeriensis* (University of Almeria, Spain) and a strain isolated from the Loa River in Chile (*Chlorophyceae* spp.). This isolation and purification was carried out by serial dilution and plating. The culture medium used was Bristol medium (UTEX S.A) enriched with a trace metal solution from F/2 of Guillard medium (UTEX media). The pH of the medium was 6.5 ± 0.1 . Microalgae biomass was cultivated via inoculation of 50 mL 7-days cultures in exponential growth into 2.1 L gas tight bottles containing 950 mL of fresh culture medium. The bottles were supplied with a constant flow of CO₂ (volume concentration > 99.9%, Abello Linde, Spain) and magnetically agitated (250 rpm) at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ for a period of 7 days prior testing. A 12:12 h:h photoperiod using LEDs lamps at $1000 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ was used for biomass cultivation, which was conducted under sterile conditions. Optical microscopy analysis was periodically performed in order to check cell culture viability and purity.

The toxic metals and the concentration range of synthetic solutions used in this study were selected based on the composition of the Loa River water. From a recompilation of composition data covering a wide area, representative collecting points were selected and water samples analyzed following the analytical procedure described in section 2.4. Maximum values of toxic elements resulted: 64 mg/L B, 11.7 mg/L As, 1.5 mg/L Cu, 2.1 mg/L Mn, 3.4 mg/L Zn, with pH ranging from 6.85 to 8.49. Initial concentrations of 60 mg/L for B, 12 mg/L for As and 3 mg/L for Cu, Mn and Zn were selected, in order to harmonize the HM adsorption study.

Stock solutions of As of 600 mg/L and B of 3000 mg/L were prepared using Na₂HAsO₄·7H₂O (Sigma Aldrich) and H₃BO₃ (Sigma Aldrich) in ultrapure water. Stock solutions of 150 mg/L of Cu, Mn and Zn were prepared using CuSO₄·5H₂O, MnCl₂·4H₂O and ZnCl₂ (Sigma Aldrich, Germany) in ultra-pure water. For multimetallic experiments, a synthetic stock solution containing 600 mg/L of As, 3000 mg/L of B and 150 mg/L of Cu, Mn and Zn was prepared. The stock solutions were stored at 4°C and periodically analyzed for quality assurance

purposes. Solutions of NaOH (0.1 M) and HCl (0.1 M) were used for pH adjustment. All chemicals employed in this study were analytical grade. All plastic and glass containers were washed in diluted HNO₃ (10% v/v) for 24 h and rinsed 3 times with Milli-Q water (R > 18 MΩ cm) before use.

2.2. Microalgal viability and growth inhibition tests

Viability and growth inhibition tests were carried out to elucidate the influence of metal concentration on the growth of the four microalgae tested. The tests were performed in glass flasks of 120 mL containing culture medium inoculated with a 7-days culture in exponential growth to an initial biomass concentration of 25 mg/L. Monometallic stock solutions were added in order to obtain three different concentrations: As-6, 9 and 12 mg/L; B-60, 120 and 180 mg/L; Cu, Mn and Zn-2, 4 and 6 mg/L in a final volume of 50 mL. The air headspace was filled with CO₂ at 10%. The bottles were incubated under a 12:12 h:h photoperiod at 1000 μE/m²/s at 23 ± 2°C under magnetic agitation (250 rpm). Control tests without metals were also prepared as above described, adding distilled water to the cultures. Optical density at 540 nm (OD₅₄₀), pH and CO₂ headspace concentration were monitored for 7 days.

The growth inhibition (G_i) of the microalgae biomass was calculated by comparing optical densities in terms of percentage, as defined by Eq. 1:

$$G_i = \left(\frac{OD_{540 \text{ control}} - OD_{540 \text{ sample}}}{OD_{540 \text{ control}}} \right) 100 \quad \text{Eq.1}$$

Where OD_{540 sample} means optical density of the analyzed experiment and OD_{540 control} optical density of the control test at identical conditions.

2.3. Influence of pH and contact time on the metal uptake efficiency

Metal uptake experiments were carried out in order to study the removal capacity of the four selected microalgae under different conditions of pH and contact time. All tests were performed batchwise using a total volume of 50 mL of metal solution in glass flasks of 120 mL. The initial concentration of biomass

(obtained after centrifugation) for all the tests was 1000 mg/L. The uptake of toxic metals by microalgae biomass was calculated in terms of the experimental uptake capacity (q) as follows (Eq. 2):

$$q = \frac{V(C_i - C_f)}{W} \quad \text{Eq. 2}$$

Where q is the uptake capacity of the biomass at the specific contact time studied (mg toxic element/g of biomass); C_i and C_f are the initial and final metal concentrations, respectively (mg toxic element/ L), V is the volume of suspension (L) and W is amount of dry microalgae (g).

On the other hand, the metal removal efficiency (Y_R) was also evaluated and expressed in percentage as defined by Eq. 3:

$$Y_R = \left(\frac{C_i - C_f}{C_i} \right) 100 \quad \text{Eq. 3}$$

2.3.1. Monometallic adsorption studies

All monometallic adsorption studies were conducted collecting samples at 10 minutes and 3 hours. These times were selected in order to compare the initial adsorption on microalgae surface and the adsorption equilibrium value. Equilibrium was considered at 3 h, as reported in previous works (Abdel-Ghani and El-Chaghaby, 2014; Bulgariu and Bulgariu, 2012). In order to study the effect of pH on the removal capacity of the biomass, pH was modified by addition of HCl (0.1 M) or NaOH (0.1 M) to three initial values (5.5, 7.0 and 9.5) prior to metal addition. This pH range was selected based on the viability range of living biomass, since more extreme conditions can significantly affect microalgal metabolism and induce cell damage (Zeraatkar et al., 2016). An aliquot of 1 mL of monometallic stock solution was added into 49 mL of microalgae suspension in order to achieve an initial concentration of As of 12 mg/L, B of 60 mg/L and Cu-Mn-Zn of 3 mg/L. The tests were conducted under magnetic stirring (250 rpm), at $23 \pm 2^\circ\text{C}$, in the absence of illumination and without CO_2 addition, in order to minimize the microalgae metabolism influence. Samples of 5 mL were taken using sterile syringe at contact times of 10 min. and 3h. Then, the samples were filtered through 0.45 μm -pore diameter membrane filters (Whatman paper), acidified with 30 μL of HNO_3 (0.1 M) and stored at 4°C prior analysis of metal concentrations.

2.3.2. Multimetallic adsorption studies

The initial concentrations of the toxic metals studied were those used in the monometallic tests. In order to work on similar conditions as those existing in photobiorreactors for water treatment, the initial pH was adjusted to 7.0 (Posadas et al., 2015; Valdés et al., 2012). The tests were conducted at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ under magnetic agitation (250 rpm). During the first 3 h, no illumination nor CO_2 addition were applied, in order to minimize the microalgae metabolism influence. After this contact time, CO_2 was injected in the closed flasks to reach a headspace concentration of 10% under a 12:12 h:h photoperiod at $1000 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$. The systems were incubated for 72 h, the typical hydraulic residence time on photobiorreactors used for water treatment (Acién et al., 2012). Samples of 5 mL were taken at 3 h, 24 h and 72 h of contact time. Samples were filtered through $0.45 \mu\text{m}$ -pore diameter membrane filters (Whatman paper) and acidified with $30 \mu\text{L}$ of HNO_3 (0.1 M) prior metal quantification. Final Total Suspended Solids (TSS) was determined for all the tests. Uptake capacities were calculated respect to the average amount of dry microalgae.

The total molar uptake capacity of the microalgae biomass (mg/mmol) was obtained as the sum of the individual molar uptake capacities, calculated by dividing the (q) value between the molecular mass of each element, as defined by Eq. 4:

$$mq = \sum \frac{q_{\text{toxic element}}}{MW_{\text{toxic element}}} \quad \text{Eq.4}$$

Where q is the experimental uptake capacity (Eq. 2), and MW is the molecular mass of each toxic element studied.

2.3.3. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis

Samples of *C. reinhardtii* after adsorption of different elements at pH 7.0 were analyzed by FTIR. In order to analyze the interactions among the HM studied and the interfering effect of As and B, monometallic (Cu, Mn and Zn) and multimetallic [B+Cu+Mn+Zn], [As+Cu+Mn+Zn] and [B+As+Cu+Mn+Zn] solutions were studied. Concentrations of As of 12 mg/L, B of 60 mg/L and Cu-Mn-Zn of 3 mg/L were used. The tests were conducted at two different contact times: 10 min and 3 h. Biomass was centrifuged at 4500 rpm for 7 min, dried in an oven at 45° C for 48 h and grinded to a fine powder for FTIR determination. Control test was prepared using raw biomass without metallic solution.

2.4. Analytical methods

CO₂ concentration was measured by gas chromatography in a Bruker 430 GC-TCD (Palo Alto, USA), according to (Cantera et al., 2016). The pH was measured using a pH-meter Basic 20+ (Crison, Spain) and cell growth was monitored spectrophotometrically by optical density at 540 nm (OD₅₄₀) using a Helios-Alpha spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). As, B, Cu, Mn and Zn concentration was determined by Inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) in octopole reaction System (HP 7500 cc, Agilent, USA). FTIR spectroscopy measurements were performed at 400 and 4000 cm⁻¹ in a Model Tensor 27 (Bruker, USA) - with ATR Golden Gate device Tecknokroma model.

3. Results and discussion

3.1. Microalgal viability and growth inhibition tests

The results evidenced a clear correlation between the growth of biomass, monitored by the increase in optical density and pH, and the consumption of CO₂ (data not shown). Figure 1 depicts the time course of these parameters in a *Chlamydomonas reinhardtii* culture in the presence of B and Cu. All control tests (absence of metals) presented a lag phase with values in optical density and pH constant between days 0 and 1. Then, culture OD₅₄₀ increased by a factor of 5 between days 1 and 4, while pH increased from 6.5 to >

10 during the same period. Biomass stopped growing at day 4 and a reduction by 10% in the optical density of the cultures was recorded between days 4 and 7. Likewise, a slight decrease in CO₂ concentration was recorded during the first 24 hours of incubation followed by a complete consumption in the following three days.

The results showed that all microalgae species studied were viable regardless of the metal tested, although microalgae metabolisms were partially inhibited in the presence of high concentrations of B, Cu. Tolerance to toxicants was species specific, and microalgae growth was always more affected by the presence of boron likely due to its higher concentration.

Surprisingly, the indigenous *Chlorophyceae* spp., was the most sensitive species, with a severe growth inhibition even at 60 mg/L of B (Gi: 36%). *Scenedesmus almeriensis* growth was also strongly affected by B. Indeed, culture OD₅₄₀ only achieved 56% of the control optical density at 60 mg/L of B and the 20% at higher concentrations. *C. reinhardtii* presented a low inhibition at 60 mg/L of B, but achieved a Gi of 60 % at 120 mg/L and no growth was recorded at 180 mg/L of B. *Chlorella vulgaris* was the more resistant species with no inhibition even at 120 mg/L of B, although B concentrations of 180 mg/L completely inhibited *C. vulgaris* growth.

The most sensitive specie to Cu was *Chlorophyceae* spp., whose metabolism was severely affected at all the concentrations studied. A significant lag phase was presented at 2 mg/L of Cu (Gi: 70% at day 4), although a similar *Chlorophyceae* spp., growth was recorded by day 7. The time course of pH and CO₂ concentration correlated to biomass growth, confirmed the complete inhibition of *Chlorophyceae* spp., at the highest Cu concentrations. *S. almeriensis* growth was reduced by 10% at 2 and 4 mg/L of Cu, but was severely inhibited at 6 mg/L of Cu (Gi: 80% at day 7). *C. vulgaris* resulted more resistant to inhibition by Cu with Gi: 20% at day 4 and 60% at day 7 at 6 mg/L. Similar Cu tolerance limits were reported in growth inhibition studies at 7 days contact time, with sub-lethal Cu dosages of 1.59 mg/L for *Chlorella sorokiniana* and of 3.18 mg/L for *Scenedesmus acuminatus* (Hamed et al., 2017). These results confirmed the high inhibitory effect of Cu, attributed in previously published works to the influence of this toxic metal in the microalgae metabolism,

cell wall structure and cell division (Torres et al., 2017). Only *C. reinhardtii* was tolerant to all the Cu concentrations tested.

On the other hand, the growth of the four microalgae species in the presence of As, Mn and Zn was not affected in the range of concentrations tested, as confirmed by the similar time course of optical density, pH and CO₂ concentration to that of the control. Only a slight lag phase during the growth of *Chlorophyceae* spp., and in the evolution of the pH of its cultivation medium was observed at the highest concentration of As (12 mg/L). Thus, culture OD₅₄₀ by day 4 at 12 mg As/L was 20% lower than that recorded in the control tests. Nevertheless, the concentration of *Chlorophyceae* spp., at 12 mg As/L was similar to that of control by day 7. Surprisingly, although no significant variation in the time course of the optical density or CO₂ concentration compared to the control tests was observed at the 3 Zn concentrations tested, a slight lag phase in the time course of the pH was recorded.

The species in study shown high Zn tolerance compared with previously published results. Therefore, *Nannochloropsis salina* growth was reduced by 50% at 2.64 mg/L Zn concentration (Dong et al., 2014). Differences in sensitivity could be related with the specie but also with the very low initial biomass concentration of 0.05 mg/L used in that work (Torres et al., 2017; Nalimova et al., 2005).

3.2. Monometallic biosorption studies

The results of the uptake capacity of microalgae at 3 hours at pH 7 showed remarkable differences among species for the metals tested (Figure 2). The As and B removal efficiencies were low, with values ranging from 10.5% (As) and 21.4% (B) for *C. vulgaris* to 20.1% (As) and 25.6% (B) for *C. reinhardtii*. Overall, the uptake capacities were much lower for As (1.31 – 2.56 mg/g) than for B (12.40 -14.84 mg/g), which might be explained by the higher initial concentration of B. Higher removal efficiencies were obtained for Cu, Mn and Zn than for As and B. *C. vulgaris* supported the highest Y_R of 87.9% for Cu, 99.4% for Mn and 88.8% for Zn. Uptake capacities for these toxic metals ranged from 1.51 to 2.65 mg Cu/g, 1.65 to 3.17 mg Mn/g and 0.88 to 2.68 mg Zn/g. Despite the high Y_R found in these tests, the uptake capacities of Cu, Mn and Zn were

remarkably lower than those reported in literature likely due to the low metal concentrations used in this research (Mehta and Gaur, 2001b; Zeraatkar et al., 2016).

3.2.1 Effect of the pH

The influence of the pH on the uptake capacity (Figure 2) was metal specific. Arsenic adsorption decreased at pH 7.0, with Y_R increasing from 20.1% at pH 7.0 to 33.6% at pH 5.5 and 38.6% at pH 9.5 in *C. reinhardtii* and from 10.5% at pH 7.0 to 32.4% and 29.0% at pH 5.5 and 9.5, respectively, in *C. vulgaris*. This low adsorption at pH 7 was likely mediated by the pKa (6.8) of As (V) species (Álvarez-Benedí et al., 2005). The highest As removal efficiency was achieved at pH 9.5 with *S. almeriensis* (41.7%).

No clear pH effect was found in the boron adsorption tests. The Y_R for B ranged from 20.4% in *Chlorophyceae* spp., to 33.5% in *C. reinhardtii*, both results at pH 5.5. A negligible pH effect was also observed for Cu biosorption, with lowest removal efficiencies at pH 7 and similar results at pH 5.5 and pH 9.5. Nevertheless, the highest Cu Y_R (87.9%) was found at a neutral pH in *C. vulgaris*. The effect of pH on Cu sorption has been reported in literature with different results depending on the microalgae species and conditions. Optimal uptake capacities were obtained at the range of pH 4-5 for *Chlorella vulgaris* working with 100 mg/L Cu concentrations (Al-Rub et al., 2006) and at pH 6 for *Chlamydomonas reinhardtii* (Flouty and Estephane, 2012).

The maximum uptake capacities of Mn and Zn were obtained at pH 5.5 for all microalgae tested except *C. vulgaris*. *C. reinhardtii* and *S. almeriensis* supported the highest Mn removal efficiencies at pH 5.5 (Y_R of 92.8% and 92.1%, respectively). The effect of pH on Zn adsorption was severe in *S. almeriensis* and *Chlorophyceae* spp., Y_R decreasing from 91.9% and 89.7% at pH 5.5 to 30.0% and 29.0% at pH 9.5, respectively. Maximum removal efficiencies were also found at pH 6 by Yang et al. (Yang et al., 2015) for Mn (II) in *Chlorella minutissima* UTEX2341, and by Monteiro et al. (Monteiro et al., 2009) for Zn in *Scenedesmus obliquus*.

