

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Centro Regional Universitario Bariloche



Evaluación de la capacidad de remoción de metal en  
especies de algas aisladas de ambientes contaminados

Trabajo Final para optar por el título de  
Licenciada en Ciencias Biológicas

Micaela Gómez Jousse

**Directora:** Dra. Gisela Ferraro<sup>a</sup>

**Co-Directora:** Dra. Carolina Bagnato<sup>a</sup>

**Lugar de Trabajo:**

<sup>a</sup>Laboratorio de Bioenergía y Procesos de Biorremediación del Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Centro Atómico Bariloche, Comisión Nacional de Energía Atómica

**Año:** 2020

# Evaluación de la capacidad de remoción de metal en especies de algas aisladas de ambientes contaminados

## Resumen

La contaminación por metales ha incrementado en las últimas décadas producto del desarrollo industrial, lo que resulta especialmente peligrosos debido a su alta toxicidad y naturaleza no biodegradable que provoca la acumulación en el ambiente. El uso de cultivos de algas unicelulares ha demostrado ser eficiente para la remoción de metales. La adsorción a la pared celular y la absorción intracelular son algunas de las estrategias que presentan las algas para reducir la toxicidad del metal. El objetivo de este trabajo fue estudiar la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  por medio de cepas algales aisladas de ambientes contaminados. Se realizaron ensayos de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  a distintas concentraciones de metal, dosis inicial de biomasa y tiempo de contacto, así como también se caracterizó el crecimiento de las algas. Se analizaron 8 cepas pertenecientes a los géneros *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. a 25 y 55  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ , obteniendo eficiencias de remoción ( $E\%$ ) entre 75-100% y altas capacidades de remoción ( $q$ ). Fueron seleccionadas las tres cepas más eficientes, RR6 (*Chlorella* sp.), RR8 y P1 (*Scenedesmus* sp.) ( $E\% \geq 91\%$ ) para determinar la concentración óptima de biomasa, la cual correspondió a 0.30, 0.47 y 0.24  $\text{g L}^{-1}$  para RR8, P1 y RR6, respectivamente. Las algas analizadas mostraron una rápida velocidad de remoción durante los primeros minutos de ensayo, alcanzando valores máximos de  $q$  muy prometedores (141-190  $\text{mg g}^{-1}$ ), a un tiempo óptimo de 120 minutos para RR8 y de 24 horas para RR6 y P1. Estos datos indicarían que la adsorción parece ser el mecanismo predominante para la captación de  $\text{Ni}^{2+}$ . El estudio cinético reveló que los modelos de pseudo-segundo orden y Elovich ajustaron mejor para las tres cepas. Los resultados obtenidos proporcionan importantes perspectivas sobre la potencial aplicación de estas cepas en el tratamiento de aguas residuales o lixiviados contaminados con  $\text{Ni}^{2+}$  a gran escala.

Palabras clave: Algas nativas, Biorremediación, *Chlorella* sp., Níquel, *Scenedesmus* sp.

---

# Evaluation of metal removal capacity in algae species isolated from contaminated environments

## Abstract

Metal environmental pollution has increased in recent decades as a result of the industrial development, which is especially dangerous due to its high toxicity and non-biodegradable nature. Unicellular algae cultures have shown to be efficient for metal removal. Cell wall adsorption and intracellular absorption are some of the strategies displayed by algae to reduce metal toxicity. The objective of this work was to study Ni<sup>2+</sup> removal using algae strains isolated from contaminated environments. Ni<sup>2+</sup> removal tests were performed at different initial metal concentrations, initial biomass dose and contact time. Also, algae growth was characterized. Eight strains belonging to the genera *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. were analyzed at 25 and 55 mg L<sup>-1</sup> of Ni<sup>2+</sup>, obtaining removal efficiencies (*E*%) between 75-100% and high removal capacities (*q*). The three most efficient strains, RR6 (*Chlorella* sp.), RR8, and P1 (*Scenedesmus* sp.) (*E*% ≥ 91%) were selected to evaluate the optimal biomass concentration, which was 0.30, 0.47 and 0.24 g L<sup>-1</sup> for RR8, P1 and RR6, respectively. Algae strains showed a fast removal rate during the first minutes of the test, reaching very promising *q* values (between 141-190 mg g<sup>-1</sup>), at an optimal time of 120 minutes for RR8, and 24 hours for RR6 and P1. These data would indicate that adsorption seems to be the predominant mechanism for Ni<sup>2+</sup> uptake. The kinetic study revealed that the pseudo-second order and Elovich models fit well for the three strains. Results obtained in this study provide important perspectives on the potential application of these strains in the treatment of wastewater contaminated with Ni<sup>2+</sup> on a large scale.

Keywords: Bioremediation, *Chlorella* sp., Native algae, Nickel, *Scenedesmus* sp.

## **Agradecimientos**

En primer lugar, le agradezco a mi familia por su apoyo y amor incondicional. Sin ellos la vida no sería el derroche de luz y amor en el que me encuentro inmersa.

En segundo lugar, les agradezco a Gise y Caro por darme la oportunidad de trabajar con ellas, por su constante ayuda, enseñanzas y paciencia. Y a todo el grupo del IEDS, que me abrieron las puertas de su laboratorio y me dejaron desempeñar mis últimos años de cursada en un lugar de gran calidad de trabajo y, por sobre todo, de gran calidez humana.

Un reconocimiento especial a todos esos compañeros de cursada que se transformaron en amigos, por las infinitas charlas compartidas entre almuerzos y recreos, por los constantes empujoncitos a lo largo de la carrera para llegar hoy a este momento. Y a todos los profesores del CRUB que formaron parte de esta etapa de formación, que abrieron puertas a temas desconocidos y me despertaron aún más curiosidad por el maravilloso mundo de la biología.

---

# Índice general

---

<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>I.1. Contexto de la problemática: Contaminación ambiental por metales y biorremediación.....</b>	<b>11</b>
<b>I.2. Algas unicelulares: Características generales y remoción de metales .....</b>	<b>13</b>
I.2.1. Mecanismos de remoción y factores que influyen en la remoción .....	14
I.2.2. Tiempo de contacto y modelos cinéticos .....	17
I.2.3. Antecedentes: Aplicación de algas en procesos de remoción de metales. ....	17
<b>I.3. Contaminación por metales: Situación nacional y regional.....</b>	<b>20</b>
<b>I.4. Níquel: Características, contaminación, normativas .....</b>	<b>22</b>
<b>I.5. Objetivos .....</b>	<b>23</b>
I.5.1. Objetivo General .....	23
I.5.2. Objetivos Específicos .....	23
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
<b>II.1. Medio de cultivo .....</b>	<b>24</b>
<b>II.2. Mantenimiento y crecimiento de los cultivos algales.....</b>	<b>25</b>
<b>II.3. Caracterización del crecimiento.....</b>	<b>25</b>
II.3.1. Parámetros de productividad .....	26
II.3.1.1. Tasa de crecimiento ( $\mu$ ).....	26
II.3.1.2. Tiempo de duplicación ( $T_2$ ).....	27
II.3.2. Medición de peso seco.....	27
II.3.2.1. Cálculo de biomasa algal ( $BST$ ).....	27
II.3.2.2. Cálculo de peso unitario ( $PSTU$ ).....	28
II.3.3. Evaluación de la viabilidad celular .....	28
II.3.4. Tamaño celular .....	28
<b>II.4. Preparación de solución estándar de níquel (<math>Ni^{2+}</math>) .....</b>	<b>30</b>
<b>II.5. Análisis de la concentración de <math>Ni^{2+}</math> en solución.....</b>	<b>30</b>
II.5.1. Reactivos .....	31
II.5.2. Preparación de la muestra.....	31
II.5.3. Curva de calibración.....	32
II.5.4. Elección del intervalo de la curva de calibración .....	32
II.5.5. Metodología espectrofotometría UV Vis.....	33
<b>II.6. Evaluación de la remoción de <math>Ni^{2+}</math> de cepas algales aisladas de sitios contaminados.....</b>	<b>34</b>
II.6.1. Ensayos de remoción.....	34

II.6.2.	Cálculo de eficiencia ( $E\%$ ) y capacidad ( $q$ ) de remoción.....	35
II.6.3.	Caracterización del efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal .....	36
II.6.4.	Análisis de remoción de metal a diferentes tiempos de contacto .....	36
II.6.5.	Modelos cinéticos.....	37
II.6.5.1.	Modelo cinético de pseudo-primero orden.....	37
II.6.5.2.	Modelo cinético de pseudo-segundo orden .....	38
II.6.5.3.	Modelo cinético de Elovich .....	39
II.6.5.4.	Análisis de los modelos cinéticos .....	40
<b>II.7.</b>	<b>Reproducibilidad y análisis estadísticos .....</b>	<b>41</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>III.1.</b>	<b>Prospección y aislamiento de las algas.....</b>	<b>42</b>
<b>III.2.</b>	<b>Control bacteriológico de los cultivos algales: Tinción con azul de metileno.....</b>	<b>44</b>
<b>III.3.</b>	<b>Ensayo de selección de la curva de calibración para detección colorimétrica de <math>Ni^{2+}</math> en solución</b>	<b>44</b>
<b>III.4.</b>	<b>Evaluación de la eficiencia y capacidad de remoción de <math>Ni^{2+}</math> para la selección de cepas algales ..</b>	<b>46</b>
<b>III.5.</b>	<b>Caracterización del crecimiento.....</b>	<b>49</b>
III.5.1.	Comportamiento de la curva de crecimiento y parámetros de productividad .....	49
III.5.2.	Tamaño celular .....	53
<b>III.6.</b>	<b>Caracterización del efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal. ....</b>	<b>55</b>
<b>III.7.</b>	<b>Análisis de remoción de metal a diferentes tiempos de contacto y ajuste a modelos cinéticos .....</b>	<b>57</b>
III.7.1.	Caracterización del efecto del tiempo de contacto sobre la remoción de $Ni^{2+}$ .....	57
III.7.2.	Modelos cinéticos de remoción .....	60
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>IV.1.</b>	<b>Evaluación de la eficiencia y capacidad de remoción de <math>Ni^{2+}</math> para la selección de cepas algales ..</b>	<b>66</b>
<b>IV.2.</b>	<b>Caracterización del crecimiento y tamaño celular .....</b>	<b>72</b>
<b>IV.3.</b>	<b>Caracterización del efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal. ....</b>	<b>77</b>
<b>IV.4.</b>	<b>Efecto del tiempo de contacto sobre la remoción de metal .....</b>	<b>80</b>
<b>IV.5.</b>	<b>Modelos cinéticos de remoción .....</b>	<b>83</b>
<b>IV.6.</b>	<b>Consideraciones finales.....</b>	<b>86</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>88</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXO I:</b>	<b>CARACTERIZACIÓN DEL CRECIMIENTO .....</b>	<b>104</b>
<b>ANEXO II:</b>	<b>EFEECTO DEL TIEMPO DE CONTACTO .....</b>	<b>107</b>

---

## Índice de Tablas

---

<b>Tabla 1:</b> Contenido de nutrientes del medio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM) [99,100] reducido en Zn y sin EDTA (BBM-R). .....	24
<b>Tabla 2:</b> Preparación de las soluciones patrones de la curva de calibración en el intervalo de 0 - 10 mg L <sup>-1</sup> de Ni <sup>2+</sup> para el desarrollo del método de detección colorimétrica por DMG de Ni <sup>2+</sup> en solución.....	32
<b>Tabla 3:</b> Preparación de las soluciones patrones de la curva de calibración preliminar en el intervalo de 0 - 80 mg L <sup>-1</sup> de Ni <sup>2+</sup> para el desarrollo del método de detección colorimétrica por DMG de Ni <sup>2+</sup> en solución. En negrita: intervalo de concentración seleccionado.....	33
<b>Tabla 4:</b> Dosis de biomasa algal utilizadas para la caracterización del efecto sobre la remoción de metal. Tratamiento de inóculos con diferentes densidades celulares (*10 <sup>7</sup> cél mL <sup>-1</sup> ) con su correspondiente valor de peso de biomasa algal seca (g L <sup>-1</sup> ) para las tres cepas evaluadas.....	36
<b>Tabla 5:</b> Referencia de las cepas de algas unicelulares utilizadas en el desarrollo del trabajo, separadas por género y sitio de aislamiento (Rio Reconquista (RR), humedal del CTP (P)). .....	42
<b>Tabla 6:</b> Parámetros de productividad de las cepas RR6, RR8 y P1: velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación ( $T_2$ ) obtenidos en la fase exponencial de los cultivos; concentración final máxima del cultivo ([Final]) ( $\pm$ error estándar), $BST$ final (biomasa seca total) y $PSTU$ (peso seco total unitario). $\pm$ desvío estándar. ....	51
<b>Tabla 7:</b> Parámetros de tamaño celular: diámetro ( $d$ ), altura ( $h$ ), biovolumen ( $V$ ) y relación superficie volumen ( $A/V$ ) de las 3 cepas seleccionadas. Valores promedio $\pm$ error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas en los resultados (prueba de Tukey; $\alpha = 0.05$ , $a > b$ ). .....	53
<b>Tabla 8:</b> Parámetros de los modelos cinético de remoción de Ni <sup>2+</sup> por las cepas RR6, RR8 y P1. Modelo de pseudo primer orden (PPO): $k_1$ (min <sup>-1</sup> ) constante de velocidad de PPO, $q_{e.m1}$ (mg g <sup>-1</sup> ) capacidad de remoción estacionaria calculada por modelo PPO; Modelo de pseudo segundo orden (PSO): $k_2$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) constante de velocidad de PSO, $q_{e.m2}$ (mg g <sup>-1</sup> ): capacidad de remoción estacionaria calculada por modelo PSO, $h$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) velocidad inicial de remoción; Modelo de Elovich: $\beta$ (g mg <sup>-1</sup> ) constante de desorción, $\alpha$ (mg g <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> ) es la velocidad de sorción inicial, $t_0$ constante de tiempo del modelo (min). Generales: $q_{e.exp}$ (mg g <sup>-1</sup> ) capacidad de remoción experimental estacionaria, $C_0$ (mg L <sup>-1</sup> ) concentración inicial de Ni <sup>2+</sup> , $X^2$ estadístico chi cuadrado, S.D.% desvío estándar porcentual. ....	65
<b>Tabla 9:</b> Comparación de la eficiencia porcentual ( $E\%$ ) y capacidad ( $q$ (mg g <sup>-1</sup> )) de remoción de Ni <sup>2+</sup> de las cepas utilizadas en el presente estudio (PE) con diferentes cepas de algas unicelulares y tratamientos. Se especifica la concentración inicial ( $C_0$ (mg L <sup>-1</sup> )) de Ni <sup>2+</sup> utilizada, pH, temperatura ( $T^\circ$ (°C)), el tiempo de contacto (TC (minutos), a menos que indique en días (d)) y la cantidad de biomasa usada (CB (g L <sup>-1</sup> )). .....	71
<b>Tabla 10:</b> Comparación de parámetros cinéticos del modelo de PSO de remoción de Ni <sup>2+</sup> de las cepas utilizadas en el presente estudio (PE) con otros trabajos. Se especifica la concentración inicial ( $C_0$ (mg L <sup>-1</sup> )) de Ni <sup>2+</sup> , pH, temperatura ( $T^\circ$ (°C)), tiempo para llegar a estado estacionario (TE, en minutos a menos que indique en días (d)) y cantidad de biomasa usada (CB (g L <sup>-1</sup> )); $q$ obtenido experimentalmente ( $q_{exp}$ (mg g <sup>-1</sup> )), $q$ obtenido por modelo de PSO ( $q_{e.m2}$ (mg g <sup>-1</sup> )), constante de velocidad de PSO ( $k_2$ (g mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )) y el coeficiente lineal ( $R^2$ ). .....	85

---

## Índice de Figuras

---

- Figura 1:** Procesos de biosorción de metales en solución en algas unicelulares. **A.** Mecanismos involucrados en la adsorción de iones metálicos: adsorción física, intercambio iónico, complejación y precipitación. **B.** Mecanismos de absorción de cationes metálicos ( $Me^{n+}$ ) al interior celular por medio de proteínas transportadoras con posterior unión a fitoquelatinas (FTs), metalotioneinas (MTs) y/o acumulación en vacuolas. Mecanismos de adsorción extracelular por unión a grupos funcionales de la pared celular. Referencias: Agente Precipitante (AP), Metal precipitado ( $MP_{(s)}$ ), Protones ( $H^+$ ) (Los protones fueron utilizados como ejemplo de ion intercambiable). Las flechas grises indican procesos. (Dibujo adaptado y modificado a partir de [14])..... 15
- Figura 2:** **A.** Ubicación de los sitios de aislamiento de las cepas de algas unicelulares utilizadas en el presente estudio. **B.** Imagen de la cuenca del Río Reconquista, provincia de Buenos Aires. **C.** Imagen satelital del Río Reconquista. (Referencias: trayecto marcado con trazo color amarillo. Sitio de muestreo indicado con símbolo de ubicación rojo situado en canal José León Suárez, zona de la comuna General San Martín.) **D.** Imagen satelital del Complejo Tecnológico Pilcaniyeu (CTP). (Referencias: Humedal del CTP marcado en amarillo; Planta de tratamientos de líquidos cloacales (PTLC) marcado con punto rojo). **E.** Imagen del predio del CTP. .... 21
- Figura 3:** Formas geométricas para calcular biovolumen y superficie celular de las algas unicelulares. Las formas están representadas tridimensionalmente y en su sección transversal. Referencias: diámetro ( $d$ ), altura ( $h$ ). (Dibujo adaptado y modificado a partir de [107,108]). .... 29
- Figura 4:** Imágenes de microscopia de campo claro (aumento 1000X) de todas las cepas evaluadas en el trabajo. (Microscopio Leica DM10000 LED, cámara Leica ICC50 HD). .... 43
- Figura 5:** Imágenes de microscopia de campo claro (aumento 1000X), cepa P7 (*Scenedesmus* sp.) fijada y tratada con tinción de azul de metileno. **A.** Cultivo axénico. **B.** Cultivo contaminado con bacterias (localización de las bacterias indicada con flecha) (Microscopio Leica DM10000 LED, cámara Leica ICC50 HD). .... 44
- Figura 6:** **A.** Recta de calibración preliminar, intervalo de concentración de 0 a 80  $mg L^{-1} Ni^{2+}$ . **B.** Recta de calibración seleccionada, intervalo de concentración de 0 a 10  $mg L^{-1} Ni^{2+}$ . Datos de absorbancia promedio. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Ambas curvas fueron construidas mediante los valores de absorbancia a 445 nm obtenidos a partir del ensayo espectrofotométrico por DMG de muestras de concentración conocida de  $Ni^{2+}$  ..... 45
- Figura 7:** Valores promedio de la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $Ni^{2+}$  en solución de los cultivos de diferentes cepas aisladas del Río Reconquista (RR) y del CTP (P). Condiciones de ensayo: Densidad celular: *Scenedesmus*:  $1 \times 10^7$  cél  $mL^{-1}$ , *Chlorella*  $2.5 \times 10^7$  cél  $mL^{-1}$ , 24 hs de ensayo, concentración inicial de **A.**  $25 \pm 2.3$   $mg L^{-1} Ni^{2+}$  y **B.**  $55 \pm 2.9$   $mg L^{-1} Ni^{2+}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). ..... 47
- Figura 8:** Valores promedio de la capacidad de remoción ( $q$ ) de  $Ni^{2+}$  de los cultivos de diferentes cepas aisladas del Río Reconquista (RR) y del CTP (P). Condiciones de ensayo: Densidad celular: *Scenedesmus*:  $1 \times 10^7$  cél  $mL^{-1}$ , *Chlorella*  $2.5 \times 10^7$  cél  $mL^{-1}$ , 24 hs de ensayo, concentración inicial de **A.**  $25 \pm 2.3$   $mg L^{-1} Ni^{2+}$  y **B.**  $55 \pm 2.9$   $mg L^{-1} Ni^{2+}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). .... 48
- Figura 9:** Aspecto macroscópico de cultivos de la cepa RR6 a lo largo del tiempo de cultivo. .... 49
- Figura 10:** Curva de crecimiento. **A.** Valores promedio del número de cél  $mL^{-1}$  **B.** ln de valor promedio del número de cél  $mL^{-1}$  de las cepas a lo largo del tiempo del cultivo. Condiciones de cultivo: luz blanca  $120 \mu mol$  fotón  $m^{-2} s^{-1}$ , fotoperiodo 12:12,  $25 \pm 2^\circ C$ , agitación magnética continua. Las barras indican  $\pm$  error estándar. .... 50
- Figura 11:** Aspecto macroscópico de las cepas RR6 y P1 a 40 días de iniciada la caracterización del crecimiento, y de la cepa RR8 a 37 días del mismo..... 52
- Figura 12:** Aspecto macroscópico de la cepa P1 (*Scenedesmus* sp.), agregación celular. Imagen A: subcultivo para ensayos de remoción. Imagen B: cultivo perteneciente a la curva de crecimiento. .... 53

- Figura 13:** Imágenes de microscopía de campo claro (aumento 1000X) de las algas seleccionadas. Cepas aisladas del humedal natural del CTP (P) y del Río Reconquista (RR). *Scenedesmus* sp.: P1 y RR8. *Chlorella* sp.: RR6. Referencias: Espinas (E), Pirenoide (P), Cenobio (Ce), Restos de Pared Celular (RP). (Microscopio Leica DM10000 LED, cámara Leica ICC50 HD)..... 54
- Figura 14:** Valores promedio de la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $Ni^{2+}$  en función de la cantidad de biomasa algal en **A.** ( $g\ L^{-1}$ ) y en **B.** densidad celular ( $cel\ mL^{-1}$ ). Condiciones de ensayo: 24 hs,  $21 \pm 0.1^{\circ}C$ , fotoperiodo 12:12, agitación manual, volumen: 10 ml,  $C_0$  de  $Ni^{2+}$ :  $55 \pm 2\ mg\ L^{-1}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). ..... 56
- Figura 15:** Valores promedio de eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $Ni^{2+}$  de los cultivos a lo largo de **A.** 3 hs y **B.** 48 hs de tiempo de contacto. Condiciones de ensayo: 24 hs,  $21 \pm 0.1^{\circ}C$ , fotoperiodo 12:12, agitación manual, volumen: 10 ml,  $C_0$  de  $Ni^{2+}$ :  $55 \pm 1\ mg\ L^{-1}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). Los análisis estadísticos se hicieron para cada cepa por separado, por lo que cada conjunto de letras corresponde a una cepa (RR6: a,b,c / P1: g,h / RR8: d,e,f)..... 58
- Figura 16:** Valores promedio de la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $Ni^{2+}$  de los cultivos a lo largo de 10 días de tiempo de contacto. Condiciones de ensayo: 24 hs,  $21 \pm 0.1^{\circ}C$ , fotoperiodo 12:12, agitación manual, volumen: 10 ml,  $C_0$  de  $Ni^{2+}$ :  $55 \pm 1\ mg\ L^{-1}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). Los análisis estadísticos se hicieron para cada cepa por separado, por lo que cada conjunto de letras corresponde a una cepa (RR6: a,b,c / P1: g,h / RR8: d,e,f)..... 59
- Figura 17:** Apariencia macroscópica de cultivos de las cepas P1 (los 3 viales empezando de la izquierda) y RR6 (los 3 viales empezando de la derecha) a 10 días de ensayo en una solución con una concentración inicial de  $55\ mg\ L^{-1}\ Ni^{2+}$ . ..... 60
- Figura 18:** Aplicación lineal de los modelos cinéticos de **(A)** Pseudo-primer orden, **(B)** Pseudo-segundo orden, **(C)** Elovich, para la remoción de  $Ni^{2+}$  a lo largo del tiempo en las cepas algales P1( $\odot$ ), RR6 ( $\triangle$ ) y RR8 ( $\bullet$ ). ..... 61
- Figura 19:** Cinética de remoción de  $Ni^{2+}$  en la cepa RR8 con el ajuste de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich. Los puntos representan el valor promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $Ni^{2+}$  de los cultivos de RR8 ( $\bullet$ ). Las líneas representan el ajuste de los diferentes modelos cinéticos. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar..... 62
- Figura 20:** Cinética de remoción de  $Ni^{2+}$  en la cepa P1 con el ajuste de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich. Los puntos representan el valor promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $Ni^{2+}$  de los cultivos de P1 ( $\odot$ ). Las líneas representan el ajuste de los diferentes modelos cinéticos. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar..... 63
- Figura 21:** Cinética de remoción de  $Ni^{2+}$  en la cepa RR6 con el ajuste de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich. Los triángulos representan el valor promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $Ni^{2+}$  de los cultivos de RR6 ( $\triangle$ ). Las líneas representan el ajuste de los diferentes modelos cinéticos. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar..... 64

---

## Anexos: Figuras

---

### Anexo I

**Figura A.I.1:** Transformación a logaritmo natural de  $N_x/N_0$  de P1 en función del tiempo. Rectas corresponden a la fase exponencial de crecimiento. (A, B y C corresponden a las réplicas). Condiciones de ensayo: fotoperiodo (12:12) 120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación constante a 110 rpm. .... 104

**Figura A.I.2:** Transformación a logaritmo natural de  $N_x/N_0$  de RR8 en función del tiempo. Rectas corresponden a la fase exponencial de crecimiento. (A, B y C corresponden a las réplicas). Condiciones de ensayo: fotoperiodo (12:12) 120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación constante a 110 rpm. .... 104

**Figura A.I.3:** Transformación a logaritmo natural de  $N_x/N_0$  de RR6 en función del tiempo. Rectas corresponden a la fase exponencial de crecimiento. (A, B y C corresponden a las réplicas). Condiciones de ensayo: fotoperiodo (12:12) 120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación constante a 110 rpm. .... 105

**Figura A.I. 4:** Densidad celular promedio (cél  $\text{mL}^{-1}$ ) y sumatoria progresiva de la tasa duplicaciones diarias ( $\Sigma\mu_2$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo (días) para las cepas A. RR8 (●), B. P1 (○) y C. RR6 (△). Las barras indican  $\pm$  error estándar. .... 106

### Anexo II

**Figura A.II. 5:** Valores promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $\text{Ni}^{2+}$  de los cultivos de RR8 (●), P1 (○) (*Scenedesmus* sp.) y RR6 (△) (*Chlorella* sp.) a lo largo de A. 3 hs, B. 48 hs, C. 10 días de tiempo de contacto. Condiciones de ensayo: concentración inicial de  $55 \pm 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ), Los análisis estadísticos se hicieron para cada cepa por separado. .... 108

---

## Lista de Abreviaturas

---

CTP : Complejo Tecnológico Pilcaniyeu

IEDS : Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable

CNEA : Comisión Nacional de Energía Atómica

CAB : Centro Atómico Bariloche

RR : Río Reconquista

BBM-R : Bold Basal Medium – Reducido

$\mu$  : Tasa de crecimiento exponencial

$\mu_2$  : Duplicaciones diarias de biomasa

$T_2$  : Tiempo de duplicación

$A$  : Área

$V$  : Volumen = Biovolumen

$A/V$  : Relación superficie / volumen

$d$  : Diámetro

$h$  : Altura

$r$  : Radio

$BST$  : Biomasa Seca Total

$PSTU$  : Peso Seco Total Unitario

$C_0$  : Concentración inicial (de metal)

$E\%$  : Eficiencia de remoción porcentual

$q$  : Capacidad de remoción

$q_{max}$  : Capacidad de remoción máxima

$q_e$  : Capacidad de remoción estacionaria

$q_t$  : Capacidad de remoción en el tiempo 't'

$q_{e.exp}$  : Capacidad de remoción estacionaria experimental

PPO : Pseudo Primer Orden

PSO : Pseudo Segundo Orden

$k_1$  : Constante de velocidad de PPO

$k_2$  : Constante de velocidad de PSO

$q_{e.m1}$  : Capacidad de remoción estacionaria calculada por modelo cinético de PPO

$q_{e.m2}$  : Capacidad de remoción estacionaria calculada por modelo cinético de PSO

## I. Introducción

### I.1. Contexto de la problemática: Contaminación ambiental por metales y biorremediación

La contaminación ambiental por metales<sup>1</sup> ha ido en aumento en las últimas décadas producto del incremento de la actividad industrial y el desarrollo tecnológico y urbano [3]. Diversas industrias generan aguas residuales que contienen metales. En muchos casos, estos efluentes son descartados en el ambiente sin ser adecuadamente tratados acumulándose progresivamente en cuerpos de agua, suelos y sedimentos cercanos a zonas industriales y mineras. Los metales son considerados unos de los contaminantes más peligrosos debido a su alta toxicidad, su naturaleza no biodegradable y su persistencia [4]. Esto provoca que se acumulen en el ambiente y en los distintos eslabones de la cadena trófica (bioacumulación), afectando negativamente a los ecosistemas terrestres y acuáticos y generando efectos adversos en múltiples organismos [5]. Por lo que, la contaminación por metales representa una amenaza para los seres vivos que allí habitan y para la salud pública. [6–9]

Los metales de mayor preocupación, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), son el cadmio (Cd), cromo (Cr), cobalto (Co), cobre (Cu), plomo (Pb), níquel (Ni), mercurio (Hg) y zinc (Zn). Los efectos que provocan estos metales sobre los sistemas vivos dependen de la concentración a la que estén expuestos y a su disponibilidad para los organismos. Algunos metales, tales como el Cu, Co, Zn, Ni, manganeso (Mn) y hierro (Fe), en bajas concentraciones juegan un papel importante en los procesos metabólicos celulares de ciertos organismos, por lo que son llamados micronutrientes o metales esenciales, y son tóxicos a concentraciones mayores [10,11]. De modo que, resulta de fundamental importancia desarrollar estrategias para la eliminación y/o reducción de los niveles de metales a sus límites permisibles en aguas residuales, así como para la remediación de ambientes ya contaminados [12].

Los métodos convencionales para la eliminación de iones metálicos tóxicos emplean tecnologías fisicoquímicas que incluyen el intercambio iónico, la precipitación química, el procesamiento de membranas, la adsorción, entre otros. Sin embargo, estas aplicaciones

---

<sup>1</sup> Es importante aclarar que al referimos a ‘metales’ se hace alusión a aquellos metales que representan una preocupación ambiental. Con frecuencia, en la bibliografía se mencionan como ‘metales pesados’, pero debido a la controversia y la inconsistencia en el uso de este término [1,2] en el presente trabajo nos referiremos simplemente a metales.

tienen limitaciones tecnológicas y económicas. Las desventajas en el desarrollo de estos procesos residen en su alto costo, consecuencia de un gran requerimiento energético y de la utilización de grandes cantidades de reactivos químicos, contaminación secundaria por la producción de compuestos residuales difíciles de eliminar (lodo químico tóxico) y/o la ineficacia que presentan especialmente al tratar soluciones con bajas concentraciones de metales [12–14]. Teniendo en cuenta estas limitantes y que las normas de descarga de aguas residuales son cada vez más estrictas, es imperativo el estudio de nuevas tecnologías que sean eficientes, de bajo costo y con el requisito adicional de ser respetuosas con el medioambiente [3,15,16].

El uso de microorganismos para la remediación de metales ha ganado mayor atención, ya que ofrecen una alternativa práctica y económicamente viable con respecto a los enfoques fisicoquímicos tradicionales [17,18]. El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que emplean organismos vivos para degradar, transformar y/o remover compuestos tóxicos contaminantes presentes en el agua, suelo y aire a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos [14]. Algas, bacterias, hongos y plantas son algunos de los seres vivos utilizados para los procesos de biorremediación. Dentro de estos organismos, las algas han mostrado ser sumamente eficientes para la remediación de metales [5,15]. La ficorremediación [19] es un área dentro de la biorremediación que se centra en el uso específico de algas como agentes remediadores de diversos contaminantes [20]. La comunidad científica ha centrado su interés particularmente en las algas unicelulares debido a sus múltiples aplicaciones, como lo es el tratamiento de aguas residuales, y los beneficios que ofrecen con respecto a otros organismos [14,21,22].

El uso de algas unicelulares para la remediación presenta numerosas ventajas. Entre ellas se encuentran la facilidad y el bajo costo de cultivo, consecuencia de sus altas tasas de crecimiento y bajos requerimientos nutricionales en comparación con otros organismos [23], además, al ser organismos fotosintéticos, no necesitan la adición de carbono orgánico para su crecimiento [14]. Sumado a esto, han demostrado ser particularmente eficientes para la remoción de metales en efluentes con bajas concentraciones de los mismos ( $<100 \text{ mg L}^{-1}$ ), en los cuales los métodos tradicionales se tornan ineficientes [24,25]. En este sentido, son una alternativa ideal para tratar grandes volúmenes de aguas residuales industriales complejas con baja concentración de metal, pero lo suficientemente alta para superar los límites tóxicos [3,7]. En contraste con los métodos tradicionales, las algas no producen lodos tóxicos y son

activas en un amplio rango de condiciones fisicoquímicas [26]; y, a diferencia de los hongos y las bacterias, suelen no sintetizar sustancias tóxicas [6,23,27,28]. Diferentes investigaciones han mostrado que las algas tienen una mejor capacidad de remoción para metales como Cd, Ni, Zn, Co y Pb que otros tipos de biomasa (bacterias y hongos) probados [29,30]. Esto se debe a que poseen una buena afinidad de unión por los iones metálicos, dada por su relativamente alta superficie específica y su carga neta negativa en la pared celular [16]. De igual importancia, los metales adsorbidos en la superficie celular pueden ser desorbidos mediante la aplicación de eluyentes como HCl, HNO<sub>3</sub>, NaOH, CaCl<sub>2</sub>, entre otros, posibilitando así, la reutilización de la biomasa y la recuperación de los metales con alto valor comercial [31,6]. Por último, las algas muestran una ventaja económica adicional ya que la biomasa, luego de un proceso de desorción, puede utilizarse para otras aplicaciones innovadoras como, por ejemplo, la producción de biocombustibles [14,21,22].

## I.2. Algas unicelulares: Características generales y remoción de metales

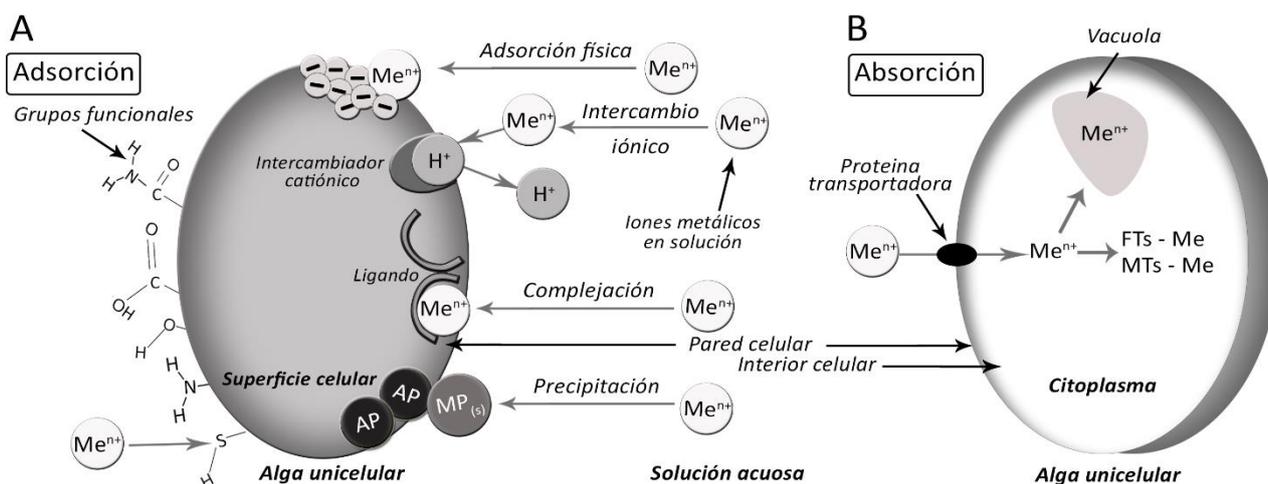
Las algas unicelulares comprenden un amplio y diverso grupo de microorganismos fotosintéticos que se encuentran mayormente en ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como salada [32]. Son un grupo polifilético, lo que hace que exista una gran variedad de algas con características diversas [33]. Desde el punto de vista biotecnológico, esto cobra gran importancia porque las algas poseen capacidades muy variadas para crecer en diferentes condiciones de cultivo, siendo generalmente organismos resistentes y de fácil adaptación a condiciones ambientales adversas. Esto permite su aplicación en distintos procesos de biorremediación [26,34].

El crecimiento de las algas se ve afectado por múltiples factores. El medio de cultivo, la temperatura y el pH del medio, la intensidad y el tipo de luz a la que están expuestas, la velocidad y el modo de agitación, la disponibilidad y concentración de nutrientes [35], la densidad celular del cultivo y la concentración de exudados tóxicos son algunos de los factores más importantes a tener en cuenta [11]. Todos estos parámetros impactan sobre la tasa de crecimiento del alga que determina directamente la concentración de biomasa, lo cual influye, a su vez, en la capacidad de remoción. Acoplado a esto, diversos estudios han mostrado que el proceso de remoción muestra grandes variaciones en función de la fase de crecimiento de las algas [15], revelando ser más efectivo durante la fase de crecimiento exponencial [36].

Los metales presentes en aguas residuales a menudo se hallan bajo una variedad de formas químicas, como iones libres o acomplejados con ligandos orgánicos e inorgánicos y adsorbidos en fases particuladas. Sin embargo, los iones metálicos libres son la forma biodisponible y también suele ser la más tóxica para los seres vivos en general [35]. La concentración de iones libres está determinada principalmente por la presencia de ligandos y el pH del medio, el cual impacta en la especiación de los metales en solución [37]. Una reducción en la biodisponibilidad del metal afecta negativamente el proceso de remoción del mismo por parte de las algas. Adicionalmente, cualquier proceso que acelere la transformación a formas unidas de los iones metálicos conduce a una reducción de su biodisponibilidad, tal y como sucede cuando se unen a la pared celular del alga y/o son captados hacia el interior celular, lo que en consecuencia disminuye los efectos y, eventualmente, la toxicidad para los seres vivos [11].

### I.2.1.Mecanismos de remoción y factores que influyen en la remoción

Las algas presentan diversas adaptaciones y mecanismos de tolerancia a la toxicidad de los metales del medio. La captación de metales por parte de las algas se da por biosorción, que es un proceso complejo que combina tanto mecanismos activos como pasivos (Figura 1). Generalmente se desarrolla como una vía de dos etapas: la primera etapa consiste en una adsorción inicial rápida que ocurre en la superficie celular tanto de células vivas como no vivas (Figura 1.A). Seguido de una segunda etapa que comprende la captación intracelular, es decir, la absorción de los metales (Figura 1.B), también llamado bioacumulación [38]. Este es un proceso mucho más lento, que implica el transporte mediado por proteínas a través de la pared y membrana celular hacia el citoplasma, con posterior unión a compuestos intracelulares como fitoquelatinas y metalotioneínas y/o eventual acumulación en vacuolas [15]. Esta etapa ocurre solo en células vivas. [11,14]



**Figura 1:** Procesos de biosorción de metales en solución en algas unicelulares. **A.** Mecanismos involucrados en la adsorción de iones metálicos: adsorción física, intercambio iónico, complejación y precipitación. **B.** Mecanismos de absorción de cationes metálicos ( $\text{Me}^{n+}$ ) al interior celular por medio de proteínas transportadoras con posterior unión a fitoquelatinas (FTs), metalotioneínas (MTs) y/o acumulación en vacuolas. Mecanismos de adsorción extracelular por unión a grupos funcionales de la pared celular. Referencias: Agente Precipitante (AP), Metal precipitado ( $\text{MP}_{(s)}$ ), Protones ( $\text{H}^+$ ) (Los protones fueron utilizados como ejemplo de ion intercambiable). Las flechas grises indican procesos. (Dibujo adaptado y modificado a partir de [14]).

La capacidad que presentan las algas para adsorber metales se atribuye a la presencia de diferentes tipos de grupos funcionales en la superficie celular. La adsorción es un mecanismo de defensa importante que permite que las algas toleren altos niveles de metales tóxicos en el medio circundante. La pared celular es la primera barrera para la captación de iones metálicos y tiene por objetivo evitar el ingreso de los mismos al interior celular. La pared consiste principalmente en polisacáridos, proteínas y lípidos que contienen grupos funcionales tales como carboxilo, hidroxilo, fosfato, amino y sulfhidrilo. Estos confieren una carga negativa neta en soluciones a pHs superiores a 3 - 4, aportando una alta afinidad de unión por los cationes metálicos. Mientras que a pHs bajos ( $\leq 2$ ) los grupos funcionales se encuentran protonados y la carga superficial celular neta es positiva [9,17,39]. La adsorción involucra varios procesos que participan en la unión del metal a la superficie celular entre los que se encuentran la adsorción física, el intercambio iónico, la complejación, la precipitación y la quelación (Figura 1.A). Estos procesos tienen lugar a microescala. La complejidad en la composición de la superficie celular de las algas hace posible que varios mecanismos operen simultáneamente y en diferente medida dependiendo de diversos factores [11,14,40]. Aunque en la gran mayoría de los estudios la adsorción se evalúa como un mecanismo general que omite estos procesos individuales [41,42], es sabido que el intercambio iónico es el mecanismo de adsorción de metales dominante por la biomasa de algas [15,43].

Las algas pueden presentar otras estrategias para reducir el efecto tóxico de los metales. Tales como el cambio de estado de oxidación del metal, convirtiéndolo en una forma menos tóxica, o la precipitación de complejantes metálicos insolubles por la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). También se han visto estrategias como la aglutinación con compuestos orgánicos secretados hacia el medio extracelular para reducir la biodisponibilidad y bioacumulación de los iones metálicos [44], bombas de eflujo impulsadas por energía que mantienen bajos los niveles en el interior celular, metilación enzimática, entre otros mecanismos [11].

Es importante destacar que estos mecanismos varían de acuerdo con la especie algal y el metal trabajado, y las condiciones predominantes del medio (pH, temperatura, etc.) [45]. Un ion metálico puede exhibir una interacción selectiva con una cepa específica [15]. Esto se debe a que la composición y el área de superficie de la pared celular varía entre algas, y por consiguiente, la distribución, la abundancia relativa de los grupos funcionales y la densidad de carga superficial difieren, lo que establece su capacidad de adsorción [46]. La capacidad de remoción también se ve afectada por otros factores como las especies químicas de los metales presentes y las concentraciones de los mismos [47], la existencia de otros iones en la solución que pueden competir por los sitios de unión con los iones de interés, la fuerza iónica, el tiempo de contacto; y factores intrínsecos de la biomasa, como el pretratamiento de las células, el estado de la biomasa (viva o muerta) y la concentración de biomasa algal utilizada [17,37,46]. Además, es primordial tener en cuenta que la presencia de materia orgánica, ácidos húmicos, ácido fúlvico y tetracetato de etilendiamina (EDTA) en la solución pueden complejarse con los iones metálicos dejándolos no biodisponible [26].

La concentración de biomasa algal influye fuertemente en la capacidad de remoción. La remoción suele aumentar con el incremento de biomasa, lo que puede atribuirse a una mayor superficie de contacto, con un mayor número de sitios de unión de metales disponibles [12]. No obstante, se puede registrar una disminución en la remoción a altos niveles de biomasa. Esto se debe a su agregación, lo que reduce la superficie efectiva disponible y la accesibilidad de los grupos de unión para los iones metálicos por una disminución de la distancia promedio entre los sitios de adsorción. A su vez, al trabajar con células vivas, la generación de efectos de sombreado reducen el crecimiento algal [11]. Por lo tanto, aumentar el nivel de biomasa solo es factible hasta cierto punto con el fin de obtener una mejor remoción [26].

### I.2.2. Tiempo de contacto y modelos cinéticos

El tiempo de contacto juega un papel vital en la interacción de los iones metálicos con los sitios adsorbentes de la superficie del alga y en la captación intracelular, por lo que su estudio es muy importante [12]. La cinética de remoción refiere a la variación en el tiempo de las concentraciones de iones metálicos en la solución y en la biomasa algal, ya que tanto la adsorción como la desorción son fenómenos dependientes del tiempo [48]. A la hora de aplicar procesos biotecnológicos para remediación ambiental es imprescindible realizar la caracterización de la cinética, debido a que se deben ajustar los tiempos de contacto correctamente para obtener la máxima remoción en el menor tiempo posible. El estudio cinético permite determinar la velocidad de remoción del metal, estableciendo el tiempo necesario para que el sistema llegue a un estado estacionario entre la concentración de iones metálicos en la superficie de la biomasa y en la solución circundante [13,25]. La velocidad de remoción es un factor esencial en el diseño de reactores y en el proceso de optimización en la industria, ya que la cinética del sistema determina el tiempo de retención de la biomasa y las dimensiones del reactor [7,49].

La remoción de metales en solución por parte de la biomasa algal es un proceso complejo que implica pasos sucesivos de difusión masiva, transferencia de masa externa, difusión intrapartícula y reacciones con los sitios de unión de metales [25,50]. Tanto los procesos de difusión como los procesos químicos pueden afectar la velocidad de reacción, por lo que las etapas más lentas son aquellas que terminan determinando la velocidad del proceso global de biosorción [51]. La interpretación por medio de modelos cinéticos proporciona una idea de los mecanismos físicos y/o químicos que permiten explicar la reacción y dilucidar cuáles son las etapas que controlan la velocidad [52]. Entre los modelos más ampliamente usados para la interpretación de los datos experimentales del proceso de biosorción se pueden mencionar la ecuación de pseudo primer orden (PPO) propuesta por Lagergren [53], la ecuación de pseudo segundo orden (PSO) propuesta por Ho [54] y la ecuación de Elovich propuesta originalmente por Zeldowitsch [55]. [49,52,56,57]

### I.2.3. Antecedentes: Aplicación de algas en procesos de remoción de metales.

La capacidad de las algas para remediar una variedad de contaminantes se ha reconocido desde hace muchos años. Se han estudiado una amplia diversidad de algas que muestran eficiencias de remediación muy prometedoras, tanto en medios formulados como en aguas

residuales [14]. Muchas especies de algas han mostrado ser particularmente aptas para la remoción de metales, entre ellas se destacan: *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Desmodesmus pleiomorphus*, *Dictyosphaerium chlorelloide*, *Parachlorella kessler*, *Spirogyra* spp., *Chlorococcum* spp. [11,26,37,43,56].

La remoción de metales divalentes como  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ha revelado resultados satisfactorios utilizando las especies *C. reinhardtii*, *Chlorella miniata* y *C. vulgaris*. Los cationes trivalentes ( $Fe^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$ ) y hexavalentes ( $Cr^{6+}$ ) también se han removido utilizando *C. vulgaris*, *C. miniata* y *Spirulina platensis* [30]. Por ejemplo, algas unicelulares de la especie *C. reinhardtii* fueron utilizada para la remoción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Hg^{2+}$  de soluciones acuosas con una concentración inicial de  $100\text{ mg L}^{-1}$ , logrando remover un 72.2, 42.6 y 96.3  $\text{mg g}^{-1}$ , respectivamente [46]. Por otro lado, una cepa de la especie *D. pleiomorphus*, aislada de un sitio contaminado, mostró una remoción máxima de 83.1  $\text{mg g}^{-1}$  de  $Zn^{2+}$  y 58.6  $\text{mg g}^{-1}$  de  $Cd^{2+}$  de forma independiente a partir de una solución de medio formulado con  $300\text{ mg L}^{-1}$  de metal [58]. Mismo así, Zhou y colaboradores probaron la remediación de un efluente de la industria textil utilizando *C. reinhardtii*, *S. obliquus*, *Chlorella pyrenoidosa* y *C. vulgaris*. Estas 4 especies fueron capaces de remover  $Al^{3+}$ ,  $Ag^{1+}$ ,  $Au^{1+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  en más de un 50%, mientras que para  $As^{5+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  y  $Sn^{4+}$  la eficiencia fue menor al 50% [59]. Otro trabajo con resultados prometedores fue llevado a cabo por García-Balboa et al., este grupo identificó 3 especies de algas: *Chlamydomonas* cf. *fonticola*, *C. reinhardtii* Dangeard y *D. chlorelloides* en estanques mineros con elevados niveles de uranio y de otros metales. Dichas algas fueron capaces de adsorber y bioacumular  $U^{3+}$  y, por lo tanto, podrían emplearse para descontaminar aguas de drenajes mineros [60]. Mientras que otros autores estudiaron una cepa de *Chlorococcum aquaticum* aislada de agua contaminada con  $Pb^{2+}$ , para la remediación de este metal desde soluciones acuosas. Estos autores reportaron una capacidad de remoción de  $500\text{ mg g}^{-1}$  trabajando con una solución con  $100\text{ mg L}^{-1}$  de  $Pb^{2+}$ . Debido a estos resultados, proponen emplear a esta cepa como un remediador de bajo costo para remover una amplia gama de concentraciones de  $Pb^{2+}$  de aguas residuales [34].

Los géneros *Chlorella* spp. y *Scenedesmus* spp. se encuentran dentro de los más empleados como modelos para explorar la remoción de metales. Esto se debe a su amplia gama de tolerancia para distintos iones metálicos [26], siendo su aplicación muy útil en el tratamiento de  $Co^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Au^{1+}$  y  $Ni^{2+}$  [43,61–63]. Tanto *Scenedesmus* spp. como

*Chlorella* spp. suelen propagarse y crecer bien en sitios contaminados y en otros cuerpos de agua superficiales, por lo que presentan una ventaja adicional [64,65]. Diversos estudios se han llevado a cabo con estas algas, y demostraron la capacidad y versatilidad de ambos géneros en la remoción de metales en soluciones formuladas y en efluentes industriales varios. Por ejemplo, Hammouda et al. expusieron el crecimiento de *Chlorella* sp. en aguas residuales mixtas domésticas-industriales, donde se encontró un alto rendimiento de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  (99.5%),  $\text{Mn}^{2+}$  (73.2%),  $\text{Fe}^{2+}$  (92.2%),  $\text{Cu}^{2+}$  (54.5%),  $\text{Zn}^{2+}$  (51.4%),  $\text{Cr}^{6+}$  (56.3%),  $\text{Mo}^{6+}$  (99.7%),  $\text{Al}^{3+}$  (98.8%),  $\text{Si}^{4+}$  (48.5%),  $\text{V}^{3+}$  (100%),  $\text{Ti}^{4+}$  (100%) y  $\text{Sr}^{2+}$  (41.9%), manifestando ser una técnica poderosa para la eliminación de estos metales en aguas residuales [66]. En otro estudio, se utilizó biomasa seca de *C. vulgaris* en efluentes de la industria de galvanoplastia y galvanización con un contenido de  $147 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Cr}^{6+}$ . Los resultados revelaron una capacidad de remoción de  $63.2 \text{ mg g}^{-1}$ , y una eficiencia de remoción del 81.3%, lo que sugiere que la biomasa de esta alga podría considerarse un remediador prometedor y de bajo costo para la eliminación de  $\text{Cr}^{6+}$  en este tipo de efluentes [67]. En un trabajo realizado por Ferraro et al., probaron la remoción de  $\text{Zn}^{2+}$  por medio de una cepa de *Chlorella* sp. aislada de aguas residuales de una granja aviar, donde encontraron eficiencia de remoción de 66.4% y 44.6% en un medio formulado con 25 y  $125 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ , respectivamente [36]. Uno de los pocos trabajos realizados a escala piloto fue llevado a cabo en la India por Rao et al.; estos investigadores utilizaron una cepa de *C. vulgaris* aislada del propio efluente en el tratamiento de las aguas residuales de una fábrica de cuero, a través de un sistema de piletas de 200 litros. *C. vulgaris* mostró una mayor eficiencia en la remoción de metales en la planta piloto que a escala de laboratorio, obteniéndose valores de vuelco para la mayoría de los contaminantes [68]. Por su parte, *Scenedesmus quadricauda* fue probada para la remoción de una variedad de iones metálicos en soluciones formuladas con  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de metal, mostrando capacidades de remoción de 52.3, 73.4, 28.4, 24.4, 64.2,  $60.0 \text{ mg g}^{-1}$  para  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , respectivamente [69]. Otro estudio evaluó el saneamiento de aguas residuales de curtiduría utilizando *Scenedesmus* sp. aislada de un hábitat local. Los resultados a escala de laboratorio revelaron que la biomasa de algas redujo la carga de metales en un 81.2-96%  $\text{Cr}^{3+}$ , 73.2-98%  $\text{Cu}^{2+}$ , 75-98%  $\text{Pb}^{2+}$  y 65-98%  $\text{Zn}^{2+}$  durante el período de crecimiento. Estos efluentes soportaron una densa población algal, convirtiéndolo en un medio de crecimiento potencial para la producción de biomasa para su remediación [70].

Las cepas algales utilizadas con fines de remediación pueden ser nativas o aisladas de otros lugares y transferidas al área contaminada que se desea sanear [26]. Las cepas aisladas de

poblaciones naturales tienen más probabilidades de establecerse y prosperar, ya que se encuentran más adaptadas a las condiciones ambientales predominantes, como es el caso de las especies de algas aisladas de sitios contaminados con metales [34]. Adicionalmente, se ha visto que cepas aisladas de sitios contaminados han demostrado una mayor capacidad para remover metales que otras cepas pertenecientes a la misma especie aisladas de lugares sin contaminación o correspondiente de una colección ya establecida. Esto puede atribuirse a que han desarrollado una ventaja adaptativa debido a la presión medioambiental [9,11,71]. En muchos casos, las cepas aisladas de sitios contaminados no son bien conocidas, por lo que su estudio puede ser importante para el progreso científico y tecnológico [72].

### I.3. Contaminación por metales: Situación nacional y regional

En Argentina, las principales fuentes de contaminación de los cursos de aguas naturales están constituidas por los basurales a cielo abierto y por los vertidos de efluentes industriales y cloacales sin o con escaso tratamiento. Un ejemplo de ello es la cuenca del Río Reconquista que en la actualidad ha alcanzado altísimos niveles de contaminación (Figura 2.B y C). Por su ubicación geográfica, la cuenca recibe varios arroyos tributarios previamente contaminados y se halla sujeta a la contaminación por la actividad antropogénica del Gran Buenos Aires. La contaminación es de origen mixto, abarcando desde residuos de sustancias de uso agropecuario, efluentes y residuos domiciliarios y efluentes industriales [73,74]. Estudios fisicoquímicos desarrollados en la cuenca indican altos niveles de fosfatos, fenoles, demanda química de oxígeno y metales como Zn, Cr, Ni y Pb [75,76]. Los metales suelen quedar retenidos y ser acumulados en los sedimentos del río, convirtiéndolo en un importante sumidero y reservorio para los mismos [77]. A su vez, estos metales pueden ser liberados nuevamente al curso de agua cuando las condiciones físico-químicas del medio se ven modificadas [78,79].

Por otro lado, en la región patagónica, más específicamente en provincia de Río Negro, se encuentra el humedal natural del Complejo Tecnológico Pilcaniyeu (CTP) (Figura 2.D y E). El humedal exhibe anormalidades en la presencia y/o distribución de Ni y U, producto de la actividad industrial desarrollada años atrás en la planta de enriquecimiento de uranio dependiente de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), por lo que requiere de saneamiento. Cabe mencionar que, de acuerdo con lo requerido por la Secretaría de Ambiente de la provincia de Río Negro, la CNEA está llevando adelante un proyecto de remediación y restitución de dicho humedal siendo el laboratorio de bioenergía y procesos de

biorremediación del Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable (IEDS) el encargado de la etapa de remoción de metales desde lixiviados.



**Figura 2:** A. Ubicación de los sitios de aislamiento de las cepas de algas unicelulares utilizadas en el presente estudio. B. Imagen de la cuenca del Río Reconquista, provincia de Buenos Aires. C. Imagen satelital del Río Reconquista. (Referencias: trayecto marcado con trazo color amarillo. Sitio de muestreo indicado con símbolo de ubicación rojo situado en canal José León Suárez, zona de la comuna General San Martín.) D. Imagen satelital del Complejo Tecnológico Pilcaniyeu (CTP). (Referencias: Humedal del CTP marcado en amarillo; Planta de tratamientos de líquidos cloacales (PTLC) marcado con punto rojo.) E. Imagen del predio del CTP. Imagen B tomada de [80]; Imagen E tomada [81]; Imágenes satelitales adaptadas de [82]

En las aguas y sedimentos de estos sitios existen una gran variedad de microorganismos, entre los que se encuentran distintas especies de algas microscópicas que soportan un alto grado de contaminación. Por lo que aislar, identificar y caracterizar cepas con potencial para remediación es de especial interés para desarrollar un método alternativo para el saneamiento de aguas y sedimentos.

El presente trabajo se llevó a cabo utilizando biomasa de algas unicelulares, aisladas de sedimentos de los sitios antes mencionados, para evaluar la capacidad de remoción de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) [83]. Las algas aisladas fueron identificadas como *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp., pertenecientes a la división Chlorophyta, llamadas coloquialmente ‘algas verdes’. Las clorofíceas son una división extremadamente variada, con diferenciaciones somáticas importantes, que van desde unicelulares hasta complejos talos multicelulares [84]. Ambos

géneros aislados se caracterizan por ser algas microscópicas unicelulares, prácticamente ubicuas. El género *Chlorella* sp. tiene un hábito unicelular cocoide con forma esférica [30,85]. Mientras que *Scenedesmus* sp. puede existir como unicelular, o disponerse en agregados celulares llamados cenobios, dependiendo de las condiciones ambientales. Los cenobios poseen un número de células definido dispuestas de forma específica, encontrándose en múltiplos de dos, siendo lo más común encontrar de cuatro u ocho células [86]. Puede haber presencia de prolongaciones de la pared celular, llamadas espinas o espículas, que se hallan en las células de los polos del cenobio [87].

#### I.4. Níquel: Características, contaminación, normativas

El níquel (Ni) es un metal de transición que puede existir en diversos estados de oxidación (+1, +2, +3, +4), aunque en medios acuosos su forma de catión divalente ( $\text{Ni}^{2+}$ ) es la predominante y generalmente se considera la más tóxica. Mismo así, pueden estar presentes otras formas del Ni según el pH, temperatura y la presencia de agentes complejantes que influyen en el estado de oxidación, la toxicidad y la biodisponibilidad en los diversos ecosistemas. Los medios acuáticos no contaminados suelen contener bajas concentraciones de Ni, producto de la degradación de rocas y suelos, y de la deposición atmosférica. Aunque existe una amplia variación en la cantidad de Ni total presente en el ambiente dependiendo de la zona que se evalúe [88,89].

El Ni es uno de los metales más ampliamente utilizados en la industria. Se encuentra con frecuencia en los efluentes de actividades mineras, en la metalurgia del Ni, la galvanoplastia y en la producción de acero inoxidable y otras aleaciones resistentes a la corrosión. Otros usos comunes son como catalizador, en baterías de Ni-Cd, monedas, productos de soldadura, en la formulación de ciertas pinturas y pigmentos, productos electrónicos, entre otros. Todos estos procesos producen efluentes con cantidades elevadas de  $\text{Ni}^{2+}$  [12,40,88].

El contacto a concentraciones de Ni que excedan su nivel crítico puede provocar enfermedades que van desde problemas graves de pulmón y riñón, dermatitis cutánea, trastornos gastrointestinales, problemas neurológicos, y, a su vez, el Ni es reconocido como cancerígeno humano [90–93]. En este sentido, se debe tener especial consideración en el cumplimiento de las regulaciones de las normativas de descarga en efluentes y de la concentración presente en el ambiente circundante.

Algunos de los valores guía en la regulación de la exposición al Ni se enumeran a continuación: El valor de ingesta diaria tolerable (IDT) de Ni en humanos es de  $12 \mu\text{g kg}^{-1}$  de peso corporal en pacientes en ayunas [94] y la concentración máxima permitida de Ni en agua potable está definida en  $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ . Por su parte, los niveles guía de calidad de agua para protección de vida acuática en agua salada, dulce y salobre superficial fueron establecidos en 7, 25 y  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  de Ni total, respectivamente; y los niveles guía de calidad de suelos para suelos residenciales, agrícolas e industriales en 100, 150 y  $500 \mu\text{g g}^{-1}$  peso seco, respectivamente [95,96]. En cuanto a las normas de descarga de efluentes industriales que rigen en Argentina, el límite máximo permitido para la descarga de Ni en la tierra y cursos de aguas superficiales y subterráneas es de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  [97], por su parte, los efluentes de minería no pueden superar los  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de Ni [95,96,98].

## I.5.Objetivos

### I.5.1.Objetivo General

El objetivo general de este trabajo es caracterizar la capacidad de remoción de metal de cepas de algas unicelulares aisladas de ambientes contaminados con el fin de desarrollar un método alternativo de remoción de metales de efluentes y cursos de agua contaminados.

### I.5.2.Objetivos Específicos

1. Evaluar la eficiencia y la capacidad de remoción de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ) de cepas de algas unicelulares (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp.) aisladas de sitios contaminados.
2. Caracterizar el crecimiento de las cepas que presenten las mejores eficiencias de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$ .
3. Caracterizar el efecto de la cantidad de biomasa de algas sobre la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$ .
4. Realizar cinéticas de biosorción de  $\text{Ni}^{2+}$ .

## II. Materiales y Métodos

El desarrollo de este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Bioenergía y Procesos de Biorremediación del Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable (IEDS) de la Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), ubicado en el Centro Atómico Bariloche (CAB) y bajo el marco del proyecto de remediación del humedal natural del predio del Complejo Tecnológico Pilcaniyeu (CTP), el cual pertenece a una instalación de CNEA.

### II.1. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado, tanto para el crecimiento de las cepas como para el desarrollo de los ensayos de remoción, fue Bold's Basal Medium reducido (BBM-R) (Tabla 1) [33,99,100]. El medio se modificó debido a que la presencia de EDTA interfiere con el proceso de remoción ya que puede actuar como complejante con los iones metálicos, disminuyendo así su biodisponibilidad en la solución [35,42,101,102].

Para los cultivos en medio semi-sólido se adicionó 1% de agar bacteriológico.

**Tabla 1:** Contenido de nutrientes del medio de cultivo Bold's Basal Medium (BBM) [99,100] reducido en Zn y sin EDTA (BBM-R).

Componentes	Solución Stock (g L <sup>-1</sup> de H <sub>2</sub> O destilada)	Cantidad (mL L <sup>-1</sup> )	Concentración en medio final (mM)
NaNO <sub>3</sub>	25.00	5	2.94
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.50	5	0.17
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	7.50	5	0.30
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.50	5	0.43
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17.50	5	1.29
NaCl	2.50	5	0.43
Solución Acida de Hierro	4.98	1	0.018
FeSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>			
Solución de Boro	11.42	1	0.185
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>			
Solución de Metales Traza:		1	Concentración (μM)
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0.023		0.079
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	1.44		7.28
MoO <sub>3</sub>	0.71		4.93
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	1.57		6.29
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.49		1.68

## II.2. Mantenimiento y crecimiento de los cultivos algales

Las cepas fueron cultivadas en un sistema batch (por lote) en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de medio de cultivo líquido y estéril (BBM-R). Los cultivos se mantuvieron en incubador bajo condiciones controladas de luz y temperatura. Se expusieron a un fotoperiodo de 12:12 horas de intervalo luz-oscuridad a  $82 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$  con lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Lámpara Philips 30 W). La temperatura de cultivo fue de  $21.0 \pm 1^\circ\text{C}$ , con agitación permanente a 110 rpm. Los recipientes se rotularon con el nombre de la cepa (sitio de origen + número de cepa), la fecha de inoculación y el tipo de medio de cultivo.

La transferencia de los cultivos a medio fresco se realizó de forma rutinaria cada 7-14 días, dependiendo de la tasa de crecimiento de cada cepa, con el fin de mantener los cultivos en un estadio de crecimiento exponencial. Las inoculaciones se hicieron en atmósfera estéril bajo campana de flujo laminar, previamente esterilizado con luz UV de 28 W por 20 minutos. A su vez, el área donde se efectuó la transferencia se limpió previamente con etanol 70%.

Para controlar que los cultivos estuvieran libres de contaminación con otros microorganismos se realizó la técnica de tinción con azul de metileno [103] cada 15-20 días. Para esto, se colocaron 15  $\mu\text{L}$  del cultivo en un portaobjetos, esparciéndolo de forma tal para que quede una película delgada y se dejó secar bajo flujo laminar. Luego, se procedió a fijar por llama el material con la película hacia arriba, y se agregó una gota de azul de metileno al 0.1% para que cubriera todo el material fijado, dejándolo actuar por 2 minutos. Se lavó el portaobjeto con abundante agua destilada y, por último, se observó al microscopio (Leica DM1000 LED) en objetivo de inmersión 100x correspondiente a un aumento de 1000 veces, para evaluar la presencia de bacterias.

Para asegurar que el material utilizado, tanto para el crecimiento de las cepas como para el desarrollo de los experimentos, estuviese libre de metales traza, fue lavado con  $\text{HNO}_3$  al 10% dejándolo actuar por 20 minutos, luego se enjuagó múltiples veces con agua destilada y, finalmente, se llevó a autoclave para esterilizarlo previo a su uso.

## II.3. Caracterización del crecimiento

Se realizó la caracterización del crecimiento de las cepas seleccionadas mediante el recuento celular. Para caracterizar el crecimiento de cada cepa se usaron cultivos unialgales y axénicos. Las algas se cultivaron en un sistema cerrado en matraces Erlenmeyer de 500 ml

con 170 ml de medio de cultivo BBM-R. Los cultivos se iniciaron con un inóculo de  $1 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup> para cada una de las cepas. Los matraces se colocaron en agitador magnético a velocidad media en un incubador provisto por lámparas fluorescentes de luz blanca fría (Lámpara philips 30 W) a  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , expuestos a un fotoperiodo de 12:12 horas de intervalo luz-oscuridad y a temperatura ambiente ( $25.5 \pm 2^\circ\text{C}$ ). El aumento de la densidad celular se midió regularmente por medio de recuento celular hasta llegar al estadio estacionario de crecimiento. Para esto se utilizó hematocitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Leica DM10000 LED). El ensayo se realizó por triplicado para cada cepa algal.

Se calcularon parámetros productivos tales como la tasa de crecimiento específica en la fase exponencial ( $\mu$ ) (Ec. (1)) y el tiempo de duplicación ( $T_2$ ) (Ec. (2)) según Vega et al. [72] (Sección II.3.1). Mismo así, se estableció la densidad celular máxima alcanzada para cada cultivo y se evaluó la duración de las diferentes fases de crecimiento.

Adicionalmente, se determinó para el estadio de crecimiento exponencial de la curva el valor de peso seco, de modo tal de poder correlacionar las variables de densidad celular y peso seco. Ver detalles de la determinación en la sección II.3.2..

### II.3.1. Parámetros de productividad

#### II.3.1.1. Tasa de crecimiento ( $\mu$ )

La ecuación utilizada para calcular la tasa específica de crecimiento de la población ( $\mu$ ) fue la siguiente [104]:

$$\mu = \frac{\ln(N_x/N_0)}{\Delta t} \quad (1)$$

Donde

- $\mu$  es la velocidad de crecimiento poblacional (día<sup>-1</sup>).
- $N_x$  y  $N_0$  es la densidad celular en el tiempo 'x' y en el tiempo cero, respectivamente (cél mL<sup>-1</sup>).
- $\Delta t = (t_x - t_0)$ , es el intervalo de tiempo transcurrido en días.

Debido a que las algas unicelulares se reproducen generalmente por división binaria,  $\mu$  se puede obtener directamente como el número de divisiones celulares o de duplicaciones diarias de biomasa ( $\mu_2$ ). Esto se consigue utilizando en la Ec. (1) el logaritmo en base 2, de acuerdo con la siguiente ecuación [72]:

$$\mu_2 = \frac{\left[ \frac{\ln(N_t/N_0)}{\ln(2)} \right]}{\Delta t} \quad (2)$$

### II.3.1.2. Tiempo de duplicación ( $T_2$ )

El tiempo de duplicación ( $T_2$ ) se calculó una vez obtenido el valor de  $\mu$  mediante la siguiente ecuación [72]:

$$T_2 = \frac{\ln(2)}{\mu} = \frac{1}{\mu_2} \quad (3)$$

Donde

- $T_2$  es el tiempo de duplicación expresado en días.
- $\mu$  es la tasa específica de crecimiento ( $\text{día}^{-1}$ ).
- $\mu_2$  es la tasa de duplicación diaria celular ( $\text{día}^{-1}$ ).
- $\ln(2)$  es una constante.

### II.3.2. Medición de peso seco

La determinación del peso seco se realizó a partir de un cultivo algal de volumen y densidad celular conocidos. El cultivo fue cosechado en estadio exponencial, el cual corresponde a la fase de crecimiento de interés para el estudio realizado. Se cosecharon las células por centrifugación a 3500 rpm (2291 g) por 10 minutos. Luego, se colocaron las muestras en crisoles previamente pesados con balanza analítica y se llevaron a estufa a 60°C hasta peso constante. A partir de esto, se calculó la biomasa algal ( $\text{g L}^{-1}$ ) y el peso unitario celular ( $10^{-11} \text{g cél}^{-1}$ ). La medición de peso seco se hizo por triplicado para las ocho cepas de la Tabla 5 (sección III.1).

#### II.3.2.1. Cálculo de biomasa algal ( $BST$ )

La cantidad de biomasa algal seca cosechada se calculó a partir de la siguiente ecuación [105]:

$$BST = \frac{(PSCM - PSC)}{VF} \quad (4)$$

Donde,

- *BST* corresponde a la biomasa algal seca total ( $\text{g L}^{-1}$ ).
- *PSCM* y *PSC* corresponden al peso seco del crisol con muestra seca y sin muestra, respectivamente (g).
- *VF* corresponde al volumen de muestra (L).

### II.3.2.2. Cálculo de peso unitario (*PSTU*)

El peso unitario es decir, el peso por célula, se calculó a partir de la siguiente ecuación [105]:

$$PSTU = \frac{BST}{N} \quad (5)$$

En donde:

- *PSTU* corresponde a el peso seco total unitario ( $\text{g cél}^{-1}$ ).
- *BST* es la cantidad de biomasa seca total, en este caso, en un mL ( $\text{g mL}^{-1}$ ).
- *N* es la densidad celular en el mismo volumen de cultivo ( $\text{cél mL}^{-1}$ ).

### II.3.3. Evaluación de la viabilidad celular

Se realizó una tinción con safranina para evaluar viabilidad celular [103]. Para esto se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de safranina (0.25%) en 50  $\mu\text{L}$  de cultivo celular algal, dejando actuar por 5 minutos, y se observó al microscopio (Leica DM1000 LED) en objetivo de 40x, para evaluar la presencia de células muertas teñidas de color rojizo.

### II.3.4. Tamaño celular

Se determinaron el biovolumen y la superficie celular. El biovolumen (Ec. (6)) y la superficie celular (Ec. (7)) para las cepas algales pertenecientes al género *Scenedesmus* sp. se evaluó a partir de la forma geométrica ‘elipsoide alargado o rotacional’. Mientras que las cepas pertenecientes al género *Chlorella* sp. se evaluaron como esferas (Ec. (8) y Ec. (9)) [106–108] (Figura 3).