3.2.2 Influence of the contact time

The concentration of all the target metals decreased significantly within the first 10 minutes of contact time, which is typically attributed to the binding of the metal to the cell wall surface (Markou et al., 2015; Winters et al., 2017). Figure 3 shows the difference between uptake capacities (q) at 3 h and 10 min of contact time. Thus, the maximum As uptake capacity was reached after 10 minutes and decreased in most of the tests after 3 h of contact, which suggested the exudation of this toxic element by the biomass (Wang et al., 2015). This reduction in As removal was remarkable at pH 7.0, with Y_R decreasing by a factor of 2 for all the microalgae species studied. However, no decrease in the As uptake capacity with time was observed at pH 9.5. In fact, the Y_R of As even increased in *S. almeriensis* from 25.8% at 10 minutes to a maximum value of 41.7% at 3 h.

Boron uptake also decreased with the time course of the adsorption experiment. The removal efficiency of B in *S. almeriensis* always decreased with time, this decrease being more remarkable at pH 5.5 (from 38.6% at 10 minutes to 28.3% at 3 h.). No correlation between pH and the decrease in Boron Y_R with time was observed, the highest reductions being recorded at pH 7 (from 36.6% to 21.4%) in *C. vulgaris* and at pH 9.5 in *C. reinhardtii* (from 38.2% to 24.3%). The only test resulting in a remarkable increase of B uptake with time was that of *Chlorophyceae* spp., at pH 5.5. In this context, previous studies using the fungi *Aspergillus versicolor* as biosorbent reported the same trend in B biosorption yields with the time course, with Y_R decreasing from 41.4% at 15 minutes to 20% - 25% after 1h - 4h of contact time (Laçin et al., 2015).

On the other hand, the uptake capacities of Cu, Mn and Zn at pH 5.5 increased with contact time for all species studied. This enhancement in the biosorption performance was especially relevant for *S. almeriensis*. Indeed, this microalga supported increases of in the removal efficiency of Mn and Zn from 50.0% to 92.1%, and from 61.6% to 89.7% when the contact time was increased from 10 min to 3 h. Similarly, *C. reinhardtii* supported increases in Y_R from 55.1% and 44.7% (at 10 min) to 92.8% and 87.0% (at 3 h) for Mn and Zn, respectively. The removal efficiency of Cu and Mn in *C. vulgaris* always increased with the time course

regardless of the pH. For instance, the Y_R of this microalga at pH 7 for Cu increased from 55.4% at 10 minutes to 87.9% at 3 h. Finally, the removal efficiency of Zn increased from 36.0% at 10 minutes to 84.2% at 3h at pH 7 in *C. reinhardtii*.

3.3. Multimetallic adsorption studies

No inhibition was detected from initial and final values of biomass concentrations, with microalgae biomass growing in all the control and multimetallic experiments. The measured growth resulted lower than 15% (w/w) in all the tests (data not shown).

The uptake capacities recorded in the multimetallic biosorption studies are shown together with monometallic results (3 h, pH 7) for a comparative reason, in Figure 4. The lowest Y_R after 3 hours were found for B, which suggests that the presence of other metals interfered on B adsorption in all microalgae tested (except for *Chlorophyceae* spp.), in spite of the high concentrations of this element in the multimetallic solution. B removal efficiencies decreased from the 21.4% in monometallic solutions to 6.6% in *C. vulgaris*, from 25.6% to 0.2% in *C. reinhardtii* and from 22.9% to 3.6% in *S. almeriensis*. Similarly, the Mn adsorption was also impacted by the presence of other metals species in *C. vulgaris* and *C. reinhardtii*. Thus, Mn removal decreased from 99.4 and 88.8% Y_R values in monometallic solutions to $\approx 60\%$ at 3 h in multimetallic solutions. On the contrary, the As uptake capacity increased by a factor of 3 in *C. vulgaris*, 2.5 in *Chlorophyceae* spp., and 1.7 in *S. almeriensis* in multimetallic compared to monometallic solutions. The highest removal efficiencies in multimetallic systems were obtained for Cu and Zn, with Y_R higher than 78% for all microalgae tested. Zn removal accounted for 96% in *C. reinhardtii* in multimetallic solution. In this context, the uptake capacities of heavier metals such as As, Cu and Zn in multimetallic media increased at the expenses of a reduction in the adsorption of lighter elements like B and, to a lesser extent, Mn. The same tendency had been reported in multimetallic solutions in *C. reinhardtii* and *Chlorella pyrenoidosa*, whose uptake capacities of Cu and Zn were twice higher than that of Mn (Zhao et al., 2013). Nevertheless, these results suggested that the recorded interference among metals cannot be attributed to a competition

by binding sites. The total molar uptake capacities, and therefore the number of occupied sites in *S. almeriensis*, *C. vulgaris* and *C. reinhardtii*, was lower in multimetallic solutions than the molar uptake capacities of B in monometallic solutions (Figure 5). The same trend was observed in terms of mass uptake capacities. However, this phenomenon was not presented in *Chlorophyceae* spp., showing even an increase on its uptake capacities of As, Cu, Zn and Mn while maintaining its B adsorption potential. The only species coming from an environment rich in B, *Chlorophyceae* spp., supported the best removal efficiencies within the first 3 h, with Y_R of 30.9% for As, 22% for B, 85.2% for Cu, 66.1% for Mn and 95.9% for Zn. On the contrary, the minimum removal efficiencies were recorded in *C. reinhardtii*, with Y_R of 18.8% for As, 0.2% for B, 78.1% for Cu and 56.7% for Mn, but 88.3% for Zn.

On the other hand, a limited impact of the contact time on As and B adsorption in multimetallic solutions was observed regardless of the microalgae (Figure 4). The B uptake capacity of *C. vulgaris* decreased with time down to a removal efficiency of 1% as reported in section 3.2.2 in monometallic solutions. Only a slight increase with time of B removal efficiency in *C. reinhardtii* (Y_R 5.5%) was observed. The Mn uptake capacities of *S. almeriensis* and *C. reinhardtii* increased with the contact time in multimetallic solutions, with Y_R increasing from 63.0% and 56.7% at 3 h to 78.0% and 85.6% at 72h, respectively (as recorded in monometallic solutions). The Zn removal efficiencies decreased with time for all the species. This reduction was remarkable in *Chlorophyceae* spp., and *C. vulgaris* and resulted in Y_R values at 72 h of 42.5% and 49.4%, respectively. The Cu uptake capacity of *Chlorophyceae* spp., also decreased with the contact time, with an associated reduction in Cu removal efficiency from 85.2% to 61.8%. Overall, these results did not suggest the occurrence of competition for free sites in the microalgae cell wall since the reduction in the uptake capacity over time for some metals was not balanced by the increase in the adsorption of others (Figure 5).

3.4. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis

C. reinhardtii was selected as a model microalga for the FTIR analysis due to the remarkably different uptake capacities exhibited in monometallic and multimetallic solutions. FTIR spectra of *C. reinhardtii* incubated for

10 min and 3h in different metallic solutions were compared to raw biomass as control (e-supplement Fig.1). The spectrum after 10 min exposure to the multimetallic solution of B, As, Cu, Mn and Zn showed important peak modifications in the ranges 1150-1300 cm^{-1} (related with phosphate ester group P=O), 1350-1400 cm^{-1} (amide III), 1535 cm^{-1} (amide II), 1645 cm^{-1} (amide I) and 3300 cm^{-1} (O-H and N-H stretching). Nevertheless, the intensity of these peaks decreased after biomass exposure for 3 h to the multimetallic solution. Interference in the interaction of cations with the carboxyl and amide groups have been previously reported in multimetallic adsorption studies of Ni, Zn and Pb in *C. vulgaris* and *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Rodrigues et al., 2012), and of Zn in *C. vulgaris* (Ferreira et al., 2011).

The spectra of *C. reinhardtii* after a 10 minutes exposure to monometallic solutions showed a remarkable impact of Cu on the amide III and the 1000-1150 cm^{-1} zone, which are related to C-C and C-O stretching mode of the polysaccharides hydroxyl groups. Cu was the only metal affecting the 3300 cm^{-1} zone, probably due to the formation of aqueous complexes. Peaks of 1535 cm^{-1} and 1741 cm^{-1} (C=O group) were also affected by Cu. The impact of Cu was remarkably reduced after 3 h of exposure, although the change in the uptake capacity with contact time was not relevant for this metal (section 3.2.2). Mn and Zn caused a minor modification in the FTIR spectrum compared to the control biomass.

The impact of As and B was assessed by adding these elements to a mixture containing Cu, Mn and Zn, showing their respective FTIR spectrum with the control at Figure 6e, 6f. Important modifications in the spectrum of [As-Cu-Mn-Zn] at 1153 cm^{-1} and 1228 cm^{-1} bands were presented. These bands modifications (which increased with the exposure time) suggested that As adsorption was mediated by the presence of the P=O groups in the *C. reinhardtii*. On the other hand, the main differences in the FTIR spectrum of the biomass exposed to [B-Cu-Mn-Zn] quaternary mixtures compared to the raw biomass control can be explained by the presence of Cu and Mn in the solution. A negligible effect of boron was observed. These results agree with the low B uptake capacity of *C. reinhardtii* in multimetallic solutions.

4. Conclusions

Viability tests demonstrated tolerance of the four microalgae, resulting *Chlorophyceae* spp., the most sensible with inhibition starting from B 60 mg/L and Cu 4 mg/L. Except for *C. vulgaris*, higher uptake capacities were found when shifting pH from neutrality, especially for As, B and Cu. Maximum Mn and Zn uptakes with *Chlorophyceae* spp., and *S. almeriensis* were obtained at pH 5.5. *Chlorophyceae* spp., shown a relevant performance in multimetallic studies, enhancing As and metals removal, and maintaining B uptake, which decreased dramatically in other microalgae. FTIR shown interaction of Cu with carboxyl and amide groups, and As with P=O group.

5. Acknowledgments

This work was supported by the research unit UIC 071 of the “Junta de Castilla y León – JCYL”, Spain. The authors thank “Ministerio de Economía y Competitividad – MINECO” (CTQ2017-84006-C3-1-R) supported by FEDER program, and “Junta de Castilla y León – JCYL” (VA094U14) for the financial support of this work. Ricardo Saavedra Concha wishes to thank the National Commission of Science & Technology (CONICYT) of Chile for providing his Doctorate Scholarship (CONICYT - Doctorado Nacional – 21140576). Authors thank Dr. Fernando Rull (University of Valladolid) for his assistance in FTIR spectra interpretation.

6. References

1. Abdel-Ghani, N., El-Chaghab, G., 2014. Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: a review of recent studies. *Mnkjournals.Com* 3, 24–42.
2. Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30, 1344–1353.
doi:10.1016/j.biotechadv.2012.02.005
3. Akunwa, N.K., Muhammad, M.N., Akunna, J.C., 2014. Treatment of metal-contaminated wastewater: A comparison of low-cost biosorbents. *J. Environ. Manage.* 146, 517–523.

doi:10.1016/j.jenvman.2014.08.014

4. Al-Rub, F.A.A., El-Naas, M.H., Ashour, I., Al-Marzouqi, M., 2006. Biosorption of copper on *Chlorella vulgaris* from single, binary and ternary metal aqueous solutions. *Process Biochem.* 41, 457–464.
doi:10.1016/j.procbio.2005.07.018
5. Álvarez-Benedí, J., Bolado, S., Cancillo, I., Calvo, C., García-Sinovas, D., 2005. Adsorption–Desorption of arsenate in three Spanish soils. *Vadose Zo. J.* 4, 282. doi:10.2136/vzj2004.0095
6. Bulgariu, D., Bulgariu, L., 2012. Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresour. Technol.* 103, 489–493. doi:10.1016/j.biortech.2011.10.016
7. Cantera, S., Lebrero, R., Sadornil, L., García-Encina, P.A., Muñoz, R., 2016. Valorization of CH₄ emissions into high-added-value products: Assessing the production of ectoine coupled with CH₄ abatement. *J. Environ. Manage.* 182, 160–165. doi:10.1016/j.jenvman.2016.07.064
8. Dong, B., Ho, N., Ogden, K.L., Arnold, R.G., 2014. Cultivation of *Nannochloropsis salina* in municipal wastewater or digester centrate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103, 45–53.
doi:10.1016/j.ecoenv.2014.02.001
9. Ferreira, L.S., Rodrigues, M.S., de Carvalho, J.C.M., Lodi, A., Finocchio, E., Perego, P., Converti, A., 2011. Adsorption of Ni²⁺, Zn²⁺ and Pb²⁺ onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systems. *Chem. Eng. J.* 173, 326–333.
doi:10.1016/j.cej.2011.07.039
10. Flouty, R., Estephane, G., 2012. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. *J. Environ. Manage.* 111, 106–114. doi:10.1016/j.jenvman.2012.06.042.
11. Fu, F., Wang, Q., 2011. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *J. Environ. Manage.* 92, 407–418. doi:10.1016/j.jenvman.2010.11.011
12. Hamed, S.M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H., 2017. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 19–25.
doi:10.1016/j.ecoenv.2017.05.048
13. Konig-Péter, A., Csudai, C., Felinger, A., Kilar, F., Pernyeszi, T., 2014. Potential of various biosorbents

- for Zn(II) removal. *Water. Air. Soil Pollut.* 225. doi:10.1007/s11270-014-2089-4
14. Kumar, D., Pandey, L.K., Gaur, J.P., 2016. Metal sorption by algal biomass: From batch to continuous system. *Algal Res.* 18, 95–109. doi:10.1016/j.algal.2016.05.026
 15. Laçin, B., Tastan, B.E., Dönmez, G., 2015. Detection of boron removal capacities of different microorganisms in wastewater and effective removal process. *Water Sci. Technol.* 72, 1832–1839. doi:10.2166/wst.2015.409
 16. Lee, Y.C., Chang, S.P., 2011. The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora* filamentous macroalgae. *Bioresour. Technol.* 102, 5297–5304. doi:10.1016/j.biortech.2010.12.103
 17. Lo, Y.C., Cheng, C.L., Han, Y.L., Chen, B.Y., Chang, J.S., 2014. Recovery of high-value metals from geothermal sites by biosorption and bioaccumulation. *Bioresour. Technol.* 160, 182–190. doi:10.1016/j.biortech.2014.02.008
 18. Markou, G., Mitrogiannis, D., Çelekli, A., Bozkurt, H., Georgakakis, D., Chrysikopoulos, C. V., 2015. Biosorption of Cu²⁺ and Ni²⁺ by *Arthrospira platensis* with different biochemical compositions. *Chem. Eng. J.* 259, 806–813. doi:10.1016/j.cej.2014.08.037
 19. Mehta, S.K., Gaur, J.P., 2001. Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecol. Eng.* 18, 1–13. doi:10.1016/S0925-8574(00)00174-9
 20. Montazer-Rahmati, M.M., Rabbani, P., Abdolali, A., Keshtkar, A.R., 2011. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of cadmium, lead, and nickel ions from aqueous solutions by intact and chemically modified brown algae. *J. Hazard. Mater.* 185, 401–407. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.047
 21. Monteiro, C.M., Castro, P.M.L., Xavier Malcata, F., 2009. Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environ. Chem. Lett.* 9, 169–176. doi:10.1007/s10311-009-0258-2
 22. Monteiro, C.M., Fonseca, S.C., Castro, P.M.L., Malcata, F.X., 2011. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *J. Appl. Phycol.* 23, 97–103. doi:10.1007/s10811-010-9542-6

23. Nalimova, A.A., Popova, V. V., Tsoglin, L.N., Pronina, N.A., 2005. The effects of copper and zinc on *Spirulina platensis* growth and heavy metal accumulation in its cells. Russ. J. Plant Physiol. 52, 229–234. doi:10.1007/s11183-005-0035-4
24. Posadas, E., Morales, M. del M., Gomez, C., Ación, F.G., Muñoz, R., 2015. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. Chem. Eng. J. 265, 239–248. doi:10.1016/j.cej.2014.12.059
25. Rodrigues, M.S., Ferreira, L.S., Carvalho, J.C.M. de, Lodi, A., Finocchio, E., Converti, A., 2012. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*: Multi-metal systems. J. Hazard. Mater. 217–218, 246–255. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.03.022
26. Tchounwou, P.B., Yedjou, C.G., Patlolla, A.K., Sutton, D.J., 2012. Heavy metal toxicity and the environment. EXS. 101, 133-164. doi:10.1007/978-3-7643-8340-4
27. Torres, E.M., Hess, D., McNeil, B.T., Guy, T., Quinn, J.C., 2017. Impact of inorganic contaminants on microalgae productivity and bioremediation potential. Ecotoxicol. Environ. Saf. 139, 367–376. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.01.034
28. Valdés, F.J., Hernández, M.R., Catalá, L., Marcilla, A., 2012. Estimation of CO₂ stripping/CO₂ microalgae consumption ratios in a bubble column photobioreactor using the analysis of the pH profiles. Application to *Nannochloropsis oculata* microalgae culture. Bioresour. Technol. 119, 1–6. doi:10.1016/j.biortech.2012.05.120
29. Vijayaraghavan, K., Balasubramanian, R., 2015. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. J. Environ. Manage. doi:10.1016/j.jenvman.2015.06.030
30. Wang, Y., Wang, S., Xu, P., Liu, C., Liu, M., Wang, Y., Wang, C., Zhang, C., Ge, Y., 2015. Review of arsenic speciation, toxicity and metabolism in microalgae. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 14, 427–451. doi:10.1007/s11157-015-9371-9
31. Winters, C., Guéguen, C., Noble, A., 2017. Equilibrium and kinetic studies of Cu(II) and Ni(II) sorption on living *Euglena gracilis*. J. Appl. Phycol. 29, 1391–1398. doi:10.1007/s10811-016-1040-z
32. Wu, Q., Zhou, H., Tam, N.F.Y., Tian, Y., Tan, Y., Zhou, S., Li, Q., Chen, Y., Leung, J.Y.S., 2016.