- Elipsoide rotacional:

$$V = \frac{4}{3} * \pi * r^3 = \frac{\pi}{6} * d^3 \tag{6}$$

$$A = \frac{\pi * d}{2} \left( d + \frac{h^2}{\sqrt{h^2 - d^2}} \sin^{-1} \frac{\sqrt{h^2 - d^2}}{h} \right) \tag{7}$$

- Esfera:

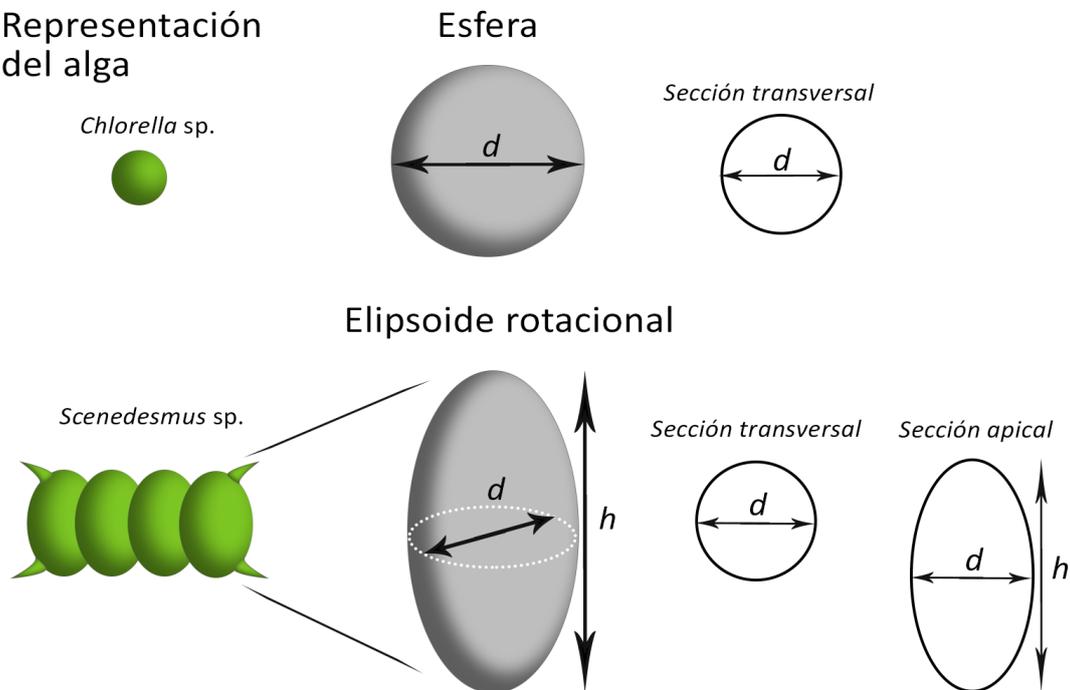
$$V = \frac{\pi}{6} * d^2 * h \tag{8}$$

$$A = 4\pi * r^2 = \pi * d^2 \tag{9}$$

Donde,

- $r$ ,  $d$  y  $h$  corresponden al radio, el diámetro y la altura celular, respectivamente ( $\mu\text{m}$ ).
- $V$  es el biovolumen ( $\mu\text{m}^3$ ).
- $A$  es la superficie celular ( $\mu\text{m}^2$ ).

Representación del alga



**Figura 3:** Formas geométricas para calcular biovolumen y superficie celular de las algas unicelulares. Las formas están representadas tridimensionalmente y en su sección transversal. Referencias: diámetro ( $d$ ), altura ( $h$ ). (Dibujo adaptado y modificado a partir de [107,108]).

Los parámetros fueron calculados a través de imágenes microscópicas de las cepas (microscopio Leica DM1000 LED, cámara Leica ICC50 HD) por medio del software ImageJ [109]. Se valoraron 60 células de cada una de las cepas. En el caso de las algas pertenecientes al género *Scenedesmus* sp. se tomaron las medidas de una sola célula por cenobio al azar. Para las cepas pertenecientes al género *Chlorella* sp. se midieron dos valores de diámetros y, a partir de su promedio, se calcularon ambos parámetros (Figura 3).

#### II.4.Preparación de solución estándar de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ )

La solución estándar de  $\text{Ni}^{2+}$  se preparó disolviendo una cantidad conocida de metal en forma de sal de nitrato ( $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) en agua destilada a una concentración final de  $5 \text{ g L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ . El stock fue almacenado en heladera a  $4^\circ\text{C}$ . Para asegurar la biodisponibilidad del metal se acidificó la solución estándar con 0.1% de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) y, de esta manera, evitar la precipitación química del Ni como hidroxilos o carbonatos [110].

Previo a cada ensayo, se prepararon las soluciones diluidas de  $\text{Ni}^{2+}$  a temperatura ambiente y en atmósfera estéril, agregando un volumen necesario de la solución estándar de  $5 \text{ g L}^{-1}$  a medio de cultivo BBM-R, para obtener la concentración de  $\text{Ni}^{2+}$  deseada. Las concentraciones de las soluciones utilizadas para los experimentos fueron de 25 y  $55 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ .

#### II.5.Análisis de la concentración de $\text{Ni}^{2+}$ en solución

Para analizar la concentración de metal en solución se usó una modificación de la técnica de detección colorimétrica de  $\text{Ni}^{2+}$  desarrollada en el paper: *Colorimetric Determination of Nickel with Dimethylglyoxime*, A. M. Mitchell y M. G. Mellon, *Purdue University, Lafayette, Ind, 1945* [111]. Debido a que en Mitchell et al. eran utilizadas grandes cantidades de reactivos, se escaló el ensayo para un volumen final de 1 mL, con el fin de producir menor cantidad de desechos. Este trabajo de modificación y reducción de escala fue realizado por la Dra. Carolina Bagnato y Estefanía Bressan, en el marco de una pasantía laboral del IEDS, y fue validado por medio de Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA), realizada en el laboratorio de análisis químico del CTP. A continuación, se detallan los reactivos y el procedimiento empleado.

### II.5.1.Reactivos

1. Agua Amoniacal: Se colocaron 900 mL de agua destilada en una botella para laboratorio y se inyectó durante un minuto y medio  $\text{NH}_3(g)$ .
2. Agua de Bromo: ( $\text{Br}_{2(aq)}$ ) Se disolvió 1.1 gr de bromuro de sodio en 10.7 mL de ácido clorhídrico 1M, mezclando bien. Luego se agregaron 7.6 mL de hipoclorito de Sodio, se agitó y, por último, se diluyó la mezcla con 32 mL de agua destilada.
3. Alcohol etílico absoluto:  $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
4. Dimetilglioxima: Se preparó una solución al 0.1%. Para esto se pesó 0.1 g del reactivo y se enrasó a 100 mL con alcohol etílico absoluto.
5. Estándar de Níquel (para construcción de la curva de calibración): Se preparó una solución a concentración  $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ , disolviendo  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en agua desionizada. Se acidificó la solución al 0.1% con  $\text{HNO}_3$ .

### II.5.2.Preparación de la muestra

En primera instancia, se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra con Ni para analizar en un tubo de microcentrífuga tipo eppendorf de 1.5 mL, luego se incorporaron 230  $\mu\text{l}$  de agua de Bromo, la cual torna de color naranja la solución. Este reactivo se agregó en exceso para asegurar la oxidación de  $\text{Ni}^{2+}$  a  $\text{Ni}^{4+}$ . El siguiente paso fue añadir 100  $\mu\text{l}$  de agua amoniacal, lo que volvió nuevamente incolora la solución. En este punto se agitó el contenido para homogeneizar. Se adicionaron 170  $\mu\text{l}$  de alcohol etílico absoluto, ya que la intensidad y la estabilidad del color de la reacción dependen de su concentración. Para finalizar, se añadieron 400  $\mu\text{l}$  de dimetilglioxima (DMG). Este compuesto forma el complejo dimetilglioximato de Ni, el cual colorea la solución de rojo-naranja. Se volvió a homogeneizar y se esperó 10 minutos antes de medir en el espectrofotómetro. Debido a que la solución es poco estable, debe ser medida en menos de 30 minutos una vez coloreada, ya que el primer desvanecimiento significativo del complejo de color ocurre después de este tiempo.

En los casos que la muestra superó una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ , se diluyó la misma con BBM-R y se volvió a realizar el preparado de reactivos para la reacción de color, para que el valor de concentración se disponga dentro del intervalo evaluado por la curva de calibración.

### II.5.3. Curva de calibración

La curva de calibración se preparó en un intervalo de concentración conocido de 0 a 10 mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>, el proceso de selección de este intervalo de concentración se explica en la sección II.5.4 y los resultados correspondientes se muestran en la sección III.3.

Las soluciones patrones de la curva de calibración se prepararon a partir de la dilución de una solución madre de 0.1 g L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> con medio de cultivo BBM-R (Tabla 2). Los puntos de la curva fueron sometidos a el mismo procedimiento que las muestras (sección II.5.2).

**Tabla 2:** Preparación de las soluciones patrones de la curva de calibración en el intervalo de 0 - 10 mg L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> para el desarrollo del método de detección colorimétrica por DMG de Ni<sup>2+</sup> en solución.

Puntos de la curva: Concentración Ni <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Volumen de stock de Ni <sup>2+</sup> 0.1 g L <sup>-1</sup> (μL)	Volumen de BBM-R (μL)
0	0	100
1.25	1.25	98.75
2.5	2.5	97.5
5	5	95
7.5	7.5	92.5
10	10	90

### II.5.4. Elección del intervalo de la curva de calibración

Para determinar el rango de concentración de la curva de calibración con el que se trabajaría se preparó una curva preliminar con concentraciones conocidas de 0 a 80 mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup> (Tabla 3) y se realizaron las mediciones de absorbancia en espectrofotómetro correspondientes a cada punto a 445 nm. A partir de estos valores se construyó la recta de calibrado para confirmar que la ecuación de Lambert-Beer se cumplía en el intervalo de concentraciones trabajado. Para esto, se graficaron en *GraphPad Prism* [112] las absorbancias de las soluciones patrones de la curva y se seleccionó el intervalo que demostró mejor ajuste mediante el coeficiente de correlación lineal más próximo a 1. La mayor linealidad se encontró entre los 0 y los 10 mg L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> (resultados correspondientes se muestran en la sección III.3).

**Tabla 3:** Preparación de las soluciones patrones de la curva de calibración preliminar en el intervalo de 0 - 80 mg L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> para el desarrollo del método de detección colorimétrica por DMG de Ni<sup>2+</sup> en solución. En negrita: intervalo de concentración seleccionado.

Puntos de la curva: Concentración Ni <sup>2+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	Volumen de stock de Ni <sup>2+</sup> 0.1 g L <sup>-1</sup> (μL)	Volumen de BBM-R (μL)
<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>1.25</b>	<b>1.25</b>	<b>98.75</b>
<b>2.5</b>	<b>2.5</b>	<b>97.5</b>
<b>5</b>	<b>5</b>	<b>95</b>
<b>7.5</b>	<b>7.5</b>	<b>92.5</b>
<b>10</b>	<b>10</b>	<b>90</b>
15	15	85
20	20	80
25	25	75
30	30	70
35	35	65
40	40	60
45	45	55
50	50	50
55	55	45
60	60	40
70	70	30
80	80	20

### II.5.5. Metodología espectrofotometría UV Vis

Una vez preparadas las muestras y las soluciones patrones para la curva de calibración, se realizaron las mediciones en espectrofotómetro UV-1800 SHIMADZU con cubetas plásticas a dos longitudes de onda ( $\lambda$ ): 445 y 543 nm. Es en estos dos puntos donde se encuentran los picos de  $\lambda$  en el que los colores observados tienen su máxima absorción. Esto representa la mejor señal para poder trabajar y analizar cuantitativamente a los estándares y muestras con Ni [111].

Al evaluar las muestras, es importante asegurarse que la solución esté debidamente homogeneizada, que no haya presencia de burbujas de aire que interfieran con las mediciones y que el tiempo transcurrido desde la adición de DMG no supere los 30 minutos.

## II.6. Evaluación de la remoción de Ni<sup>2+</sup> de cepas algales aisladas de sitios contaminados

### II.6.1. Ensayos de remoción

La capacidad de remoción de las cepas se determinó incubando 10 mL de solución de Ni<sup>2+</sup> de concentración conocida en botellas de vidrio tipo vial de 100 mL, con un inóculo algal de  $1 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup> para las cepas pertenecientes a *Scenedesmus* sp. y  $2.5 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup> para *Chlorella* sp..

El volumen del inóculo se determinó por medio de conteo celular del cultivo stock, utilizando hemocitómetro Neubauer de 0.1 mm de profundidad y un microscopio compuesto (Leica DM10000 LED). En todos los experimentos se cosecharon las células de algas en la fase exponencial del cultivo stock. La biomasa del inóculo se cosechó centrifugando el volumen correspondiente del cultivo stock a 3500 rpm (2291 g) por 10 minutos, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió el pellet en la solución de Ni<sup>2+</sup>.

La concentración deseada de solución de Ni<sup>2+</sup> se preparó diluyendo en medio de cultivo la solución stock de Ni<sup>2+</sup> (véase sección II.4). Se usaron diluciones frescas para cada estudio de remoción. Previo a la inoculación con el alga, se ajustó el pH inicial de la solución a 5.5, con NaOH 0.1 M y se realizó la medición del mismo mediante tiras indicadoras de pH (*DF universal test paper*, rango 0 - 14). Se trabajó con este valor de pH inicial ya que se ha registrado que la máxima eficiencia de remoción en la biomasa para el ion metálico Ni<sup>2+</sup> se da en ese valor [40,71,113–115]. A su vez, se evita la precipitación del Ni<sup>2+</sup> por la formación de complejos insolubles a pH más básicos, que provocan una disminución en la concentración de iones metálicos libres y, por ende, su biodisponibilidad [3,7].

Las cepas fueron incubadas por 24 horas bajo las mismas condiciones que las de crecimiento, realizando agitación manual. Una vez concretado el tiempo de incubación, se separó la biomasa de algas de la solución metálica por centrifugación a 3500 rpm (2291 g) durante 10 minutos y se analizó la fracción sobrenadante para los iones residuales de Ni<sup>2+</sup> por determinación colorimétrica mediante el método de DMG [111] (véase sección II.5). La captación de metal fue evaluada como la eficiencia de remoción de metal porcentual ( $E\%$ ) (Ec. (10)) y la capacidad de remoción ( $q$ ) (Ec. (11)).

Se realizaron tres controles experimentales compuestos por la solución de medio de cultivo y metal, sin algas, para descartar el posible efecto de adsorción en las paredes del material. Las

concentraciones iniciales de  $\text{Ni}^{2+}$  de los ensayos se confirmaron tomando una alícuota de los controles experimentales y analizándolas de igual manera que el resto de las muestras. Todos los ensayos se realizaron por triplicado para cada cepa, al igual que los controles experimentales.

## II.6.2.Cálculo de eficiencia ( $E\%$ ) y capacidad ( $q$ ) de remoción

La eficiencia de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  porcentual ( $E\%$ ) se determinó utilizando la siguiente ecuación [116]:

$$E\% = \left( \frac{C_o - C_f}{C_o} \right) * 100 \quad (10)$$

La capacidad de remoción ( $q$ ), que comprende a la cantidad de iones de  $\text{Ni}^{2+}$  removidos por unidad de biomasa algal seca, se calculó mediante la ecuación de balance de masa [117]:

$$q = \frac{(C_o - C_f) V}{m} \quad (11)$$

Donde

- $C_o$  corresponde a la concentración inicial de metal en la solución ( $\text{mg L}^{-1}$ ).
- $C_f$  corresponde a la concentración de metal del sobrenadante luego del ensayo de remoción ( $\text{mg L}^{-1}$ ).
- $V$  corresponde al volumen de ensayo (L).
- $m$  corresponde al peso seco de biomasa algal utilizada (g).
- $E\%$  es la eficiencia de remoción de metal porcentual.
- $q$  es la cantidad de metal removido por unidad de masa de biomasa ( $\text{mg de Ni}^{2+}$  removidos por g de peso seco de biomasa algal) ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

La capacidad de remoción estacionaria ( $q_e$ ) se calculó por medio de la Ec. (12) [62,118],

$$q_e = \frac{(C_i - C_e) V}{m} \quad (12)$$

Donde:

- $q_e$  es la capacidad de remoción de metal estacionaria ( $\text{mg de Ni}^{2+}$  removidos por g de peso seco de biomasa algal) ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

- $C_e$  corresponde a la concentración de  $\text{Ni}^{2+}$  en estado estacionario ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

Esta ecuación es equivalente a la Ec. (11) cuando  $C_f = C_e$ .

### II.6.3. Caracterización del efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal

Se caracterizó el efecto de la cantidad de biomasa algal sobre la eficiencia de remoción de metal de las cepas seleccionadas. Para determinar este efecto se realizaron ensayos de remoción de metal como los descritos en la sección II.6.1 variando la densidad celular del inóculo algal entre  $0.25 \times 10^7$  -  $2.5 \times 10^7$   $\text{cél mL}^{-1}$  para una concentración fija de metal de  $55 \pm 2$   $\text{mg L}^{-1}$   $\text{Ni}^{2+}$ . En la Tabla 4 se muestran las equivalencias de la densidad celular del inóculo algal con respecto al peso de la biomasa seca en  $\text{g L}^{-1}$  para las tres cepas evaluadas.

**Tabla 4:** Dosis de biomasa algal utilizadas para la caracterización del efecto sobre la remoción de metal. Tratamiento de inóculos con diferentes densidades celulares ( $\times 10^7$   $\text{cél mL}^{-1}$ ) con su correspondiente valor de peso de biomasa algal seca ( $\text{g L}^{-1}$ ) para las tres cepas evaluadas.

Tratamientos: Densidad celular ( $\times 10^7$ $\text{cél mL}^{-1}$ )	Biomasa algal ( $\text{g L}^{-1}$ )		
	RR8	P1	RR6
0.25	$0.075 \pm 0.004$	$0.118 \pm 0.004$	-
0.5	$0.150 \pm 0.009$	$0.235 \pm 0.007$	-
0.75	$0.225 \pm 0.013$	$0.353 \pm 0.011$	$0.072 \pm 0.001$
1	$0.299 \pm 0.017$	$0.471 \pm 0.015$	-
1.25	-	-	$0.121 \pm 0.001$
1.5	-	-	$0.145 \pm 0.001$
1.75	-	-	$0.169 \pm 0.002$
2	-	-	$0.193 \pm 0.002$
2.5	-	-	$0.241 \pm 0.002$

### II.6.4. Análisis de remoción de metal a diferentes tiempos de contacto

Se realizaron análisis de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  durante 6 días, a partir de la metodología descrita en la sección II.6.1, utilizando la biomasa óptima de las cepas de algas seleccionadas y a una concentración inicial de  $55 \text{ mg L}^{-1}$   $\text{Ni}^{2+}$ . La eficiencia y la capacidad de remoción de metal se evaluó en función de diferentes tiempos de contacto, tomando alícuotas de  $100 \mu\text{L}$  a intervalos de tiempo predeterminados de 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 1440, 2880, y 8460 minutos, para evaluar las concentraciones de iones metálicos residuales en solución, mientras

que los otros parámetros se mantuvieron constantes. Los tiempos de incubación en algunos casos se extendieron hasta 10 días, tomando una última alícuota antes de finalizar el ensayo.

Los datos de remoción se calcularon por medio de la ecuación de capacidad de remoción ( $q$ ) y la eficiencia de remoción ( $E\%$ ) (sección II.6.2). Las cinéticas de remoción se realizaron analizando los datos de  $q$  en función del tiempo ( $q_t$ ). Los resultados fueron interpretados a partir de modelos cinéticos de remoción.

### II.6.5. Modelos cinéticos

Se aplicaron los modelos cinéticos de pseudo-primer orden, pseudo-segundo orden y el modelo de Elovich, para analizar los datos experimentales de la cinética de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en la biomasa alga [119–122].

#### II.6.5.1. Modelo cinético de pseudo-primer orden

El modelo cinético de pseudo-primer orden (PPO), también llamado el modelo de Lagergren [53], se basa en la siguiente ecuación:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_l (q_e - q_t) \quad (13)$$

Donde:

- $q_t$  corresponden a la capacidad de remoción de metal ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en el tiempo  $t$ .
- $q_e$  capacidad de remoción de metal estacionaria ( $\text{mg g}^{-1}$ ).
- $k_l$  es la constante de velocidad de adsorción de PPO ( $\text{min}^{-1}$ ).
- $t$  indica el tiempo (min).

Luego de integrar y reordenar la Ec. (13), aplicando las condiciones límites:  $q_t = 0$  a  $t = 0$  y  $q_t = q_t$  a  $t=t$ , se obtiene:

$$q_t = q_e \cdot \ln(1 - e^{-k_l t}) \quad (14)$$

Que es representada en su forma lineal por:

$$\ln(q_e - q_t) = \ln q_e - k_l t \quad (15)$$

Los valores de  $k_1$  y  $q_e$  calculada por el modelo de PPO ( $q_{e.ml}$ ) se obtienen a partir de la pendiente y la ordenada al origen de la gráfica lineal de  $\ln(q_e - q_t)$  versus ( $t$ ), respectivamente. Por lo que es necesario conocer el valor de  $q_e$  experimental ( $q_{e.exp}$ ) para ajustar los datos experimentales a la ecuación, siendo la gráfica:  $\ln(q_{e.exp} - q_t)$  versus ( $t$ ).

### II.6.5.2. Modelo cinético de pseudo-segundo orden

El modelo de pseudo-segundo orden (PSO) para reacciones cinéticas fue desarrollado por Ho [54], y es expresado bajo la siguiente ecuación de velocidad:

$$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2 \quad (16)$$

Donde

- $q_t$  corresponden a la capacidad de remoción de metal ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en el tiempo  $t$ .
- $q_e$  capacidad de remoción de metal estacionaria ( $\text{mg g}^{-1}$ ).
- $k_2$  es la constante de velocidad de adsorción de PSO ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ).
- $t$  indica el tiempo (min).

Al integrar la Ec. (16) para las condiciones límites  $t = 0, q_t = 0$  y  $t = t, q_t = q_t$  y reorganizar las variables, se obtiene:

$$q_t = \frac{q_e^2 k_2 t}{1 + q_e k_2 t} \quad (17)$$

A partir de la cual se consigue su forma linealizada bajo la siguiente Ec. (18), que predice que la cantidad adsorbida de metal es una función lineal del tiempo [123]:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (18)$$

Donde la velocidad de adsorción inicial ' $h$ ' ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) es igual a  $q_t/t$  cuando  $t$  es 0, lo que corresponde a:

$$h = k_2 q_e^2 \quad (19)$$

Por lo tanto la Ec. (18) puede reescribirse como:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{h} + \frac{1}{q_e} t \quad (20)$$

Realizando el gráfico de  $\frac{t}{q_t}$  en función de  $(t)$  se obtienen los valores de  $q_{e.m2}$  y  $k_2$ , donde  $\frac{1}{q_e}$  es la pendiente y  $\frac{1}{K_2 q_e^2}$  es la ordenada al origen. Si la cinética de PSO es aplicable al sistema metal-biomasa, entonces la gráfica de la Ec. (18) debería dar una relación lineal [122]. A diferencia del modelo de PPO, no es necesario conocer el valor de  $q_{e.exp}$  para aplicar el modelo.

### II.6.5.3. Modelo cinético de Elovich

El modelo de Elovich [55] se expresa de la siguiente manera [124]:

$$\frac{dq_t}{dt} = \alpha e^{-\beta q_t} \quad (21)$$

Donde,

- $\alpha$  y  $\beta$  son constantes:  $\alpha$  es la velocidad de adsorción inicial del ion metálico ( $\text{mg g}^{-1} \text{min}^{-1}$ );  $\beta$  es el coeficiente de desorción ( $\text{g mg}^{-1}$ ).
- $q_t$  corresponden a la capacidad de remoción de metal ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en el tiempo  $t$ .

Integrando y aplicando las condiciones límites  $q_t = 0$  a  $t = 0$  y  $q_t = q_t$  a  $t = t$ , la Ec. (21) se transforma en:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(t + t_0) + \frac{1}{\beta} \ln(t_0) \quad (22)$$

Donde  $t_0$  es una constante de tiempo del modelo,  $t_0 = 1/\alpha\beta$ . Si  $t_0$  es despreciable con respecto a  $t$  la Ec. (22) se simplifica como:

$$q_t = \frac{1}{\beta} \ln(\alpha\beta) + \frac{1}{\beta} \ln(t) \quad (23)$$

Por lo tanto, las constantes  $\beta$  y  $\alpha$  se obtuvieron a partir de la gráfica  $q_t$  en función de  $\ln(t)$ , donde la pendiente es  $\left(\frac{1}{\beta}\right)$  y la ordenada al origen es  $\left(\frac{1}{\beta}\right) \ln(\alpha\beta)$  [62].

#### II.6.5.4. Análisis de los modelos cinéticos

Los criterios por los cuales se determinó la idoneidad de los modelos linealizados para ajustarse a los datos experimentales fueron el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) y el valor  $q_e$  calculado por el modelo ( $q_{e.m}$ ). Para esto, se determinó la significancia estadística de los coeficientes de regresión y se evaluó que el  $R^2$  se aproximara a la unidad; además, se comparó que el valor de  $q_{e.m}$  coincidiera con el valor de  $q_{e.exp}$  [12].

A su vez, se comprobó el ajuste no lineal, utilizando las ecuaciones (14), (17) y (23) para evaluar la aplicabilidad de cada modelo a los valores de  $q_t$  obtenidos experimentalmente. Se evaluó el ajuste mediante el test de Chi-cuadrado ( $X^2$ ) (Ec. (24)) y el estadístico de desviación estándar porcentual ( $S.D.\%$ ) (Ec. (25)) [125]. Los valores de  $X^2$  son útiles para poder determinar el modelo óptimo que describa mejor la cinética de remoción, cuanto mejor es el ajuste de los datos experimentales a los predichos por el modelo, menor será el valor de  $X^2$  y  $S.D.\%$  [126].

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(q_{exp} - q_m)^2}{q_m} \quad (24)$$

$$S.D.\% = 100 * \left\{ \frac{\sum N(1 - (q_m / q_{exp}))^2}{N} \right\}^{1/2} \quad (25)$$

Donde,  $q_{exp}$  es la capacidad de remoción obtenida experimentalmente,  $q_m$  es la capacidad de remoción obtenida por el modelo, y  $N$  es el número total de datos utilizados para la Ec. (25).

Adicionalmente, se realizó un análisis de la raíz cuadrada del tiempo de contacto de acuerdo con la Ecu. (26) propuesta por Weber y Morris [127], para distinguir si el proceso de remoción se desarrollaba bajo un control cinético o de difusión. El gráfico de  $q_t$  en función de  $t^{1/2}$ , genera una línea recta de pendiente  $k_d$  (parámetro de la tasa de difusión ( $\text{mg g}^{-1} (\text{min}^{-1/2})^{-1}$ ) que debe pasar por el origen (intersección con cero), lo cual indicaría una influencia del control de difusión intrapartícula en la velocidad del proceso de remoción [50,119,122].

$$q_t = k_d * t^{1/2} \quad (26)$$

## II.7.Reproducibilidad y análisis estadísticos

El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante los valores promedios de tres experimentos replicados y su respectivo desvío estándar (en los casos que se usó error estándar se aclara). Para determinar la existencia de diferencias estadísticas entre tratamientos se realizaron ANOVA de un factor y se realizaron comparaciones *a posteriori* del ANOVA usando la prueba de Tukey, utilizando un nivel de significancia  $\alpha$  de 0.05. En dependencia de que los datos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza. De no cumplirse estos supuestos, se procedió a analizar los datos mediante tests no paramétricos (Kruskal-Wallis).

En los casos que la barra de error no es visible en los gráficos, significa que este tiene un valor más pequeño o igual al símbolo (desviaciones estándar por debajo del 5%).

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete de software informático *GraphPad Prism* versión 6.01 y *SigmaPlot* versión 14.0 [112,128].

### III.Resultados

#### III.1.Prospección y aislamiento de las algas

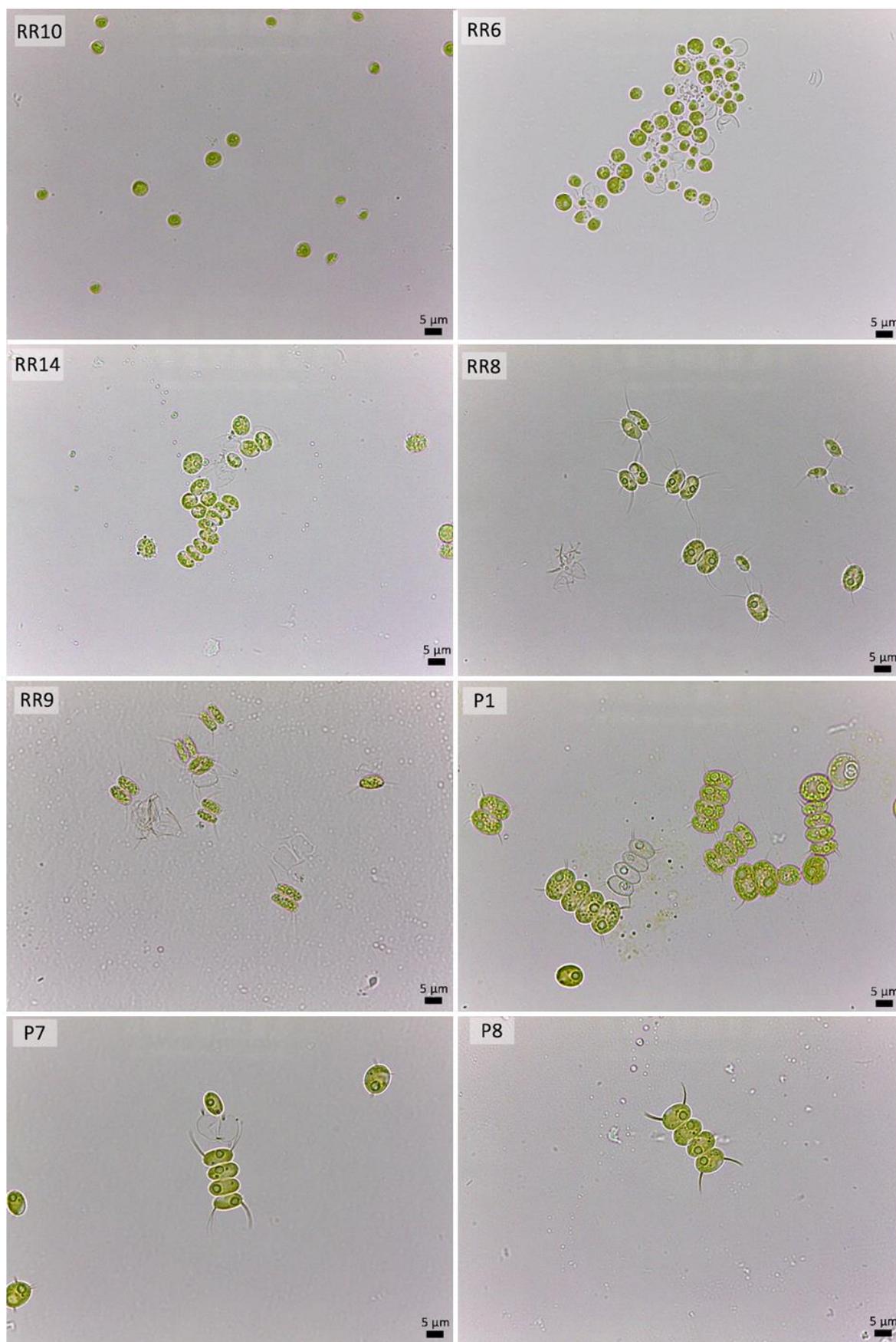
Las algas utilizadas para este trabajo fueron aisladas previamente por el grupo de trabajo de dos sitios que presentan contaminación por metales: la cuenca del Río Reconquista ubicado en Provincia de Buenos Aires y el humedal Natural del predio del CTP, ubicado en Provincia de Río Negro [83,129].

Para el aislamiento de las algas se utilizó la técnica de selección de única colonia [33], con protocolos adaptados a las muestras a tratar (sedimentos) y para promover la selección de especies de la división Chlorophyta. A partir de estos aislamientos se obtuvieron numerosas cepas que se encuentran en cultivos unialgales y axénicos. Hasta la fecha han sido identificadas a nivel de género, entre ellas se cuenta con *Scenedesmus* sp. y *Chlorella* sp. [129].

En este trabajo se utilizaron un total de ocho cepas de algas unicelulares. Los nombres de las cepas se componen de dos partes: (1) El sitio de aislamiento. Las cepas aisladas del humedal del CTP comienzan con ‘P’ y las cepas aisladas del Río Reconquista comienzan con ‘RR’. (2) y un número, que corresponde al orden de aislamiento (Tabla 5 y Figura 4).

**Tabla 5:** Referencia de las cepas de algas unicelulares utilizadas en el desarrollo del trabajo, separadas por género y sitio de aislamiento (Río Reconquista (RR), humedal del CTP (P)).

<i>Scenedesmus</i> sp.		<i>Chlorella</i> sp.
P1	RR8	RR6
P7	RR9	RR10
P8	RR14	



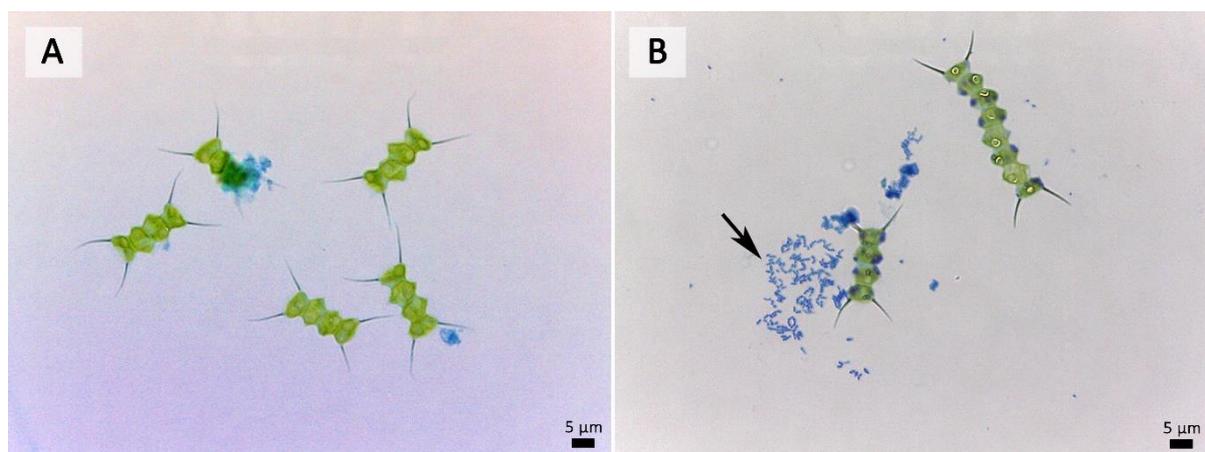
**Figura 4:** Imágenes de microscopía de campo claro (aumento 1000X) de todas las cepas evaluadas en el trabajo. (Microscopio Leica DM10000 LED, cámara Leica ICC50 HD).

### III.2. Control bacteriológico de los cultivos algales: Tinción con azul de metileno

Los cultivos algales utilizados a lo largo de los ensayos se mantuvieron de forma axénica. Para lo cual se evaluó regularmente la posible presencia de bacterias por medio de la tinción con azul de metileno (sección II.2).

En la Figura 5 se puede observar el mismo cultivo de una de las cepas algales perteneciente al género *Scenedesmus* sp. en estado axénico (A) y contaminado (B). En la imagen (B) se denota la presencia de bacterias debido a la pigmentación azul adquirida, su morfología y tamaño característicos, que contrastan con respecto a las células eucariotas del alga que son de mayor tamaño.