Contamination, toxicity and speciation of heavy metals in an industrialized urban river: Implications for the dispersal of heavy metals. *Mar. Pollut. Bull.* 104, 153–161.

doi:10.1016/j.marpolbul.2016.01.043

33. Yang, J.S., Cao, J., Xing, G.L., Yuan, H.L., 2015. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresour. Technol.* 175, 537–544. doi:10.1016/j.biortech.2014.10.124
34. Zeraatkar, A.K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A.F., Moheimani, N.R., McHenry, M.P., 2016. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *J. Environ. Manage.*
doi:10.1016/j.jenvman.2016.06.059
35. Zhao, Y., Wang, B., Liu, C., Wu, Y., 2013. Biosorption of trace metals from aqueous multimetal solutions by green microalgae. *Chinese J. Geochemistry* 32, 385–391. doi:10.1007/s11631-013-0646-y

Figures captions

Figure 1. Time course of the optical density, CO₂ headspace concentration and pH in *Chlamydomonas reinhardtii* cultures (Initial concentration: 0.025 mg/L) in the presence of Boron (A, C, E) and Copper (B, D, F); [■]: Control (0 mg/L), [●]: (B 60 mg/L, Cu 2 mg/L), [▲]: (B 120 mg/L, Cu 4 mg/L), and [▼]: (B 180 mg/L, Cu 6 mg/L).

Figure 2. Influence of the pH on the 3h uptake capacities (mg/g) of 1g/L suspensions of *Chlorophyceae* spp. (CS), *Scenedesmus almeriensis* (SA), *Chlorella vulgaris* (CV) and *Chlamydomonas reinhardtii* (CR) for monometallic solutions with initial concentrations of A) Arsenic 12 mg/L, B) Boron 60 mg/L, C) Copper 3 mg/L, D) Manganese 3 mg/L and E) Zinc 3 mg/L, at pH 5.5 (■), pH 7.0 (▨) and pH 9.5 (▩).

Figure 3. Difference between uptake capacities (q) at 3 hours and 10 min of contact time (mg/g) in 1g/L suspensions of ■: *Chlorophyceae* spp. (CS), ▨: *S. almeriensis* (SA), ▩: *C. vulgaris* (CV), ▨: *C. reinhardtii* (CR), for monometallic solutions with initial concentrations of A) Arsenic 12 mg/L, B) Boron 60 mg/L, C) Copper 3 mg/L, D) Manganese 3 mg/L and E) Zinc 3 mg/L.

Figure 4. Uptake capacities (mg/g) at pH 7 for A) Arsenic, B) Boron, C) Copper, D) Manganese and E) Zinc in 1g/L suspensions of *Chlorophyceae* spp. (CS), *Scenedesmus almeriensis* (SA), *Chlorella vulgaris* (CV), *Chlamydomonas reinhardtii* (CR). Monometallic solution, 3h: (■), Multimetallic solution, 3h: (▨), Multimetallic solution, 24h: (▩) and Multimetallic solution, 72h: (▨).

Figure 5. Comparison of molar uptake capacities (mmol/g biomass) of boron monometallic solution and multimetallic solutions at pH 7 in 1 g/L suspensions of *Chlorophyceae* spp. (CS), *Scenedesmus almeriensis* (SA), *Chlorella vulgaris* (CV), *Chlamydomonas reinhardtii* (CR), in A) Monometallic boron solution- 3h, B) Multimetallic - 3h, C) Multimetallic - 24h and D) Multimetallic - 72h. For Boron (▨), Arsenic (▩), Copper (▨), Manganese (■) and Zinc (□).

Figure 1.

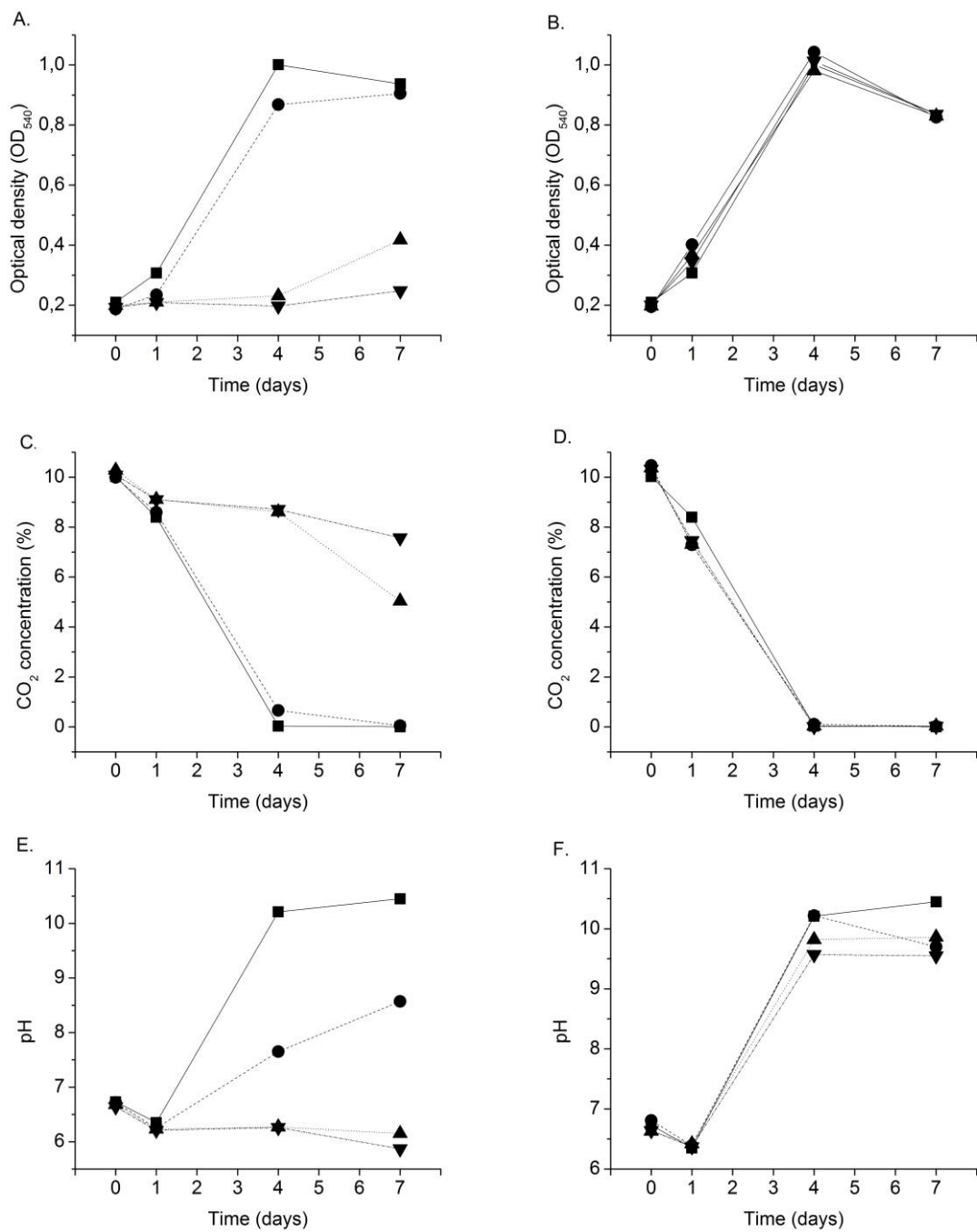


Figure 2.

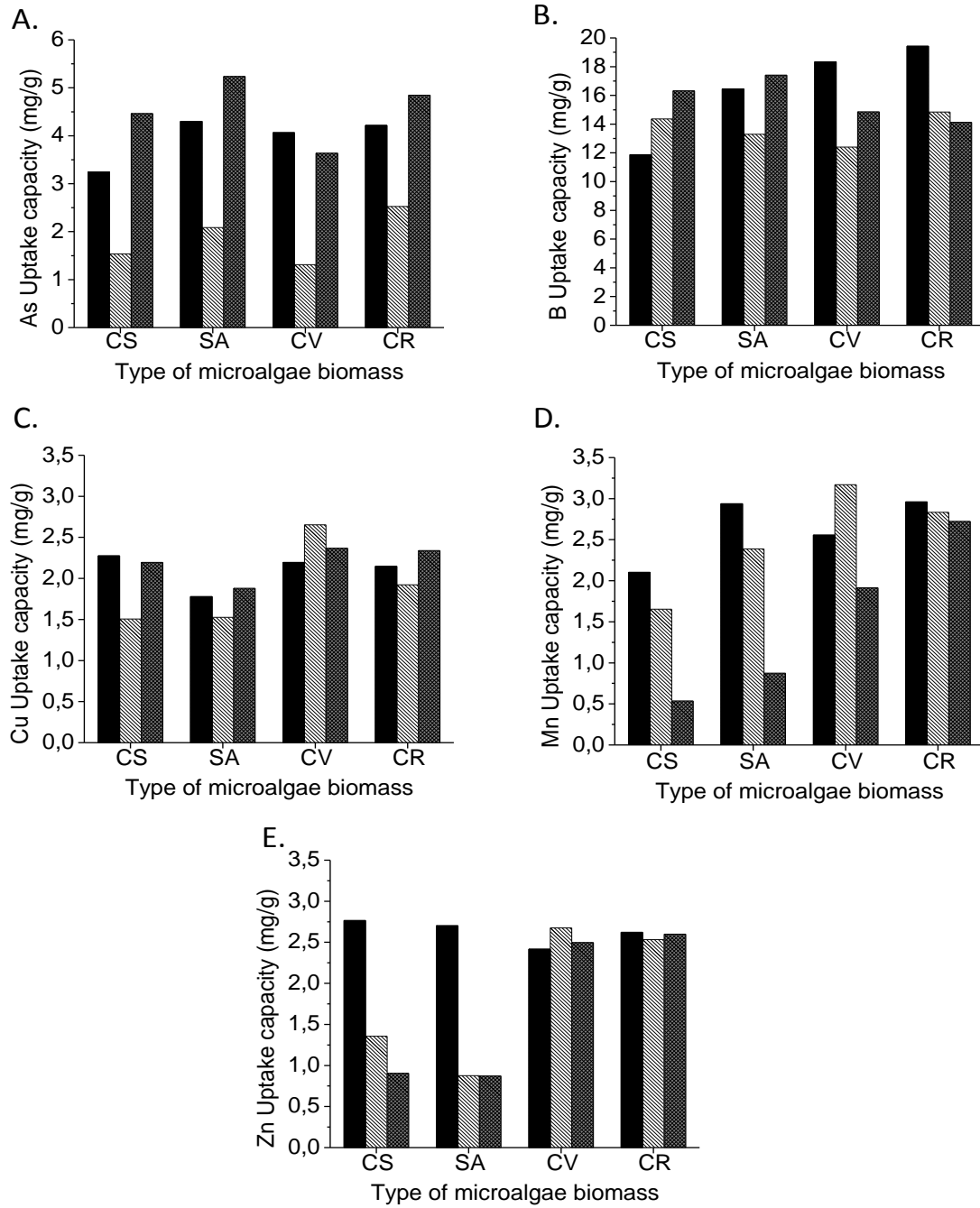


Figure 3.

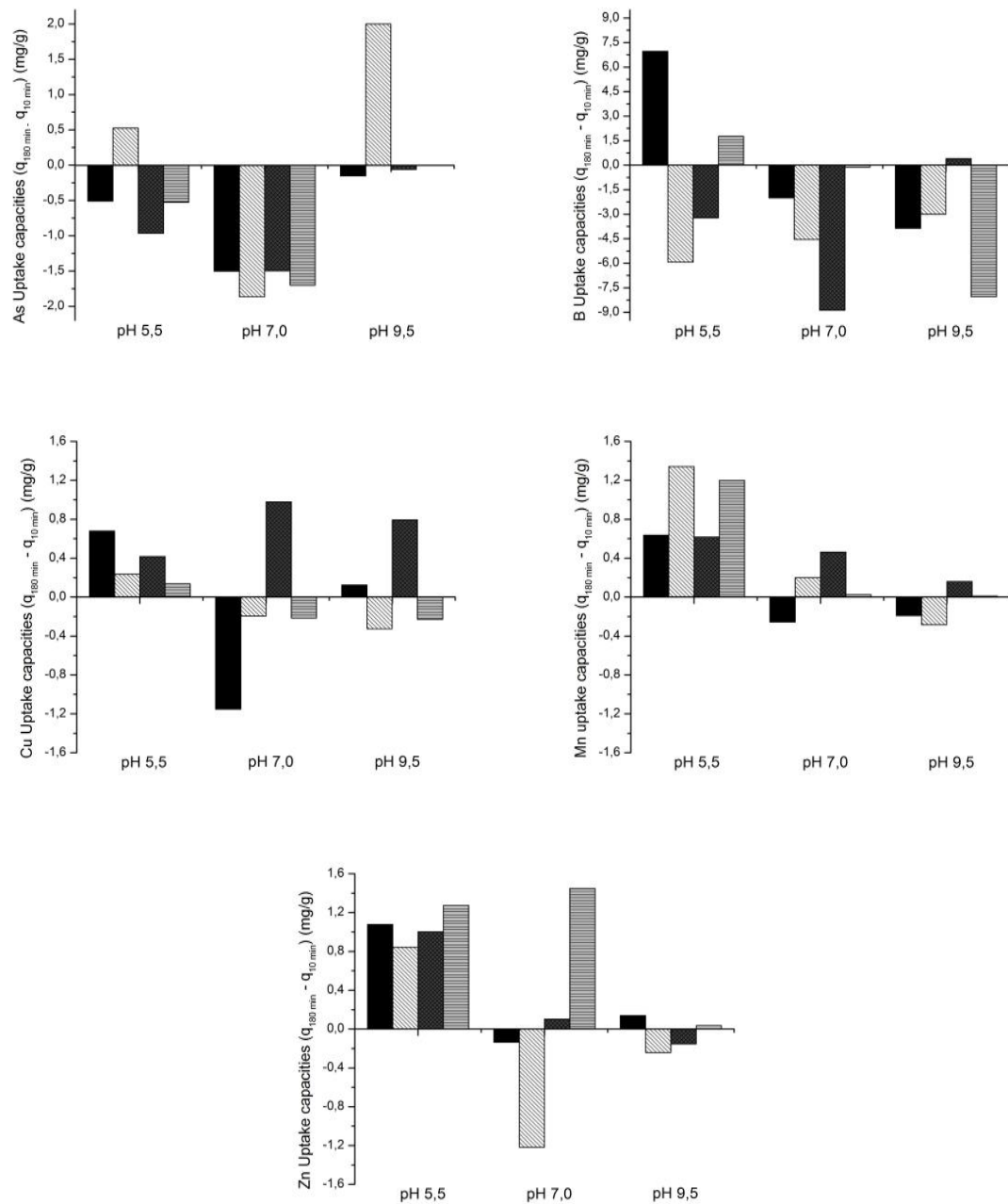


Figure 4.

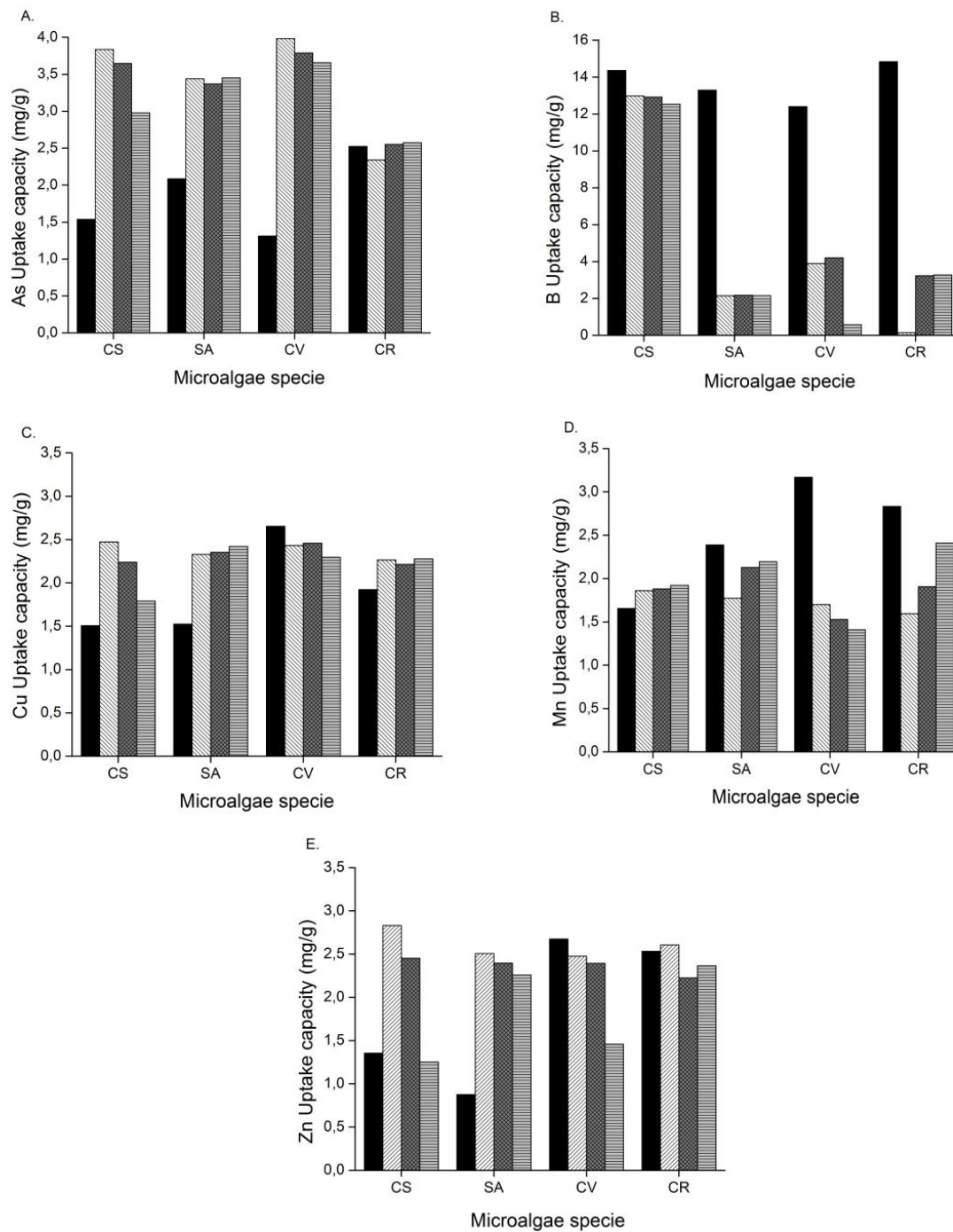
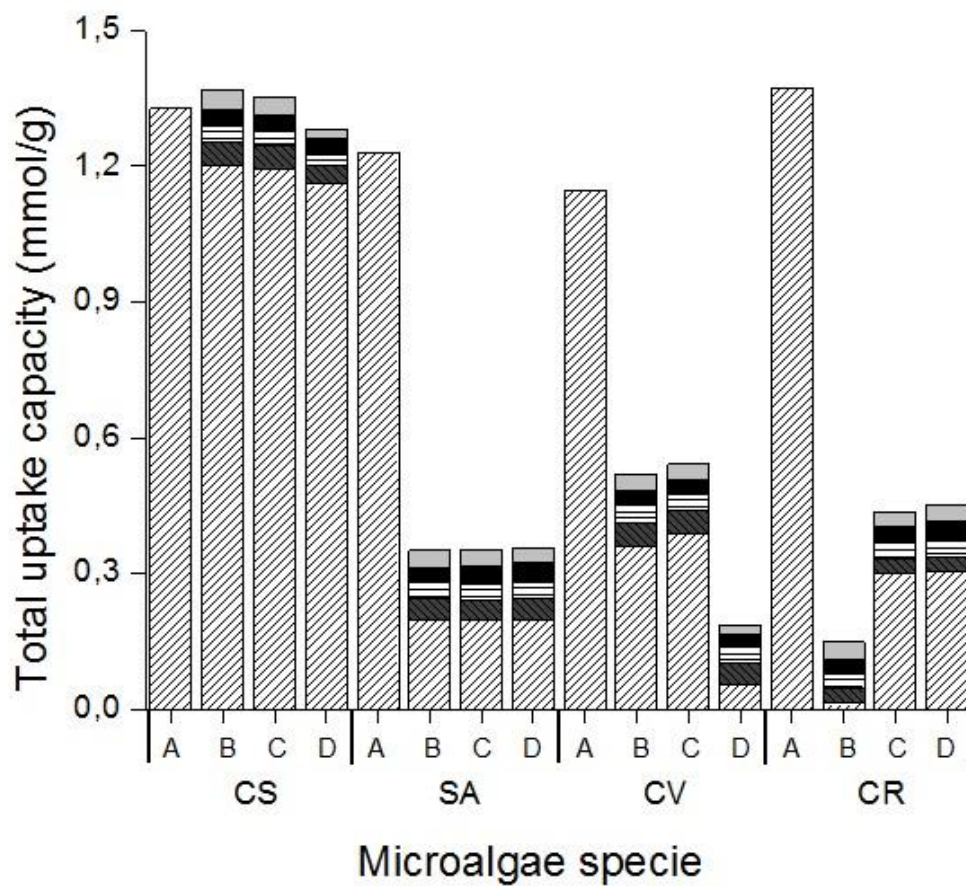


Figure 5.



Influence of organic matter and CO₂ supply on bioremediation of heavy metals by *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus almeriensis* in a multimetallic matrix

Ricardo Saavedra^{a,b}, Raúl Muñoz^{a,b}, María Elisa Taboada^c, Silvia Bolado^{a,b*}

^a Institute of Sustainable Processes. University of Valladolid, 47011, Calle Dr. Mergelina, s/n, 47011, Valladolid, Spain.

^b Department of Chemical Engineering and Environmental Technology, University of Valladolid, Calle Dr. Mergelina, s/n, 47011, Valladolid, Spain.

^c Department of Chemical Engineering, Universidad de Antofagasta, Avenue 02800, CP 1240000, Antofagasta, Chile

*Corresponding author: silvia@iq.uva.es

DECLARATIONS OF INTEREST: NONE

ABSTRACT

This research evaluated the influence of organic matter (OM) and CO₂ addition on the bioremediation potential of two microalgae typically used for wastewater treatment: *Chlorella vulgaris* (CV) and *Scenedesmus almeriensis* (SA). The heavy metal (HM) removal efficiencies and biosorption capacities of both microalgae were determined in multimetallic solutions (As, B, Cu, Mn, and Zn) mimicking the highest pollutant conditions found in the Loa river (Northern Chile). The presence of OM decreased the total biosorption capacity, specially in As (from 2.2 to 0.0 mg/g for CV and from 2.3 to 1.7 mg/g for SA) and Cu (from 3.2 to 2.3 mg/g for CV and from 2.1 to 1.6 mg/g for SA), but its influence declined over time. CO₂ addition decreased the total HM biosorption capacity for both microalgae species and inhibited CV growth. Finally, metal recovery using different eluents (HCl, NaOH, and CaCl₂) was evaluated at two different concentrations. HCl 0.1 M provided the highest recovery efficiencies, which supported values over 85% of As, 92% of Cu, and ≈ 100% of Mn and Zn from SA. The presence of OM during the loaded stage resulted in a complete recovery of As, Cu, Mn, and Zn when using HCl 0.1 M as eluent.

Keywords: *bioremediation, CO₂, heavy metal, microalgae, organic matter, toxicity.*

1. Introduction

Heavy metal (HM) pollution in bodies of water is an environmental problem that affects millions of people as well as important economic activities worldwide. Conventional technologies such as chemical precipitation, adsorption, ionic exchange, electrochemical treatment and reverse osmosis are expensive, not eco-friendly and not efficient for the treatment of dilute HM laden effluents (<100 mg/L) (Montazer-Rahmati et al., 2011). In addition, the increasingly stringent environmental regulations and public awareness of HM pollution have triggered the quest for novel and cost-competitive remediation technologies.

In this context, biosorption has arisen as a green alternative to conventional technologies for the treatment of effluents containing dilute metal concentrations (Suresh Kumar et al., 2015a). This technique is

based on the high affinity and fast adsorption kinetics exhibited by organisms such as bacteria, plant, microalgae species, or a mixture of them, towards inorganic pollutants (Bilal et al., 2018; Li et al., 2018; Zhang et al., 2012). In this context, microalgae have emerged as a promising biosorbent for water treatment due to the presence of a high number of functional groups in their cell wall that contribute to the removal of toxic elements from water in a simple, efficient, and economic manner (Zeraatkar et al., 2016). Previous studies have demonstrated the ability of microalgae species to adsorb HM ions from water, which confirms their high bioremediation potential (Cameron et al., 2018; Torres et al., 2017). For instance, a metal biosorption of 22.3 mg Zn (II)/g was obtained in a solution with 150 mg Zn/L, using the green microalgae *Scenedesmus obliquus* (Monteiro et al., 2011b). Moreover, *C. vulgaris* exhibited a biosorption capacity of 45.4 mg As/g in a solution with 200 mg As/L in an experiment of 7 days of contact time (Jiang et al., 2011).

On the other hand, many recent research efforts have focused on the integration of wastewater treatment (WWT), CO₂ mitigation and bioenergy production processes in microalgae-based photobioreactors (Gani et al., 2017; Rugnini et al., 2019). In this context, domestic and agroindustrial wastewaters contain high concentrations of organic matter (OM) and nutrients suitable for the growth of microalgae (B. Dong et al., 2014; Sahu et al., 2013). The performance of a microalgae-based WWT system depends directly on the capacity of microalgae to assimilate effectively inorganic carbon (CO₂), organic carbon, and nutrients like N and P, with the purpose to produce clean water and low-cost biomass that can be used for biofuels or for the generation of other bio-products (Abou-Shanab et al., 2013; Salama et al., 2017). Nevertheless, typical industrial and livestock wastewaters not only contain nutrients but also hazardous HM. The capacity of the microalgae used in WWT photobioreactors to remove HM in these wastewaters has been widely reported. For instance, a complete reduction of Cu and a 64.96% Zn removal were obtained in *C. vulgaris* cultures in sewage after 10 days at neutral conditions (El-Sheekh et al., 2016). Nevertheless, the biosorption capacity of microalgae in multimetal matrices has been sparsely studied. In this context, the interference of OM and CO₂ supply on HM adsorption has been reported in sediments and soils, but there is a limited understanding of these phenomena in microalgae (Álvarez-Benedí et al., 2005; X. Dong et al., 2014). This work will contribute to elucidate the potential of microalgae biomass for HM

removal and the effect of OM concentration and CO₂ supply on the biosorption process occurring in photobioreactors devoted to WWT. This will provide valuable information about the biosorption mechanisms, applicable also to other microbes.

Additionally, HM adsorption on microalgae biomass plays a key role during WWT but can remarkably affect the further valorization processes and bioproduct applications (Bădescu et al., 2018). The recovery of metals improves the economic viability of the process, thereby valorizing the bioremediation process and subsidizing the bioremediation process (Piccini et al., 2019). Therefore, recovery of HM might be needed before biomass processing, which will entail the recovery of HM in a concentrated form (Gupta and Rastogi, 2008). The recovery process can be carried out by proton exchange using eluents such as acid solutions (i.e. HCl, HNO₃), chelating agents (EDTA) or exchange with other ions (i.e. CaCl₂) (Vijayaraghavan and Balasubramanian, 2015a). Previous studies with *Scenedesmus quadricauda* using HNO₃ 0.5 M as the eluent revealed a desorption capacity of 90% for Cd and Pb (Mirghaffari et al., 2014).

This research combines the study of the effect of the presence of OM and CO₂ supply on the HM biosorption in a multimetallic solution using microalgae and the evaluation of alternatives of eluents to recover the HM retained in the biomass. Two green microalgae species currently used in studies of photobioreactors for WWT (i.e. *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus almeriensis*) with proven metal adsorption capacity were used as model microorganisms. The toxic elements As, B, Cu, Mn, and Zn were selected as model metals for this study based on the maximum pollution levels recorded in the Loa River basin, the main water source in the Antofagasta region (Chile): an arid region and mining zone with serious problems of water shortage and toxic metal pollution (Romero et al., 2003; Saavedra et al., 2018). Firstly, the effect of the OM concentration on the biosorption of HM by microalgae was studied, comparing the results with and without CO₂ supply. Variables such as microalgae growth, pH and TOC (total organic carbon) depletion were also monitored for a comprehensive understanding of the OM effect in the bioremediation process. Then, the recovery of toxic elements retained by harvested biomass using three different eluents (HCl, NaOH, CaCl₂) at two concentrations (0.1 M and 0.2 M) was evaluated, analyzing metal recovery along time and the effect of OM on the desorption with HCl.

2. Material and methods

2.1. Microalgae cultures and reagents

The microalgae species used in this work were *Chlorella vulgaris* (obtained from the collection of the University of Antofagasta, Chile) and *Scenedesmus almeriensis* (provided by the University of Almeria, Spain). Microalgae biomass was cultivated under axenic conditions using a Bristol medium (UTEX S.A) enriched with a trace metal solution from F/2 of Guillard medium (UTEX S.A) supplying pure CO₂, as reported by (Saavedra et al., 2018). LEDs lamps at 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ were used in a 12:12 h:h photoperiod. Cell culture viability and purity were periodically checked by optical microscopy analysis.

Multimetallic solutions of toxic elements were prepared by dissolving a stock solution with 600 mg As /L (Na₂HAsO₄·7H₂O, Sigma Aldrich), 3000 mg B /L (H₃BO₃, Sigma Aldrich), 150 mg/L of Cu, Mn, and Zn (CuCl₂·2H₂O, MnCl₂·4H₂O, and ZnCl₂, Sigma Aldrich, Germany) and ultra-pure water under acidic conditions (pH < 3). The stock solution was periodically analyzed and stored at 4°C for quality assurance purposes.

Synthetic sewage waters (SSW) were prepared based on typical wastewater compositions by adding (per L of deionized water) 30 mg urea, 28 mg K₂HPO₄, 7 mg NaCl, 4 mg CaCl₂·2H₂O, and 2 mg MgSO₄·7H₂O and varying amounts of peptone and meat extract: COM₃ = 160 mg of peptone and 110 mg of meat extract; COM₂ = 80 mg of peptone and 55 mg of meat extract; COM₁ = 40 mg of peptone and 27.5 mg of meat extract, and COM₀ = neither peptone nor meat extract (control test) (Alcántara et al., 2015).

NaOH (0.1 M) and HCl (0.1 M) were used for pH adjustment. All the chemicals employed in this study were analytical grade (PANREAC, Barcelona). Plastics and glass containers were immersed in diluted HNO₃ (10% v/v) for 24 h and rinsed three times with Milli-Q water (R > 18M Ω ·cm) before use.

2.2. Multimetallic biosorption experiments

Biosorption experiments were performed batchwise for both microalgae species at different OM concentrations. The microalgae culture was centrifuged at 4500 rpm for 7 min, washed with Milli-Q water to

remove the growth medium and centrifuged again prior to the determination of the biomass concentration by gravimetric analysis of the total solid (TS). Synthetic sewage waters of different OM concentrations were added to 4 mL of multimetallic stock solution in order to obtain 200 mL of solution with initial concentrations of toxic elements 12 mg As/L, 60 mg B /L, and 3 mg/L of Cu, Mn, and Zn. Toxic elements and their concentrations were selected according with the composition and maxima concentrations of HM found in the Loa river (Saavedra et al., 2018). The calculated weight of washed and centrifuged biomass were added to these multimetallic solutions to obtain 1 g/L microalgae suspension. The pH value was adjusted to 7.0 in order to simulate the environmental conditions that exist in WWT photobioreactors (Posadas et al., 2015). The tests were conducted in 500 mL glass flasks at 25°C and 1000 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ under a 12:12 h:h photoperiod and magnetic agitation at 250 rpm. Control experiments (without biomass) were conducted at operating pH conditions to check multimetallic solubility. The total contact time was 72 h based on the typical hydraulic residence time used for WWT photobioreactors (Acién et al., 2012). Samples of 8 mL were taken at time 0, 3, 24, and 72 hours to determine the pH and HM concentrations. After pH determination, samples were filtered through 0.22 μm membrane filters. Aliquots of 4 ml were acidified with 30 μL of HNO_3 (0.1 M) and stored at 4°C prior to metal quantification, while the remaining sample was immediately used for TOC determination. An additional test series was conducted under identical conditions but a constant flow of pure CO_2 was supplied ($v > 99.9\%$, Abello Linde, Spain). The total suspended solid (TSS) concentration (after filtration) in the liquid medium was measured at time 0 and 72 h in order to determine the microalgae growth. TOC removal was determined according to Eq. (1):

$$\text{TOC removal (\%)} = (\text{TOC}_0 - \text{TOC}_t) / \text{TOC}_0 \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

where TOC_0 and TOC_t are the TOC concentrations at the initial and sampling times (t), respectively, in (mg/L). On the other hand, the removal efficiency of each element (i) at time t ($\text{RE}_{i,t}$) was determined by Eq. (2):

$$\text{RE}_{i,t} = (C_{i,0} - C_{i,t}) / C_{i,0} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

where $C_{i,0}$ and $C_{i,t}$ are the concentrations at the initial and sampling times (t), respectively, for each toxic element (i) (mg/L). On the other hand, the biosorption capacity of microalgae for each toxic element ($q_{i,72}$) was calculated by Eq. (3):

$$q_{i,72} = V \times (C_{i,0} - C_{i,72}) / W_{72} \quad \text{Eq. (3)}$$

where $q_{i,72}$ is the biosorption capacity for each toxic element i: As, B, Cu, Mn, and Zn at 72 h (mg toxic element/g of biomass), V is the volume of suspension (L), $C_{i,0}$ and $C_{i,72}$ are the initial and final toxic elements concentrations (mg/L), respectively, and W_{72} is the mass of dry microalgae at 72 h (g).