En caso de encontrar presencia de bacterias en los cultivos algales, fueron plaqueados en medio BBM-R Agar y una colonia algal, sin presencia de colonias bacterianas alrededor, fue repicada a medio fresco. Una vez crecido el cultivo, se corroboró nuevamente por la técnica de tinción la axenidad del mismo.

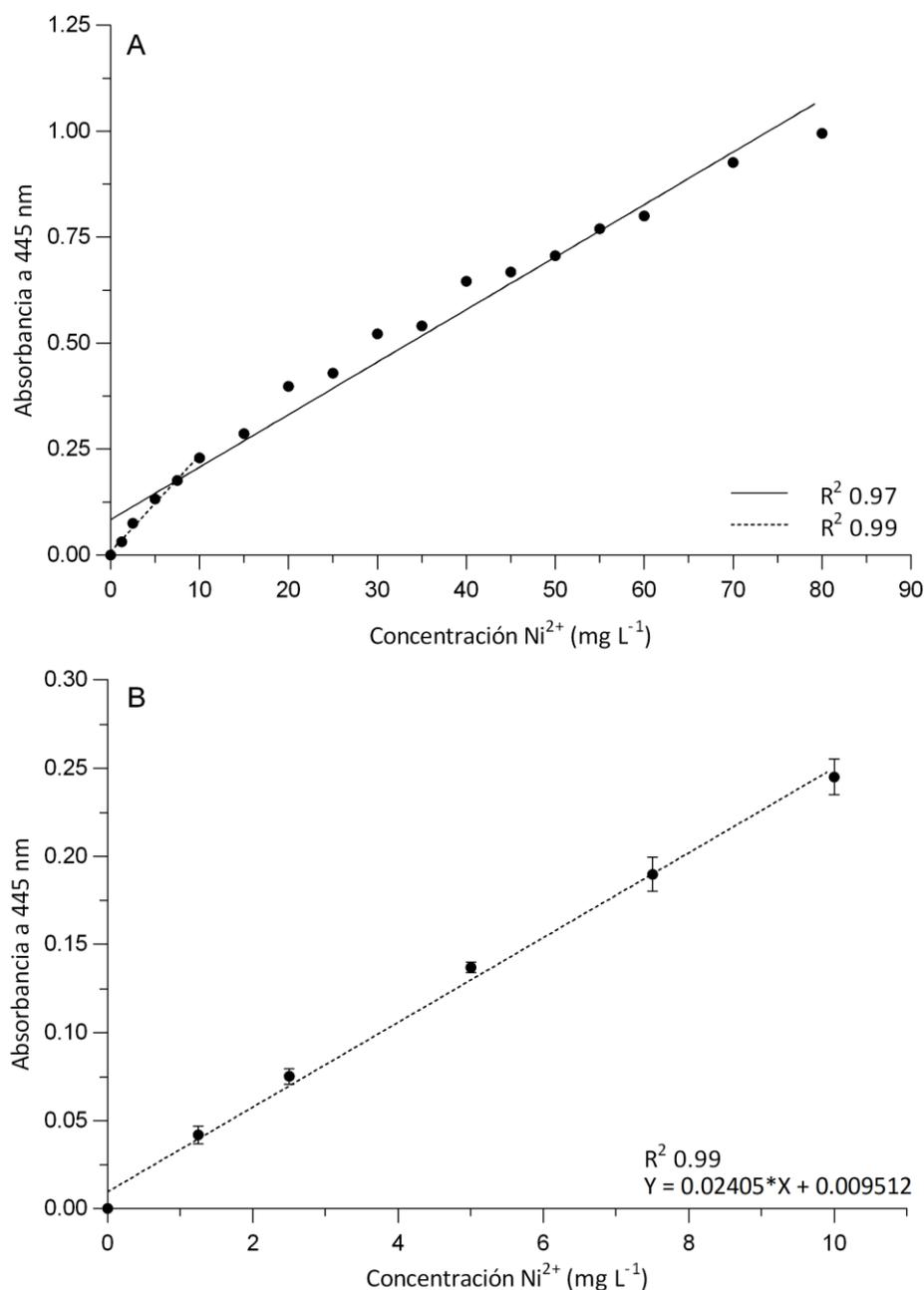


**Figura 5:** Imágenes de microscopia de campo claro (aumento 1000X), cepa P7 (*Scenedesmus* sp.) fijada y tratada con tinción de azul de metileno. **A.** Cultivo axénico. **B.** Cultivo contaminado con bacterias (localización de las bacterias indicada con flecha) (Microscopio Leica DM10000 LED, cámara Leica ICC50 HD).

### III.3. Ensayo de selección de la curva de calibración para detección colorimétrica de $\text{Ni}^{2+}$ en solución

Con el fin de determinar el rango de concentración óptimo para la curva de calibración del ensayo de determinación de  $\text{Ni}^{2+}$  por medio del método de la DMG se realizó un análisis con concentraciones entre 0 – 80 mg L<sup>-1</sup> del estándar de  $\text{Ni}^{2+}$ . En la Figura 6.A. se muestra la recta de calibrado correspondiente a los valores de absorbancia de la curva de calibración

preliminar. A partir de esta recta, se halló que el intervalo de concentraciones de 0 a 10 mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup> obtuvo el mayor coeficiente de correlación lineal ( $R^2 = 0.99$ ) (Figura 6.B). A concentraciones mayores de 10 mg L<sup>-1</sup> la recta disminuyó su coeficiente ( $R^2 = 0.97$ ), mostrando una tendencia a la saturación (Figura 6.A). Por lo que se resolvió usar la curva de calibración en el intervalo de 0 a 10 mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup> para evaluar la concentración de metal de las muestras analizadas en este trabajo.



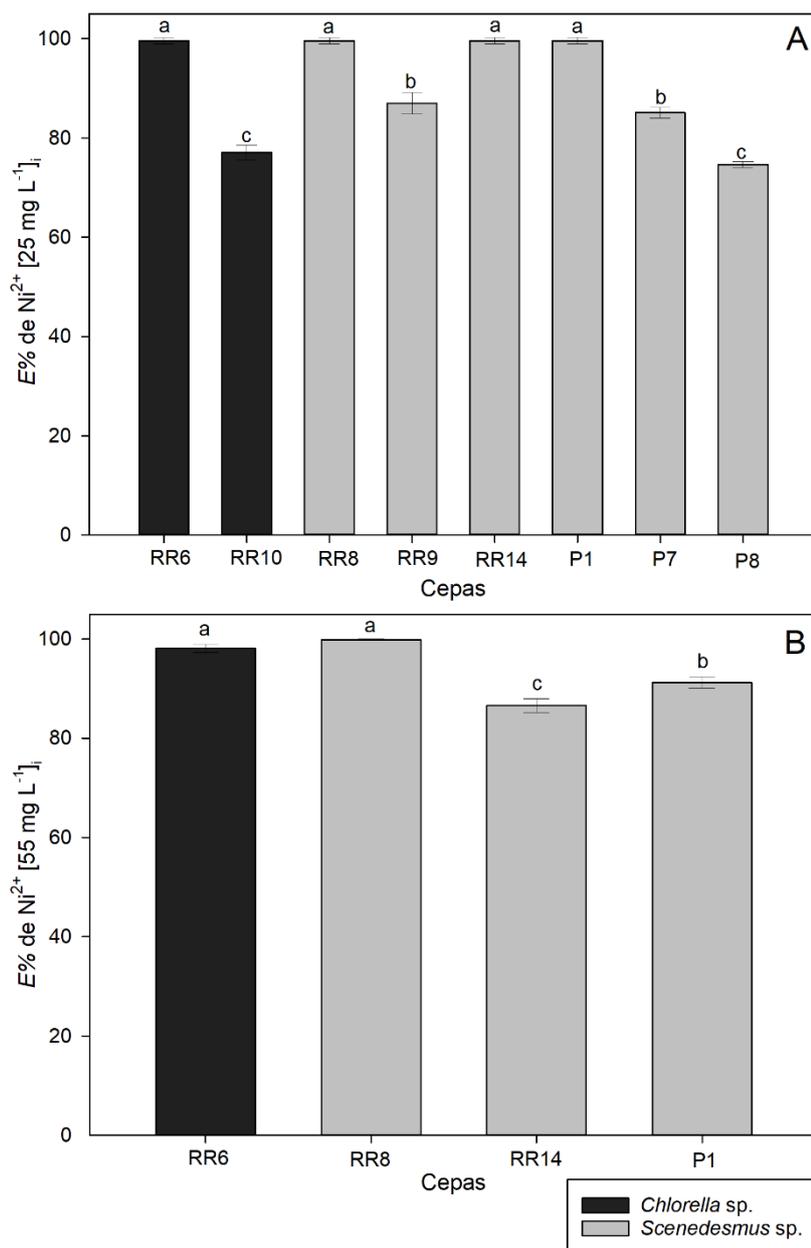
**Figura 6:** A. Recta de calibración preliminar, intervalo de concentración de 0 a 80 mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>. B. Recta de calibración seleccionada, intervalo de concentración de 0 a 10 mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>. Datos de absorbancia promedio. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Ambas curvas fueron construidas mediante los valores de absorbancia a 445 nm obtenidos a partir del ensayo espectrofotométrico por DMG de muestras de concentración conocida de Ni<sup>2+</sup>.

Para calcular las concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  en solución se utilizaron los valores de absorbancia obtenidos a 445 nm, debido a que el complejo de color dimetilglioximato de Ni alcanzó un mayor pico a esta longitud de onda ( $\lambda$ ), con respecto a los valores obtenidos a 543 nm (datos no mostrados). De igual manera, cabe destacar que los cálculos de cantidad de metal realizados con las absorbancias en ambos valores de  $\lambda$  dieron resultados en el mismo rango de concentración.

#### III.4. Evaluación de la eficiencia y capacidad de remoción de $\text{Ni}^{2+}$ para la selección de cepas algales

Se evaluó la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de las ocho cepas de algas (Tabla 5) para la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  de una solución de medio de cultivo formulado con una concentración inicial de  $25 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$  (Figura 7.A). Se obtuvieron buenas eficiencias en todos los casos, con valores entre 74.6 y 100% de remoción. En particular, se destacaron las cepas RR6, RR8, RR14 y P1, que presentaron  $E\%$  significativamente mayores que el resto, removiendo aproximadamente el 100% de metal de la solución (Figura 7.A). En consecuencia de las altas  $E\%$  presentada por estas cuatro cepas, se desarrolló un segundo ensayo incrementando la concentración inicial de metal a  $55 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ , y manteniendo el resto de las condiciones del ensayo iguales. Para, de esta manera, determinar si frente a mayores concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  existían diferencias en las  $E\%$  de las mismas.

A una mayor concentración de metal, RR6 y RR8 exhibieron las mejores  $E\%$ , alcanzando más de un 98% de remoción (Figura 7.B). Estas cepas no presentaron una disminución significativa en su  $E\%$  con respecto al ensayo a menor concentración de  $\text{Ni}^{2+}$ . Por otro lado, las  $E\%$  de las cepas RR14 y P1 disminuyeron un 13.4 y un 8.8%, respectivamente, al someterlas a mayor concentración de  $\text{Ni}^{2+}$  (Figura 7).

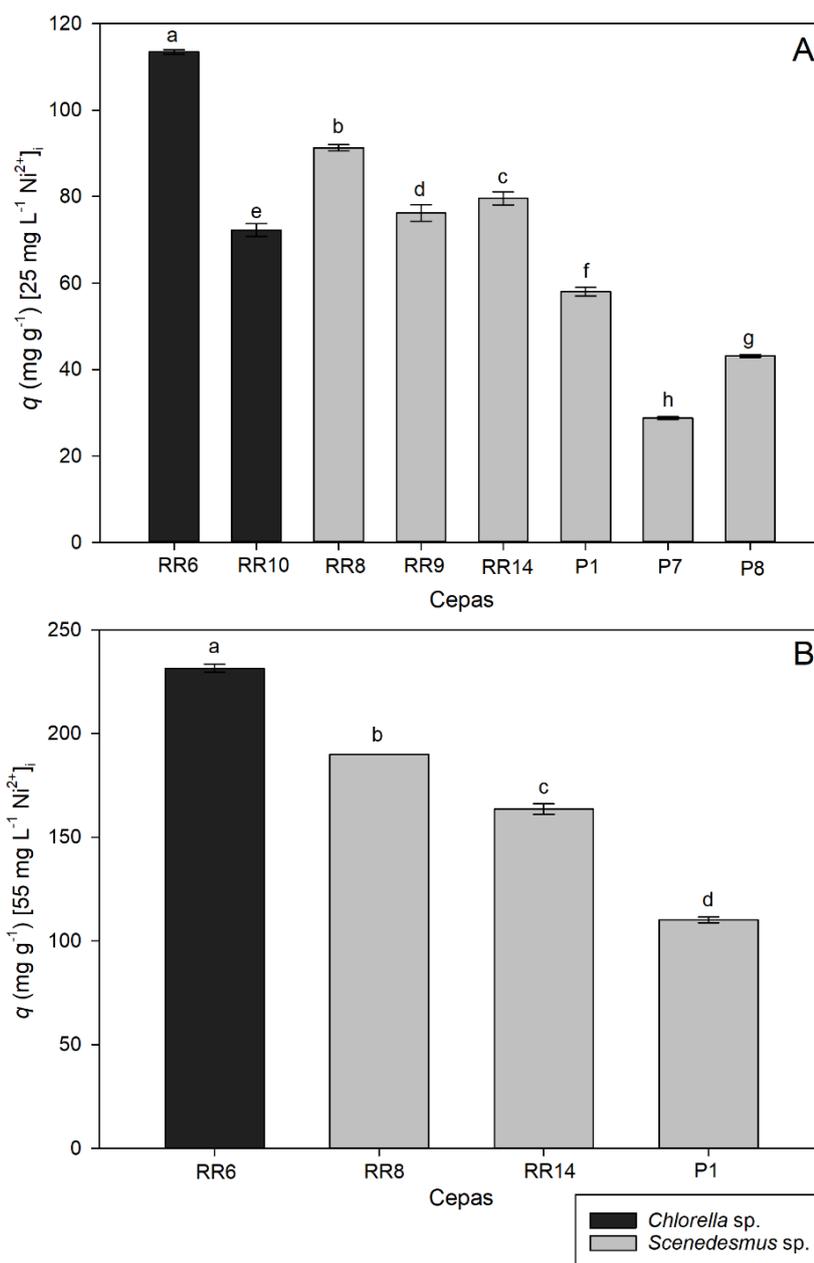


**Figura 7:** Valores promedio de la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $Ni^{2+}$  en solución de los cultivos de diferentes cepas aisladas del Río Reconquista (RR) y del CTP (P). Condiciones de ensayo: Densidad celular: *Scenedesmus*:  $1 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>, *Chlorella*  $2.5 \times 10^7$  cél mL<sup>-1</sup>, 24 hs de ensayo, concentración inicial de **A.**  $25 \pm 2.3$  mg L<sup>-1</sup>  $Ni^{2+}$  y **B.**  $55 \pm 2.9$  mg L<sup>-1</sup>  $Ni^{2+}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

Asimismo, a partir de los ensayos de remoción de metal, se calculó la capacidad de remoción ( $q$ ). Este parámetro tiene en cuenta la cantidad de biomasa empleada y permite entonces comparar resultados entre distintas cepas. El valor de  $q$  mostró mayor variabilidad entre cepas, donde RR6, RR8 y RR14 presentaron una mejor remoción de  $Ni^{2+}$  por gramo de biomasa algal, alcanzando valores de 113.4, 91.3 y 79.6 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Mientras que P1, que removió menor cantidad de metal con respecto a las algas aisladas del Río

Reconquista, fue la más prometedora de las cepas aisladas del humedal del CTP, mostrando un valor de  $q$  35% mayor que P8 y 102% mayor que P7 (Figura 8.A).

Como es posible observar en la Figura 8.B, la capacidad de remoción de RR8, RR6, RR14 y P1 aumentó al someterlas a una mayor concentración inicial de  $\text{Ni}^{2+}$ , duplicando sus valores de  $q$  con respecto al ensayo a una menor concentración inicial de metal (Figura 8.A).



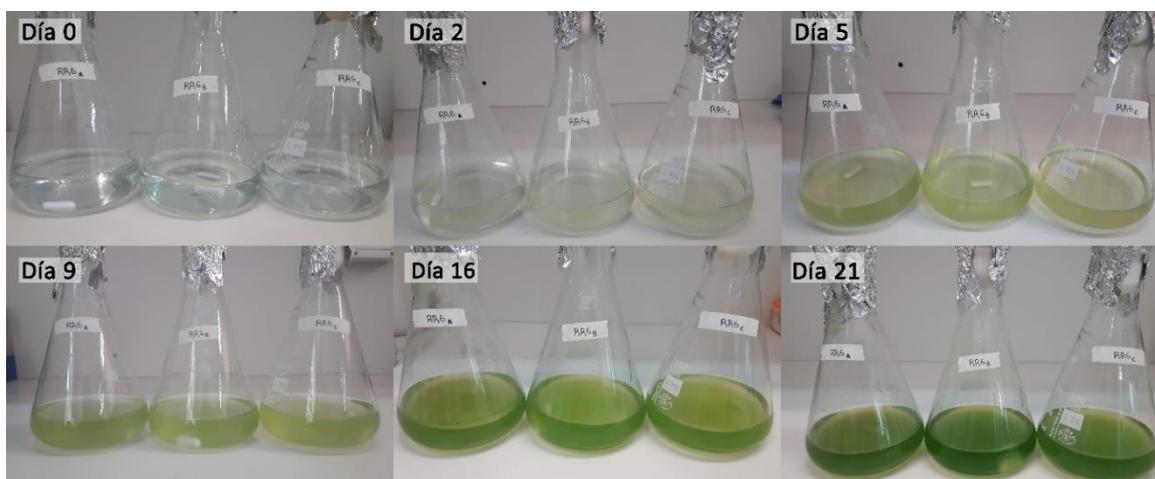
**Figura 8:** Valores promedio de la capacidad de remoción ( $q$ ) de  $\text{Ni}^{2+}$  de los cultivos de diferentes cepas aisladas del Río Reconquista (RR) y del CTP (P). Condiciones de ensayo: Densidad celular: *Scenedesmus*:  $1 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>, *Chlorella*  $2.5 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>, 24 hs de ensayo, concentración inicial de **A.**  $25 \pm 2.3$  mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup> y **B.**  $55 \pm 2.9$  mg L<sup>-1</sup> Ni<sup>2+</sup>. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

La selección de las cepas se realizó en base a los datos de  $E\%$  y  $q$  obtenidos y en los intereses particulares del grupo: seleccionar al menos una cepa de cada género evaluado y de cada sitio de aislamiento para su caracterización. Por lo que las cepas RR6, RR8 y P1 (Imágenes microscópicas Figura 13) fueron seleccionadas para proseguir con la investigación. Siendo las cepas RR6 y RR8 (*Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., respectivamente) las que presentaron mayor remoción de metal en ambas concentraciones de  $Ni^{2+}$  evaluadas. Mientras que la cepa P1 (*Scenedesmus* sp.) fue la más prometedora de las aisladas del humedal del CTP (Figura 7 y 8).

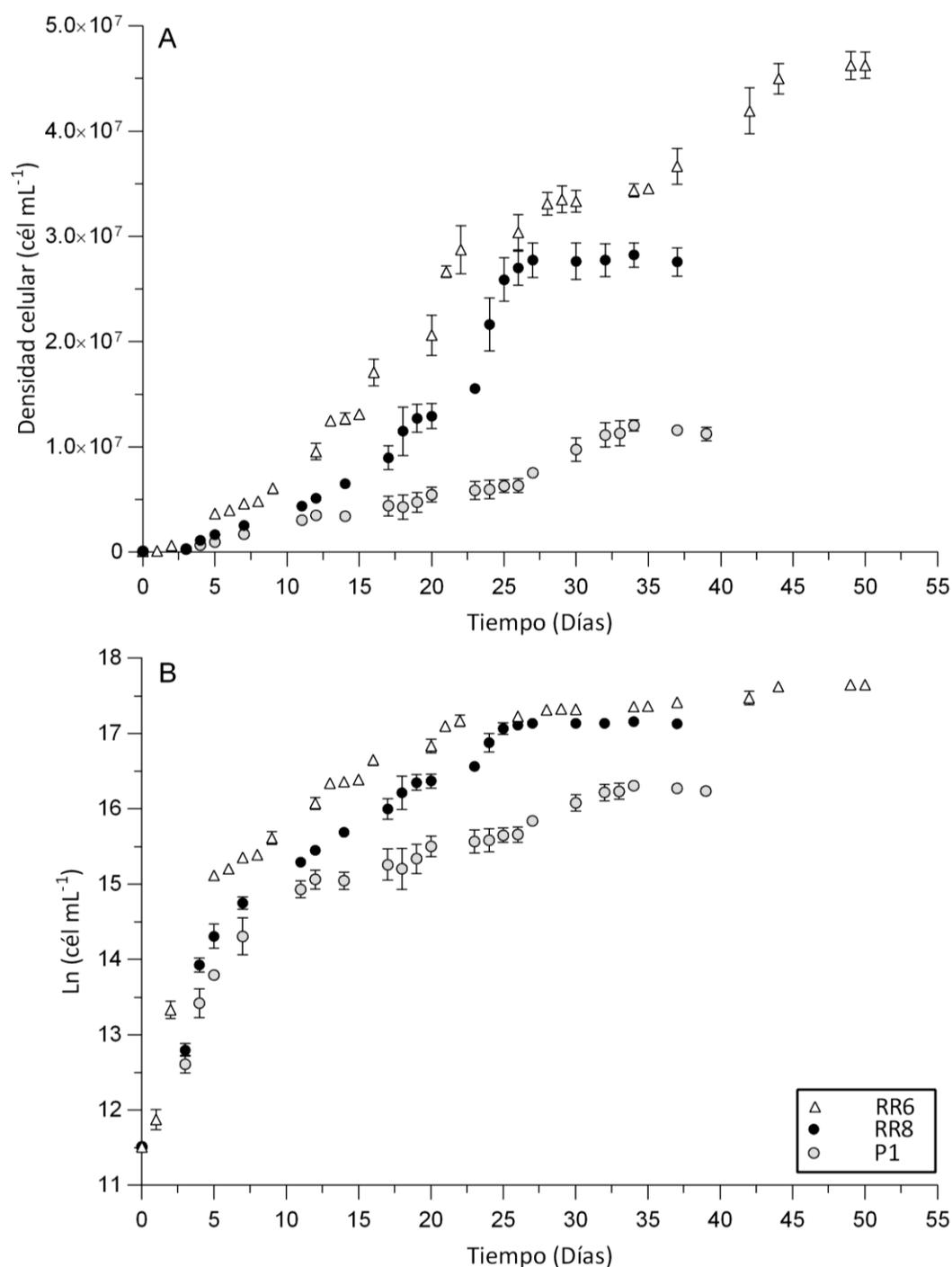
### III.5. Caracterización del crecimiento

#### III.5.1. Comportamiento de la curva de crecimiento y parámetros de productividad

Se realizaron curvas de crecimiento para las tres cepas evaluadas a partir de los datos de densidad celular en función del tiempo de cultivo. En la Figura 9 se puede observar, a modo ilustrativo, el aspecto macroscópico de los cultivos utilizados para realizar la caracterización del crecimiento de la cepa RR6 a lo largo del tiempo. En la Figura 10 se muestra la curva de crecimiento de RR6, RR8 y P1, y la conversión al logaritmo natural de la densidad celular. Aquí se puede apreciar que las tres cepas evaluadas presentaron una forma de crecimiento sigmoidea (Figura 10.A), donde se describe un ciclo de desarrollo casi completo que incluye la fase exponencial, la fase de crecimiento lineal y la fase estacionaria [131]. La adaptación del inóculo (fase lag) tuvo lugar en un lapso menor a 24 horas, por lo que no fue reflejado en los datos de densidad celular tomados.



**Figura 9:** Aspecto macroscópico de cultivos de la cepa RR6 a lo largo del tiempo.



**Figura 10:** Curva de crecimiento. **A.** Valores promedio del número de cél mL<sup>-1</sup> **B.** Ln de valor promedio del número de cél mL<sup>-1</sup> de las cepas a lo largo del tiempo del cultivo. Condiciones de cultivo: luz blanca 120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperiodo 12:12,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación magnética continua. Las barras indican  $\pm$  error estándar.

Se evaluó la duración de las fases de crecimiento a partir del gráfico de la suma progresiva de la tasa de crecimiento diario ( $\Sigma\mu_2$ ) en función del tiempo (Figura A.I. 4, Anexo I), ya que cualquier cambio de la pendiente de esta curva indica una variación de la velocidad de duplicación [72]. Para la determinación de la tasa de crecimiento  $\mu$  en la fase de crecimiento

exponencial se utilizó la densidad celular diaria registrada y posteriormente se construyeron las curvas del logaritmo natural de  $(N_x/N_0)$  en función el tiempo (véase sección II.3.1.1) para cada una de las 3 réplicas realizadas por cepa algal, ajustando una regresión lineal en la fase exponencial de cada cultivo, es decir, la sección de la curva con el mayor coeficiente de correlación ( $R^2 \approx 1$ ), donde la pendiente de la recta corresponde al valor de  $\mu$  máximo. De esta manera, se informó el valor de  $\mu$  promedio (Figura A.I.2, 2 y 3, Anexo I).

La fase de crecimiento exponencial se extendió hasta el día 5 - 6 para los tres cultivos (Figura 10.B, Figura A.I. 4, Anexo 1). La tasa de crecimiento poblacional ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación ( $T_2$ ) obtenidos en este periodo exponencial presentaron diferencias significativas entre las tres cepas, donde la cepa de *Chlorella* sp., RR6, presentó el mayor  $\mu$ . Las dos cepas de *Scenedesmus* sp. mostraron un menor valor de  $\mu$ , siendo el de RR8 significativamente mayor que el de P1 (Tabla 6).

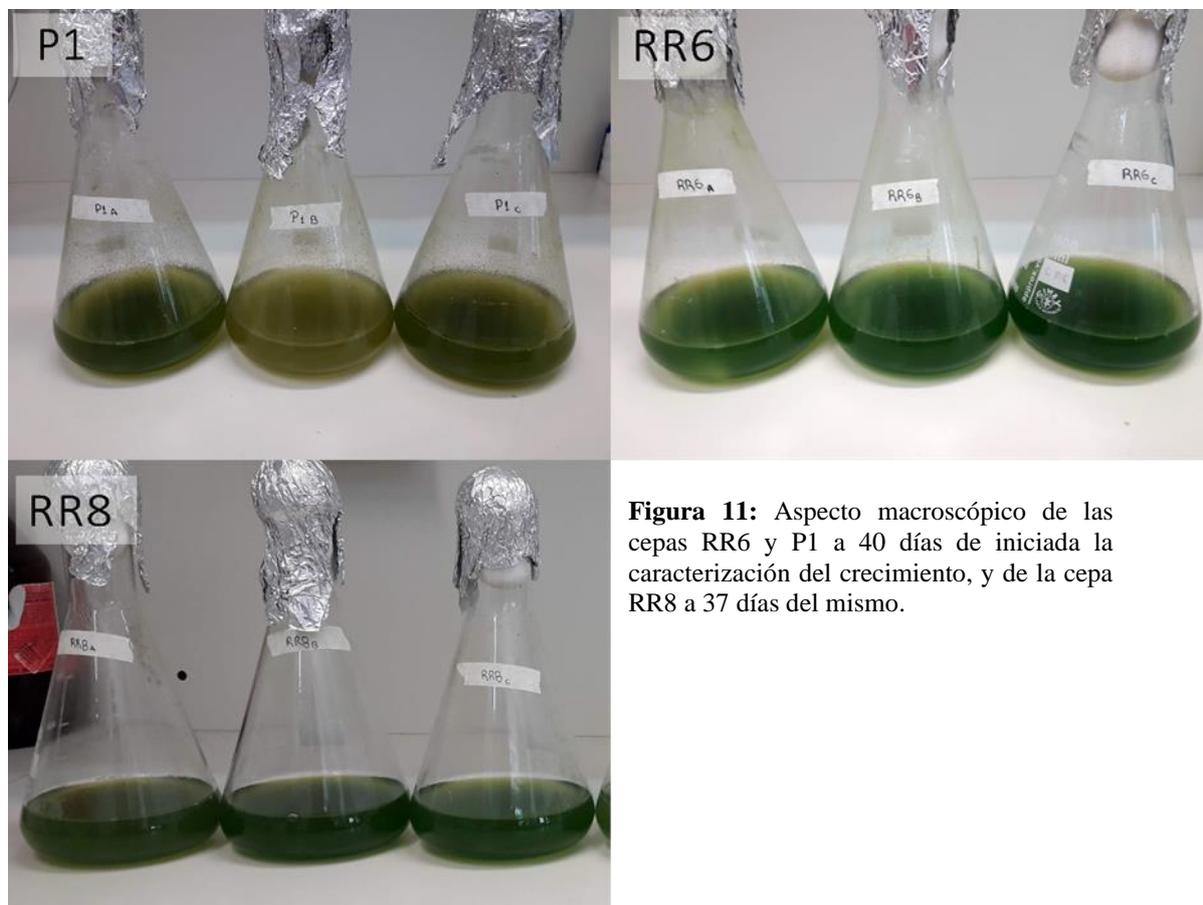
**Tabla 6:** Parámetros de productividad de las cepas RR6, RR8 y P1: velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y tiempo de duplicación ( $T_2$ ) obtenidos en la fase exponencial de los cultivos; concentración final máxima del cultivo ([Final]) ( $\pm$ error estándar), *BST* final (biomasa seca total) y *PSTU* (peso seco total unitario).  $\pm$  desvío estándar.

Parámetros	RR6	RR8	P1
$\mu$ (día <sup>-1</sup> )	0.745 $\pm$ 0.021 <sup>a</sup>	0.561 $\pm$ 0.063 <sup>b</sup>	0.443 $\pm$ 0.012 <sup>c</sup>
$T_2$ (día)	0.931 $\pm$ 0.025 <sup>c</sup>	1.245 $\pm$ 0.136 <sup>b</sup>	1.566 $\pm$ 0.045 <sup>a</sup>
[Final] (*10 <sup>6</sup> cél mL <sup>-1</sup> )	46.250 $\pm$ 1.301 <sup>a</sup>	27.583 $\pm$ 1.354 <sup>b</sup>	11.250 $\pm$ 0.653 <sup>c</sup>
<i>BST</i> final (g L <sup>-1</sup> )	0.446 $\pm$ 0.022 <sup>c</sup>	0.826 $\pm$ 0.070 <sup>a</sup>	0.530 $\pm$ 0.053 <sup>b</sup>
<i>PSTU</i> (*10 <sup>-11</sup> g cél <sup>-1</sup> )	0.965 $\pm$ 0.009 <sup>c</sup>	2.995 $\pm$ 0.170 <sup>b</sup>	4.709 $\pm$ 0.147 <sup>a</sup>

Diferentes superíndices indican diferencias significativas en los resultados (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ , a > b).

Luego de la fase exponencial, se observó una fase de desaceleración con crecimiento lineal, hasta que el crecimiento cesó dando comienzo a la fase estacionaria aproximadamente en el día 20, 24 y 26 para la cepa RR6, RR8 y P1, respectivamente (Figura A.I. 4, Anexo 1). La duración de la fase estacionaria se mantuvo alrededor de 14 días para los cultivos de RR8 y P1 antes de que la densidad celular empezara a decrecer (valores de densidad celular no mostrados); aunque la cepa P1 fue la única que mostró muerte celular de forma evidente hacia el final del ensayo. En el caso de la cepa RR6, el ensayo finalizó antes de llegar a mostrar muerte celular (Figura 10). En la Figura 11 se puede observar el aspecto macroscópico de los cultivos hacia el final del ensayo, denotándose que la cepa P1 muestra clorosis producto de la edad del cultivo y de la muerte celular, mientras que las cepas RR8 y RR6 muestran un verde oscuro intenso característico de esta etapa de crecimiento. La fase

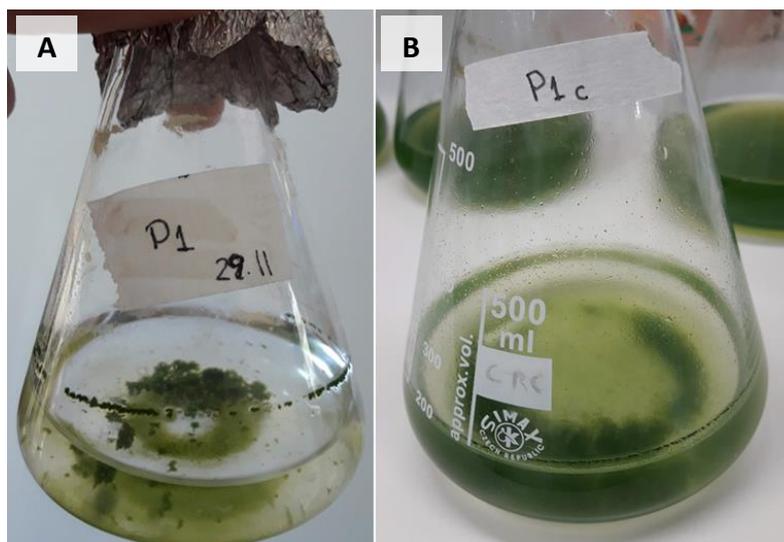
estacionaria de RR6 alcanzó una densidad celular final 4.1 veces mayor que P1 y 1.7 que RR8, mientras que la densidad celular final de RR8 fue 2.5 veces mayor que la de P1 (Tabla 6).



**Figura 11:** Aspecto macroscópico de las cepas RR6 y P1 a 40 días de iniciada la caracterización del crecimiento, y de la cepa RR8 a 37 días del mismo.

Es importante destacar que la cepa P1 mostró mayor dificultad a la hora de realizar los conteos celulares, ya que es una cepa que tiende a agregarse a medida que progresa su ciclo de crecimiento (Figura 12). Los subcultivos de esta cepa que presentaban mucha agregación (Figura 12.A) no fueron usados para realizar los ensayos de remoción.

Se evaluó la biomasa seca (*BST*) obtenida al final del ensayo de crecimiento y se calculó el peso celular de cada cepa (*PSTU*) (véase sección II.3.2). La cepa RR8 presentó la mayor cantidad de *BST*, seguida por P1 y por último RR6. Al evaluar el *PSTU* de estas cepas, P1 mostró un peso 57% mayor que RR8. Por su parte, RR6 exhibió un peso mucho menor que las otras dos cepas (Tabla 6).