2.3. HM Recovery studies

Suspensions of 200 ml containing 1g/L of microalgae, 12 mg/L of As, 60 mg/L of B, and 3 mg/L of Cu, Mn, and Zn were stirred at 250 rpm and 25 ± 1 °C under dark conditions for 3 h in order to load the microalgae with metals. At the end of the contact time, the aqueous phase was removed by centrifugation (4500 rpm, 7 min), and 4 ml of supernatant was filtered through 0.22 μ m membrane filters, acidified with 30 μ L of HNO₃ (0.1 M) and stored at 4° C for the determination of the HM concentrations. Subsequently, 50 mL of the selected eluents (HCl 0.1 M and 0.2 M, NaOH 0.1 M and 0.2 M, CaCl₂ 0.1 M and 0.2 M) were added to the centrifuged microalgae. The suspensions were stirred at 250 rpm and 25° C \pm 0.1 for 60 minutes. Samples of 4 mL were taken at time 10, 20 and 60 min, filtered through 0.22 μ m membrane filters, acidified with 30 μ L of HNO₃ (0.1 M) and stored at 4°C prior to the analysis of element concentrations. All the experiments were performed in duplicate. The recovery efficiency ($Y_{R,i,t}$) was defined as follows (Eq. (4)):

$$Y_{R,i,t} = (C_{R,i,t} \times V_e) / (W_0 \times q_{i,3}) \times 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

where $C_{R,i,t}$ (mg/L) is the concentration of each toxic element (i) in the solution after recovery at sampling time (t), V_e is the volume of eluent (L), W_0 is the initial mass of dry microalgae (g), and $q_{i,3}$ is the initial specific element content of the microalgae (mg/g).

In order to analyze the effect of the presence of OM in the metal loading step on metal recovery, the experiment supporting the highest metal recovery efficiency was repeated under identical operation conditions using C_{OM3} SSW instead of ultrapure water to prepare the multimetallic solution used for the load of toxic elements in the microalgae.

2.4. Analytical procedures

The aqueous concentrations of As, B, Cu, Mn, and Zn were determined by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (HP 7500 cc, Agilent, USA) according to the internal procedures of the Instrumental Techniques Laboratory (LTI – UVa). For quality assurance, two reference water materials were included in the ICP-OES analysis as quality control (QC) samples: ICP multielement Calibration Standard Solution, 100 mg/l Scharlau (26 elements in HNO_3 5%), and a certified Reference Material (Environment Canada TMDA-64.2 LOT 0313, HNO_3 : 0.2%) as trace element fortified calibration standard. QC samples were measured every 10 samples, considering a range within 10% of the true value for valid acceptance. Concentrations of dissolved TOC were measured using a Shimadzu TOC-VCSH analyzer (Japan) according to (Marín et al., 2018). The pH was measured using a pH-meter Basic 20+ (Crison, Spain). Determination of TS and TSS concentrations were performed according to standard methods (E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, 2017).

2.5. Statistical analysis

The influence of TOC concentration, pH, CO_2 supply and ICP-OES analysis was statistically evaluated by correlation and interference analysis (ANOVA). Additionally, results of HM recovery studies were analyzed by one-way ANOVA and t-test ($P < 0.05$). The data were analyzed using the software Minitab 18.

3. Results and discussion

3.1. Effect of OM on the biosorption of toxic elements from the multimetallic solution without CO₂ supply

The pH value in *C. vulgaris* cultures remained approximately constant, slightly increasing in solutions with high OM concentrations (values of 7.1 and 7.3 at 72 h in C_{OM2} and C_{OM3}, respectively). These results were consistent with the biomass growth recorded during the experiments: no growth in the control solution C_{OM0} and increases in TSS of 2.0% in C_{OM1}, 16.3% in C_{OM2} test and 27.6% in C_{OM3} tests at 72 h. Interestingly, TOC concentrations increased remarkably at 3 h in the biosorption experiments with *C. vulgaris* regardless of the OM concentrations (Fig. 1A). However, the TOC concentration decreased in all the experiments after 24 h of incubation, although positive TOC removals at 72 h were only achieved in C_{OM2} and C_{OM3} test (15.9% and 76.9%, respectively). It is therefore clear that the presence of HM in the medium significantly influenced SSW treatment.

On the other hand, the pH in *S. almeriensis* biosorption experiments experienced a remarkable initial increase up to pH 8 at 3 h regardless of the OM concentrations. This fast change in medium pH can be related to the high physiological activity associated to the phototrophic metabolism under this experimental condition (Cabello et al., 2015). From 24 h onwards, pH values increased slightly at high OM concentrations (i.e. pH of 8.3 in C_{OM2} at 72 h) and pH decreased in solutions at low OM concentrations (pH of 7.1 in C_{OM0} at 72 h). An increase of *S. almeriensis* biomass concentration was recorded in all biosorption experiments, evidencing that the experimental methodology applied did not affect cell viability, and cell growth was correlated with the OM concentration in the solution. Thus, *S. almeriensis* growth at 72 h ranged from 30.6% in C_{OM0} to 40.8% in C_{OM3}. It is known that microalgae support different metabolic processes in order to avoid the high toxicity generated by the presence of HM in the medium. Indeed, extracellular sequestration, intracellular sequestration, active export and enzymatic detoxification rank among the most common processes (Yin et al., 2018). The expression of proteins such as Glutathione S-transferases (GSTs) play an important role in the cell detoxification process, contributing to the protection against oxidative stress generated by the presence of HM (Yin et al., 2016; W. Zhang et al., 2013). Previous studies showed different growth responses of microalgal species to HM stress. Thus, *Scenedesmus acuminatus* presented a higher

antioxidant capacity, lower membrane damage, and higher tolerance than *Chlorella sorokiniana* to stress induced by Cu ions, demonstrating a better tolerance against Cu (Hamed et al., 2017). Therefore, the difference in the pH and cell growth observed between the microalgae studied can be explained by the different metabolic mechanisms used to alleviate HM toxicity.

Contrary to the results recorded for *C. vulgaris*, *S. almeriensis* biosorption tests revealed TOC removal from the beginning of the experiment, with a greater removal at higher initial OM concentrations (Fig. 1B). At 3 h, TOC removal was low in all *S. almeriensis* biosorption tests, ranging from 0.3% for C_{OM0} to 25.1% for C_{OM3} . From 24 h onwards, TOC removal increased remarkably up to 10.4%, 57.9%, 63.2% and 77.9% at 72 h in C_{OM0} , C_{OM1} , C_{OM2} , and C_{OM3} tests, respectively. TOC removal in the medium can be directly associated to the ability of microalgae to use organic carbon as energy source for mixotrophic growth (Shen et al., 2015). Therefore, the results obtained in *S. almeriensis* tests can be associated to the higher cell growth of this microalga, which supported a superior tolerance over the multimetallic solution compared to *C. vulgaris* during the treatment of wastewater contaminated with metals.

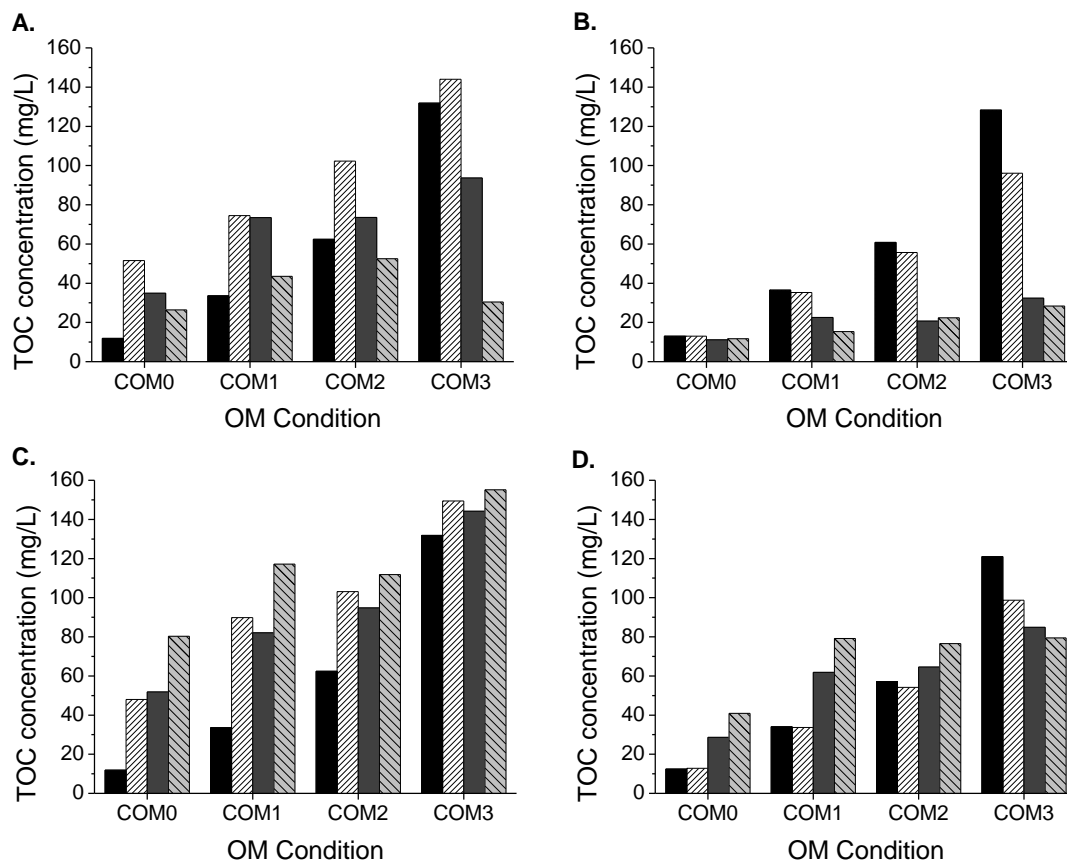


Fig. 1. Time course of the TOC concentration (mg/L) in biosorption studies of *Chlorella vulgaris* (CV) and *Scenedesmus almeriensis* (SA) conducted in a multimetallic solution with different initial OM concentrations at 1 g TSS/L and pH 7.0. A) CV – without CO₂ supply; B) SA – without CO₂ supply; C) CV – with CO₂ supply; D) SA – with CO₂ supply. (■) T₀ (Initial time), (▨) 3 h; (■) 24 h; (▨) 72 h.

The influence of OM on the As biosorption in *C. vulgaris* tests was remarkable from the first sampling time at 3 h (with RE_{As,3} 14.2% in COM₀ and 3.7% in COM₁). The highest As removal efficiencies were obtained in control tests, where no growth of biomass was observed (Fig. 2A). Interestingly, the As removal efficiencies remained constant from 24 h onwards. The effect of OM was higher in terms of As biosorption capacity of *C. vulgaris* (q_{As,72} of 2.2 mg/g, 0.8 mg/g, 0.5 mg/g, and 0.02 mg/g in COM₀, COM₁, COM₂, and COM₃, respectively) than in terms of As removal. Therefore, the presence of OM decreased As removal but promoted biomass growth, thus increasing biomass concentration.

Overall, the As removal efficiencies for *S. almeriensis* were higher than for *C. vulgaris* (Fig. 2B). The highest As removal efficiency of *S. almeriensis* was obtained in the control solution C_{OM0} at 3 h (32.4%), which decreased with the contact time to $\sim 20\%$ by 72 h, similar to the observations in the other SSW tested. Differences in the final calculated $q_{As,72}$ in *S. almeriensis* tests were inversely correlated with cell growth, descending from 2.3 mg/g in C_{OM0} to 1.7 mg/g in C_{OM3} . The lower influence of OM on the As biosorption capacity of *S. almeriensis* compared to *C. vulgaris* could be related to its higher TOC removal capacity, which supported similar final OM concentrations in all the experiments.

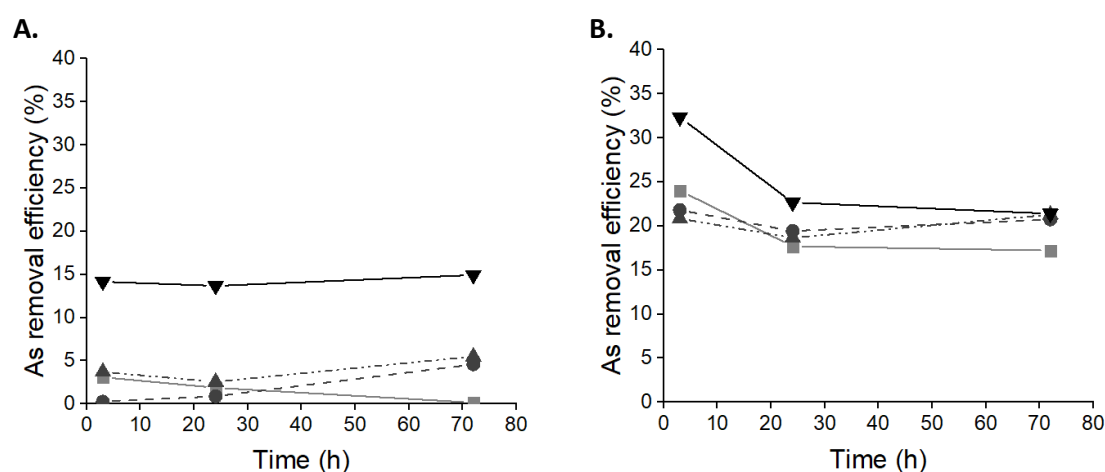


Fig. 2. Time course of the removal efficiency (%) of As in biosorption studies without CO_2 supply at different initial OM concentrations by *Chlorella vulgaris* (A), and *Scenedesmus almeriensis* (B) cultures at 1g TSS/L and pH 7.0. (—▼—): C_{OM0} (control); (—▲—): C_{OM1} (40 mg peptone /L and 27.5 mg meat extract /L); (—◆—): C_{OM2} (80 mg peptone /L and 55 mg meat extract /L), and (—■—): C_{OM3} (160 mg peptone /L and 110 mg meat extract /L).

The As biosorption capacities obtained in the control tests in this study were lower than those previously reported by Saavedra et al, (2018) in multimetallic solutions at the same metal concentrations, but without the addition of urea and mineral salts. It has been hypothesized that some of the added compounds such as urea or phosphates, besides enhancing the growth and resistance of *S. almeriensis*, could compete with As for the adsorption sites, decreasing the As uptake by microalgae cells (Yamani et al., 2016).

B removal efficiencies were low and relatively stable over time, with a maximum of 8.6% in $RE_{B,24}$ for *S. almeriensis* at C_{OM1} (Supplementary material). The B biosorption capacity of *C. vulgaris* increased with the OM concentration of the SSW (1.4 mg/g, 2.1 mg/g, 2.3 mg/g and 2.6 mg/g in C_{OM0} , C_{OM1} , C_{OM2} , and C_{OM3} , respectively). These results agree with previous studies that reported an uptake capacity of 2.7 mg B/g for *Chlorella* sp. at pH 7.0 (Taştan et al., 2012). Nevertheless, no clear influence of the initial OM concentration was observed in B biosorption capacities of *S. almeriensis*, with $q_{B,72}$ values ranging from 3.2 mg/g in C_{OM0} to 3.7 mg/g in C_{OM2} . The biosorption capacities for B in the control tests were higher than those previously found in the multimetallic solution without the addition of urea and minerals (Saavedra et al., 2018), but these differences were lower for the overall bioremediation process.