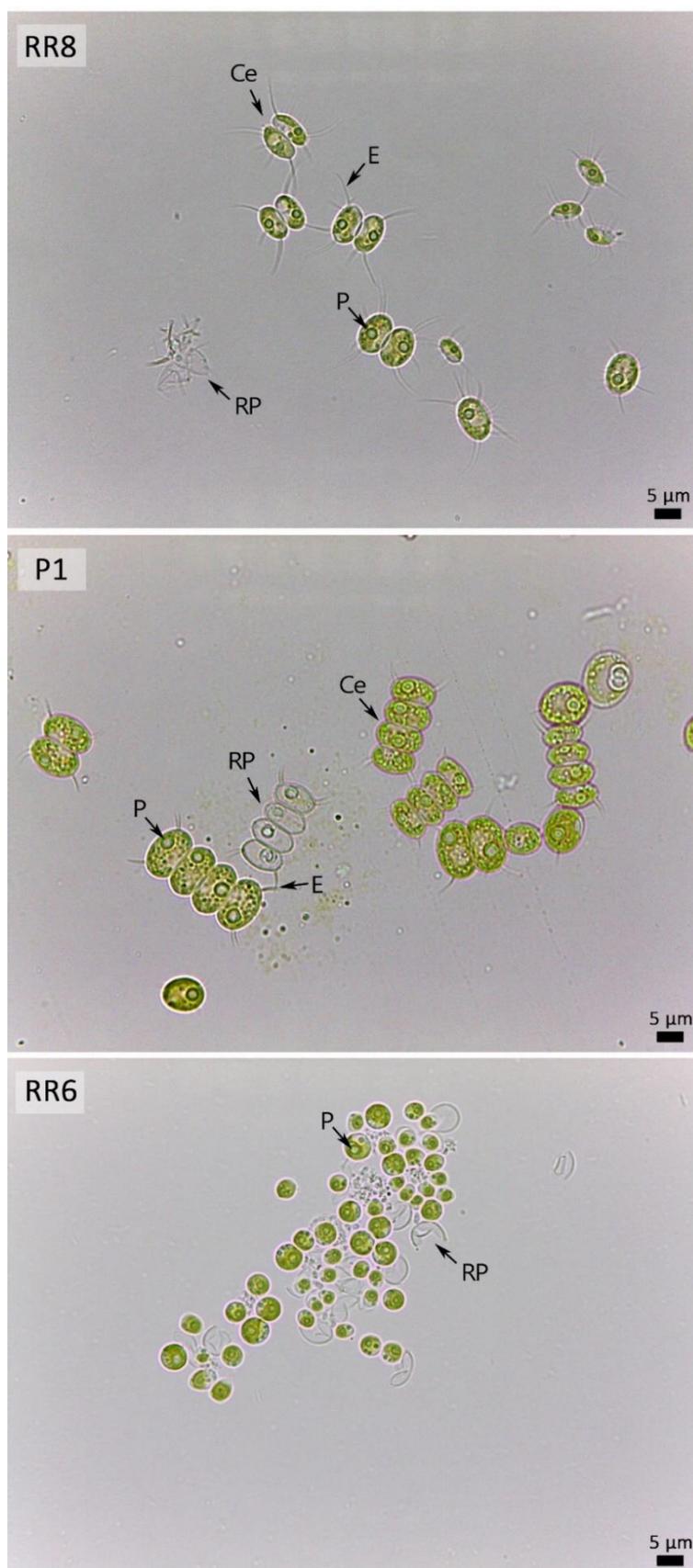
**Figura 12:** Aspecto macroscópico de la cepa P1 (*Scenedesmus* sp.), agregación celular. Imagen A: subcultivo para ensayos de remoción. Imagen B: cultivo perteneciente a la curva de crecimiento.

### III.5.2. Tamaño celular

Se analizó el tamaño celular mediante determinación del biovolumen ( $V$ ) y la superficie celular ( $A$ ) (véase sección II.3.4) para poder determinar si existe una correlación entre la diferencia de peso obtenida y el tamaño de las células. La cepa P1 presentó tanto un valor de  $V$  como de  $A$  significativamente mayor con respecto a la cepa RR8, ambas pertenecientes al género *Scenedesmus* sp.. Mientras que la cepa RR6 (*Chlorella* sp.) obtuvo el menor valor para ambos parámetros. Al evaluar la relación  $A/V$ , las cepas RR6 y RR8 mostraron valores similares, siendo un tanto menor la relación de RR8; por su parte, la cepa P1 expuso un valor significativamente menor (Tabla 7). En la Figura 13 se observan las imágenes microscópicas de las tres cepas evaluadas a partir de las que se calcularon los parámetros de tamaño celular.

**Tabla 7:** Parámetros de tamaño celular: diámetro ( $d$ ), altura ( $h$ ), biovolumen ( $V$ ) y relación superficie volumen ( $A/V$ ) de las 3 cepas seleccionadas. Valores promedio  $\pm$  error estándar. Diferentes superíndices indican diferencias significativas en los resultados (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

Parámetros	Cepas		
	RR8	P1	RR6
$d$ ( $\mu\text{m}$ )	4.385 $\pm$ 0.017	6.196 $\pm$ 0.021	4.740 $\pm$ 0.011
$h$ ( $\mu\text{m}$ )	7.953 $\pm$ 0.021	9.505 $\pm$ 0.024	- -
$V$ ( $\mu\text{m}^3$ )	88.602 $\pm$ 0.842 <sup>b</sup>	203.574 $\pm$ 1.680 <sup>a</sup>	58.913 $\pm$ 0.414 <sup>c</sup>
$A$ ( $\mu\text{m}^2$ )	97.945 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>	168.552 $\pm$ 0.885 <sup>a</sup>	72.036 $\pm$ 0.327 <sup>c</sup>
$A/V$ ( $\mu\text{m}^{-1}$ )	1.261 $\pm$ 0.046 <sup>a</sup>	0.903 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	1.300 $\pm$ 0.003 <sup>a</sup>



**Figura 13:** Imágenes de microscopía de campo claro (aumento 1000X) de las algas seleccionadas. Cepas aisladas del humedal natural del CTP (P) y del Río Reconquista (RR). *Scenedesmus* sp.: P1 y RR8. *Chlorella* sp.: RR6. Referencias: Espinas (E), Pirenoide (P), Cenobio (Ce), Restos de Pared Celular (RP). (Microscopio Leica DM10000 LED, cámara Leica ICC50 HD).

### III.6. Caracterización del efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal.

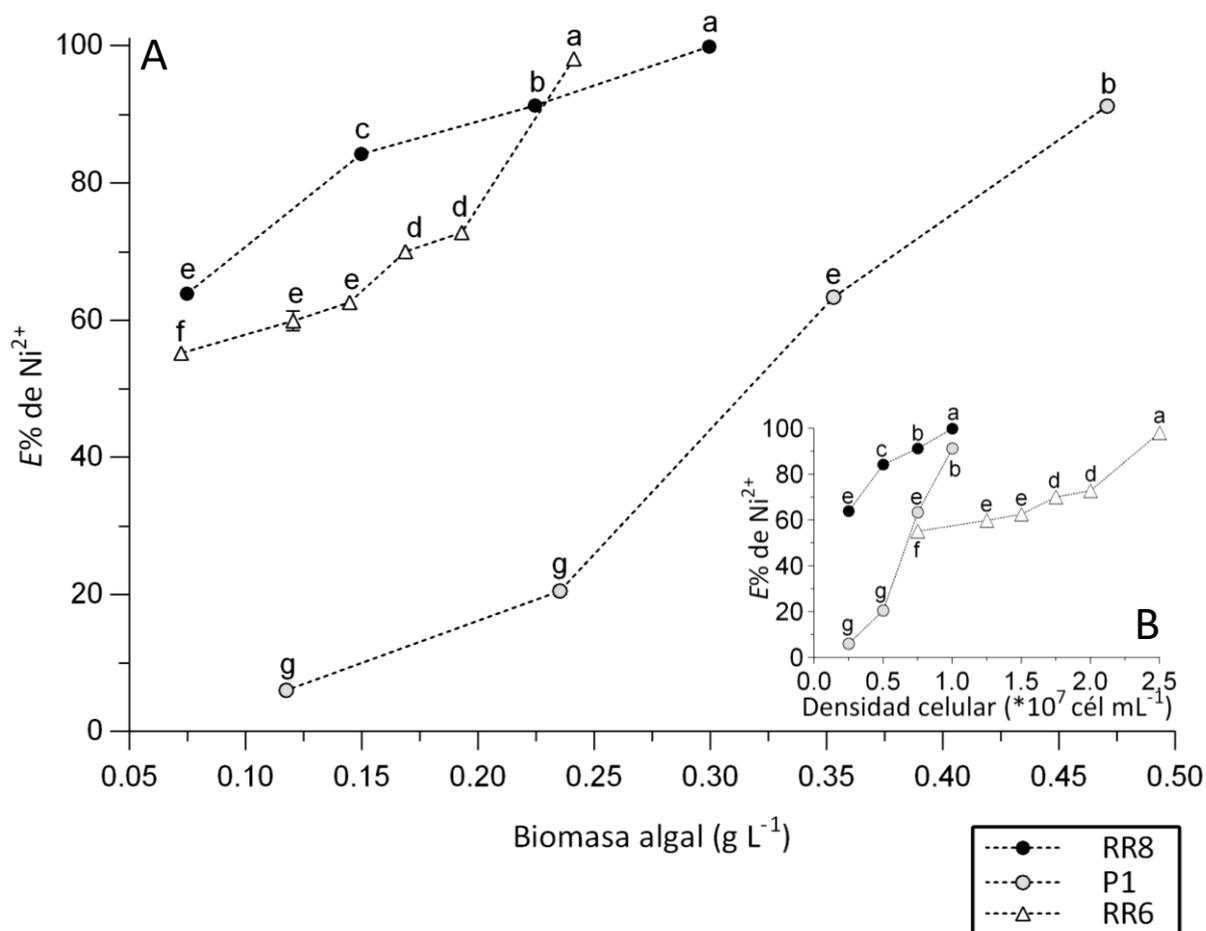
Uno de los parámetros que afectan fuertemente la remoción de metal es la concentración de biosorbente, en este caso la cantidad de biomasa algal en solución. Es fundamental determinar la dosis de biomasa óptima a la hora de diseñar sistemas de remoción de metales efectivos con el menor costo de producción posible [11]. Por lo que se realizaron una serie de experimentos para evaluar este efecto sobre la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  utilizando las cepas RR6, RR8 y P1, seleccionadas por su alta remoción. Se efectuaron ensayos de remoción de 24 horas empleando diferentes dosis de biomasa algal para una concentración fija de metal de  $55 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ . Para las cepas RR8 y P1, ambas perteneciente al género *Scenedesmus* sp., se realizaron 4 tratamientos partiendo de inóculos con densidades celulares de:  $0.25 \times 10^7$ ,  $0.5 \times 10^7$ ,  $0.75 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$ . Para la cepa RR6, perteneciente al género *Chlorella* sp., se hicieron 6 tratamientos utilizando inóculos con densidad celular de:  $0.75 \times 10^7$ ,  $1.25 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^7$ ,  $1.75 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$  (ver equivalencias en  $\text{g L}^{-1}$  en Tabla 4). La cantidad de biomasa para los tratamientos se seleccionó partiendo de los resultados obtenidos del ensayo de remoción efectuado anteriormente (sección III.4); donde se obtuvo un 100% de  $E\%$  a una concentración inicial de  $55 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$  para las cepas RR8 y RR6 a una dosis inicial de  $1 \times 10^7$  y  $2.5 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$ , respectivamente y un valor de 91% para la cepa P1 con una densidad de  $1 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$  (Figura 7.B). Por lo que se quiso probar si a una cantidad de biomasa menor se continuaba obteniendo una  $E\%$  por arriba del 90%.

En la Figura 14 se presentan los resultados del efecto de la dosis de biomasa sobre la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  para las tres cepas evaluadas. Los resultados mostraron que la concentración de biomasa algal afectó fuertemente la cantidad de metal removido de la solución. En las cepas RR8 y P1 la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  fue significativamente distinta entre todos los tratamientos, donde se observó el aumento de la  $E\%$  en función del aumento de biomasa. Para la cepa RR6, el incremento de biomasa de  $0.13$  a  $0.15 \text{ g L}^{-1}$  y de  $0.17$  a  $0.19 \text{ g L}^{-1}$  no generó un aumento significativo en la  $E\%$ . Al aumentar a  $0.24 \text{ g L}^{-1}$  de biomasa, RR6 mostró un aumento importante en su  $E\%$ .

Las cepas RR8 y RR6 mostraron  $E\%$  del 64 y 55%, respectivamente, a la menor dosis de biomasa evaluada. Mientras que la cepa P1 presentó una gran disminución en la  $E\%$  a las menores dosis de biomasa, removiendo tan solo un 6% de  $\text{Ni}^{2+}$  a  $0.12 \text{ g L}^{-1}$  y un 20% a  $0.24 \text{ g L}^{-1}$ . Con el aumento adicional de biomasa a  $0.35 \text{ g L}^{-1}$  la  $E\%$  de P1 incrementó rápidamente a

63.4%. La dosis mínima de biomasa para remover más del 90% de metal de la solución para RR6 y P1 correspondió a la máxima dosis de biomasa evaluada, mientras que para la cepa RR8 se vio una  $E\%$  del 91% a  $0.23 \text{ g L}^{-1}$  (Figura 14).

El mayor valor de  $E\%$  fue observado en la máxima dosis de biomasa evaluada para las tres cepas. Por lo que se puede inferir que se evaluó la  $E\%$  justo en el límite de concentración crítica de biomasa. De manera que, es esperable obtener el punto óptimo de remoción entre la mayor dosis de biomasa evaluada y el tratamiento anterior, donde se siga obteniendo un alto valor de  $E\%$ . En este sentido, la dosis de biomasa seleccionada para el desarrollo del siguiente ensayo para evaluar el efecto del tiempo de contacto sobre la remoción de RR8, P1 y RR6 fue  $0.3$ ,  $0.47$  y  $0.24 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, debido a que presentaron los mayores valores de  $E\%$  (Figura 14).



**Figura 14:** Valores promedio de la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $\text{Ni}^{2+}$  en función de la cantidad de biomasa algal en **A.** ( $\text{g L}^{-1}$ ) y en **B.** densidad celular ( $\text{cél mL}^{-1}$ ). Condiciones de ensayo: 24 hs,  $21 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 12:12, agitación manual, volumen: 10 ml,  $C_0$  de  $\text{Ni}^{2+}$ :  $55 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ).

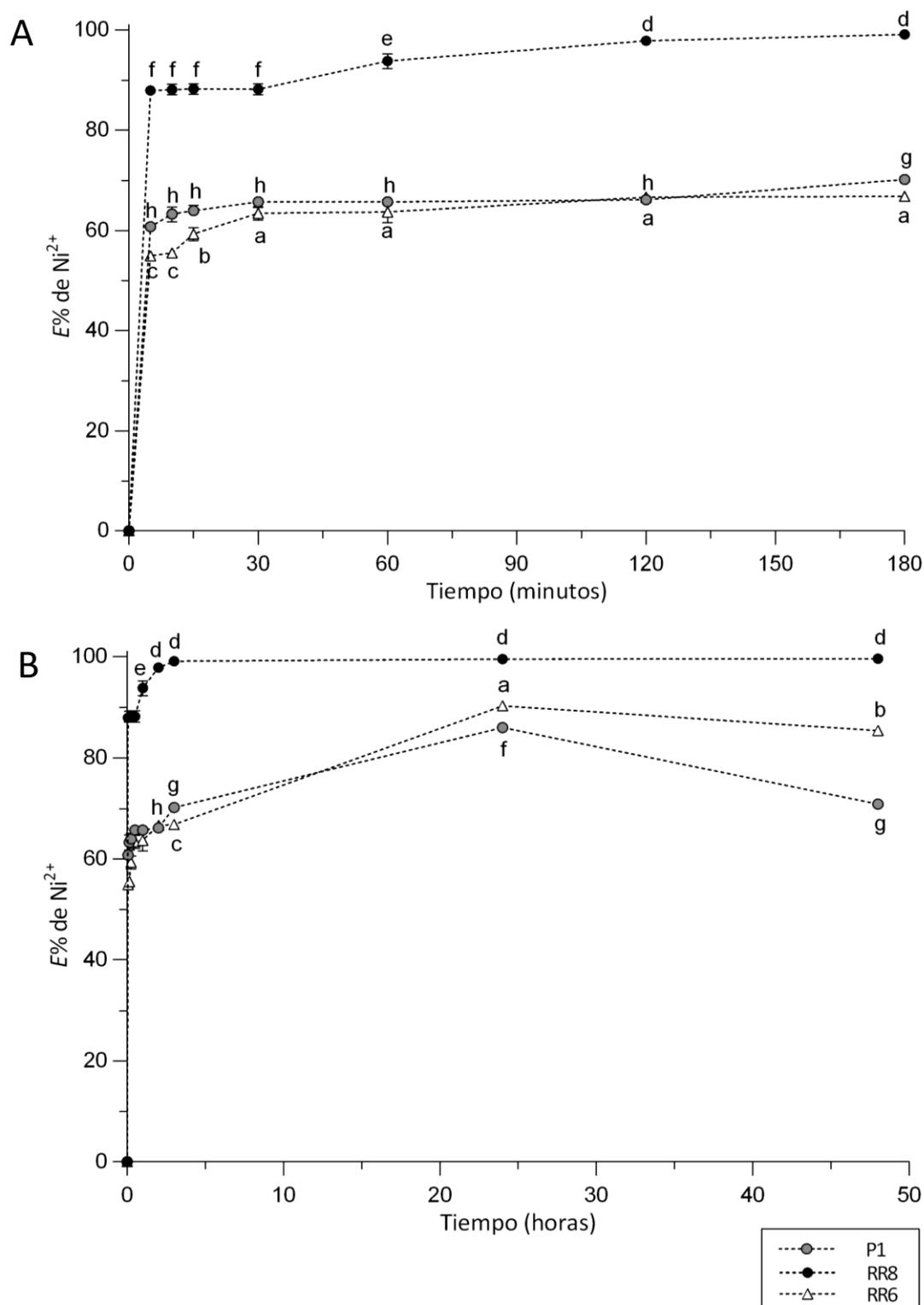
### III.7. Análisis de remoción de metal a diferentes tiempos de contacto y ajuste a modelos cinéticos

Conocer el perfil de remoción de metal a lo largo del tiempo es de fundamental importancia para desarrollar protocolos a mayor escala y poder diseñar sistemas económicamente viables [7]. Debido a esto, se caracterizó al proceso de remoción a diferentes tiempos de exposición de las algas, utilizando la dosis de biomasa óptima evaluada anteriormente para cada cepa (sección III.6). Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer si la capacidad de remoción se ve afectada por el tiempo de exposición a metal y así determinar el tiempo mínimo necesario para obtener la máxima remoción. Además, la aplicación de modelos cinéticos en este estudio permitió determinar la velocidad de remoción de metal, establecer el tiempo necesario para llegar a un estado estacionario y determinar el tipo de mecanismo predominante en el proceso de remoción.

#### III.7.1. Caracterización del efecto del tiempo de contacto sobre la remoción de $\text{Ni}^{2+}$

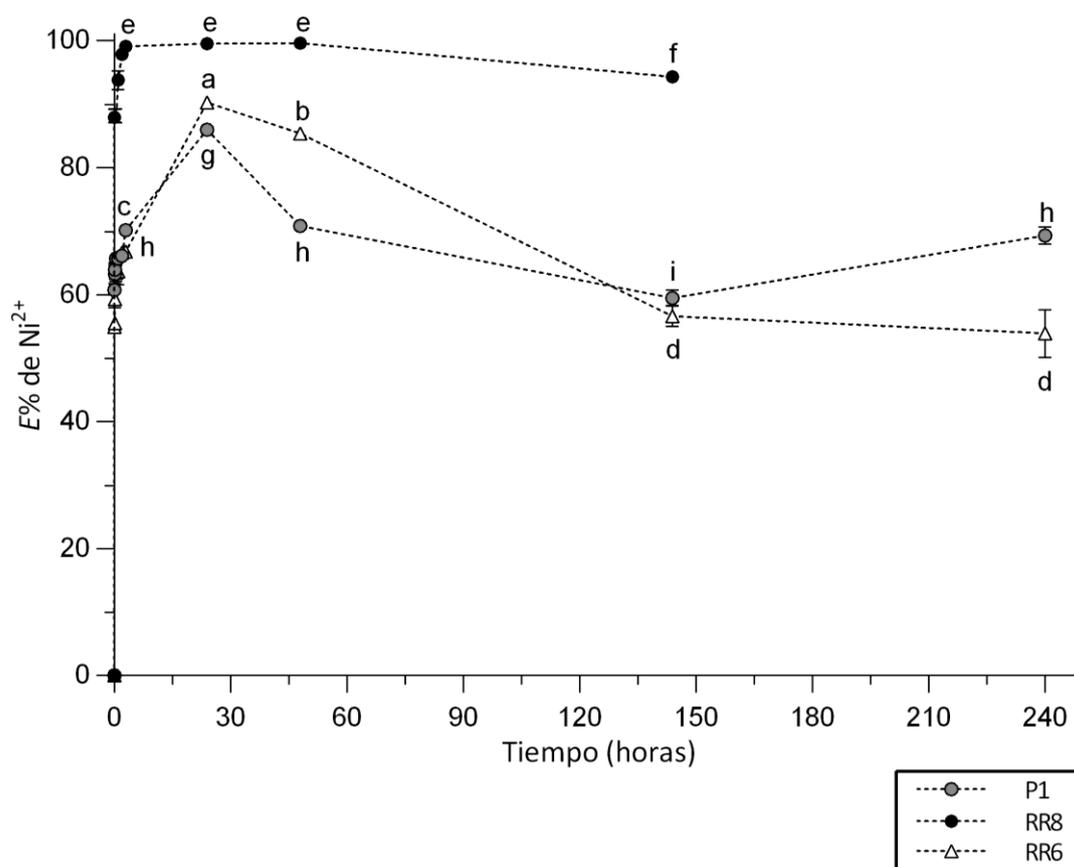
Para conocer el perfil de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  de las cepas RR8, RR6 y P1 a lo largo del tiempo se realizó un ensayo durante un periodo de 6 días a una solución de  $55 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  y a un pH de 5.5. La remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  se expresó tanto en términos de eficiencia de remoción ( $E\%$ ) como de capacidad de remoción ( $q$ ).

En la Figura 15 se graficó la  $E\%$  a lo largo de 3 horas (Figura 15.A) y 48 horas (Figura 15.B) de ensayo. De acuerdo con estos gráficos, los valores de  $E\%$  aumentaron con el tiempo de contacto, siendo la remoción muy rápida al principio del ensayo para las tres cepas evaluadas. El proceso de remoción consistió en un rápido incremento durante los primeros 30 minutos logrando una remoción mayor al 65% de  $\text{Ni}^{2+}$  en el caso de las cepas RR6 y P1, y aproximadamente un 90% de  $E\%$  para la cepa RR8. Luego de esta rápida remoción inicial, para tiempos entre 30 y 180 minutos, ocurrió un incremento gradual y mucho más lento, donde se observa un leve aumento en el porcentaje de remoción. La cepa RR8 fue la única que alcanzó un 100% de  $E\%$  en un tiempo menor a 3 horas; después de este tiempo no se observó ningún incremento notorio en la captación de  $\text{Ni}^{2+}$ , obteniendo una capacidad de remoción máxima ( $q_{max}$ ) de  $167.8 \text{ mg g}^{-1}$  (Figura A.II. 5, Anexo II). Transcurridos 6 días de ensayo, RR8 mostró una disminución de  $E\%$  de 5.3% ( $8.9 \text{ mg g}^{-1}$ ) (Figura 16), lo que puede deberse a una posible desorción, y/o a liberación de metal absorbido.



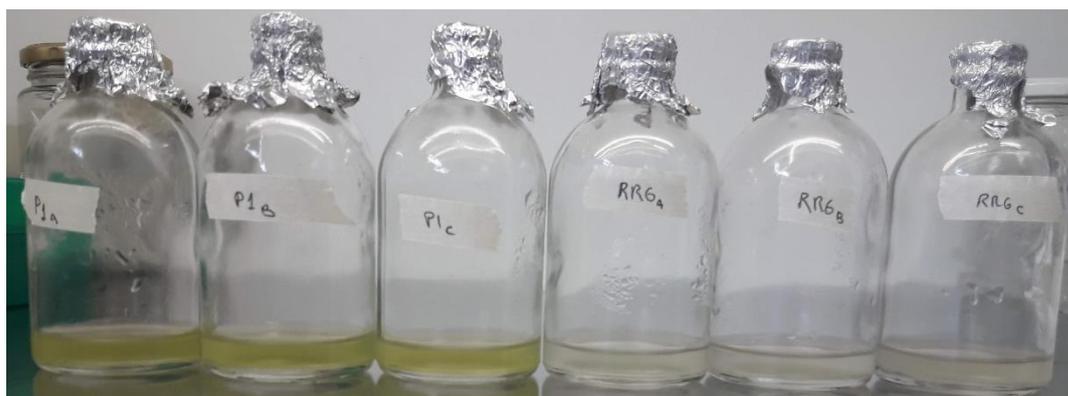
**Figura 15:** Valores promedio de eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de  $\text{Ni}^{2+}$  de los cultivos a lo largo de **A.** 3 hs y **B.** 48 hs de tiempo de contacto. Condiciones de ensayo: 24 hs,  $21 \pm 0.1^\circ\text{C}$ , fotoperiodo 12:12, agitación manual, volumen: 10 ml,  $C_0$  de  $\text{Ni}^{2+}$ :  $55 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). Los análisis estadísticos se hicieron para cada cepa por separado, por lo que cada conjunto de letras corresponde a una cepa (RR6: a,b,c / P1: g,h / RR8: d,e,f).

En el caso de las cepas RR6 y P1, transcurridas 24 horas del inicio del ensayo mostraron una biosorción adicional, alcanzando una  $E\%$  máxima de 90.3% y un  $q_{max}$  de 190.3 mg g<sup>-1</sup> para RR6 y una  $E\%$  máxima de 86% y un  $q_{max}$  de 140.6 mg g<sup>-1</sup> para P1 (Figura 15.B y Figura A.II. 5, Anexo II). La  $E\%$  del metal comenzó a disminuir significativamente a las 48 horas de ensayo, y continuó hasta los 6 días reduciéndose en un 34% (68.6 mg g<sup>-1</sup>) y 27% (43.3 mg g<sup>-1</sup>) la  $E\%$  de Ni<sup>2+</sup> para RR6 y P1, respectivamente (Figura 15.B, Figura 16 y Figura A.II. 5 Anexo II). Debido a esto, se decidió extender el experimento hasta los 10 días para estas dos cepas y así evaluar si la captación de Ni<sup>2+</sup> continuaba disminuyendo en este lapso. Asimismo, se evaluó la densidad celular de RR6 y P1 a los 6 días de ensayo. La cepa P1 mantuvo su densidad en  $1 \times 10^7 \pm 6 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, mientras que RR6 tuvo una disminución en su densidad celular ( $2 \times 10^7 \pm 9 \times 10^4$  cél mL<sup>-1</sup>). Transcurridos los 10 días de ensayo, RR6 no mostró una disminución significativa en su  $E\%$ . Por el contrario, en el caso de P1, la  $E\%$  incrementó un 10% (Figura 16).



**Figura 16:** Valores promedio de la eficiencia de remoción porcentual ( $E\%$ ) de Ni<sup>2+</sup> de los cultivos a lo largo de 10 días de tiempo de contacto. Condiciones de ensayo: 24 hs, 21 ± 0.1°C, fotoperiodo 12:12, agitación manual, volumen: 10 ml,  $C_0$  de Ni<sup>2+</sup>: 55 ± 1 mg L<sup>-1</sup>. Las barras indican ± desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). Los análisis estadísticos se hicieron para cada cepa por separado, por lo que cada conjunto de letras corresponde a una cepa (RR6: a,b,c / P1: g,h / RR8: d,e,f).

Al concluir con el ensayo a los 10 días, la apariencia macroscópica del cultivo celular de la cepa RR6 estaba completamente clorótica, en cambio, la cepa P1 conservaba una pigmentación similar a la del inicio del ensayo (Figura 17). Por lo que se realizó una tinción con safranina para evaluar muerte celular. Mientras que en la cepa P1 no hubo presencia de células teñidas, indicando la viabilidad del cultivo, en la cepa RR6 todas las células se teñieron (imágenes no mostradas), revelando la muerte celular del cultivo. Por su parte, la cepa RR8 no mostró clorosis durante los 6 días en los que transcurrió el ensayo.



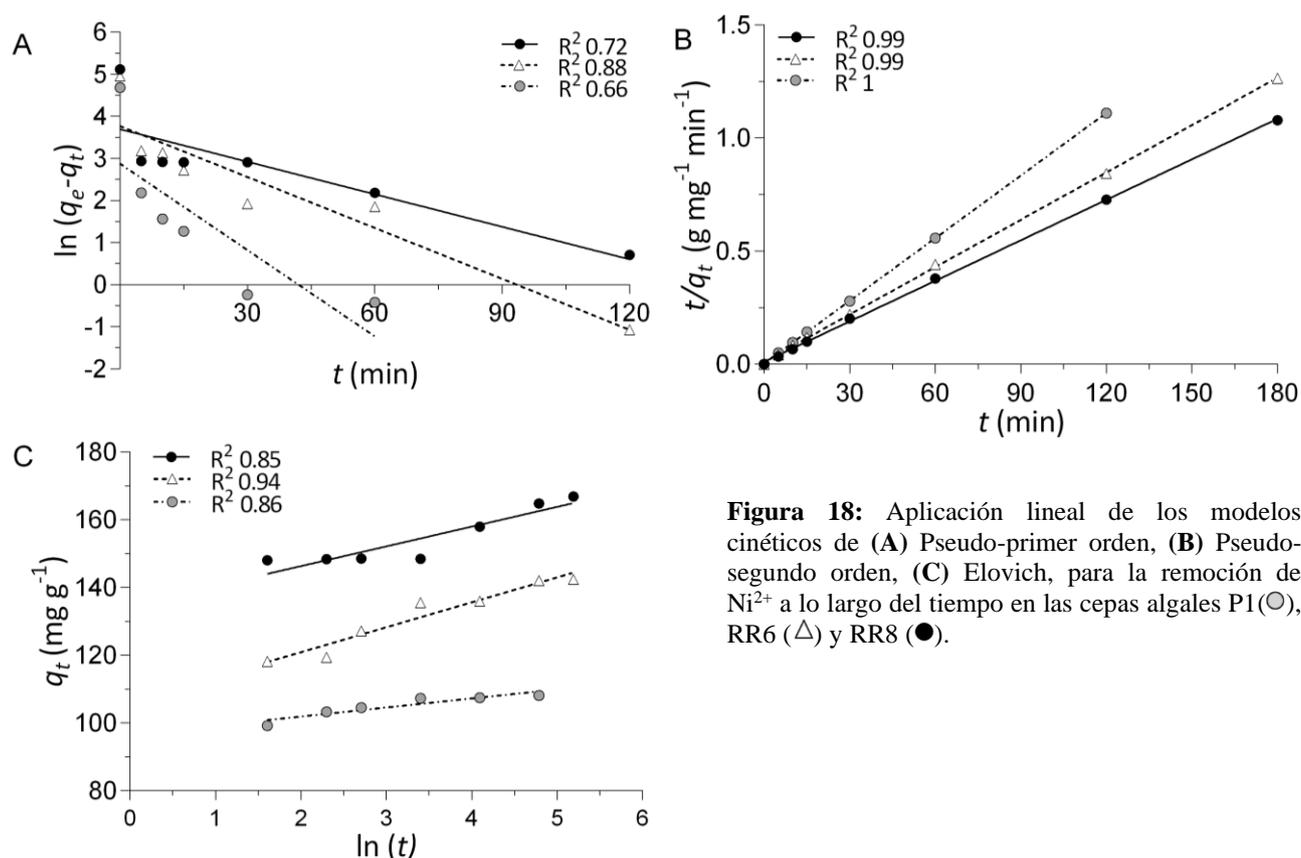
**Figura 17:** Apariencia macroscópica de cultivos de las cepas P1 (los 3 viales empezando de la izquierda) y RR6 (los 3 viales empezando de la derecha) a 10 días de ensayo en una solución con una concentración inicial de  $55 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ .

### III.7.2. Modelos cinéticos de remoción

Los modelos cinéticos de pseudo-primer orden (PPO), pseudo-segundo orden (PSO) y de Elovich fueron aplicados para interpretar y ajustar los datos experimentales de la cinética de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en la biomasa algal de las tres cepas seleccionadas. El análisis fue realizado recogiendo muestras hasta las 3 horas de ensayo. La elección de estos tiempos de contacto se debe a que dentro de este lapso se pueden interpretar los datos más exclusivamente asociados a fenómenos de adsorción a causa de los tiempos requeridos del proceso [122], pudiendo así, conocer la adsorción inicial en la superficie celular del alga y el valor estacionario de adsorción ( $q_e$ ) [24]. El estado estacionario se consideró a las 3 horas, tal y como se informó en trabajos anteriores [12,24,132] para las cepas RR6 y RR8, mientras que para P1 se consideró hasta las 2 horas debido a que a las 3 horas presentó un cambio en los valores de  $q$ .

En primera instancia, se evaluó el ajuste del modelo de difusión intrapartícula, donde se encontró que este modelo no ajustó para ninguna de las tres cepas (Ajuste lineal:  $R^2 \leq 0.4$ ; Ajuste no lineal:  $X^2 \geq 1967$ ,  $S.D.\% \geq 48\%$ ). Por lo que se prosiguió a analizar la concordancia de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich con los datos experimentales

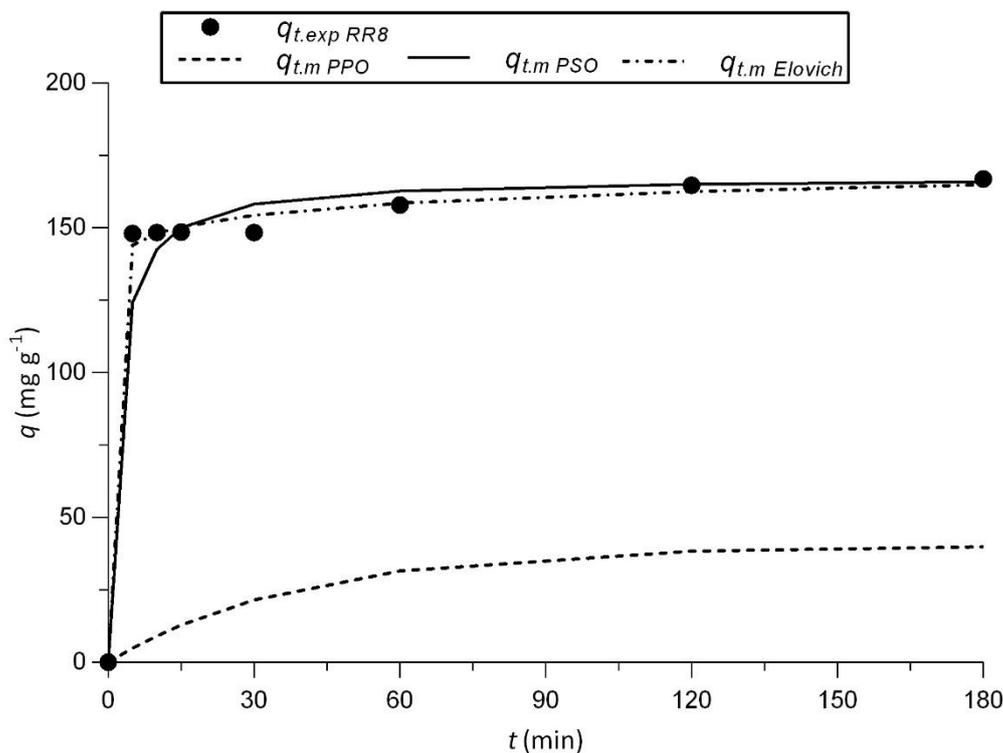
por medio del ajuste lineal (Figura 18), evaluando el coeficiente de regresión lineal ( $R^2$ ), y el no lineal, con los datos de chi cuadrado ( $X^2$ ) y la desviación estándar porcentual ( $S.D.\%$ ). Mismo así, se graficó el valor de  $q_t$  calculado por el modelo de Elovich (Ecu. (23)), por el modelo de PSO (Ecu. (17)) y por el modelo de PPO (Ecu. (14)), y el valor de  $q_t$  experimental para cada una de las cepas (Figura 19, 20 y 21). Los valores de los parámetros de ajuste obtenidos de los tres modelos, como así también las constantes cinéticas calculadas, se resumen en la Tabla 8.



**Figura 18:** Aplicación lineal de los modelos cinéticos de (A) Pseudo-primero orden, (B) Pseudo-segundo orden, (C) Elovich, para la remoción de  $Ni^{2+}$  a lo largo del tiempo en las cepas algales P1 (○), RR6 (△) y RR8 (●).

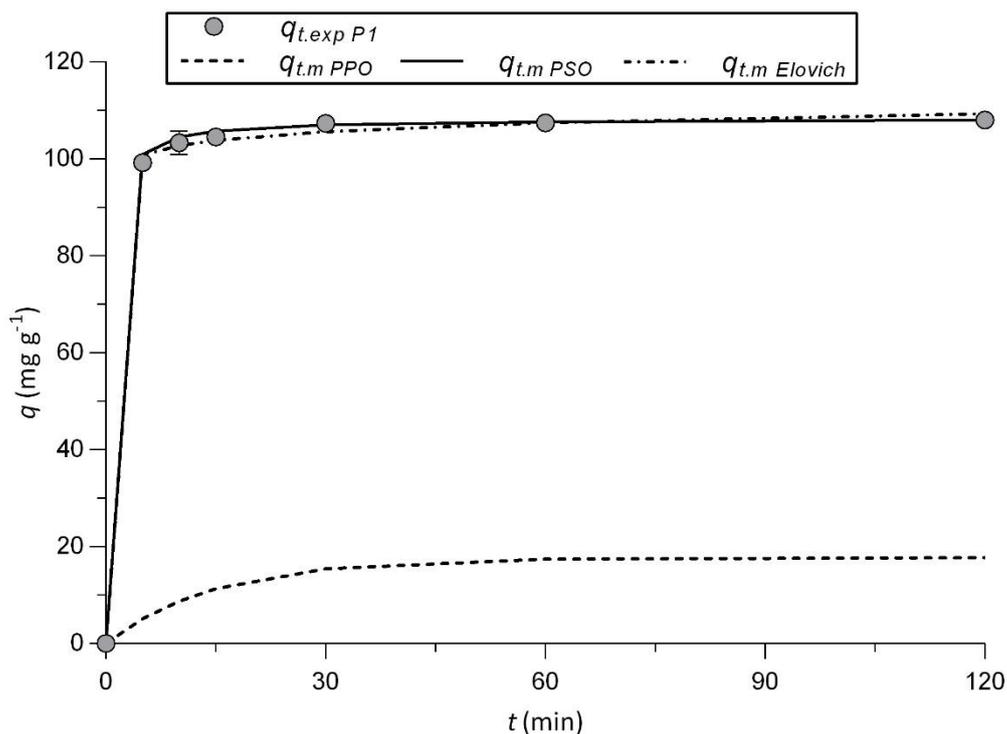
En la cinética de la cepa RR8, el modelo de PSO presentó el mayor coeficiente de regresión lineal ( $R^2 = 0.999$ ), indicando un buen ajuste de la ecuación lineal a los datos experimentales para la estimación de los parámetros del modelo (Figura 18.B y Tabla 8). Mismo así, el valor de  $q$  obtenido por PSO ( $q_{e.m2}$ ) tuvo una gran aproximación al  $q_{e.exp}$ . Si bien, al comparar los valores de  $X^2$  y  $\%S.D.$  del modelo de PSO y de Elovich, ambos modelos presentaron un buen ajuste, este último obtuvo valores más bajos para los dos estadísticos, lo que revela una mejor concordancia con los datos experimentales (Tabla 8). En la Figura 19 se puede apreciar que el modelo de Elovich proporciona un mejor ajuste a la curva experimental durante los primeros

60 minutos de ensayo con respecto al modelo de PSO. En este sentido, el proceso de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  por parte de la cepa RR8 concierda mejor a los modelos de PSO y Elovich.



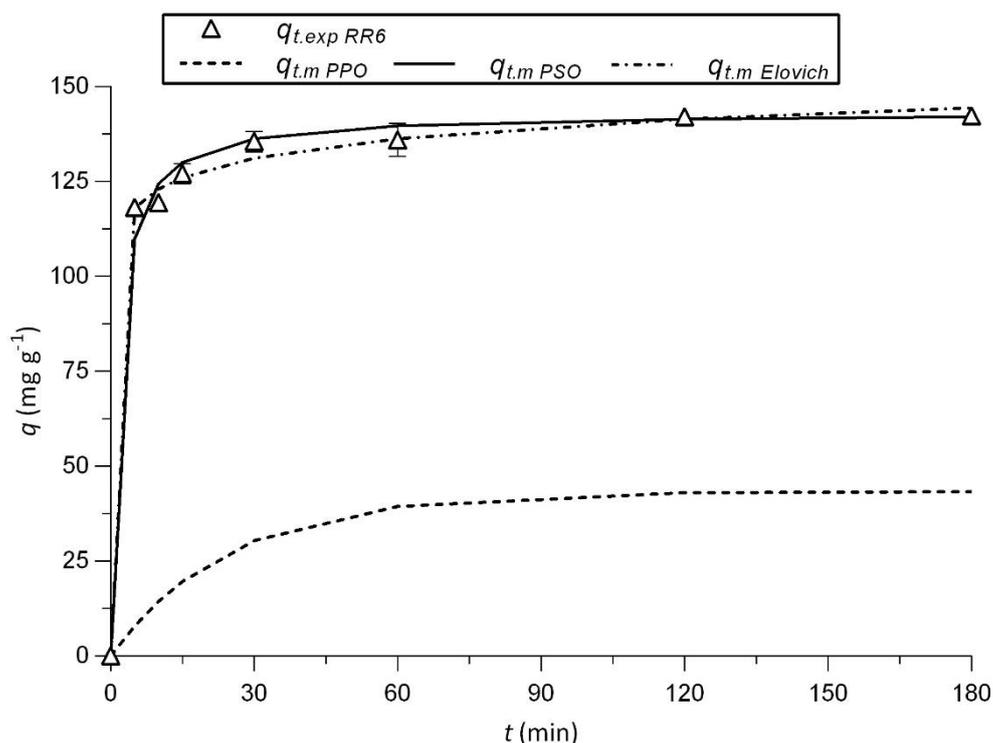
**Figura 19:** Cinética de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en la cepa RR8 con el ajuste de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich. Los puntos representan el valor promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $\text{Ni}^{2+}$  de los cultivos de RR8 (●). Las líneas representan el ajuste de los diferentes modelos cinéticos. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar.

En el caso de la cepa P1, el modelo de PSO presentó el mejor ajuste lineal ( $R^2 = 1$ ) (Figura 18.B) y no lineal, puesto que obtuvo los valores más bajos para ambos estadísticos ( $\bar{X}^2$  y  $\%S.D.$ ). Aunque el modelo de Elovich también alcanzó un buen ajuste no lineal a los datos experimentales (Tabla 8). En la Figura 20 se puede observar que los datos de  $q_{t.exp}$  se ajustan alternadamente a los valores de  $q$  calculados por medio de estos dos modelos. Por su parte, el valor teórico de  $q_{e.m2}$  se asemejó con el valor de  $q_{e.exp}$  (Tabla 8). Según los datos alcanzados, se estableció que tanto el modelo de PSO como el de Elovich describen la cinética de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  de la cepa P1 dentro del intervalo de tiempo analizado.



**Figura 20:** Cinética de remoción de Ni<sup>2+</sup> en la cepa P1 con el ajuste de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich. Los puntos representan el valor promedio de la capacidad de remoción ‘*q*’ de Ni<sup>2+</sup> de los cultivos de P1 (○). Las líneas representan el ajuste de los diferentes modelos cinéticos. Las barras indican ± desvío estándar.

Para la cepa RR6, el modelo de PSO presentó el mejor ajuste lineal ( $R^2= 0.999$ ) (Figura 18.B). Mientras que el modelo de Elovich obtuvo el mejor ajuste no lineal (Figura 21), obteniendo los valores más bajos para los estadísticos de  $X^2$  y %*S.D.*, lo que muestra un alto grado de correlación entre los datos experimentales y los datos teóricos predichos por el modelo. Por su parte, el valor de  $q_{e,m2}$  fue muy cercano al valor de  $q_{e.exp}$  (Tabla 8). Por lo que se puede concluir que el modelo de PSO y el de Elovich son los más indicados para describir la cinética de remoción de Ni<sup>2+</sup> de la cepa RR6 en todo el intervalo de tiempo analizado.



**Figura 21:** Cinética de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en la cepa RR6 con el ajuste de los modelos cinéticos de PPO, PSO y Elovich. Los triángulos representan el valor promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $\text{Ni}^{2+}$  de los cultivos de RR6 ( $\Delta$ ). Las líneas representan el ajuste de los diferentes modelos cinéticos. Las barras indican  $\pm$  desvío estándar.

El modelo de PPO no fue adecuado para describir a ninguna de las curvas evaluadas, obteniendo valores muy bajos de  $R^2$ , valores muy altos de los estadísticos  $X^2$  y  $\%S.D.$ , y valores de  $q_{e.ml}$  mucho menores a los  $q_{e.exp}$  (Tabla 8). En conclusión, los modelos de Elovich y de PSO describen de mejor forma el proceso de adsorción de  $\text{Ni}^{2+}$  en las cepas RR8, P1 y RR6 en las condiciones de ensayo evaluadas y para el tiempo de contacto analizado.

**Tabla 8:** Parámetros de los modelos cinético de remoción de Ni<sup>2+</sup> por las cepas RR6, RR8 y P1. Modelo de pseudo primer orden (PPO):  $k_1$  (min<sup>-1</sup>) constante de velocidad de PPO,  $q_{e.m1}$  (mg g<sup>-1</sup>) capacidad de remoción estacionaria calculada por modelo PPO; Modelo de pseudo segundo orden (PSO):  $k_2$  (g mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) constante de velocidad de PSO,  $q_{e.m2}$  (mg g<sup>-1</sup>): capacidad de remoción estacionaria calculada por modelo PSO,  $h$  (mg g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) velocidad inicial de remoción; Modelo de Elovich:  $\beta$  (g mg<sup>-1</sup>) constante de desorción,  $\alpha$  (mg g<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>) es la velocidad de sorción inicial,  $t_0$  constante de tiempo del modelo (min). Generales:  $q_{e.exp}$  (mg g<sup>-1</sup>) capacidad de remoción experimental estacionaria,  $C_0$  (mg L<sup>-1</sup>) concentración inicial de Ni<sup>2+</sup>,  $X^2$  estadístico chi cuadrado, S.D.% desvío estándar porcentual.

Modelos / Parámetros		Cepas		
		RR8	P1	RR6
$C_0$ Ni <sup>2+</sup>		55 ± 1	55 ± 1	55 ± 1
$q_{e.exp}$		166.85	108.09	142.36
Pseudo Primer Orden	$q_{e.m1}$	40.25	17.72	43.35
	$k_1$	0.026	0.0684	0.040
	R <sup>2</sup>	0.719*	0.660*	0.879*
	X <sup>2</sup>	9717.92	4980.54	3942.32
	S.D.%	60.81	62.35	57.27
Pseudo Segundo Orden	$q_{e.m2}$	167.48	108.34	143.28
	$k_2$	0.0034	0.0251	0.0046
	$h$	96.16	294.68	94.27
	R <sup>2</sup>	0.999*	1*	0.999*
	X <sup>2</sup>	5.58	0.06	1.01
Elovich	S.D.%	4.84	0.69	2.40
	$\beta$	0.171	0.375	0.136
	$\alpha$	6.176 x10 <sup>10</sup>	1.412 x10 <sup>16</sup>	1.340 x10 <sup>7</sup>
	$t_0$	9.444 x10 <sup>-11</sup>	1.890 x10 <sup>-16</sup>	5.495 x10 <sup>-7</sup>
	R <sup>2</sup>	0.846*	0.861*	0.937*
	X <sup>2</sup>	0.428	0.08	0.294
S.D.%	1.436	0.78	1.275	

\* estadísticamente significativo ( $\alpha = 0.05$ )

## IV. Discusión

La contaminación por metales se da, en general, como consecuencia de la deposición de aguas residuales de diversas industrias con escaso o nulo tratamiento [133]. Los metales se acumulan en el ambiente perturbando a una gran variedad de seres vivos [134]. Las algas unicelulares, principales productores primarios en ecosistemas acuáticos, son recurrentemente afectadas por la presencia de concentraciones anormales de metales [135]. Existen muchas algas que habitan cuerpos de agua contaminados que poseen la capacidad de adsorber y/o acumular grandes cantidades de estos elementos, reduciendo así, la biodisponibilidad en el medio y, por ende, su toxicidad [11,136,137]. Por lo que se han aplicado varias especies de algas unicelulares para procesos de remediación, entre ellas, los géneros *Chlorella* spp. y *Scenedesmus* spp. han sido estudiados en numerosas ocasiones [138], mostrando buenos resultados para la remoción de distintos iones metálicos [43,61–63,139].

La caracterización de la biomasa algal es útil para evaluar su efectividad como remediador y comprender el o los mecanismos involucrados en el proceso de remoción [140]. En este trabajo, se investigó la posibilidad de utilizar distintas cepas aisladas de sitios contaminados, identificadas como *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp., para la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en soluciones acuosas. Este estudio se centró en evaluar la potencialidad de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  de las distintas cepas, caracterizar su crecimiento celular, el efecto de la dosis de biomasa y el tiempo de contacto sobre la remoción de metal y, a su vez, estudiar el proceso de biosorción en términos de modelos cinéticos de aquellas cepas más prometedoras.

### IV.1. Evaluación de la eficiencia y capacidad de remoción de $\text{Ni}^{2+}$ para la selección de cepas algales

Al realizar los ensayos de remoción de metal, todas las cepas analizadas mostraron altas eficiencias de remoción ( $E\%$ ), alcanzando valores entre 74.6 y 100%, en una solución con una concentración inicial ( $C_0$ ) de 25  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  y a un pH de 5.5 (Figura 7.A). Los valores obtenidos son comparables y, en algunos casos mayores, con respecto a otros trabajos que estudiaron la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  utilizando *Chlorella* sp. y *Scenedesmus* sp. [37,69,71,141–145] (Tabla 9). Por ejemplo, se informó una remoción del 80.2% de  $\text{Ni}^{2+}$  utilizando biomasa viva de *C. vulgaris* a una  $C_0$  de 50.5  $\text{mg L}^{-1}$  [146]. Mientras que en una solución con una  $C_0$  de 100  $\text{mg L}^{-1}$ , donde también utilizaron biomasa viva de esta especie, reportaron una  $E\%$  de  $\text{Ni}^{2+}$  del 52% [144]. Por su parte, en otro trabajo encontraron una  $E\%$  del 68.7 y 52.2% para una solución con una  $C_0$  de 24.6 y 52.7  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ ,

respectivamente, utilizando biomasa seca de *C. vulgaris* [17]. Asimismo, empleando una cepa distinta de *C. vulgaris* se logró remover un 54.4% de  $\text{Ni}^{2+}$  ( $C_0 = 29.4 \text{ mg L}^{-1}$ ) [147]. En otro estudio probaron la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  para distintas especies de algas unicelulares, alcanzando entre un 50 – 70% de  $E\%$  para diversas cepas vivas de *Chlorella* (*C. miniata*, *C. vulgaris*, *C. sorokiniana*, *Chlorella* sp.) y un 99% por parte de *S. quadricauda*, a una  $C_0$  de 30  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  [148]. Por otro lado, un trabajo mostró un 40% de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  por parte de una cepa de *S. quadricauda* partiendo de una solución con una  $C_0$  de 8  $\text{mg L}^{-1}$ , mientras que la misma alga fue capaz de remover un 98% en una solución con una  $C_0$  de tan solo 2  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  [149].

En este trabajo, las cepas más prometedoras, RR8, RR14, RR6 y P1 ( $E\% \cong 100\%$ ) dejaron una concentración residual en solución menor a 0.01  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ . Este valor se encuentra muy por debajo de los límites para descarga de efluentes industriales y mineros que rigen en la Argentina [97,98], tanto así, que se encuadra dentro de los niveles guía de calidad de agua para los seres vivos [95,96]. Lo cual resulta extremadamente satisfactorio a la hora de desarrollar tecnologías para el tratamiento de efluentes y/o lixiviados contaminados con  $\text{Ni}^{2+}$  aplicando estas cepas.

Al aumentar la concentración de 25 a 55  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$  para las cepas más eficientes (RR14, P1, RR8 y RR6), las mismas presentaron  $E\%$  similares o un tanto menores ( $\approx -10\%$ ) a las exhibidas a menor  $C_0$  de metal (Figura 7.B). La disminución en la  $E\%$  a altos valores de  $C_0$  de iones metálicos se ha manifestado en muchos estudios [146,147,150,151]. La  $E\%$  de metal por la biomasa algal se incrementa inicialmente al aumentar la  $C_0$  del mismo, hasta alcanzar un punto donde los sitios de unión de la superficie algal se saturan, por lo que quedan sin remover una gran cantidad de iones en la solución. Mientras que, a menores  $C_0$  de metal, la gran mayoría de los iones interactúan con los sitios de unión facilitando el 100% de remoción [12,37]. Por ejemplo, Manzoor et al. observaron que al aumentar la  $C_0$  de  $\text{Ni}^{2+}$  de 50.5 a 100  $\text{mg L}^{-1}$  la  $E\%$  de *C. vulgaris* se redujo fuertemente de  $\cong 75\%$  a menos del 40% [146]. Mismo así, al trabajar con células vivas, una mayor exposición al metal puede producir efectos tóxicos sobre las algas, afectando la  $E\%$  [5,15,115]. Se ha visto que el  $\text{Ni}^{2+}$  puede provocar disrupciones en la membrana celular, estrés oxidativo e inhibir las actividades enzimáticas de las células [134,152–154].

En cuanto a la capacidad de remoción ( $q$ ), las cepas presentaron una gran variabilidad alcanzando valores de remoción entre 29 y 113  $\text{mg g}^{-1}$  para una  $C_0$  de 25  $\text{mg L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$

(Figura 8.A). Estas diferencias en la capacidad de captación de los iones metálicos pueden deberse a propiedades intrínsecas de las algas, como por ejemplo: la estructura celular, la presencia de distintos grupos funcionales de la pared, el área superficial efectiva para la captación de iones, la capacidad de acumulación intracelular, entre otras. A su vez, todos estos factores dependen en gran medida del género y especie algal pertenecientes [14,26,145,155]. Particularmente en este trabajo, la variabilidad encontrada en los valores de  $q$  no puede atribuirse a diferencias entre los dos géneros analizados. Siendo que las condiciones del ensayo se mantuvieron constantes y se utilizó la misma cantidad de biomasa para *Chlorella* sp., el valor de  $q$  varió notoriamente de acuerdo con la cepa evaluada, mismo así ocurrió entre las cepas de *Scenedesmus* sp.. Por este motivo, podemos decir que  $q$  depende de la cepa empleada, pero no particularmente del género algal probado. Por su parte, hubo una clara diferencia en los valores de  $q$  entre las cepas aisladas del Río Reconquista (RR) y del humedal del CTP, siendo significativamente mayor en todas las cepas del RR (Figura 8.A). Las cepas pertenecientes al humedal del CTP mostraron una notable tendencia a la agregación. La agregación algal produce una disminución en la remoción, debido a que se reduce la superficie efectiva de adsorción del alga [38,11]. Sin embargo, para poder sacar conclusiones más fehacientes sobre a qué se debe esta diferencia en los valores de  $q$  entre las cepas de los dos sitios de aislamiento, es necesario el conocimiento estructural y de la composición de la superficie celular de las algas, así como la comprensión del mecanismo de remoción de metal de cada cepa, lo que requiere de una investigación más exhaustiva [65,134,156,157]. Este trabajo no evaluó el destino de los iones metálicos en las células algales. A futuro se planea caracterizar, mediante la realización de análisis por TEM (microscopía electrónica de transmisión), la eventual acumulación de metal en el interior celular [139]. Mientras que, se identificarán los grupos funcionales de la superficie celular capaces de interactuar con los iones metálicos, por medio de un estudio FT-IR (espectroscopía de transmisión de infrarrojo por transformada de Fourier) [24,158], ya que tanto la presencia, cantidad y variedad de los grupos funcionales influyen en la afinidad y especificidad de los metales por las algas [159]. Así también, se llevarán a cabo análisis SEM-EDS (microscopía electrónica de barrido con detector EDS), para evaluar la adsorción de metales en la superficie celular y posibles cambios en los caracteres morfológicos y estructurales de la misma [160–162].

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de remoción, se seleccionaron las cepas RR6 y RR8 por sus altos valores de  $E\%$  y  $q$  en ambas concentraciones de  $\text{Ni}^{2+}$  evaluadas, y se

seleccionó a la cepa P1 por su gran importancia en el proyecto de saneamiento del humedal del CTP, dentro del marco de estudio del IEDS y CNEA. Por lo que estas tres cepas son representativas de los dos géneros algales evaluados (RR6: *Chlorella* sp. y RR8, P1: *Scenedesmus* sp.) y de los dos sitios de aislamiento.

Al analizar los datos de  $q$  se vio que la cepa RR6 no solo fue la más prometedora del género *Chlorella* sp., sino que también presentó una remoción claramente mayor con respecto a las cepas evaluadas de *Scenedesmus* sp., con una  $q$  de 113 mg g<sup>-1</sup> y 231 mg g<sup>-1</sup> para una  $C_o$  de 25 y 55 mg L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup>, respectivamente (Figura 8.A). Si bien se ha visto una gran variabilidad en los valores de  $q$  encontrados en la bibliografía, lo que probablemente refleje las diferencias en las condiciones experimentales y/o de trabajo, la cepa RR6 obtuvo altos valores de remoción de Ni<sup>2+</sup> en comparación con otras cepas algales del género *Chlorella* sp.. Por ejemplo, en un estudio hallaron una remoción de 20.1 mg g<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> para biomasa seca de *C. vulgaris* [163]. En otro trabajo, en el que también usaron biomasa seca de esta especie, encontraron un valor de  $q$  de 31.2 mg g<sup>-1</sup> [164]. Años después, los mismos autores realizaron un nuevo trabajo utilizando biomasa viva de *C. vulgaris*, donde obtuvieron un valor de  $q$  entre 16.9 - 27.5 mg g<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup> [17]; mientras que otra investigación reportó una remoción de 15.4 mg g<sup>-1</sup> para esta misma especie viva [144]. El trabajo de Mehta et al. fue el único estudio encontrado en el que aplicaron biomasa viva de *C. vulgaris* para la remoción de Ni<sup>2+</sup> que alcanzó un valor de remoción similar al de la cepa RR6, reportando una remoción de 165.5 mg g<sup>-1</sup> a una  $C_o$  de 29.3 mg L<sup>-1</sup> de metal [165]. Por su parte, RR8 fue la que mostró el mejor desempeño de las cepas analizadas pertenecientes a *Scenedesmus* sp., con un valor de  $q$  de 91.3 y 190 mg g<sup>-1</sup> para una solución de una  $C_o$  de 25 y 55 mg L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup>, respectivamente. Mientras que la cepa P1, también perteneciente al género *Scenedesmus*, fue la más prometedora dentro de las cepas aisladas del humedal del CTP, con un valor de  $q$  de 58 y 110 mg g<sup>-1</sup> para las dos concentraciones probadas ( $C_o = 25$  y 55 mg L<sup>-1</sup> de Ni<sup>2+</sup>, respectivamente) (Figura 8). Otros autores, al usar biomasa viva de *S. quadricauda*, encontraron una remoción de 18.19 y 64.25 mg g<sup>-1</sup> para  $C_o$  de 20 y 40 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (para ver detalles de las condiciones experimentales de los ensayos nombrados ir a Tabla 9) [69]. Es interesante destacar que cuando se compara la remoción de Ni<sup>2+</sup> con la de otros iones metálicos se observa que el valor de  $q$  de Ni<sup>2+</sup> suele ser menor para una variedad de algas [38,71,146–148,155,162,166,167]. Esta diferencia en la remoción podría deberse a características propias de cada elemento y/o sus diferentes toxicidades.

Conforme a una revisión exhaustiva de la literatura, se han encontrado pocas investigaciones en los últimos años que hayan estudiado la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  por medio de la utilización de algas unicelulares, más particularmente del género *Scenedesmus*. En la Tabla 9 se resumen los valores de remoción y las condiciones experimentales de diversos estudios que trataron la remediación de  $\text{Ni}^{2+}$  utilizando algas de los géneros *Chlorella* y *Scenedesmus*. Cabe mencionar que, por lo general, las investigaciones hacen uso de biomasa algal muerta, atribuyendo la remoción únicamente a un proceso de adsorción [11,69,142,115,167]. Mismo así, ya que no hay una estandarización en el diseño experimental, ni en las variables del sistema tales como el pH, la temperatura, el medio de cultivo, tiempo de contacto, etc., existe una dificultad para evaluar y comparar los resultados alcanzados [14,168]. Por lo que, la comparación entre los valores de  $q$  obtenidos por las algas del presente estudio y otras algas utilizadas en la literatura debe ser tomada con precaución. No obstante, como ya fue mencionado, las cepas algales estudiadas en este trabajo mostraron muy buenos resultados en términos de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$ , siendo la mayor  $E\% \approx 100\%$  y obteniendo altos valores de  $q$ .

**Tabla 9:** Comparación de la eficiencia porcentual ( $E\%$ ) y capacidad ( $q$  ( $\text{mg g}^{-1}$ )) de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  de las cepas utilizadas en el presente estudio (PE) con diferentes cepas de algas unicelulares y tratamientos. Se especifica la concentración inicial ( $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ )) de  $\text{Ni}^{2+}$  utilizada, pH, temperatura ( $T^\circ$  ( $^\circ\text{C}$ )), el tiempo de contacto (TC (minutos), a menos que indique en días (d)) y la cantidad de biomasa usada (CB ( $\text{g L}^{-1}$ )).

Especie	Tipo de biomasa (tratamiento)	Condiciones de ensayo					$E\%$	$q$	Ref.
		$C_0$	pH	$T^\circ$	TC	CB			
<i>C. sorokiniana</i>	Viva e inmovilizada (matriz de alginato)	50	5	$23 \pm 1$	180	0.3 g	51	20	[141]
<i>C. sorokiniana</i>	Seca	50	4 - 5	$25 \pm 2$	120	2.5	<i>n.d.</i>	$\approx 29$	[114]
	Inmovilizada (esponja de loofa)					1		$\approx 38$	
<i>C. vulgaris</i>	Viva	50.5	6	25	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	80.2	<i>n.d.</i>	[146]
<i>C. vulgaris</i>	Viva	100	5	25	120	2.5	52	15.4	[144]
	Seca						30	15.6	
	Inmovilizada (algas en polvo + matriz de alginato)						64	28.6	
<i>Chlorella</i> spp.	Viva	30	4.5	$26 \pm 1$	300	$5 \times 10^8$ cél $\text{mL}^{-1}$	50 - 70	27.5	[148]
<i>C. vulgaris</i>	Viva	29.3	5.5	$25 \pm 2$	180	0.1	<i>n.d.</i>	165.5	[165]
	Viva pretratamiento HCl 0.1 mM						<i>n.d.</i>	266.5	
<i>C. vulgaris</i>	Seca	24.6	4.5	25	1 d	1	68.7	16.9	[17]
		52.7					52.2	27.5	
<i>C. vulgaris</i>	Seca	42.4	4.5	25	120	1	<i>n.d.</i>	31.2	[164]
<i>C. vulgaris</i>	Seca	50	5	<i>n.d.</i>	90	1	<i>n.d.</i>	20.1	[163]
<i>C. vulgaris</i>	Seca	42.4	4.5	25	1 d	1	72.9	30.9	[145]
<i>C. vulgaris</i>	Seca	29.4	5.5	$25 \pm 1$	120	2	54.4	7.9	[147]
		58.7					<i>n.d.</i>	13.9	
<i>S. quadricauda</i>	Viva	40	6	25	720	0.42 $\text{mg L}^{-1}$	> 66	64.3	[69]
<i>S. quadricauda</i>	Viva	30	4.5	$26 \pm 1$	300	$5 \times 10^8$ cél $\text{mL}^{-1}$	99	16.9	[148]
<i>S. obliquus</i>	Seca	25.9	4.5	25	1 d	1	34.7	9	[145]
		41.7					29.5	12.3	
<i>Scenedesmus</i> sp. (cepa RR8)	Viva	25	5.5	21	1 d	0.30	100	91.3	PE
		55					100	190	
<i>Scenedesmus</i> sp. (cepa P1)	Viva	25	5.5	21	1 d	0.47	100	58	PE
		55					91.2	110	
<i>Chlorella</i> sp. (cepa RR6)	Viva	25	5.5	21	1 d	0.24	100	113	PE
		55					98.1	231	

*n.d.* no disponible, referido a datos no reportados en las referencias originales.

Los resultados de este trabajo mostraron que al aumentar la concentración inicial de  $\text{Ni}^{2+}$   $q$  incrementó de forma proporcional (Figura 8). Esto es consecuente con lo que se ha

encontrado en otros estudios, donde el aumento de la concentración de iones metálicos generó un incremento en capacidad de remoción de la biomasa [71,144,147,151,164]. La cantidad de metal removido por las algas depende de su concentración original en la solución. Se ha reportado que  $q$  aumenta inicialmente con un incremento en la concentración de metal, hasta que se alcanza el punto de saturación de los sitios de unión del alga después de superar cierto umbral de concentración [11,37,145]. Una  $C_0$  de metal más alta mejora la fuerza impulsora para superar la resistencia de la transferencia de masa de los iones metálicos entre la biomasa algal y la solución, aumentando así el valor de  $q$  [7]. Sumado a esto, el aumento de la  $C_0$  de iones metálicos genera un incremento en la probabilidad de colisiones entre estos y los sitios de unión de la biomasa, contribuyendo a mejorar el proceso de remoción [144,169].

## IV.2. Caracterización del crecimiento y tamaño celular

Las algas unicelulares son consideradas organismos con gran potencial biotecnológico, entre otras razones, porque poseen altas tasas de crecimiento que permiten conocer en pocos días la densidad celular y el efecto causado por el agente tóxico [14,170]. El estudio y la caracterización del crecimiento celular de las algas es de vital importancia para comprender la capacidad productiva a la hora de llevar a cabo procesos de remoción. Una baja densidad celular en los sistemas de cultivos algales representa una limitación para la producción a gran escala, generando un alto costo para la obtención de la biomasa [171]. La evaluación de la remoción de metal de las algas debe ser complementado con estudios de crecimiento celular, ya que no basta con que sean buenas remediadoras, sino que también deben poseer una buena tasa de crecimiento [41]. En este trabajo se evaluó la tasa de crecimiento en fase exponencial ' $\mu$ ', la máxima densidad celular obtenida y la biomasa seca final ( $BST$ ) de las 3 cepas seleccionadas (RR6, RR8 y P1), así como también se calculó el peso celular ( $PSTU$ ) y la relación superficie/volumen ( $A/V$ ) (Tabla 6 y 7).

Al analizar los resultados obtenidos, se observó que las curvas de crecimiento no mostraron una fase de latencia (fase lag) (Figura 10). Por lo que la adaptación al medio de cultivo sucedió en un tiempo menor a 24 horas, a pesar de la baja densidad celular del inóculo. Otros estudios también documentan una fase lag inexistente o menor a 24 horas [172–174]. Esto puede deberse a que cuando el cultivo stock en crecimiento exponencial se transfiere al mismo medio, en las mismas condiciones de crecimiento, suele no haber retraso y el crecimiento exponencial comienza inmediatamente [32]. Asimismo, está demostrado que

tanto *Chlorella* sp., como *Scenedesmus* sp. tienen una rápida adaptación a diversos medios de cultivo y, particularmente, han mostrado un buen crecimiento en BBM [175–177].

La fase de crecimiento exponencial se desarrolló desde el primer día de ensayo hasta el día 5 - 6 (Figura 10 y Figura A.I. 4, Anexo 1). En diversos estudios esta fase se prolongó entre 3 y 7 días [157,173,174,178], dependiendo de las condiciones de cultivo y de las algas empleadas. Durante este periodo, las células crecen y se dividen en función exponencial del tiempo, ya que ni los nutrientes ni la luz son factores limitantes para la división celular [179]. En este trabajo se analizó el crecimiento celular en “batch”, el cual corresponde a un sistema cerrado, por lo que el crecimiento exponencial es limitado. Diversos factores producen una disminución en la tasa de división celular, alcanzando una fase de crecimiento lineal, también llamada de “desaceleración”. La linealidad indica que el crecimiento de las algas se vio limitado por algún factor externo a la capacidad intrínseca de las células para reproducirse [180]. Al concluir la fase exponencial, las células se han multiplicado de tal manera que se produce un efecto de sombreado entre ellas, obstaculizando la captación de luz. Por lo general, la falta de luz es el principal factor limitante, ya que la penetración de esta es inversamente proporcional a la concentración celular [172,181]. En este estudio, la fase de crecimiento lineal se extendió por  $\geq 15$  días (Figura 10 y Figura A.I. 4, Anexo I). A partir de este punto la tasa de crecimiento disminuyó considerablemente; lo que pudo deberse a la acumulación de desechos tóxicos excretados por las propias células que inhiben el crecimiento, a limitaciones en la transferencia de masa de CO<sub>2</sub> y/o a que se agotaron progresivamente los nutrientes esenciales del medio [32]. Por lo que el cultivo alcanzó su máxima concentración celular, deteniendo su crecimiento y llegando a una fase estacionaria.

La fase estacionaria tuvo lugar a partir del día 20 – 26 de cultivo aproximadamente (Figura 10 y Figura A.I. 4, Anexo 1). Similar a lo reportado por Quevedo et al. y Kumar et al, donde esta etapa dio inicio entre los días 20 y 30 de cultivo para una cepa de *Scenedesmus* sp. y una de *C. vulgaris*, respectivamente [182,183]. Esta fase se caracteriza porque no hay aumento o disminución neta en la densidad celular, ya que los procesos de división y muerte celular se equilibran entre sí y, por lo tanto, la tasa de crecimiento de la población es cero [32]. La fase estacionaria tuvo una duración  $\geq 14$  días, mientras que la obtenida por Kumar et al. y Mehta et al. se extendió por un máximo de 10 días aproximadamente, alcanzado una fase de declinación celular a los 40 y 20 días de cultivo, respectivamente [157,183]. La viabilidad de las células eventualmente disminuye y comienzan a morir más de las que se dividen, lo que

es causado por las condiciones desfavorables del medio [32]. Esta fase de muerte celular se vio únicamente en la cepa P1, donde se pudo apreciar clorosis a los 40 días de iniciado el ensayo (Figura 11); mientras que para las cepas RR8 y RR6 el ensayo culminó antes de alcanzar la etapa de declinación.

La tasa de crecimiento exponencial ( $\mu$ ) más alta fue alcanzada por la cepa RR6 (*Chlorella* sp.) ( $\mu = 0.75$ ) (Tabla 6). El tamaño es un factor fundamental en la ecología de las algas. La composición bioquímica, el metabolismo y los procesos de crecimiento son dependientes del tamaño celular. Las algas más pequeñas, tal como *Chlorella* sp., suelen alcanzar tasas fotosintéticas más altas, tienen tasas de crecimiento específicas mayores, y poseen un transporte de nutrientes por unidad de biomasa más veloz con respecto a los géneros más grandes, como es el caso de *Scenedesmus* sp. [26,32,62]. Esto último es producto de una mayor relación de la superficie celular con respecto al volumen ( $A/V$ ). Entre las dos cepas de *Scenedesmus* sp. evaluadas, P1 mostró una menor tasa de crecimiento con respecto a RR8 ( $\mu_{P1} = 0.443 / \mu_{RR8} = 0.561$ ). Lo que sigue siendo consecuente con la diferencia de tamaño entre estas dos cepas, donde P1 mostró un tamaño significativamente mayor que RR8 (Tabla 7). La relación  $A/V$  siguió el orden inverso al tamaño, siendo la relación de  $RR6 > RR8 > P1$ , como era de esperarse. Hay que tener en cuenta que, así como la morfología esférica unicelular característica de *Chlorella* le aporta una mayor relación  $A/V$  [32], el hábito de agregado celular del género *Scenedesmus*, donde las células suelen encontrarse en cenobios conformados por 2, 4 y hasta 8 células, reduce su superficie de adsorción [37]. Por lo que las cepas RR8 y P1 poseen una relación  $A/V$  efectiva menor a la expresada en la Tabla 7.