C. vulgaris showed an inverse correlation between RE for Cu, Mn, and Zn and the initial OM concentration at the first sampling time (Fig. 3A, C, and D). For instance, the $RE_{Cu,3}$ accounted for 93.6%, 70.9%, 36.7% and 20.7% in C_{OM0} , C_{OM1} , C_{OM2} , and C_{OM3} , respectively. Nevertheless, this inverse correlation between OM and RE was not maintained over time. In *C. vulgaris*, the RE_{Cu} increased with the contact time, especially in the C_{OM2} and C_{OM3} tests ($RE_{Cu,72} > 88.6\%$), although $q_{Cu,72}$ decreased from 3.2 mg/g in C_{OM0} to 2.3 mg/g in C_{OM3} . Mn and Zn removal efficiencies in *C. vulgaris* also increased with time in C_{OM3} solutions, achieving values of 70.8% and 86.4% at 72 h, respectively. The increase observed in Cu, Mn, and Zn removal efficiencies by *C. vulgaris* in high OM concentration tests was likely due to the gradual decrease in TOC concentration (Hussain et al., 2017), but also to cellular growth, which enhanced biosorption by increasing the adsorption sites. Finally, *C. vulgaris* growth likely mediated differences in the Mn and Zn biosorption capacities, with values of $q_{Mn,72}$ of 2.4 mg/g in C_{OM0} and 1.5 mg/g in C_{OM2} , and $q_{Zn,72}$ values ranging from 2.7 mg/g in C_{OM0} to 2.3 mg/g in C_{OM2} .

Remarkable differences in the RE of Cu, Mn, and Zn in *S. almeriensis* biosorption tests were recorded as a function of the initial OM conditions during the first 3 h (Fig. 3B, D, and F). The highest RE_{Cu} was measured in the control tests, with values almost independent of contact time ($RE_{Cu,3}$ of 90.1% and $RE_{Cu,72}$ of 88%). Similar RE_{Cu} values in C_{OM1} , C_{OM2} , and C_{OM3} were reported in *S. almeriensis* cultures, which increased over time from 39.8% at 3 h in C_{OM1} to 73% at 72 h in C_{OM3} . Similarly, Cu biosorption capacities of this microalga reached a

maximum $q_{Cu,72}$ of 2.1 mg/g in the control test, which was higher than the $q_{Cu,72}$ of 1.5 mg/g, 1.7 mg/g and 1.6 mg/g determined in C_{OM1} , C_{OM2} , C_{OM3} , respectively. These lower values on RE_{Cu} demonstrated that the OM effect produced a decrease on Cu removal, occurring independently of the the initial OM concentration in the SSW with added peptone and meat extract.

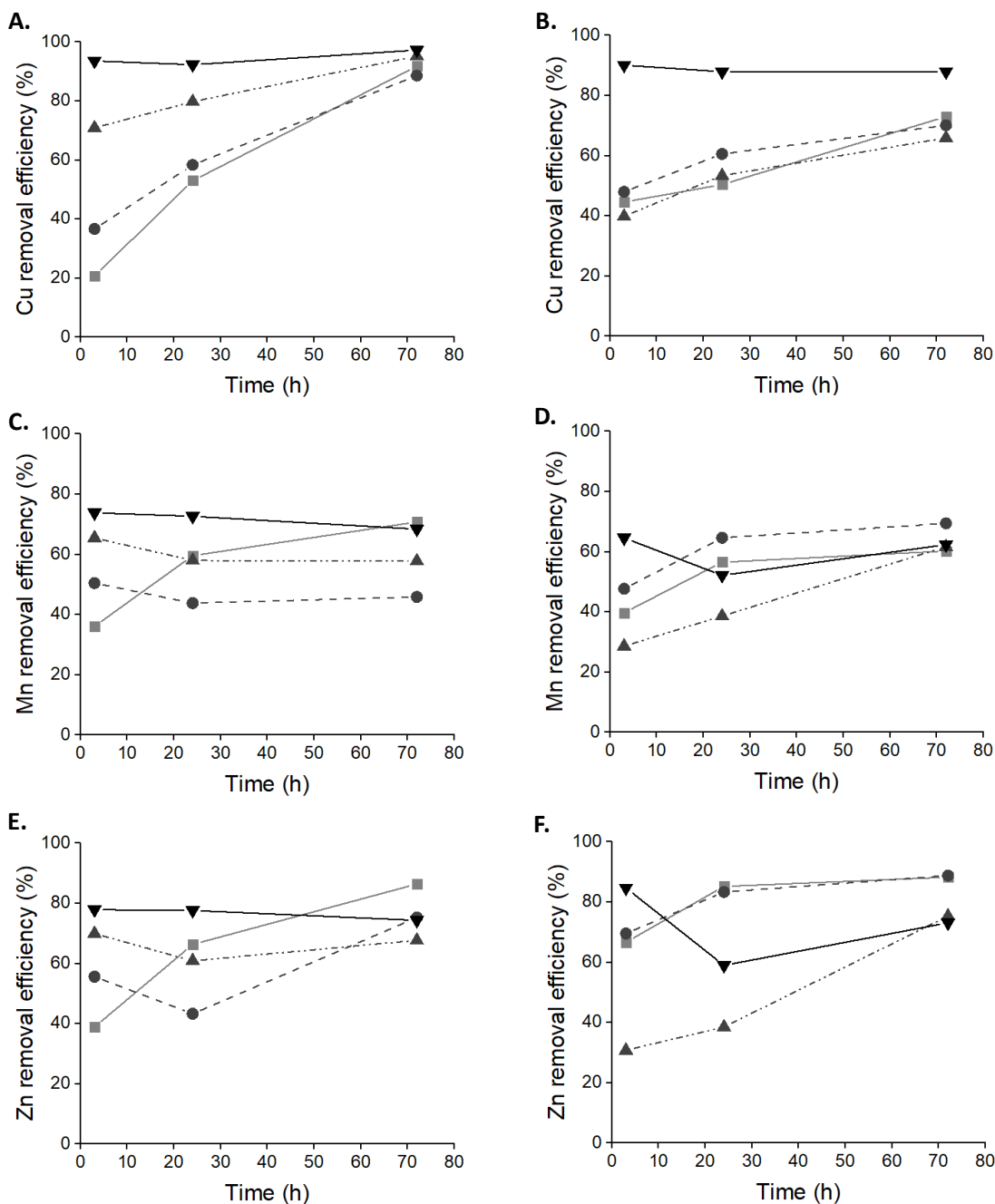


Fig. 3. Time course of the removal efficiency (%) of copper (Cu), manganese (Mn), and zinc (Zn); in

biosorption studies without CO₂ supply at different initial OM concentrations by *Chlorella vulgaris* (CV) and by *Scenedesmus almeriensis* (SA) cultures at 1g TSS/L and pH 7.0. A) CV-Cu; B) SA-Cu; C) CV-Mn; D) SA-Mn; E) CV-Zn; F) SA-Zn. (—▼—): C_{OM0} (control); (—▲—): C_{OM1} (40 mg peptone /L and 27.5 mg meat extract /L); (—◆—): C_{OM2} (80 mg peptone /L and 55 mg meat extract /L), and (—■—): C_{OM3} (160 mg peptone /L and 110 mg meat extract /L).

Although RE_{Mn} and RE_{Zn} increased in the tests conducted with time in SSW with added peptone and meat extract, the removal efficiency of Mn and Zn by *S. almeriensis* decreased with the contact time in the control tests. The lowest Mn and Zn removal efficiencies were obtained at 3 h in C_{OM1} (28.6% and 30.7%, respectively). The Mn removal efficiencies and biosorption capacities at 72 h reached similar values, independently of the initial OM concentration (\approx 63% and 1.6 mg/g). Larger differences were obtained in the Zn biosorption test using *S. almeriensis*: RE_{Zn,72} of \sim 74% and q_{Zn,72} of \sim 2.0 mg/g in C_{OM0} and C_{OM1}, and RE_{Zn,72} of \sim 88% and q_{Zn,72} of 2.4 mg/g in C_{OM2} and C_{OM3}.

The biosorption capacities based on the total mass of elements adsorbed at 72 h revealed similar values for both microalgae studied. Interestingly, the C_{OM0} test achieved the maximum biosorption capacity in both microalgae species. At 72 h, the total biosorption capacity of *C. vulgaris* ranged from 11.9 mg/g in C_{OM0} to 9.2 mg/g in C_{OM3}, whereas that of *S. almeriensis* ranged from 11.2 mg/g in C_{OM0} to 10.4 mg/g in C_{OM3}. The results showed a clear negative influence of the OM concentration on microalgae biosorption capacity for the multimetallic solution under investigation. Nevertheless, correlation of various factors associated with the biosorption process produced a combined effect, which modified the extent of this influence over time (Fig. 4). At higher OM concentration in the SSW, the toxic effect of HM on microalgae decreased. This triggered microalgae growth, which slight increased the pH of the medium. When cellular growth is favored, TOC was subsequently consumed. Therefore, the TOC concentration decreased along the test and the negative effect associated with OM concentration in the biosorption process also decreased. The final differences in the total biosorption capacity observed between C_{OM0} and C_{OM3} at 72 h can be directly

related to the severe effect that OM induced in As biosorption, which was the only toxic element that experienced the interference of OM in the biosorption process over time.

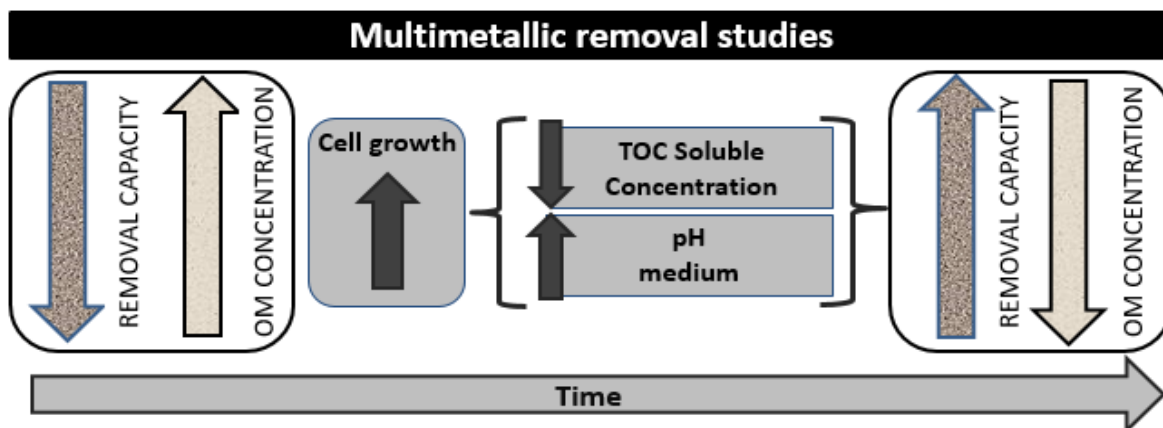


Fig. 4. Schematic correlation of organic matter (OM), cell growth, TOC concentration, and pH medium in the removal capacity of microalgae biomass for a multimetallic system.

Finally, no precipitation was observed in the multimetallic control samples, probably due to the increase in the solubility of the cationic metals produced by the high borate concentration present in the multimetallic solution (Beckett, 2016; Graff et al., 2017). Future studies should be addressed to analyze possible metabolic responses of microalgae to HM, as the activation of desorption mechanisms to alleviate HM toxicity.

3.2. Effect of OM on the biosorption of toxic elements from the multimetallic solution with CO₂ supply

The addition of CO₂ in the biosorption experiments resulted in a decrease in the pH from initial neutrality to ≈ 5.2 at 24 h, regardless of the microalgae species. This medium acidification can be directly attributed to CO₂ dissolution in the cultivation broth (Hu et al., 2012). Slight differences in a range of pH of 5.1 – 5.5 were found at 72 h, where the highest pH values were recorded in the test carried out at highest initial OM concentrations.

A negative biomass growth was recorded in the *C. vulgaris* biosorption tests conducted with CO₂ addition. The TSS decreased by 10.2% in C_{OM0}, 15.3% in C_{OM1}, 8% in C_{OM2} and 4.1% in C_{OM3}. These results suggest a cell decay in cultures mediated by the high concentrations of CO₂ in the medium and by the low pH (<5.5) (Hussain et al., 2017). Interestingly, *S. almeriensis* was able to grow under all conditions tested in spite of the low pH value. Indeed, the TSS concentration increased by 19.4% in C_{OM0} and by 53.1% in C_{OM3} at 72 h. These results confirmed the higher tolerance and growth capacity of *S. almeriensis* (compared to *C. vulgaris*) previously found without CO₂ addition.

TOC concentrations increased with the time course in *C. vulgaris* experiments. At 72 h, TOC concentrations reached values 676.4%, 348.4%, 179.1%, and 117.7% higher than those observed at time 0 in C_{OM0}, C_{OM1}, C_{OM2}, and C_{OM3}, respectively (Fig. 1C). These findings were likely due *C. vulgaris* decay in excess of CO₂ and the TOC generated can be associated with the activation of protection mechanisms, such as metabolic export processes to control the oxidative stress (Mohamed, 2008). Lower increases in TOC concentrations (327.7%, 232.1% and 133.8% at 72 h in C_{OM0}, C_{OM1} and C_{OM2}, respectively) were recorded for *S. almeriensis* (Fig. 1D). A positive TOC removal efficiency of 34.4% was found in C_{OM3} at 72 h. The moderate increase in TOC concentration, together with the *S. almeriensis* growth observed, could be associated to a partial cellular death but also to the excretion of metabolites, in a lower extent than that observed in *C. vulgaris* (Wang et al., 2010b). Interestingly, similar final TOC concentrations of ~ 78 mg/L were detected at 72 h in C_{OM1}, C_{OM2}, and C_{OM3} experiments.

Arsenic biosorption was severely affected by CO₂ addition, especially in *C. vulgaris* experiments (Fig. 5A). Low As removal efficiencies (< 4 %) were obtained for *C. vulgaris* regardless of the OM in SSW, resulting in a maximum As biosorption capacity of 0.6 mg/g in C_{OM1} at 72 h. CO₂ addition also decreased As removal efficiencies in *S. almeriensis* in SSW with added peptone and meat extract, especially at high contact times ($q_{As,72}$ of 0.06 mg/g in C_{OM1}, and 0.1 mg/g in C_{OM2} and C_{OM3}) (Fig. 5B). Only the control experiments supported a significant As biosorption, which decreased from 25.4% at 3 h to 15.6% at 24 h, resulting in $q_{As,72}$ of 1.9 mg/g).

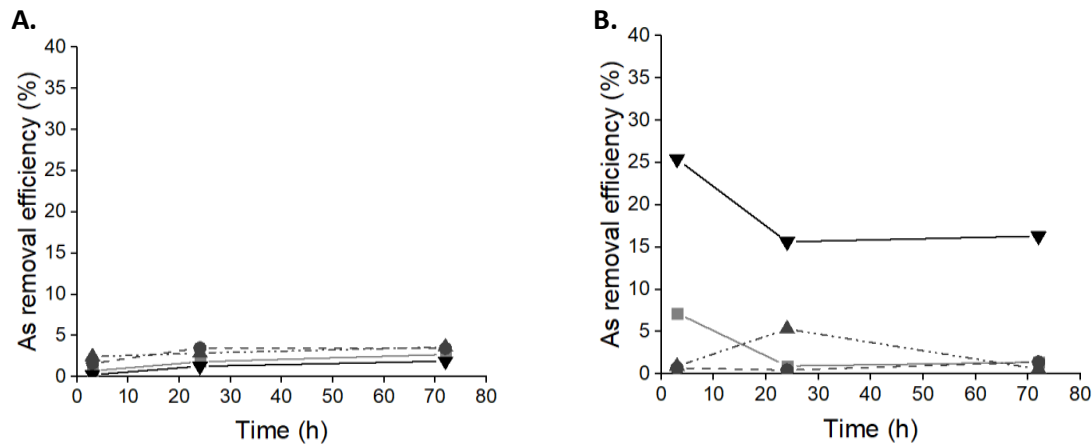


Fig. 5. Time course of the removal efficiency (%) of As in biosorption studies with CO₂ supply at different initial OM concentrations by *Chlorella vulgaris* (A), and *Scenedesmus almeriensis* (B) cultures at 1g TSS/L and pH 7.0. (▼): CoM₀ (control); (▲): CoM₁ (40 mg peptone /L and 27.5 mg meat extract /L); (◆): CoM₂ (80 mg peptone /L and 55 mg meat extract /L), and (■): CoM₃ (160 mg peptone /L and 110 mg meat extract /L).

Similarly, CO₂ addition resulted in even lower B removal efficiencies than those reported in Subsection 3.1 for *C. vulgaris* with RE_{B,72} of ≈ 3 % and a maximum q_{B,72} of 1.8 mg/g in CoM₃ (Supplementary material). The removal of B was less impacted by CO₂ addition in *S. almeriensis* experiments, with a slight variation of RE_B from 4.0% in CoM₂ at 3 h to 6.4% in CoM₀ at 72 h. The final B biosorption capacity of *S. almeriensis* decreased with the OM concentration of SSW from 3.3 mg/g in CoM₀ to 2.4 mg/g in CoM₃ (considering cell growth). The lower effect of CO₂ addition on B biosorption studies could be associated with the high solubility of the B complexes in moderately-acidic solutions (Guan et al., 2016). Hence, differences in B removal can be only associated with H⁺ competition for the active sites on the surface adsorption process.