Cabe destacar que la cepa P1 presentó mayor dificultad a la hora de realizar los recuentos celulares debido a su gran capacidad de agregación. Lo que también podría haber influido en su menor tasa de crecimiento y menor densidad celular con respecto a la cepa RR8, que acarrearón, a su vez, una menor producción de *BST* final (Tabla 6). Como fue discutido con anterioridad, la agregación celular disminuye la superficie efectiva de contacto entre el alga y la solución [26]. En este sentido, puede existir una reducción, entre otras cosas, de la difusión de gases y la capacidad de absorción de nutrientes [32]. Por otra parte, puede que la agregación de las células exacerbe los fenómenos de sombreado, donde las células del interior del agregado no reciban luz.

Debido a que la adsorción es un fenómeno de superficie, las diferencias de tamaño y relación  $A/V$  halladas entre las algas evaluadas se pueden corresponder con los altos valores de  $q$  que

obtuvo la cepa RR6 en los ensayos de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  con respecto a las cepas RR8 y P1 (Figura 8). Mismo así, RR8 presenta un menor tamaño y una mayor relación  $A/V$  que P1 (Tabla 7), lo que podría explicar, al menos en parte, su mayor  $q$  al presentar mayor superficie efectiva de adsorción.

A partir de los datos obtenidos, se evaluó la densidad celular máxima, la producción de *BST* y el *PSTU* para las cepas RR6, RR8 y P1 (Tabla 6 y 7). En este sentido, la cepa RR6 alcanzó concentraciones celulares mucho mayores, lo que era de esperarse debido a su mayor  $\mu$ . Sin embargo, a pesar de la alta densidad celular alcanzada, la producción de *BST* fue significativamente menor con respecto a las dos cepas de *Scenedesmus*. Con frecuencia, cepas algales que proporcionan concentraciones celulares mayores a otras, no presentan una producción de biomasa superior, esto se debe a cambios en el peso celular [72]; lo que es consecuente con el bajo valor de *PSTU* y el pequeño tamaño de RR6. Por su parte, RR8 obtuvo la mayor producción de *BST* entre las tres cepas evaluadas, a pesar de que su  $T_2$  fue mayor y su densidad celular final fue menor que la obtenida por RR6. La cepa RR8 alcanzó una concentración celular final 2.5 veces mayor que P1, mientras que el valor de *BST* fue solo 1.6 veces mayor (Tabla 6). Esto se corresponde con un mayor *PSTU* por parte de la cepa P1 (57% más), en línea con un mayor tamaño celular (Tabla 6 y 7). Es importante tener en cuenta que el tamaño no es razón suficiente para explicar la diferencia del *PSTU*, sino que también, puede haber otros factores como la acumulación de lípidos u otros compuestos que afecten significativamente el peso.

Los valores de  $\mu$  para algas unicelulares en cultivo autotrófico suelen darse en el rango de 0.2 - 0.7  $\text{día}^{-1}$  [178]. En la bibliografía se halló una gran variabilidad en las tasas de crecimiento exponencial para una misma especie algal, al igual que en los valores de producción de *BST*. Debido a que la tasa de crecimiento está influenciada por las condiciones del medio (pH, temperatura, luz, composición del medio de cultivo, agitación, etc.), así como por las características genéticas del propio organismo [32,33], los valores de  $\mu$  pueden diferir ampliamente.

El valor de  $\mu$  alcanzado en este trabajo por la cepa RR6 fue similar al reportado por Zheng et al. para *C. sorokiniana*, donde encontraron un crecimiento de  $0.73 \pm 0.05 \text{ día}^{-1}$  (medio de cultivo Kuhl, 27°C, volumen de 0.25 L, luz continua a  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , densidad celular inicial de  $2 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$  y suplementado con aire con 0.9%  $\text{CO}_2$  a una tasa de  $0.08 \text{ L min}^{-1}$ ) [172]. Sin embargo, la densidad celular final fue de  $261 \pm 29 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ , mucho mayor que

la alcanzada por la cepa RR6 ( $46.3 \pm 1.3 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>). La mayor densidad celular puede atribuirse a la adición de burbujeo con CO<sub>2</sub>, que aumenta la homogeneización del sistema y facilita el intercambio de gases [184], y a una exposición lumínica continua, ya que en los cultivos autotróficos la falta de luz es uno de los factores limitantes más importantes [181]. Además, el inóculo algal fue mucho mayor que el empleado para el cultivo de RR6 ( $1 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>). La cantidad de inóculo utilizada es una de las variables que determina tanto el valor de  $\mu$  como la duración de las fases de la curva de crecimiento [170]. Otros autores cultivaron *Chlorella* sp. en aguas residuales, encontrando valores de  $\mu$  entre 0.412 - 0.948 día<sup>-1</sup> (volumen: 100 mL,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con luz continua, 100 rpm) [174]. En este trabajo tampoco fue observada una fase lag y la fase exponencial tuvo una duración de 3 a 4 días, un tanto más corta que lo evaluado para la cepa RR6. Mientras que en otro estudio, obtuvieron un valor de  $\mu$  mucho menor, de  $0.278 \pm 0.001$  día<sup>-1</sup>, al cultivar *C. vulgaris* en BBM (volumen de cultivo de 25 mL,  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ , luz continua a  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , agitación de 150 rpm y una concentración inicial de  $1.18 \times 10^8$  cél mL<sup>-1</sup>) [175]. Estos autores alcanzaron una concentración celular máxima de  $3 \times 10^8 \pm 6 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> en el día 12 de cultivo, y una *BST* final de  $1.42 \pm 0.01$  g L<sup>-1</sup>, siendo ambos parámetros extensamente mayores que los obtenidos por RR6 a pesar del menor valor de  $\mu$ , lo que puede ser producto de la alta densidad celular del inóculo algal. Por su parte, en un estudio realizado por Kumar et al., consiguieron una *BST* final de 0.332 g L<sup>-1</sup> a los 30 días de cultivo de *C. vulgaris* (medio de cultivo Fog's , 17:7 hs de fotoperiodo,  $35^\circ\text{C}$ , volumen 200 mL) [183], menor a la obtenida por la cepa RR6 a un tiempo de cultivo comparable (0.446 g L<sup>-1</sup>).

Al comparar los parámetros de crecimiento obtenidos por las dos cepas de *Scenedesmus* sp. (P1 y RR8) con la bibliografía, se hallaron mayores valores de  $\mu$ . Por ejemplo, un estudio reportó un crecimiento de 0.76 día<sup>-1</sup> (medio BG11,  $25^\circ\text{C}$ , volumen 0.2 mL, concentración celular inicial  $6.5 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, intensidad lumínica  $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en un periodo de 14:10 hs) [22]. Esta diferencia puede deberse a contrastes en las condiciones experimentales, entre ellas se destacan la menor intensidad de luz y una densidad del inóculo mucho mayor, respecto a las utilizadas en este ensayo. Asimismo, Toranzo et al. también obtuvieron valores de  $\mu$  mayores a los alcanzados por RR8 y P1, entre 0.6 - 0.7 día<sup>-1</sup> para dos cepas de *S. dimorphus*. y un tiempo de duplicación ( $T_2$ ) de 1 día bajo condiciones experimentales similares (BBM, densidad del inóculo  $1 \times 10^5$  cél mL<sup>-1</sup>, volumen de 100 mL,  $21^\circ\text{C}$ ,  $80 \mu\text{mol fotón m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y 14 h de fotoperiodo) [185]. Mientras que en otro trabajo, el máximo valor de  $\mu$  obtenido para *Scenedesmus acutus* fue de 0.38 día<sup>-1</sup>, con un  $T_2$  de 2.62,

una densidad final de  $29.0 \pm 2.1 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup> y una *BST* de  $0.25 \pm 0.02$  g L<sup>-1</sup> (medio de cultivo 1/2 SS, densidad inóculo de  $3.50 \pm 0.47 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>, 23 – 25°C, 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>, 12:12, y un flujo de aire de 4 L/min (1.1 atm)) [21]. La densidad celular obtenida por estos autores fue similar a la presentada por la cepa RR8 ( $27.6 \pm 1.4 \times 10^6$  cél mL<sup>-1</sup>); no obstante, la producción de biomasa seca fue significativamente menor (Tabla 6), lo que podría indicar una diferencia en el valor de *PSTU* entre estas cepas, siendo RR8 más pesada. Por su parte, Quevedo et al. reportaron para *Scenedesmus* sp. una cantidad de biomasa aún menor a la obtenida por la cepa P1, *BST* de  $0.408 \pm 0.027$  g L<sup>-1</sup> (inóculo de 0.2 g L<sup>-1</sup>, temperatura ambiente de  $25 \pm 3$  °C, fotoperíodo 12:12 hs, intensidad lumínica de 12 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> y agitación de 200 rpm) [182], lo que pudo deberse a la baja exposición lumínica impartida en el experimento.

En este trabajo se observó una variabilidad marcada en la densidad celular diaria entre las réplicas de cada cepa, lo que puede atribuirse, en parte, a que el ensayo de crecimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, durante una época de mucha fluctuación a lo largo del día, particularmente entre el día y la noche, por lo que la temperatura no fue constante a lo largo del experimento. La temperatura es uno de los factores más sensible para el crecimiento de las algas unicelulares y las actividades metabólicas en las células [22,184].

Más allá del potencial de crecimiento intrínseco que pueda presentar cada cepa, la optimización de las condiciones de cultivo, para obtener la mayor densidad celular posible, tiene un gran peso a la hora de usar algas en sistemas de industrialización para lograr el nivel de eficiencia deseado [15]. El objetivo de este trabajo no trato la optimización de las condiciones de crecimiento para conocer la producción autótrofa máxima, por lo que no podemos descartar que frente a otro medio de cultivo u otras condiciones experimentales la cepa P1 muestre mejores tasas de crecimiento que la cepa RR8.

### IV.3. Caracterización del efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal.

La cantidad de biomasa algal es un factor que afecta fuertemente la remoción de metal [11]. El tamaño del inóculo también puede influir en la toxicidad que generan los metales sobre las células algales individuales [26]. La respuesta fisiológica de las distintas cepas puede variar debido al estrés ocasionado por el metal, su tolerancia y el porcentaje de células vivas [170]. La dosis de biomasa óptima, es decir, la menor concentración de algas a la que se obtiene la

mayor remoción de metal posible, es un parámetro sustancial para determinar el potencial de remediación de las algas.

La remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  por parte de las cepas RR6, RR8 y P1 fue evaluada a distintas densidades celulares iniciales ( $0.25 \times 10^7 - 2.5 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ). Los resultados mostraron que la concentración de algas afectó fuertemente la cantidad de metal removido de la solución, donde se observó un aumento de la  $E\%$  en función del incremento de la dosis de biomasa (Figura 14). Esto puede atribuirse a que, conforme aumenta la cantidad de algas, existe una mayor superficie de contacto que produce, a su vez, un aumento en la disponibilidad de sitios de unión para los iones metálicos. Mismo así, se ha estudiado que una concentración de biomasa más alta proporciona un incremento en las reacciones electrostáticas y en las interacciones entre los sitios de unión, favoreciendo la remoción [12,13,37]. Sin embargo, algunos trabajos observaron que la  $E\%$  disminuye con el aumento excesivo de biomasa. Esto se debe a limitaciones en la movilidad iónica y a la agregación parcial de las células algales, lo cual ocasiona una disminución del área de superficie efectiva para la biosorción [62,11]. El decrecimiento de la  $E\%$  no fue observada dentro de las dosis de biomasa evaluadas en este trabajo (Figura 14).

Al analizar el efecto de la biomasa algal sobre la remoción del metal en función de la cantidad de biomasa seca (expresada en  $\text{g L}^{-1}$ ) se pone en evidencia la gran diferencia que existe en los valores de  $PSTU$  entre cepas (Figura 14, Tabla 6). Por lo que, bajo una misma densidad celular, la biomasa de P1 fue significativamente mayor que la de RR8 y RR6 (Figura 14). La cepa P1 mostró una marcada disminución en la  $E\%$  a medida que la dosis de biomasa se redujo, lo que podría deberse a su mayor tamaño celular, menor relación  $A/V$  y a su característica de agregación celular que produce una reducción de su área de superficie tridimensional para la remoción [26,114].

En el caso de la cepa P1 se obtuvo una relación lineal del aumento de la  $E\%$  con respecto a la dosis de biomasa ( $R^2 = 0.97$ ) (Figura 14). Mientras que para la cepa RR8 se observó una tendencia decreciente de los valores de  $E\%$  a dosis de biomasa mayores. Siendo que, al incrementar de  $0.5 \times 10^7$  a  $1 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$  ( $0.15$  a  $0.30$   $\text{g L}^{-1}$ ) se removió tan solo un 15.7% más de  $\text{Ni}^{2+}$  (Figura 14). Esto es consecuente con una posible saturación de los sitios de adsorción y/o procesos de agregación de la biomasa que resultan en una disminución del área superficial efectiva de biosorción [26,51]. Sin embargo, RR8 alcanzó una  $E\%$  máxima a la mayor dosis empleada. Asimismo, la cepa RR8 obtuvo valores más altos de  $E\%$  que la cepa

P1 para todos los tratamientos. Como se mencionó con anterioridad, el mayor tamaño y la menor relación  $A/V$  de P1 podrían explicar estos resultados. Por su parte, la cepa RR6 mostró un salto en la  $E\%$ , de 72% a 100% al pasar de  $2 \times 10^7$  a  $2.5 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$  ( $0.19$  a  $0.24$  g  $\text{L}^{-1}$ ), mostrando una tendencia tipo sigmoidea en el aumento de la  $E\%$  (Figura 14). Las tres cepas obtuvieron la mayor  $E\%$  a la máxima dosis de biomasa evaluada; donde RR8 y RR6 alcanzaron un 100% y P1 un 91.2% de  $E\%$ . Por lo que se puede asumir que las densidades celulares evaluadas estaban dentro del punto crítico para obtener la mayor remoción, infiriendo que a partir de estas dosis se alcanza la máxima cantidad de sitios disponibles para obtener la mayor remoción de  $\text{Ni}^{2+}$ .

Muchos autores han investigado el efecto de la dosis de biomasa algal sobre la remoción de metal [12,40,46,62,140,67,115,151,186,187]. La bibliografía muestra que el aumento de la concentración de biomasa seca de *S. quadricauda* de  $0.05$  a  $0.7$  g  $\text{L}^{-1}$  produjo un aumento de 18.3% a 64% para  $\text{Cd}^{2+}$  y de 31.9% a 95% para  $\text{Pb}^{2+}$  [140]. En un estudio evaluaron el efecto de diferentes dosis de biomasa seca de *C. vulgaris* sobre la biosorción de  $\text{Cr}^{+3}$  en efluentes industriales, variando el inóculo de  $0.2$  -  $2.0$  g  $\text{L}^{-1}$ . Los datos revelaron que la biosorción incrementó con el aumento de la cantidad de biomasa, mostrando una dosis óptima a  $1$  g  $\text{L}^{-1}$ , con un 80% de remoción a 4 hs de ensayo, y se volvió constante a dosis más altas de biomasa [67]. En otro caso, probaron distintas concentraciones de biomasa seca de *C. vulgaris*, entre  $0.5$  -  $2$  g  $\text{L}^{-1}$ , para examinar el efecto sobre la remoción de  $\text{Cd}^{2+}$  a una  $C_0$  de  $100$  mg  $\text{L}^{-1}$ . Aquí observaron un aumento de la biosorción de metales al incrementar las dosis de biomasa, alcanzando la saturación a  $1$  g  $\text{L}^{-1}$  ( $\approx 78\%$   $E\%$ ) [183]. Asimismo, en una investigación en la que utilizaron *C. sorokiniana* y *S. quadricauda* para la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$ , encontraron un 53.3% y un 99% de  $E\%$ , respectivamente, para una densidad celular inicial de  $5 \times 10^8$  cél  $\text{mL}^{-1}$  ( $C_0 = 30$  mg  $\text{L}^{-1}$ ) [148]. La  $E\%$  de *S. quadricauda* es comparable con las obtenidas por RR8 y P1, sin embargo, la densidad celular inicial usada en el presente trabajo fue mucho menor ( $1 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ). Por su parte, *Chlorella* sp. (RR6) obtuvo una  $E\%$  del 100% a una densidad celular inicial significativamente menor ( $2.5 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$ ).

La obtención de una gran  $E\%$  de metal a la menor dosis de biomasa posible describe la aplicabilidad industrial del proceso a un bajo costo [62]. Otros trabajos que han evaluado diversas especies de algas unicelulares para la remoción de metales utilizaron dosis de biomasa ampliamente mayores a las empleadas en este estudio, de alrededor  $1$  g  $\text{L}^{-1}$ , obteniendo  $E\%$  comparables y/o menores (Tabla 9) [51,67,183]. Por lo que es importante

destacar el gran potencial de remoción que mostraron las cepas RR6, RR8 y P1 para la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  a dosis de biomasa relativamente bajas. En este sentido, las dosis de biomasa óptima para la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  seleccionadas fueron 0.30, 0.47 y 0.24 g  $\text{L}^{-1}$  para RR8, P1 y RR6, respectivamente; correspondiendo a una densidad celular de  $1 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$  para las dos cepas de *Scenedesmus* sp. y  $2.5 \times 10^7$  cél  $\text{mL}^{-1}$  para *Chlorella* sp. (Figura 14).

#### IV.4.Efecto del tiempo de contacto sobre la remoción de metal

El tiempo de contacto entre la biomasa algal y los iones metálicos juega un rol fundamental en su remoción [13]. El tiempo de contacto óptimo, es decir, el menor tiempo requerido para lograr la máxima remoción de metal, es uno de los factores clave para saber si la biomasa algal tiene potencial como remediador para desarrollar protocolos a mayor escala [12]. Una cepa algal ideal debe poder remover una gran cantidad del metal de la solución en un tiempo relativamente corto [3,62].

En el presente estudio, tras la exposición de las cepas RR8, RR6 y P1 a una solución con una  $C_0$  de 55 mg  $\text{L}^{-1}$  de  $\text{Ni}^{2+}$ , el curso temporal de la remoción mostró dos fases: una remoción inicial muy rápida en los primeros 5 minutos de ensayo, seguida de una remoción más lenta y gradual hasta las 3 horas (Figura 15.A). Esto coincide con trabajos anteriores que han observado el mismo comportamiento de remoción para diversos iones metálicos en distintos tipos de biomasa [40,62,63,114,121,132,148,157,160,164,168,186]. Por ejemplo, una cepa viva de *S. quadricauda* redujo un 97% de  $\text{Ni}^{2+}$  de la solución en los primeros 5 min de contacto ( $C_0 = 30$  mg  $\text{L}^{-1}$ ), alcanzando un 99% de  $E\%$  después de 90 minutos [148]. Este patrón de remoción puede deberse a que los sitios de unión de la superficie celular se encuentran, en primera instancia, disponibles y la concentración de iones metálicos en el medio es relativamente alta. En consecuencia, la tasa de adsorción aumenta rápidamente en la etapa inicial. Gradualmente, los sitios de unión se saturan, lo que da como resultado una disminución en la tasa de remoción a medida que la competencia entre los iones metálicos por los sitios de unión restantes se intensifica [12].

La rápida captación de los iones de  $\text{Ni}^{2+}$  que alcanzaron las cepas evaluadas sugiere que la remoción se produjo principalmente por mecanismos de adsorción [188]. Lo que concuerda con informes previos que demuestran una mayor proporción ( $\approx 70 - 90\%$ ) de iones metálicos en la superficie celular en comparación con la fracción intracelular [9,11,156,157,187]. Sin embargo, al trabajar con células vivas no se puede descartar que la acumulación intracelular

cumpla un papel en la remoción del metal [15]. A menudo, se ha visto que la biosorción se produce en dos etapas, que consisten en una rápida adsorción en la superficie del alga seguida de una lenta absorción al interior celular [39,46,67,169,189]. También se ha reportado que ambos procesos pueden ocurrir simultáneamente [65]. Por ejemplo, en un estudio observaron que la adsorción a la superficie celular contribuyó alrededor de un 80% en la remoción total de  $\text{Ni}^{2+}$  por *C. vulgaris*, saturando su capacidad de adsorción en tan solo 10 minutos de contacto; mientras que la captación intracelular aumentó a una velocidad casi constante hasta los 30 minutos de exposición, y luego disminuyó su tasa de absorción [157].

Al analizar el patrón de remoción de las algas evaluadas a lo largo del tiempo de exposición, se puede observar que la cepa RR8 presentó una curva de remoción típica de la bibliografía [34,190,144]. La cepa RR8 removió casi todo el metal suplementado a los 120 minutos de exposición al  $\text{Ni}^{2+}$ , alcanzando una  $E\%$  y  $q$  máximas (100% y  $167.8 \text{ mg g}^{-1}$ ) que permanecieron constante hasta casi el final del ensayo (Figura 15). Por lo que se puede indicar que el tiempo de contacto óptimo es de 120 minutos. En otros estudios se ha informado que la capacidad de biosorción podría alcanzar normalmente un tiempo óptimo durante los primeros 120 - 180 minutos [7,13,69,115,140,144].

Por su parte, las cepas RR6 y P1 mostraron un comportamiento diferente en la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$ . Tras la rápida remoción inicial, la tasa disminuyó gradualmente hasta las 3 horas, pero a las 24 horas se encontró una remoción adicional del 16% para P1 y 24% para RR6, alcanzando en este punto los valores de  $E\%$  y  $q$  máximas para ambas cepas ( $E\% = 90.3$  y  $86\%$ ,  $q = 190.3$  y  $140.6 \text{ mg g}^{-1}$ , para RR6 y P1, respectivamente) (Figura 15 y Figura A.II. 5, Anexo II). Este comportamiento puede deberse a múltiples factores, entre ellos podría ser producto de la captación intracelular de metal por mecanismos fisiológicos activos. Las algas vivas muestran un proceso de remoción más complejo que las células muertas debido a la asimilación celular [155]. Se ha reportado que la absorción toma un papel más importante en la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  cuando los sitios de unión de la superficie comienzan a saturarse [65]. También, se ha estudiado que a medida que se internalizan los iones metálicos se liberan sitios de la superficie celular para un nuevo proceso de adsorción [14]. Otros trabajos han manifestado que los sitios de unión de la pared celular de mayor afinidad son ocupados en los primeros minutos de exposición, dejando disponibles una baja cantidad de sitios de unión menos expuestos y/o con menor afinidad por los iones metálicos, lo que provoca una remoción adicional a una tasa de adsorción más lenta [168]. O bien, otra posible explicación

se puede atribuir a cambios morfológicos en el alga inducidos por el metal [135], que pueden provocar un aumento adicional en la remoción [191]. Se han observado desde remodelaciones de la pared celular, cambios en el grosor de la pared, en el tamaño celular y en la acumulación intracelular de proteínas o lípidos [161,192,193]. Asimismo, se ha visto por medio de análisis FT-IR que algunas algas exponen una mayor cantidad de grupos funcionales en la superficie celular en presencia de metales [36].

Las 3 cepas estudiadas sufrieron una disminución en la  $E\%$  a lo largo del experimento. Mientras que para RR8 se produjo una leve disminución a los 6 días de ensayo, las cepas RR6 y P1 mostraron un decrecimiento significativo en la  $E\%$  a las 48 horas, que continuó incrementándose hasta los 6 días (Figura 15.B. y Figura 16). Esto pudo deberse a una desorción de los iones metálicos adsorbidos en la pared celular [151], o a la posible expulsión de metal [24], que pudiese encontrarse internalizado en las células, producto de un aumento excesivo de la toxicidad [11]. Particularmente para la cepa RR6, hubo una disminución en la densidad celular en el día 6 de ensayo, mientras que en el día 10 el cultivo se halló muerto, lo que podría explicar el aumento de  $Ni^{2+}$  en la solución por la posible liberación del contenido intracelular. A diferencia de la biomasa muerta, la biomasa viva es afectada por múltiples factores del medio circundante tal y como la acumulación de sustancias tóxicas, la falta de nutrientes, el pH, la temperatura, y la misma toxicidad que el metal puede producir en ellas [14]. Diversos estudios han reportado la inhibición del crecimiento de cepas del género *Chlorella* por la exposición a  $Ni^{2+}$  y otros metales [5,71,135]. Sumado a esto, las células pequeñas son más sensibles a la presencia de metales que las especies más grandes debido a su mayor relación  $A/V$  [26].

En el caso de P1, en el día 10 de ensayo hubo un aumento en la  $E\%$  y el cultivo se mantuvo viable, por lo que esta cepa fue más resistente que RR6. La tolerancia de la cepa P1 frente a la exposición prolongada al  $Ni^{2+}$  podría deberse, en primer lugar, a características morfológicas propias del alga. Como parte del mismo fenómeno de agregación y el mayor tamaño celular de la cepa P1, rasgos que proporcionan una menor relación  $A/V$ , la resistencia difusional a la transferencia de masa es mayor, es posible que la mayor parte de la superficie interna de la célula no se utilice para remoción de  $Ni^{2+}$ ; en consecuencia se podría atribuir un menor efecto a la toxicidad del metal y, a su vez, se condice con su menor  $E\%$  y  $q$  [194]. Asimismo, estas dos especies también pueden tener diferente composición y estructura de las paredes celulares, lo que afectaría la unión del metal y sus efectos adversos en ellas [26,114].

En segundo lugar, P1 fue aislada de un humedal donde se han registrado concentraciones anormales de  $\text{Ni}^{2+}$ , mientras que para la cepa RR6 el  $\text{Ni}^{2+}$  no está establecido como uno de los mayores contaminantes naturales del RR [75]. Numerosos autores han sugerido que las poblaciones de algas unicelulares expuestas a ambientes contaminados podrían haber desarrollado una mayor tolerancia a este metal por medio de diversas estrategias adaptativas [34,58,195,196].

Un rápido proceso de remoción tiene una importancia práctica significativa para reducir el tamaño del reactor, el área de instalación y los recursos humanos, aumentando así la producción y economizando el sistema [69,169]. Sobre la base de los experimentos realizados, a la hora de plantear un protocolo de remoción de metal a mayor escala se recomienda que la cepa RR8 sea utilizada en un tiempo de contacto de 120 min para remover  $\text{Ni}^{2+}$  a una  $C_0$  de  $55 \text{ mg L}^{-1}$ . Por su parte, para las cepas P1 y RR6 el tiempo de contacto óptimo se dio a las 24 horas de ensayo. Sin embargo, para obtener mayor precisión en este parámetro sería conveniente plantear un nuevo ensayo de remoción con mayor cantidad de puntos entre las 3 y las 24 horas de exposición, ya que no se puede asumir que la  $E\%$  y  $q_{max}$  evaluados sean efectivamente los valores máximos.

En la bibliografía se puede apreciar que los ensayos de evaluación del efecto del tiempo de contacto suelen realizarse en lapsos menores a 24 horas [24,44,51,141,156], por lo que puede haber una remoción adicional y/o procesos de desorción, excreción de metal, etc. que no sean contemplados. Sumado a esto, tal y como se ha nombrado con anterioridad, el uso de biomasa muerta es más frecuente que el de biomasa viva [11,15,141], por lo que la remoción se atribuye solamente a un proceso de adsorción y no existen efectos de toxicidad sobre el alga, ni efectos de remoción por absorción.

#### IV.5. Modelos cinéticos de remoción

Los estudios cinéticos proporcionan información sobre el tiempo requerido para completar el proceso de biosorción y permiten indagar sobre el orden de la reacción y los mecanismos que limitan la velocidad de remoción [13,25,34]. Los parámetros cinéticos son esenciales a la hora de plantear un proyecto de optimización en la industria, ya que la cinética del sistema determina el tiempo de retención de la biomasa y las dimensiones del reactor [7,62,197].

Los modelos cinéticos se emplean para analizar y describir el comportamiento transitorio del proceso de biosorción a lo largo del tiempo. Estos modelos pueden estar basados en

interacciones químicas o en procesos de difusión. Aquellos basados en interacciones químicas, que incluyen desde reacciones químicas, a intercambio iónico, complejación, etc., ignoran la influencia de los diversos pasos de difusión que ocurren antes de la interacción de los sitios de unión de la biomasa con los iones metálicos. Por su parte, los modelos basados en difusión no toman en cuenta la interacción de los sitios de unión con los iones metálicos. Dentro de los proceso de difusión, sólo la transferencia de masa externa y la difusión intrapartícula tienen un papel fundamental en la determinación de la velocidad [25,122].

Los modelos aplicados en este trabajo fueron la ecuación de pseudo primer orden (PPO), la ecuación de pseudo segundo orden (PSO) y la ecuación de Elovich, que suelen ser los más empleados en la literatura [49,52,56,57]. Por su parte, el modelo de difusión intrapartícula fue probado, según lo propuesto por Ho et al. [122], para diferenciar si se produjo un control cinético y/o de difusión en la velocidad de remoción. La cinética de remoción se evaluó en un lapso de hasta 3 horas; la elección de estos tiempos se debe a que se pueden interpretar los datos de remoción más exclusivamente a procesos de adsorción [24,122,132]. De forma muy general, si el sistema alcanza un estado de equilibrio entre la concentración de iones metálicos en la superficie de la biomasa y en la solución circundante en un tiempo menor a 3 horas el proceso suele ser controlado cinéticamente y, por encima de las 24 horas, es controlado por procesos de difusión. Entre las 3 y 24 horas uno o ambos procesos se pueden desempeñar como limitantes de la velocidad [122]. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los efectos de los fenómenos de transporte y las reacciones químicas a menudo son inseparables experimentalmente [50]. Cabe señalar que, a diferencia del proceso de adsorción, la captación intracelular no debe considerarse un proceso de equilibrio [14]; por lo que en este estudio, producto de que se utilizó biomasa viva, nos pareció más apropiado referirnos a un “estado estacionario” de remoción.

Los resultados mostraron que tanto el modelo cinético de PSO como el de Elovich se ajustaron bien a los datos experimentales (Figura 18 a 21). Se encontró que los valores de  $q_e$  obtenidos por los modelos y los obtenidos experimentalmente fueron similares. Consiguiendo, en términos generales, un mejor ajuste lineal para el modelo de PSO, y un mejor ajuste no lineal para el modelo de Elovich (Tabla 8). Debido a esto, fue imposible concluir cual modelo resulta más apropiado. La aplicabilidad de estos dos modelos para explicar la cinética de la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  sugiere que el paso limitante de la velocidad en el tiempo evaluado podría ser la quimiosorción, involucrando fuerzas de valencia a través del

intercambio iónico o uniones covalentes entre la biomasa y los iones metálicos, además de mecanismos de complejación, coordinación, y/o quelación; y que, por su parte, los procesos de difusión no serían limitantes de la velocidad de reacción [52,198]. No obstante, el hecho de que los datos experimentales puedan ser ajustados a un modelo no es evidencia suficiente para asignarle un mecanismo al proceso de remoción. Un factor de complicación adicional es que el proceso de control de la velocidad puede cambiar a lo largo del tiempo [122].

En general, la ecuación de PSO se ha aplicado con éxito a los datos de remoción de iones metálicos en una gran cantidad de especies de algas [3,7,50,52,56,115,114]. El modelo de PSO se basa en el hecho de que los iones metálicos desplazan los iones alcalinotérreos ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , etc.) de los sitios de unión. Por lo que la remoción puede considerarse una reacción de segundo orden, donde la cinética se modela asumiendo que la tasa de ocupación de los sitios de unión es proporcional al cuadrado del número de sitios desocupados en la biomasa [43]. Los parámetros cinéticos de PSO obtenidos en este estudio se encuentran dentro del rango de valores encontrados en la literatura para la adsorción de  $\text{Ni}^{2+}$  por parte de otras cepas algales (Tabla 10).

**Tabla 10:** Comparación de parámetros cinéticos del modelo de PSO de remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  de las cepas utilizadas en el presente estudio (PE) con otros trabajos. Se especifica la concentración inicial ( $C_0$  ( $\text{mg L}^{-1}$ )) de  $\text{Ni}^{2+}$ , pH, temperatura ( $T^\circ$  ( $^\circ\text{C}$ )), tiempo para llegar a estado estacionario (TE, en minutos a menos que indique en días (d)) y cantidad de biomasa usada (CB ( $\text{g L}^{-1}$ ));  $q$  obtenido experimentalmente ( $q_{exp}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ )),  $q$  obtenido por modelo de PSO ( $q_{e.m2}$  ( $\text{mg g}^{-1}$ )), constante de velocidad de PSO ( $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )) y el coeficiente lineal ( $R^2$ ).

Especie	Tipo de biomasa	Condiciones de ensayo					$q_{e.exp}$	$q_{e.m2}$	$k_2$	$R^2$	Ref.
		$C_0$	pH	$T^\circ$	TE	CB					
<i>C. vulgaris</i>	Viva	100	5	Amb.	60	2.5	<i>n.d.</i>	15.4	0.0113	-	[144]
<i>C. vulgaris</i>	Seca	10	5.5	Amb.	30	0.1	$\approx 7^*$	7.14	0.0127	0.997	[115]
<i>C. vulgaris</i>	Viva	58.7	5.5	$25 \pm 2$	90	0.1	$\approx 165^*$	165.5	0.0013	<i>n.d.</i>	[165]
<i>C. sorokiniana</i>	Inmóvil (alginato)	50	5	$23 \pm 1$	180	0.3 g	19.3	20.2	0.0054	0.999	[141]
<i>S. quadricauda</i>	Viva	40	6.6	$25 \pm 2$	200	0.42	64.3	55.7	0.0005	0.991	[69]
<i>S. quadricauda</i>	Inmóvil (Ca-alginato)	100	5	25	90	1 g alga + ca- alg.	27.3	27.8	0.004	0.990	[166]
<i>Scenedesmus</i> sp. (cepa RR8)	Viva	55	5.5	21	180	0.30	166.9	167.5	0.0034	0.999	PE
<i>Scenedesmus</i> sp. (cepa P1)	Viva	55	5.5	21	120	0.47	108.1	108.3	0.0251	1	PE
<i>Chlorella</i> sp. (cepa RR6)	Viva	55	5.5	21	180	0.24	142.4	143.3	0.0046	0.999	PE

*n.d.* no disponible, referido a datos no reportados en las referencias originales. \*datos de  $q$  tomados de gráfico.

Por su parte, el modelo de Elovich es una ecuación empírica que generalmente se aplica para explicar procesos de quimisorción. Aunque no proporciona ninguna evidencia mecanicista, ha demostrado ser adecuada para emplear en sistemas en los cuales la superficie de adsorción es heterogénea, es decir, los sitios activos de la biomasa exhiben diferentes energías de activación, basándose en un mecanismo de reacción de segundo orden [57,199]. Por ejemplo, encontró un buen ajuste a ese modelo para la remoción de  $\text{Cr}^{+3}$  y  $\text{Pb}^{+2}$  en *Cyclotella meneghiniana* [51].

A partir de todos los datos obtenidos, podemos expresar que la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en estas cepas parece darse principalmente por un proceso de adsorción rápido durante los primeros minutos de exposición al metal; alcanzando una remoción máxima a los 120 minutos para la cepa RR8. Mientras que para las cepas RR6 y P1 se estaría dando adicionalmente un proceso de remoción que podría ser de absorción intracelular, a una tasa más lenta, alcanzando su máxima  $E\%$  registrada recién a las 24 horas de ensayo.