Furthermore, CO₂ addition remarkably reduced the Cu, Mn, and Zn removal efficiencies of *C. vulgaris*, with the major impact being in the control tests (Fig. 6A, C, and E). Thus, Cu, Mn, and Zn removal by *C. vulgaris* in CoM₀ under CO₂ supply at 3 h accounted for 83.5%, 43.4%, and 40.1%, and decreased to 55.2%, 9.3%, and 0.6% at 72 h, respectively. The effect of CO₂ addition was less pronounced in SSW with higher OM concentrations, where RE_{Cu}, RE_{Mn}, and RE_{Zn} remained higher than in the control test, but lower than those

recorded in the absence of CO₂ supply. These lower RE of Cu, Mn and Zn could be associated with cell decay mediated by pH modification caused by CO₂ addition. Cu removal at 3 h was the only exception to the general trend, with efficiencies decreasing with the OM concentration of the SSW and values similar or even higher to those obtained without CO₂ addition. The trends in the biosorption capacities were identical to those in the removal efficiencies (increasing with OM) as a result of the decrease in *C. vulgaris* concentration in this set of experiments. The final biosorption capacities ranged from 2.0 mg/g in C_{OM0} to 2.8 mg/g in C_{OM3} for Cu; from 0.3 mg/g in C_{OM0} to 1.8 mg/g in C_{OM3} for Mn; and from 0.03 mg/g in C_{OM0} to 2.9 mg/g in C_{OM3} for Zn.

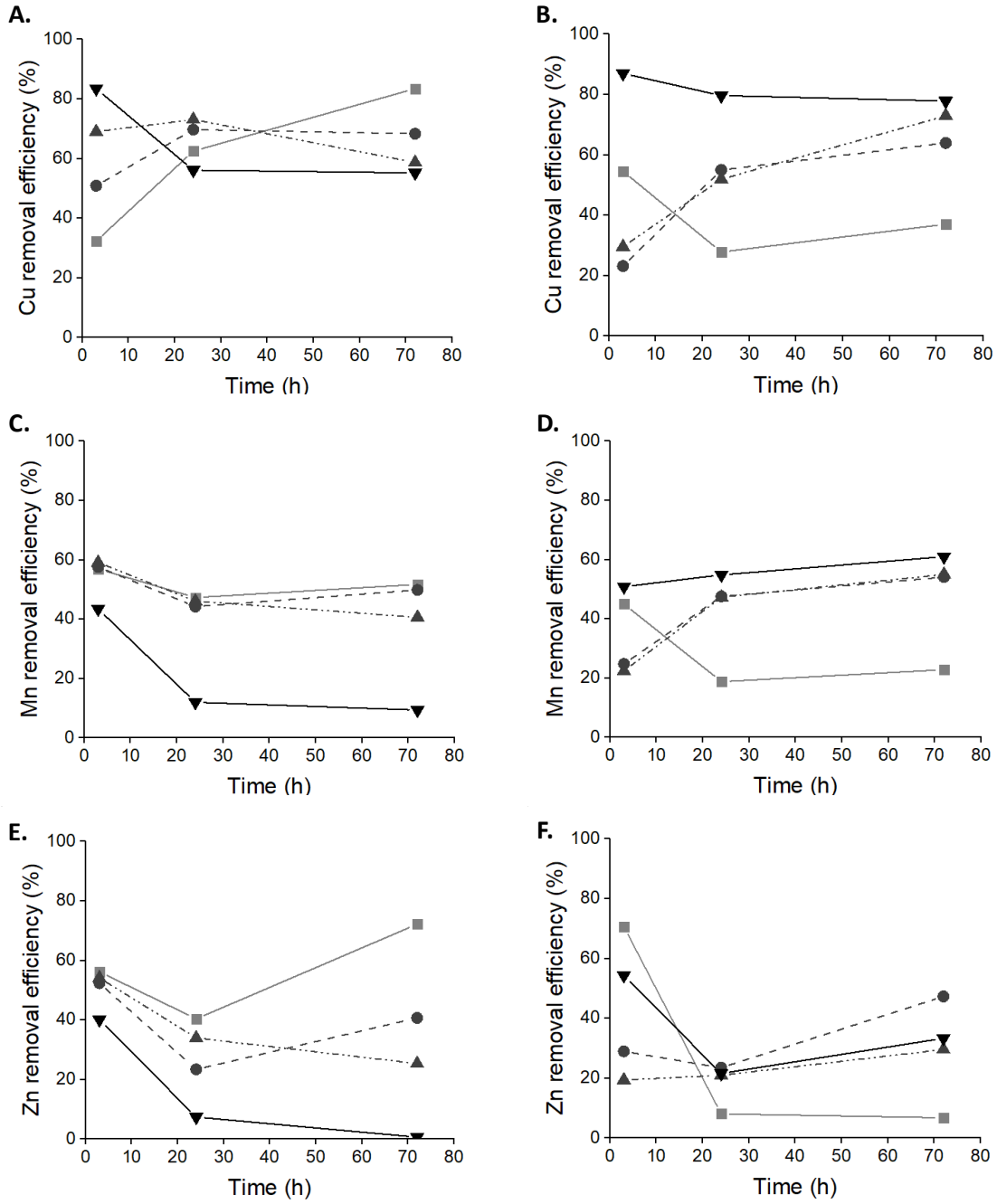


Fig. 6. Time course of the removal efficiency (%) of copper (Cu), manganese (Mn), and zinc (Zn); in biosorption studies with CO₂ supply at different initial OM concentrations by *C. vulgaris* (CV) and by *S. almeriensis* (SA) cultures at 1g TSS/L and pH 7.0. A) CV-Cu; B) SA-Cu; C) CV-Mn; D) SA-Mn; E) CV-Zn; F) SA-Zn. (—▼—): CoM₀ (control); (- -▲- -): CoM₁ (40 mg peptone /L and 27.5 mg meat extract /L);(- ● -): CoM₂ (80

mg peptone /L and 55 mg meat extract /L), and (—■—): C_{OM3} (160 mg peptone /L and 110 mg meat extract /L).

On the other hand, the reduction in Cu, Mn, and Zn removal efficiencies by *S. almeriensis* under CO₂ addition increased with the OM concentration of the SSW (Fig. 6B, D, and F). The results at 3 h of contact time represented the only exception, with higher Cu, Mn, and Zn removal efficiencies in C_{OM3} with supply of CO₂. In these tests, the removal efficiencies decreased from 54.6%, 45.0%, and 70.6% at 3 h to 27.8%, 18.8%, and 8.0% at 24 h, respectively, with Zn being the toxic element most affected by CO₂ addition regardless of the OM concentration. The Cu, Mn, and Zn biosorption capacities in *S. almeriensis* exhibited an inverse correlation with the initial OM concentration, with values decreasing from 2.1 mg/g in C_{OM0} to 0.8 mg/g in C_{OM3} for Cu, from 1.7 mg/g in C_{OM0} to 0.5 mg/g in C_{OM3} for Mn, and from 1.0 mg/g in C_{OM0} to 0.2 mg/g in C_{OM3} for Zn. These values were lower than those obtained without CO₂ supply, with the highest decrease being recorded in the C_{OM3} tests.

Contrary to the expected effect of stimulation of microalgae growth by CO₂ supply, the results evidenced the negative influence of CO₂ addition on the removal of the target elements by *C. vulgaris* and *S. almeriensis*. The decrease in cell growth was associated to medium acidification, as well as to a metabolic response to the oxidative stress. The increase in OM concentration in the SSW resulted in the opposite effect on the total biosorption capacities in both microalgal species. Thus, whereas the total biosorption capacity of *C. vulgaris* increased linearly with the initial OM concentrations, from 4.4 mg/g in C_{OM0} to 9.7 mg/g in C_{OM3}, the total biosorption capacity of *S. almeriensis* decreased from 9.7 mg/g in C_{OM0} to 3.9 mg/g in C_{OM3}.

No positive effects on biomass growth or nutrient removal by CO₂ addition were founded in studies of *Chlorella* sp. cultivated in wastewater containing high OM concentrations in a closed photobioreactor system (Min et al., 2011). Indeed, an optimal CO₂ concentration of 6.5% was identified in studies with *Chlorella vulgaris* P12 (Anjos et al., 2013). In contrast, higher growth rates were founded at higher CO₂ concentration (~20%) in cultures of *Scenedesmus* (Tang et al., 2011). Therefore, these results confirmed that

high CO₂ concentrations can induce different metabolic pathways between species and determine the OM influence on the overall HM biosorption processes. The differences found between the two pure microalgae species on this study warn about the risk of extrapolating biosorption results of pure species to consortia of different microalgae and bacteria, as those growing in WWT photobioreactors. These results indicate that microalgae could remove efficiently HM from water with low OM content as the river water, but its effectiveness could decrease in WWT photobioreactors with high OM content and, usually, working with CO₂ addition. Further in-situ experiments of HM biosorption in real WWT photobioreactors are required to study the biosorption of toxic elements in these plants. Nevertheless, microalgae could be potentially used as a low-cost complement for the purification step presented in the final stage of the decontamination process.

3.3. Recovery of toxic elements from microalgae

High recovery efficiency yields of As, Cu, Mn, and Zn from *C. vulgaris* ($Y_R > 70\%$) were obtained with no significant differences ($P > 0.05$) using HCl at 0.1 M and 0.2 M as eluent, regardless of the sampling times (Fig. 7A). The maximum recovery was achieved for As with 0.1 M HCl at 60 min ($Y_{R,As,60}$ of 89 %). Cu, Mn, and Zn recovery increased slightly with the HCl concentration, with maximum Y_R of 81%, 80%, and 78% for Cu, Mn, and Zn, respectively, using 0.2 M HCl at 60 min. A slight increase on Cu recovery efficiency with increasing the HCl concentration from 0.1M (~ 80%) to 0.2M (88%) at 60 min, in studies of *Halimeda gracilis*, was also previously reported (Jayakumar et al., 2015).

By contrast, B recovery from *C. vulgaris* with HCl was low (Y_R of 15-20% regardless of time). HCl at 0.1 M also mediated the highest recoveries of As, Cu, Mn, and Zn from *S. almeriensis*, with an almost complete metal recovery of Mn and Zn (> 99%) at 10 min (Fig. 7B). The recovery of B using HCl from *S. almeriensis* was low regardless of the concentration used. In this context, (Vannela and Verma, 2006) reported the highest recovery efficiencies (> 95%) of Co⁺², Cu⁺², and Zn⁺² from *Spirulina platensis* using inorganic acids (0.1 M HCl) in an eluents screening study comparing the performance of inorganic acids, inorganic salts, chelating agents

and organic acids. Unexpectedly, the increase in the HCl concentration decreased the recovery efficiencies from *S. almeriensis* with significant differences ($P = 0.001$) for all toxic elements by $\sim 50\%$, except B, likely due to damage to the cell wall structure caused by the high acid concentration (Abdolali et al., 2015; Kołodyńska et al., 2017).

NaOH at 0.1 M provided the highest As recovery efficiency from *C. vulgaris* (93% at 20 min), a moderate recovery of Zn ($Y_{R,Zn}$ of 40%) and low recovery efficiencies for the rest of the elements tested (Fig. 7C). The increase in the NaOH concentration to 0.2 M improved Zn recovery ($Y_{R,Zn,10}$ of 55%) from *C. vulgaris*, although it slightly decreased the As recovery. Alkaline solutions supported lower recovery efficiencies from *S. almeriensis* than from *C. vulgaris*, with maximum Y_R of 70% for As at 20 min using 0.1 M NaOH, and 51% for Cu at 20 min using 0.2 M NaOH (Fig. 7D). No significant differences ($P > 0.05$) on metal recovery were observed between NaOH concentrations in *S. almeriensis*. The recovery of Mn was low when using NaOH solutions as eluents, with Y_R values lower than 8% for both microalgae species.

Finally, the recovery efficiencies using $CaCl_2$ increased over time in all the experiments, for all the elements except for B (Fig. 7E, F). The increase of $CaCl_2$ concentration to 0.2 M achieved the maximum recoveries for As and Mn from *C. vulgaris*, reaching Y_R values of 77% and 72% at 60 min, respectively. On the other hand, a low recovery of all the elements from *S. almeriensis* was obtained. Only, $CaCl_2$ 0.2 M supported a relevant B recovery efficiency of 38% at 10 min, the highest achieved for this element.

From the above results, biomass elution with 0.1M HCl supported the best metal recovery performance of the target metals in both microalgae species. Therefore, these conditions were applied during the evaluation of the effect of the OM on the recovery of toxic metals. In this context, a complete recovery of As, Cu, Mn, and Zn using 0.1 M HCl as eluent was achieved in both *C. vulgaris* and *S. almeriensis* loaded with the multimetallic solution in C_{OM3} SSW. The above described decrease in the removal capacity of the biomass induced by the presence of OM in the medium likely facilitated the recovery process. It was noteworthy that kinetics of metal recovery were very fast (data not shown), supporting a total recovery ($\sim 100\%$) of As, Cu, Mn, and Zn within 10 min. The presence of OM in the multimetallic solution used to load

the microalgae slightly increased the B recovery efficiency from *C. vulgaris* (26% at 10 min), but decreased B recovery from *S. almeriensis* (18% at 10 min).

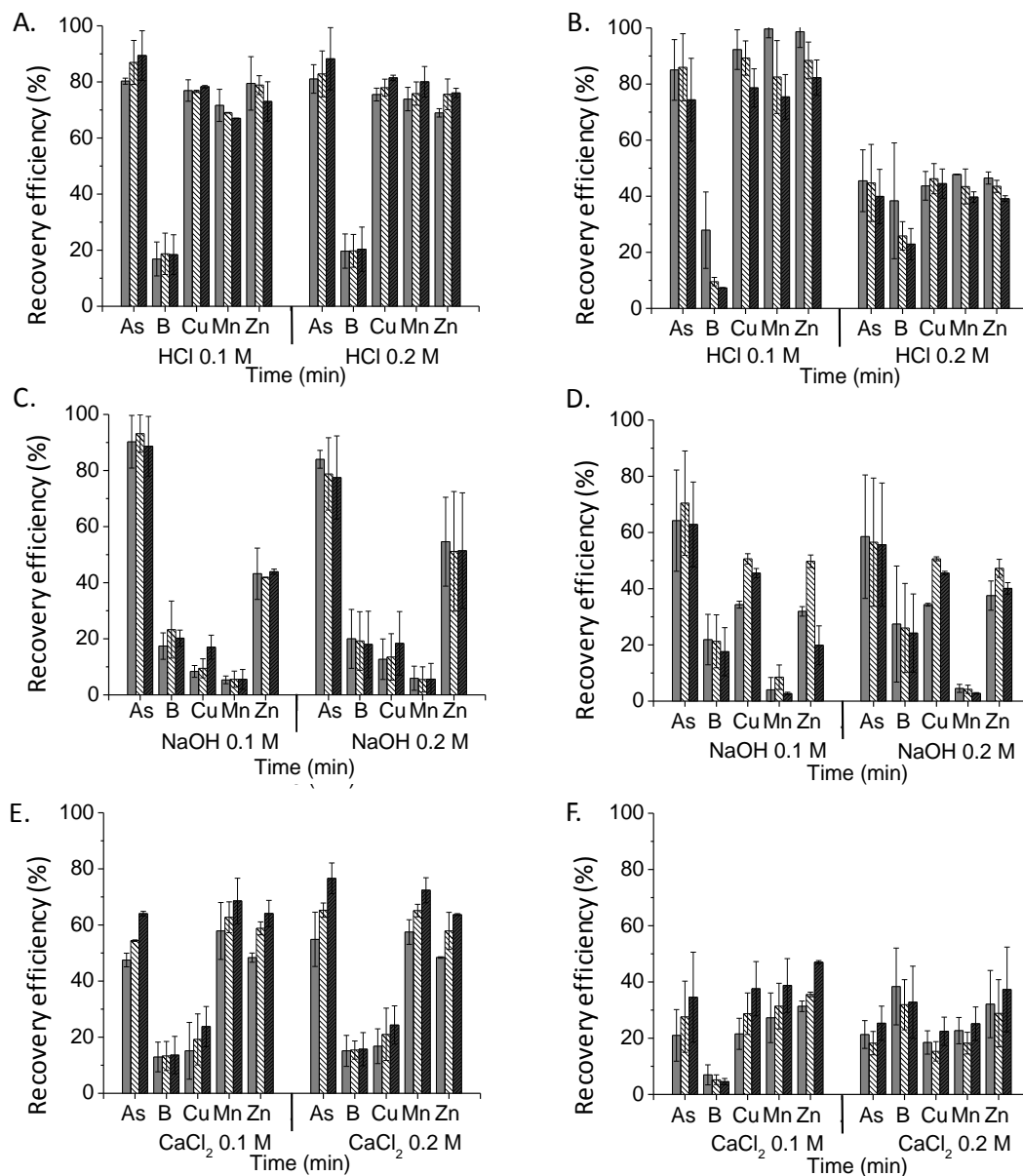


Fig. 7. Time course of the recovery efficiency of toxic elements (%) in *C. vulgaris* (CV), and *S. almeriensis* (SA) cultures at 1g TSS/L and pH 7.0, using different eluents (HCl, NaOH, and CaCl₂) at two concentrations (0.1 M, 0.2 M). A) CV – HCl, B) SA – HCl, C) CV – NaOH, D) SA – NaOH, E) CV – CaCl₂, F) SA – CaCl₂. (■): 10 min, (▨): 20 min, (■): 60 min.

4. Conclusions

S. almeriensis resulted in better performance in HM tolerance, arsenic removal and TOC removal in multimetallic solutions of HM than *C. vulgaris*. A negative effect in RE was associated with OM presence, but this effect decreased along time. The highest arsenic removals (14.9% for CV; 32.4% for SA) were obtained in absence of OM and without CO₂ addition. Boron removal was low (<8.5%), with no clear influence of the presence of OM and CO₂. Overall, the presence of OM decreased Cu, Mn, and Zn removals, but facilitated metal recovery under acidic elution. CO₂ addition decreased the total biosorption capacity from average values of 10.1 and 11.0 mg/g to 7.1 and 6.6 mg/g for CV and SA, respectively. HM biosorption by microalgae can be useful for remediation of water with low OM content, but further in-situ studies of HM biosorption in WWT photobioreactors are recommended. HCl 0.1 M resulted the best eluent for metal recovery, despite supporting low boron recovery.

5. Acknowledgments

This work was supported by the regional government of Castilla y León (UIC 071, CLU 2017-09 and VA080G18). The authors also thank “Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades” (CTQ2017-84006-C3-1-R) and the EU-FEDER (CLU 2017-09 and CTQ2017-84006-C3-1-R) for the financial support of this work. Ricardo Saavedra Concha wishes to thank the National Commission of Science & Technology (CONICYT) of Chile for providing his Doctorate Scholarship (CONICYT – Doctorado Nacional – 21140576).

6. References

1. Abdolali, A., Hao, H., Guo, W., Zhou, J.L., Du, B., Wei, Q., Wang, X.C., Dan, P., 2015. Bioresource Technology Characterization of a multi-metal binding biosorbent : Chemical modification and desorption studies. *Bioresour. Technol.* 193, 477–487.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.123>
2. Abinandan, S., Subashchandrabose, S.R., Pannerselvan, L., Venkateswarlu, K., Megharaj, M., 2019.

- Potential of acid-tolerant microalgae, *Desmodesmus* sp. MAS1 and *Heterochlorella* sp. MAS3, in heavy metal removal and biodiesel production at acidic pH. *Bioresour. Technol.* 278, 9–16.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.01.053>
3. Abou-Shanab, R.A.I., Ji, M.K., Kim, H.C., Paeng, K.J., Jeon, B.H., 2013. Microalgal species growing on piggery wastewater as a valuable candidate for nutrient removal and biodiesel production. *J. Environ. Manage.* 115, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.11.022>
 4. Acién, F.G., Fernández, J.M., Magán, J.J., Molina, E., 2012. Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnol. Adv.* 30, 1344–1353.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.005>
 5. Alcántara, C., Muñoz, R., Norvill, Z., Plouviez, M., Guieysse, B., 2015. Nitrous oxide emissions from high rate algal ponds treating domestic wastewater. *Bioresour. Technol.* 177, 110–117.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.134>
 6. Álvarez-Benedí, J., Bolado, S., Cancillo, I., Calvo, C., García-Sinovas, D., 2005. Adsorption–Desorption of Arsenate in Three Spanish Soils. *Vadose Zo. J.* 4, 282. <https://doi.org/10.2136/vzj2004.0095>
 7. Anjos, M., Fernandes, B.D., Vicente, A.A., Teixeira, J.A., Dragone, G., 2013. Optimization of CO₂ bio-mitigation by *Chlorella vulgaris*. *Bioresour. Technol.* 139, 149–154.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.032>
 8. Bădescu, I.S., Bulgariu, D., Ahmad, I., Bulgariu, L., 2018. Valorisation possibilities of exhausted biosorbents loaded with metal ions – A review. *J. Environ. Manage.* 224, 288–297.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.07.066>
 9. Beckett, M.A., 2016. Recent advances in crystalline hydrated borates with non-metal or transition-metal complex cations. *Coord. Chem. Rev.* 323, 2–14. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.12.012>
 10. Bilal, M., Rasheed, T., Sosa-Hernández, J.E., Raza, A., Nabeel, F., Iqbal, H.M.N., 2018. Biosorption: An interplay between marine algae and potentially toxic elements—A review. *Mar. Drugs* 16, 1–16.
<https://doi.org/10.3390/md16020065>
 11. Cabello, J., Toledo-Cervantes, A., Sánchez, L., Revah, S., Morales, M., 2015. Effect of the temperature, pH and irradiance on the photosynthetic activity by *Scenedesmus obtusiusculus* under

- nitrogen replete and deplete conditions. *Bioresour. Technol.* 181, 128–135.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.034>
12. Cameron, H., Mata, M.T., Riquelme, C., 2018. The effect of heavy metals on the viability of *Tetraselmis marina* AC16-MESO and an evaluation of the potential use of this microalga in bioremediation. *PeerJ* 6, e5295. <https://doi.org/10.7717/peerj.5295>
 13. Dong, B., Ho, N., Ogden, K.L., Arnold, R.G., 2014. Cultivation of *Nannochloropsis salina* in municipal wastewater or digester centrate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103, 45–53.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.02.001>
 14. Dong, X., Wang, C., Li, H., Wu, M., Liao, S., Zhang, D., Pan, B., 2014. The sorption of heavy metals on thermally treated sediments with high organic matter content. *Bioresour. Technol.* 160, 123–128.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.006>
 15. E.W. Rice, R.B. Baird, A.D. Eaton, editors, 2017. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd Edition, American Water Works Association.
 16. El-Sheekh, M.M., Farghl, A.A., Galal, H.R., Bayoumi, H.S., 2016. Bioremediation of different types of polluted water using microalgae. *Rend. Lincei* 27, 401–410. <https://doi.org/10.1007/s12210-015-0495-1>
 17. Gani, P., Sunar, N.M., Matias-peralta, H., Latiff, A.A.A., Parjo, U.K., Oyekanmi, A.A., Abdul, A.A., Parjo, U.K., Oyekanmi, A.A., 2017. Green Approach in the Bio-removal of Heavy Metals from wastewaters. *MATEC Web Conf.* 06007, 1–8. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201710306007>
 18. Graff, A., Barrez, E., Baranek, P., Bachet, M., Bénézech, P., 2017. Complexation of Nickel Ions by Boric Acid or (Poly)borates. *J. Solution Chem.* 46, 25–43. <https://doi.org/10.1007/s10953-016-0555-x>
 19. Guan, Z., Lv, J., Bai, P., Guo, X., 2016. Boron removal from aqueous solutions by adsorption - A review. *Desalination* 383, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2015.12.026>
 20. Gupta, V.K., Rastogi, A., 2008. Sorption and desorption studies of chromium (VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. *J. Hazard. Mater.* 154, 347–354.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.032>

21. Hamed, S.M., Selim, S., Klöck, G., AbdElgawad, H., 2017. Sensitivity of two green microalgae to copper stress: Growth, oxidative and antioxidants analyses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 144, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.05.048>
22. Hu, B., Min, M., Zhou, W., Li, Y., Mohr, M., Cheng, Y., Lei, H., Liu, Y., Lin, X., Chen, P., Ruan, R., 2012. Influence of exogenous CO₂ on biomass and lipid accumulation of microalgae *Auxenochlorella protothecoides* cultivated in concentrated municipal wastewater. *Appl Biochem Biotechnol* 166, 1661–1673. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9566-2>
23. Hussain, F., Shah, S.Z., Zhou, W., Iqbal, M., 2017. Microalgae screening under CO₂ stress: Growth and micro-nutrients removal efficiency. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 170, 91–98. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.021>
24. Jayakumar, R., Rajasimman, M., Karthikeyan, C., 2015. Optimization, equilibrium, kinetic, thermodynamic, and desorption studies on the sorption of Cu (II) from an aqueous solution using marine green algae : *Halimeda gracilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 121, 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.03.040>
25. Jiang, Y., Purchase, D., Jones, H., Garelick, H., 2011. Technical note: Effects of arsenate (as⁵⁺) on growth and production of glutathione (GSH) and phytochelatin (PCS) in *Chlorella Vulgaris*. *Int. J. Phytoremediation* 13, 834–844. <https://doi.org/10.1080/15226514.2010.525560>
26. Kołodyńska, D., Krukowska, J., Thomas, P., 2017. Comparison of sorption and desorption studies of heavy metal ions from biochar and commercial active carbon. *Chem. Eng. J.* 307, 353–363. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.08.088>
27. Lee, H., Nam, K., Yang, J.W., Han, J.I., Chang, Y.K., 2016. Synergistic interaction between metal ions in the sea salts and the extracellular polymeric substances for efficient microalgal harvesting. *Algal Res.* 14, 79–82. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.01.006>
28. Li, Y., Yang, X., Geng, B., 2018. Preparation of Immobilized Sulfate-Reducing Bacteria-Microalgae Beads for Effective Bioremediation of Copper-Containing Wastewater. *Water. Air. Soil Pollut.* 229. <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3709-1>
29. Marín, D., Posadas, E., Cano, P., Pérez, V., Lebrero, R., Muñoz, R., Blanco, S., 2018. Seasonal

- variation of biogas upgrading coupled with digestate treatment in an outdoors pilot scale algal-bacterial photobioreactor. *Bioresour. Technol.* 163, 58-66.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.117>
30. Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2015. Effect of metals, metalloids and metallic nanoparticles on microalgae growth and industrial product biosynthesis: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 23929–23969. <https://doi.org/10.3390/ijms161023929>
 31. Min, M., Wang, L., Li, Y., Mohr, M.J., Hu, B., Zhou, W., Chen, P., Ruan, R., 2011. Cultivating *Chlorella* sp. in a pilot-scale photobioreactor using centrate wastewater for microalgae biomass production and wastewater nutrient removal. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165, 123–137.
<https://doi.org/10.1007/s12010-011-9238-7>
 32. Mirghaffari, N., Moeini, E., Farhadian, O., 2014. Biosorption of Cd and Pb ions from aqueous solutions by biomass of the green microalga, *Scenedesmus quadricauda*. *J. Appl. Phycol.* 27, 311–320. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0345-z>
 33. Mohamed, Z.A., 2008. Polysaccharides as a protective response against microcystin-induced oxidative stress in *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda* and their possible significance in the aquatic ecosystem. *Ecotoxicology* 17, 504–516. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0204-2>
 34. Montazer-Rahmati, M.M., Rabbani, P., Abdolali, A., Keshtkar, A.R., 2011. Kinetics and equilibrium studies on biosorption of cadmium, lead, and nickel ions from aqueous solutions by intact and chemically modified brown algae. *J. Hazard. Mater.* 185, 401–407.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.09.047>
 35. Monteiro, C.M., Fonseca, S.C., Castro, P.M.L., Malcata, F.X., 2011. Toxicity of cadmium and zinc on two microalgae, *Scenedesmus obliquus* and *Desmodesmus pleiomorphus*, from Northern Portugal. *J. Appl. Phycol.* 23, 97–103. <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9542-6>
 36. Palumbo, A.J., Daughney, C.J., Slade, A.H., Glover, C.N., 2013. Influence of pH and natural organic matter on zinc biosorption in a model lignocellulosic biofuel biorefinery effluent. *Bioresour. Technol.* 146, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.07.053>
 37. Pérez-Esteban, J., Escolástico, C., Masaguer, A., Vargas, C., Moliner, A., 2014. Soluble organic carbon

- and pH of organic amendments affect metal mobility and chemical speciation in mine soils. *Chemosphere* 103, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.055>
38. Piccini, M., Raikova, S., Allen, M.J., Chuck, C.J., 2019. A synergistic use of microalgae and macroalgae for heavy metal bioremediation and bioenergy production through hydrothermal liquefaction. *Sustain. Energy Fuels* 3, 292–301. <https://doi.org/10.1039/c8se00408k>
39. Posadas, E., Morales, M. del M., Gomez, C., Ación, F.G., Muñoz, R., 2015. Influence of pH and CO₂ source on the performance of microalgae-based secondary domestic wastewater treatment in outdoors pilot raceways. *Chem. Eng. J.* 265, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.12.059>
40. Romero, L., Alonso, H., Campano, P., Fanfani, L., Cidu, R., Dadea, C., Keegan, T., Thornton, I., Farago, M., 2003. Arsenic enrichment in waters and sediments of the Rio Loa (Second Region, Chile). *Appl. Geochemistry* 18, 1399–1416. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(03\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(03)00059-3)
41. Rugnini, L., Ellwood, N.T.W., Costa, G., Falsetti, A., Congestri, R., Bruno, L., 2019. Scaling-up of wastewater bioremediation by *Tetrademus obliquus*, sequential bio-treatments of nutrients and metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.059>
42. Saavedra, R., Muñoz, R., Taboada, M.E., Vega, M., Bolado, S., 2018. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresour. Technol.* 263, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>
43. Sahu, A.K., Siljudalen, J., Trydal, T., Rusten, B., 2013. Utilisation of wastewater nutrients for microalgae growth for anaerobic co-digestion. *J. Environ. Manage.* 122, 113–120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.02.038>
44. Salama, E.S., Kurade, M.B., Abou-Shanab, R.A.I., El-Dalatony, M.M., Yang, I.S., Min, B., Jeon, B.H., 2017. Recent progress in microalgal biomass production coupled with wastewater treatment for biofuel generation. *Renew. Sustain. Energy Rev.* 79, 1189–1211. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.05.091>
45. Shen, Q.H., Jiang, J.W., Chen, L.P., Cheng, L.H., Xu, X.H., Chen, H.L., 2015. Effect of carbon source on biomass growth and nutrients removal of *Scenedesmus obliquus* for wastewater advanced treatment and lipid production. *Bioresour. Technol.* 190, 257–263.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.04.053>

46. Suresh Kumar, K., Dahms, H.U., Won, E.J., Lee, J.S., Shin, K.H., 2015. Microalgae - A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 329–352.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>
47. Taştan, B.E., B., Duygu, E., Dönmez, G., Ertit Taştan, B., Duygu, E., Dönmez, G., Taştan, B.E., Duygu, E., Dönmez, G., 2012. Boron bioremoval by a newly isolated *Chlorella* sp. and its stimulation by growth stimulators. *Water Res.* 46, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.10.045>
48. Torres, E.M., Hess, D., McNeil, B.T., Guy, T., Quinn, J.C., 2017. Impact of inorganic contaminants on microalgae productivity and bioremediation potential. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 139, 367–376.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.01.034>
49. Vannela, R., Verma, S.K., 2006. Co^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} accumulation by cyanobacterium *Spirulina platensis*. *Biotechnol. Prog.* 22, 1282–1293. <https://doi.org/10.1021/bp060075s>
50. Vijayaraghavan, K., Balasubramanian, R., 2015. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. *J. Environ. Manage.* 160, 283–296.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.030>
51. Wang, L., Wang, Y., Chen, P., Ruan, R., 2010. Semi-continuous cultivation of *Chlorella vulgaris* for treating undigested and digested dairy manures. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162, 2324–2332.
<https://doi.org/10.1007/s12010-010-9005-1>
52. Yamani, J.S., Lounsbury, A.W., Zimmerman, J.B., 2016. Towards a selective adsorbent for arsenate and selenite in the presence of phosphate: Assessment of adsorption efficiency, mechanism, and binary separation factors of the chitosan-copper complex. *Water Res.* 88, 889–896.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.11.017>
53. Yin, K., Lv, M., Wang, Q., Wu, Y., Liao, C., Zhang, W., Chen, L., 2016. Simultaneous bioremediation and biodetection of mercury ion through surface display of carboxylesterase E2 from *Pseudomonas aeruginosa* PA1. *Water Res.* 103, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.07.053>
54. Yin, K., Wang, Q., Lv, M., Chen, L., 2018. Microorganism remediation strategies towards heavy

- metals. Chem. Eng. J. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.226>
55. Zeraatkar, A.K., Ahmadzadeh, H., Talebi, A.F., Moheimani, N.R., McHenry, M.P., 2016. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. J. Environ. Manage. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.059>
56. Zhang, J., Hua, P., Krebs, P., 2016. The influences of dissolved organic matter and surfactant on the desorption of Cu and Zn from road-deposited sediment. Chemosphere 150, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.015>
57. Zhang, W., Chen, L., Liu, D., 2012. Characterization of a marine-isolated mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain SP1 and its potential application in marine mercury reduction. Appl. Microbiol. Biotechnol. 93, 1305–1314. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3454-5>
58. Zhang, W., Yin, K., Li, B., Chen, L., 2013. A glutathione S-transferase from *Proteus mirabilis* involved in heavy metal resistance and its potential application in removal of Hg²⁺. J. Hazard. Mater. 261, 646–652. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.023>