#### IV.6. Consideraciones finales

Los efluentes industriales son extensamente complejos, en ellos coexisten una gran variedad de metales y especies metálicas, además de diversos compuestos orgánicos [3,25,31]. Para que la tecnología de remediación sea efectiva y económica es esencial que se reduzcan de manera eficiente las concentraciones de metales a niveles ambientalmente aceptables, así como también ser aplicable en condiciones de campo, tales como efluentes y cuerpos acuáticos [26]. No obstante, hay que tener en cuenta que, al igual que en este trabajo, la mayoría de los estudios de remediación se realizan utilizando soluciones sintéticas en un laboratorio bajo condiciones controladas. Sumado a esto, las investigaciones suelen estar basadas en la evaluación de una sola cepa algal y un solo metal, por lo que no se valoran condiciones experimentales que se asemejen a las reales [200]. Debido a lo cual, no se puede asegurar que las cepas algales sean adecuadas para aplicaciones a gran escala. Por ejemplo, en aguas residuales industriales, como las de galvanoplastia, preparación de aleaciones, fundición, electrónica y fabricación de baterías se encuentran con frecuencia el  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  asociados. Por lo que el desarrollo de tecnologías de remediación requiere de estudios de soluciones multimetales que provean una representación más aproximada a los problemas ambientales existentes [17,155,168,196,201], o mismo así, utilizar efluentes reales para superar estas limitaciones [14].

Para obtener verdaderos beneficios de la ficorremediación se debe investigar el potencial de biosorción de varias especies de algas utilizando aguas residuales reales [34]. A futuro se planea ensayar la remoción a partir de una matriz de lixiviados obtenidos del humedal del CTP, que contienen Ni y  $UO_6$ , y así poder desarrollar protocolos para escalar el proceso de remediación del respectivo humedal de forma eficiente. En estos ensayos se probarán las 3 cepas estudiadas en este trabajo, debido a que las condiciones experimentales en las que se evaluaron aquí (soluciones de medio formulado, monometálicas) son diferentes a las del lixiviado y, por lo tanto, las eficiencias y capacidades de remoción por parte de las algas podrían diferir. Mismo así, no descartamos la posibilidad de trabajar combinando cepas en el proceso de remoción, ya que la diversidad de estrategias de captación de metal que presentan le podría otorgar versatilidad al sistema de remediación. Por lo que además, el conocimiento de los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que confieren resistencia al metal en cada cepa algal son de suma importancia [65].

## V. Conclusiones

Este estudio reveló que las cepas algales evaluadas, aisladas de sitios contaminados, presentaron un gran potencial como remediadoras de  $\text{Ni}^{2+}$  en soluciones formuladas y en condiciones de laboratorio. Mostrando  $E\%$  comparables y/o mayores a las reportadas en la bibliografía, mientras que los valores de  $q$  de  $\text{Ni}^{2+}$  obtenidos superaron ampliamente a los encontrados en la literatura para los géneros *Scenedesmus* y *Chlorella* (Tabla 9). En términos generales, las cepas más pequeñas (con mayor relación  $A/V$ ) mostraron una mayor tasa de crecimiento  $\mu$  y mayores valores de  $q$ . Tanto la dosis de biomasa utilizada como el tiempo de exposición al metal influyeron fuertemente en la captación de metal. La  $E\%$  aumento en función del incremento de la dosis de biomasa, alcanzando altas  $E\%$  de  $\text{Ni}^{2+}$  a bajas dosis ( $\leq 0.47 \text{ g L}^{-1}$ ). Mismo así, parece ser que la adsorción de  $\text{Ni}^{2+}$  es el mecanismo predominante de remoción, siendo muy rápida dentro de los primeros minutos de ensayo. Además, el estudio cinético manifestó un mejor ajuste a los datos experimentales por parte del modelo de PSO y de Elovich, donde la quimiosorción podría actuar como el mecanismo que controla la tasa de adsorción de  $\text{Ni}^{2+}$ .

A partir de los resultados obtenidos, se propone trabajar con la cepa RR8 para la remoción de  $\text{Ni}^{2+}$  en medios formulados, debido a que presentó un 100% de  $E\%$  y altos valores de  $q$  en tan solo 120 minutos de exposición, y a una dosis de biomasa pequeña ( $0.3 \text{ g L}^{-1}$ ). La rápida remoción alcanzada por RR8 tiene una importancia práctica significativa, ya que facilita el uso de reactores de menor volumen, aumentando la eficiencia y economizando el proceso [69]. Pese a que la tasa de crecimiento de RR8 no fue la más alta dentro de las cepas evaluadas, obtuvo la mayor cantidad de  $BST$  para un tiempo de cultivo menor que RR6 y P1, lo que reduce costos de producción. En cuanto a las otras dos cepas, RR6 alcanzó la mayor tasa de crecimiento, así como también el valor más alto de  $q$ ; pero la remoción máxima se dio para un lapso de aproximadamente 24 horas, por lo que el proceso fue más lento. Por último, la cepa P1 presentó una buena tolerancia a la exposición prologada de  $\text{Ni}^{2+}$ , pero obtuvo menores valores de  $E\%$  y  $q$  para un tiempo de remoción de 24 horas, sumado a esto, no fue una cepa de fácil crecimiento debido a su gran agregación.

## VI. Bibliografía

- [1] Ali H, Khan E. What are heavy metals? Long-standing controversy over the scientific use of the term ‘heavy metals’ – proposal of a comprehensive definition. *Toxicological & Environmental Chemistry* 2018;100:6–19. <https://doi.org/10.1080/02772248.2017.1413652>.
- [2] Pourret O, Bollinger J-C. “Heavy metal” - What to do now: To use or not to use? *Science of The Total Environment* 2018;610–611:419–20. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.043>.
- [3] Areco MM, Haug E, Curutchet G. Studies on bioremediation of Zn and acid waters using *Botryococcus braunii*. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 2018;6:3849–59. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.05.041>.
- [4] Bonanno G, Borg JA, Di Martino V. Levels of heavy metals in wetland and marine vascular plants and their biomonitoring potential: A comparative assessment. *Science of The Total Environment* 2017;576:796–806. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.171>.
- [5] Afkar E, Ababna H, Fathi AA. Toxicological Response of the Green Alga *Chlorella vulgaris*, to Some Heavy Metals. *American Journal of Environmental Sciences* 2010;6:230–7. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2010.230.237>.
- [6] Abbas SH, Ismail IM, Mostafa TM, Sulaymon AH. Biosorption of Heavy Metals: A Review. *Journal of Chemical Science and Technology* 2014;3:74–102.
- [7] Pahlavanzadeh H, Keshtkar AR, Safdari J, Abadi Z. Biosorption of nickel(II) from aqueous solution by brown algae: Equilibrium, dynamic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials* 2010;175:304–10. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.004>.
- [8] Alyüz B, Veli S. Kinetics and equilibrium studies for the removal of nickel and zinc from aqueous solutions by ion exchange resins. *Journal of Hazardous Materials* 2009;167:482–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.01.006>.
- [9] Monteiro CM, Marques APGC, Castro PML, Xavier Malcata F. Characterization of *Desmodesmus pleiomorphus* isolated from a heavy metal-contaminated site: biosorption of zinc. *Biodegradation* 2009;20:629–41. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9250-6>.
- [10] Shamim S. Biosorption of Heavy Metals. *Biosorption*, InTech; 2018. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72099>.
- [11] Monteiro CM, Castro PML, Malcata FX. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnological Progress* 2012;28:299–311. <https://doi.org/10.1002/btpr.1504>.
- [12] Abdel-Ghani NT, El-Chaghaby GA. Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: A review of recent studies. *Journal of Environmental Science and Technology* 2014:19.
- [13] Vishan I, Saha B, Sivaprakasam S, Kalamdhad A. Evaluation of Cd(II) biosorption in aqueous solution by using lyophilized biomass of novel bacterial strain *Bacillus badius*

- AK: Biosorption kinetics, thermodynamics and mechanism. *Environmental Technology & Innovation* 2019;14:100323. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100323>.
- [14] Mantzorou A, Navakoudis E, Paschalidis K, Ververidis F. Microalgae: a potential tool for remediating aquatic environments from toxic metals. *International Journal Environmental Science and Technology* 2018;15:1815–30. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1783-y>.
- [15] Zeraatkar AK, Ahmadzadeh H, Talebi AF, Moheimani NR, McHenry MP. Potential use of algae for heavy metal bioremediation, a critical review. *Journal of Environmental Management* 2016;181:817–31. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.06.059>.
- [16] Monteiro CM, Castro PML, Xavier Malcata F. Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environmental Chemistry Letters* 2009;9:169–76. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0258-2>.
- [17] Aksu Z, Dönmez G. Binary biosorption of cadmium(II) and nickel(II) onto dried *Chlorella vulgaris*: Co-ion effect on mono-component isotherm parameters. *Process Biochemistry* 2006;41:860–8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.025>.
- [18] Tien C-J. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface characteristics. *Process Biochemistry* 2002;38:605–13. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00183-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00183-8).
- [19] John J. A self-sustainable remediation system for acidic mine voids. Bangkok: International Association of Water Quality 2000a:506–11.
- [20] Das A, Adhikari S, Kundu P. Bioremediation of Wastewater Using Microalgae. In: Kundu R, Narula R, Paul R, Mukherjee S, editors. *Environmental Biotechnology For Soil and Wastewater Implications on Ecosystems*, Singapore: Springer Singapore; 2019, p. 55–60. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-6846-2\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-13-6846-2_8).
- [21] Doria E, Longoni P, Scibilia L, Iazzi N, Cella R, Nielsen E. Isolation and characterization of a *Scenedesmus acutus* strain to be used for bioremediation of urban wastewater. *J Appl Phycol* 2012;9.
- [22] Xin L, Hong-ying H, Yu-ping Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. under different cultivation temperature. *Bioresource Technology* 2011;102:3098–102. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.10.055>.
- [23] Das N, Vimala R, Karthika P. Biosorption of heavy metals—An overview. *INDIAN J BIOTECHNOL* 2008.
- [24] Saavedra R, Muñoz R, Taboada ME, Vega M, Bolado S. Comparative uptake study of arsenic, boron, copper, manganese and zinc from water by different green microalgae. *Bioresource Technology* 2018;263:49–57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.101>.
- [25] Kumar D, Pandey LK, Gaur JP. Metal sorption by algal biomass: From batch to continuous system. *Algal Research* 2016;18:95–109. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2016.05.026>.

- [26] Kumar SK, Dahms H-U, Won E-J, Lee J-S, Shin K-H. Microalgae – A promising tool for heavy metal remediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2015;113:329–52. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.12.019>.
- [27] Gani P, Sunar NM, Matias-Peralta HM, Latiff AAA, Parjo UK, Embong Z, et al. The potential of biodiesel production from *Botryococcus* sp. biomass after phycoremediation of domestic and industrial wastewater. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* 2016;160:012048. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/160/1/012048>.
- [28] Gani P, Sunar NM, Matias-Peralta H, Latiff AAA, Parjo K, Razak ARA. Phycoremediation of Wastewaters and Potential Hydrocarbon from Microalgae: A Review. *Advances in Environmental Biology* 2015;9:1–8.
- [29] Henriques B, Lopes CB, Figueira P, Rocha LS, Duarte AC, Vale C, et al. Bioaccumulation of Hg, Cd and Pb by *Fucus vesiculosus* in single and multi-metal contamination scenarios and its effect on growth rate. *Chemosphere* 2017;171:208–22. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.086>.
- [30] González F, Romera E, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JÁ, García-Balboa C. Algal Biosorption and Biosorbents. In: Kotrba P, Mackova M, Macek T, editors. *Microbial Biosorption of Metals*, Dordrecht: Springer Netherlands; 2011, p. 159–78. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5_7).
- [31] Chu W-L, Phang S-M. Biosorption of Heavy Metals and Dyes from Industrial Effluents by Microalgae. In: Alam MdA, Wang Z, editors. *Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment*, Singapore: Springer Singapore; 2019, p. 599–634. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-981-13-2264-8_23).
- [32] Madigan MT, editor. *Brock biology of microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2012.
- [33] Andersen RA. *Algal culturing techniques*. Elsevier; 2005.
- [34] Liyanage LMM, Lakmali WGM, Athukorala SNP, Jayasundera KB. Application of live *Chlorococcum aquaticum* biomass for the removal of Pb(II) from aqueous solutions. *J Appl Phycol* 2020. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02242-w>.
- [35] Mehta SK, Gaur JP. Use of Algae for Removing Heavy Metal Ions From Wastewater: Progress and Prospects. *Critical Reviews in Biotechnology* 2005;25:113–52. <https://doi.org/10.1080/07388550500248571>.
- [36] Ferraro G, Toranzo R, Castiglioni D, Lima J E, Mansilla M, Fellenz N, et al. Zinc removal by *Chlorella* sp. biomass and harvesting with low cost magnetic particles. *Algal Research* 2018:266–76.
- [37] Manzoor F, Karbassi A, Golzary A. Removal of Heavy Metal Contaminants from Wastewater by Using *Chlorella vulgaris* Beijerinck: A Review. *CEM* 2019;6:174–87. <https://doi.org/10.2174/2212717806666190716160536>.
- [38] Rugnini L, Costa G, Congestri R, Bruno L. Testing of two different strains of green microalgae for Cu and Ni removal from aqueous media. *Science of The Total Environment* 2017;601–602:959–67. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.222>.

- [39] Kaplan D. Absorption and Adsorption of Heavy Metals by Microalgae. In: Richmond A, Hu Q, editors. Handbook of Microalgal Culture, Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2013, p. 602–11. <https://doi.org/10.1002/9781118567166.ch32>.
- [40] Gupta VK, Rastogi A, Nayak A. Biosorption of nickel onto treated alga (*Oedogonium hatei*): Application of isotherm and kinetic models. Journal of Colloid and Interface Science 2010;342:533–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2009.10.074>.
- [41] Jais NM, Mohamed RMSR, Al-Gheethi AA, Hashim MKA. The dual roles of phycoremediation of wet market wastewater for nutrients and heavy metals removal and microalgae biomass production. Clean Techn Environ Policy 2017;19:37–52. <https://doi.org/10.1007/s10098-016-1235-7>.
- [42] Naja M, Murphy V, Volesky B. Biosorption, metals. Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology 2010:1–29.
- [43] Brinza L, Dring MJ, Gavrilescu M. Marine micro and macro algal species as biosorbent for heavy metals. Environ Eng Manag J 2007;6:237–51. <https://doi.org/10.30638/eemj.2007.029>.
- [44] Flouty R, Estephane G. Bioaccumulation and biosorption of copper and lead by a unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* in single and binary metal systems: A comparative study. Journal of Environmental Management 2012;111:106–14. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.06.042>.
- [45] Chojnacka K, Chojnacki A, Górecka H. Biosorption of Cr<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> ions by blue–green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. Chemosphere 2005;59:75–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.005>.
- [46] Tüzün İ, Bayramoğlu G, Yalçın E, Başaran G, Çelik G, Arıca MY. Equilibrium and kinetic studies on biosorption of Hg(II), Cd(II) and Pb(II) ions onto microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. Journal of Environmental Management 2005;77:85–92. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2005.01.028>.
- [47] Wang S, Zhang D, Pan X. Effects of cadmium on the activities of photosystems of *Chlorella pyrenoidosa* and the protective role of cyclic electron flow. Chemosphere 2013;93:230–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.070>.
- [48] Azizian S. Kinetic models of sorption: a theoretical analysis. Journal of Colloid and Interface Science 2004;276:47–52. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.03.048>.
- [49] Ho Y. Review of second-order models for adsorption systems. Journal of Hazardous Materials 2006;136:681–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.12.043>.
- [50] Park D, Yun Y-S, Park JM. The past, present, and future trends of biosorption. Biotechnol Bioproc E 2010;15:86–102. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0199-4>.
- [51] Rearte TA. Acumulación de lípidos y biosorción de metales en microalgas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires., 2016.
- [52] Febrianto J, Kosasih AN, Sunarso J, Ju Y-H, Indraswati N, Ismadji S. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. Journal of Hazardous Materials 2009;162:616–45. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.06.042>.

- [53] Lagergren S. Zurtheorie der sogenannten adsorption gelösterstoffe. Kungliga Sevenska Vetenskapakademiens, Handlingar 1898:1–39.
- [54] Ho Y-S. Absorption of heavy metals from waste streams by peat. d\_ph. University of Birmingham, 1995.
- [55] Zeldowitsch J. Über den mechanismus der katalytischen oxydation von CO an MnO<sub>2</sub>. Acta Physicochim URSS 1934;1:364–449.
- [56] Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances* 2009;27:195–226. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.11.002>.
- [57] Ho YS, McKay G. Application of Kinetic Models to the Sorption of Copper(II) on to Peat. *Adsorption Science & Technology* 2002;20:797–815. <https://doi.org/10.1260/026361702321104282>.
- [58] Monteiro CM, Castro PML, Malcata FX. Capacity of simultaneous removal of zinc and cadmium from contaminated media, by two microalgae isolated from a polluted site. *Environ Chem Lett* 2011;9:511–7. <https://doi.org/10.1007/s10311-011-0311-9>.
- [59] Zhou G-J, Ying G-G, Liu S, Zhou L-J, Chen Z-F, Peng F-Q. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. *Environmental Science Processes & Impacts* 2014;16:2018–27. <https://doi.org/10.1039/c4em00094c>.
- [60] García-Balboa C, Baselga-Cervera B, García-Sánchez A, Igual JM, Lopez-Rodas V, Costas E. Rapid adaptation of microalgae to bodies of water with extreme pollution from uranium mining: An explanation of how mesophilic organisms can rapidly colonise extremely toxic environments. *Aquatic Toxicology* 2013;144–145:116–23. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.003>.
- [61] Chen C-Y, Chang H-W, Kao P-C, Pan J-L, Chang J-S. Biosorption of cadmium by CO<sub>2</sub>-fixing microalga *Scenedesmus obliquus* CNW-N. *Bioresource Technology* 2012;105:74–80. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.124>.
- [62] Pradhan D, Sukla LB, Mishra BB, Devi N. Biosorption for removal of hexavalent chromium using microalgae *Scenedesmus* sp. *Journal of Cleaner Production* 2019;209:617–29. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.10.288>.
- [63] Monteiro CM, Castro PML, Xavier Malcata F. Biosorption of zinc ions from aqueous solution by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Environ Chem Lett* 2011;9:169–76. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0258-2>.
- [64] Marinova G, Ivanova J, Pilarski P, Chernev G, Chaneva G. Effect of heavy metals on the green algae *Scenedesmus incrassatulus*. *Oxidation Communications* 2018;41(2):318–28.
- [65] Shakya PR. Nickel Adsorption by Wild type and Nickel Resistant Isolate of *Chlorella* sp. 2007;8:5.
- [66] Hammouda O, Abdel-Raouf N, Shaaban M, Kamal M. Treatment of mixed domestic-industrial wastewater using microalgae *Chlorella* sp. *Journal of American Science* 2015;11(12):303–15.

- [67] Sibi G. Biosorption of chromium from electroplating and galvanizing industrial effluents under extreme conditions using *Chlorella vulgaris*. *Green Energy & Environment* 2016;1:172–7. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2016.08.002>.
- [68] Hanumantha Rao P, Ranjith Kumar R, Raghavan B, Subramanian V, Sivasubramanian V. Application of phycoremediation technology in the treatment of wastewater from a leather-processing chemical manufacturing facility. *Water SA* 2011;37:7–14. <https://doi.org/10.4314/wsa.v37i1.64099>.
- [69] Kızılkaya B, Türker G, Akgül R, Doğan F. Comparative Study of Biosorption of Heavy Metals Using Living Green Algae *Scenedesmus quadricauda* and *Neochloris pseudoalveolaris*: Equilibrium and Kinetics. *Journal of Dispersion Science and Technology* 2012;33:410–9. <https://doi.org/10.1080/01932691.2011.567181>.
- [70] Ajayan KV, Selvaraju M, Unnikannan P, Sruthi P. Phycoremediation of tannery waste water using microalgae *Scenedesmus* species. *International Journal of Phytoremediation* 2015;17:907–16. <https://doi.org/10.1080/15226514.2014.989313>.
- [71] Wong JPK, Wong YS, Tam NFY. Nickel biosorption by two *Chlorella* species, *Chlorella vulgaris* (a commercial species) and *Chlorella miniata* (a local isolate). *Bioresource Technology* 2000;73:133–7. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00175-3](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00175-3).
- [72] Arredondo Vega BO, Lobina DV. Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal 2017.
- [73] Alli CE, Cantera C, Villalba B, Alfonso M, Scasso R, Trinelli M. Determinación de metales pesados y arsénico en muestras de agua del Río Reconquista mediante espectrofotometría de absorción atómica por horno de grafito. *SNS* 2016;10:9.
- [74] Marbán L, de López Camelo LG, Ratto S, Agostini A. Contaminación con metales pesados en un suelo de la cuenca del río Reconquista. *Ecología Austral* 1999;9(01y02):015–9.
- [75] Kuczynski D. Occurrence of pathogenic bacteria in surface water of an urban river in Argentina (Reconquista River, Buenos Aires). *Int J of Aquatic Science* 2016;7:30–8.
- [76] Topalián ML, Castañé PM. Principal Component Analysis of Dissolved Heavy Metals in Water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1999;63:484–90. <https://doi.org/10.1007/s001289901006>.
- [77] Castañé. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev Toxicol* 2003;7.
- [78] Ferraro S, Curutchet G, Tasat D. Bioaccessible heavy metals-sediment particle from Reconquista River induce lung inflammation in mice. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2012. <https://doi.org/10.1002/etc.1911>.
- [79] Pía Di Nanno M, Curutchet G, Ratto S. Anaerobic sediment potential acidification and metal release risk assessment by chemical characterization and batch resuspension experiments. *J Soils Sediments* 2007;7:187–94. <https://doi.org/10.1065/jss2007.04.220>.
- [80] Federovisky S. El Río Reconquista, el segundo cauce más contaminado de la Argentina. *Infobae* 2019. <https://www.infobae.com/tendencias/ecologia-y-medio->

- ambiente/2019/03/10/el-rio-reconquista-el-segundo-cauce-mas-contaminado-de-la-argentina/ (accessed December 17, 2020).
- [81] Reactivación del enriquecimiento de uranio Complejo Tecnológico Pilcaniyeu (CNEA) municipio de Pilcaniyeu provincia de Río Negro - Estudio de Impacto Ambiental Vol II 2012.
- [82] Google Maps (DigitalGlobe). 2020.
- [83] Ferraro G, Areco M, Passucci V, Bagnato C, Toranzo R, Curutchet G, et al. Metal bioremediation performed by native algae isolated from the Reconquista River. 6to Simp Int Ing Ambient Mexico 2018.
- [84] Gualtieri P, Barsanti L. Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology. Boca Raton: Taylor & Francis; 2006.
- [85] Huss VAR, Frank C, Hartmann EC, Hirmer M, Kloboucek A, Seidel BM, et al. Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). Journal of Phycology 1999;35:587–98. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3530587.x>.
- [86] Lee RE. Phycology, Fourth edition. 2008.
- [87] Hegewald E. Taxonomy and Phylogeny of *Scenedesmus*. Algae 1997;12(4):235–46.
- [88] OMS. Nickel in Drinking-water. Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality 2019.
- [89] Barceloux DG. Nickel. Clinical Toxicology 1999;37(2):239–58.
- [90] Ramadoss R, Subramania D. Adsorption of Chromium Using Blue Green Algae- Modeling and Application of Various Isotherms. International J of Chemical Technology 2018;10:1–22. <https://doi.org/10.3923/ijct.2018.1.22>.
- [91] Fu F, Wang Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. Journal of Environmental Management 2011;92:407–18. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.11.011>.
- [92] ATDR. Toxicological Profile for Nickel 2005.
- [93] Kasprzak K. Nickel carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 2003;533:67–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.021>.
- [94] OMS. Guías para la calidad del agua de consumo humano: cuarta edición que incorpora la primera adenda. 2017.
- [95] Boletín Oficial República Argentina - Secretaría de Regulación y Gestión Sanitaria y Secretaría de Alimentos y Bioeconomía - Resolución Conjunta 34/2019 2019. <https://www.boletinoficial.gob.ar/detalleAviso/primera/222045> (accessed July 24, 2020).
- [96] Residuos Peligrosos. Decreto 831/93. Reglamentación de la Ley N°24.051. Argentina. 1993. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/10000-14999/12830/norma.htm> (accessed September 3, 2020).

- [97] EPA. Standards for Effluent Discharge Regulations General Notice No.44.of 2003. Environmental Protection Act (EPA). Regulations made by the Minister under sections 39 and 96 of the Environment Protection Act 2002 2003.
- [98] Environment and Climate Change Canada. Canadian environmental sustainability indicators: status of wild species. 2018.
- [99] Bold HC. The morphology of *Chlamydomonas chlamydogama*. Sp Nov Bulletin of the Torrey Botanical Club 1949:101–8.
- [100] Bischoff HW, Bold HC. Phycological studies. IV. Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species. University of Texas Publications, 6318 1963:1–95.
- [101] Zhou JL. Zn biosorption by *Rhizopus arrhizus* and other fungi. Appl Microbiol Biotechnol 1999;51:686–93. <https://doi.org/10.1007/s002530051453>.
- [102] Kapoor A, Viraraghavan T. Heavy metal biosorption sites in *Aspergillus niger*. Bioresource Technology 1997;61:221–7. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00055-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00055-2).
- [103] Vullo DL, Wachsman MB, Alche LE. Microbiología en práctica Manual de técnicas de laboratorio para la enseñanza de microbiología básica y aplicada 2000.
- [104] Guillard RRL. Division rates. In: J R Stein, Ed, Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements, Cambridge University Press 1973:289–311.
- [105] Arredondo Vega BO, Cordero Esquivel B, Herrero C, Abalde J. Manual de técnicas bioquímicas aplicadas a ficología. Manual de Prácticas Del 1er Curso Teórico Práctico: Aplicaciones Biotecnológicas Del Cultivo de Microalgas La Paz, Baja California Sur, México 1997.
- [106] Olenina I. Biovolumes and Size-Classes of Phytoplankton in the Baltic Sea. Baltic Marine Environment Protection Commission. 2006.
- [107] Sun J, Liu D. Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. Journal of Plankton Research 2003;25:1331–46. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbg096>.
- [108] Hillebrand H, Dürselen C-D, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. Journal of Phycology 1999;35:403–24. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.1999.3520403.x>.
- [109] Rasband WS. ImageJ 1997.
- [110] Kotrba P. Microbial Biosorption of Metals—General Introduction. In: Kotrba P, Mackova M, Macek T, editors. Microbial Biosorption of Metals, Dordrecht: Springer Netherlands; 2011, p. 1–6. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-94-007-0443-5_1).
- [111] Mitchell AM, Mellon MG. Colorimetric Determination of Nickel with Dimethylglyoxime. Ind Eng Chem Anal Ed 1945;17:380–2. <https://doi.org/10.1021/i560142a012>.
- [112] Prism G. Prism 6.01 for Windows 2012.

- [113] Chen Z, Ma W, Han M. Biosorption of nickel and copper onto treated alga (*Undaria pinnatifida*): Application of isotherm and kinetic models. *Journal of Hazardous Materials* 2008;155:327–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.064>.
- [114] Akhtar N. Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. *Journal of Hazardous Materials* 2004;108:85–94. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.002>.
- [115] Mehta SK, Gaur JP. Characterization and optimization of Ni and Cu sorption from aqueous solution by *Chlorella vulgaris*. *Ecological Engineering* 2001:13.
- [116] Özdemir S, Kilinc E, Poli A, Nicolaus B, Güven K. Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii* sub.sp. *decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans* sub.sp. *stromboliensis*: Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal* 2009;152:195–206. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.04.041>.
- [117] Volesky B. Sorption and biosorption. BV Sorbex, St Lambert 2003.
- [118] Davis TA, Volesky B, Vieira RHSF. *Sargassum* seaweed as biosorbent for heavy metals. *Water Research* 2000;34:4270–8. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00177-9](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00177-9).
- [119] Sen Gupta S, Bhattacharyya KG. Kinetics of adsorption of metal ions on inorganic materials: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 2011;162:39–58. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.12.004>.
- [120] Plazinski W, Rudzinski W, Plazinska A. Theoretical models of sorption kinetics including a surface reaction mechanism: A review. *Advances in Colloid and Interface Science* 2009;152:2–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2009.07.009>.
- [121] Sarı A, Tuzen M. Biosorption of total chromium from aqueous solution by red algae (*Ceramium virgatum*): Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Hazardous Materials* 2008;160:349–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.005>.
- [122] Ho YS, Ng JCY, McKay G. Kinetics of pollutant sorption by biosorbent: Review. *Separation and Purification Methods* 2000;29:189–232. <https://doi.org/10.1081/SPM-100100009>.
- [123] Rudzinski W, Plazinski W. On the applicability of the pseudo-second order equation to represent the kinetics of adsorption at solid/solution interfaces: a theoretical analysis based on the statistical rate theory. *Adsorption* 2009;15:181. <https://doi.org/10.1007/s10450-009-9167-8>.
- [124] Chien SH, Clayton WR. Application of Elovich Equation to the Kinetics of Phosphate Release and Sorption in Soils. *Soil Science Society of America Journal* 1980;44:265–8. <https://doi.org/10.2136/sssaj1980.03615995004400020013x>.
- [125] Wu F-C, Tseng R-L, Juang R-S. Characteristics of Elovich equation used for the analysis of adsorption kinetics in dye-chitosan systems. *Chemical Engineering Journal* 2009;150:366–73. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.01.014>.
- [126] Ho Y-S, Chiu W-T, Wang C-C. Regression analysis for the sorption isotherms of basic dyes on sugarcane dust. *Bioresource Technology* 2005;96:1285–91. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.10.021>.

- [127] Weber WJ, Morris JC. Kinetics of adsorption on carbon from solution. *Journal of the Sanitary Engineering Division* 1963;89:31–60.
- [128] Systat Software Inc. SigmaPlot, version 14.0 2017.
- [129] Castiglioni D, Toranzo R, Ferraro G, Bagnato C. Aislamiento de especies de microalgas con interés biotecnológico. Documento Técnico Interno - Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable (IEDS) - CNEA 2018:36.
- [130] Ferraro G, Toranzo R, Castiglioni D, Bagnato C. Informe de avance del Proyecto “Tratamiento del Humedal Mediante una Estrategia de Bioremediación ex-situ en el sitio por biolixiviación y biosorción por microalgas.” Laboratorio de Bioenergía y Procesos de Biorremediación: IEDS - CNEA; 2019.
- [131] Vonshak A, Maske H. ALGAE: GROWTH TECHNIQUES AND BIOMASS PRODUCTION. *Techniques in Bioproductivity and Photosynthesis* n.d.:12.
- [132] Bulgariu D, Bulgariu L. Equilibrium and kinetics studies of heavy metal ions biosorption on green algae waste biomass. *Bioresource Technology* 2012;103:489–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.016>.
- [133] Azimi A, Azari A, Rezakazemi M, Ansarpour M. Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewaters: A Review. *ChemBioEng Reviews* 2017;4:37–59. <https://doi.org/10.1002/cben.201600010>.
- [134] Ayangbenro AS, Babalola OO. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. *Int J Environ Res Public Health* 2017:16.
- [135] Carfagna S, Lanza N, Salbitani G, Basile A, Sorbo S, Vona V. Physiological and morphological responses of Lead or Cadmium exposed *Chlorella sorokiniana* 211-8K (Chlorophyceae). *SpringerPlus* 2013;2:147. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-147>.
- [136] Pahazri NF, Mohamed R, Al-Gheethi A, Kassim AHM. Production and harvesting of microalgae biomass from wastewater: a critical review. *Environmental Technology Reviews* 2016;5:39–56. <https://doi.org/10.1080/21622515.2016.1207713>.
- [137] Oliveira R, Palmieri M, Garcia O. Biosorption of Metals: State of the Art, General Features, and Potential Applications for Environmental and Technological Processes. In: Shaukat S, editor. *Progress in Biomass and Bioenergy Production*, InTech; 2011. <https://doi.org/10.5772/17802>.
- [138] Renuka N, Sood A, Prasanna R, Ahluwalia AS. Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for bioremediation and biomass generation. *Int J Environ Sci Technol* 2014;12:1443–60. <https://doi.org/10.1007/s13762-014-0700-2>.
- [139] Shanab S, Essa A, Shalaby E. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signaling & Behavior* 2012;7:392–9. <https://doi.org/10.4161/psb.19173>.
- [140] Mirghaffari N, Moeini E, Farhadian O. Biosorption of Cd and Pb ions from aqueous solutions by biomass of the green microalga, *Scenedesmus quadricauda*. *J Appl Phycol* 2015;27:311–20. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0345-z>.

- [141] Petrovič A, Simonič M. Removal of heavy metal ions from drinking water by alginate-immobilised *Chlorella sorokiniana*. *Int J Environ Sci Technol* 2016;13:1761–80. <https://doi.org/10.1007/s13762-016-1015-2>.
- [142] Soma Halder P. Bioremediation of Heavy Metals through Fresh Water Microalgae: A Review. *Scholars Academic Journal of Biosciences* 2014;2:825–30.
- [143] Rehman A, Shakoori AR. Tolerance and Uptake of Cadmium and Nickel by *Chlorella* sp., Isolated from Tannery Effluents. *Pakistan Journal of Zoology* 2004;36:327–31.
- [144] Al-Rub FAA, El-Naas MH, Benyahia F, Ashour I. Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. *Process Biochemistry* 2004;39:1767–73. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.08.002>.
- [145] Çetinkaya Dönmez G, Aksu Z, Öztürk A, Kutsal T. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochemistry* 1999;34:885–92. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00005-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00005-9).
- [146] Manzoor F, Karbassi A, Golzary A. A theoretical and experimental study on removal of nickel, lead, and zinc metals from wastewater using *Chlorella vulgaris* microalgae 2020:24.
- [147] Ferreira LS, Rodrigues MS, de Carvalho JCM, Lodi A, Finocchio E, Perego P, et al. Adsorption of Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> onto dry biomass of *Arthrospira (Spirulina) platensis* and *Chlorella vulgaris*. I. Single metal systems. *Chemical Engineering Journal* 2011;173:326–33. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.039>.
- [148] Chong AMY, Wong YS, Tam NFY. Performance of different microalgal species in removing nickel and zinc from industrial wastewater. *Chemosphere* 2000;41(1-2):251–7.
- [149] Al-Mayaly IK. Removal of nickel ions *Scenedesmus quadricauda* from contaminated water under laboratory conditions. *Iraqi Journal of Science* 2009;50(4):458–61.
- [150] Yang J, Cao J, Xing G, Yuan H. Lipid production combined with biosorption and bioaccumulation of cadmium, copper, manganese and zinc by oleaginous microalgae *Chlorella minutissima* UTEX2341. *Bioresource Technology* 2015;175:537–44. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.124>.
- [151] Edris G, Alhamed Y, Alzahrani A. Biosorption of Cadmium and Lead from Aqueous Solutions by *Chlorella vulgaris* Biomass: Equilibrium and Kinetic Study. *Arab J Sci Eng* 2014;39:87–93. <https://doi.org/10.1007/s13369-013-0820-x>.
- [152] Gong N, Shao K, Feng W, Lin Z, Liang C, Sun Y. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere* 2011;83:510–6. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.059>.
- [153] Pinto E, Sigaud-kutner TCS, Leitao MAS, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol* 2003;39:1008–18. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>.
- [154] Randhawa VK, Zhou F, Jin X, Nalewajko C, Kushner DJ. Role of oxidative stress and thiol antioxidant enzymes in nickel toxicity and resistance in strains of the green alga *Scenedesmus acutus* f. *alternans*. *Can J Microbiol* 2001;47:987–93. <https://doi.org/10.1139/cjm-47-11-987>.

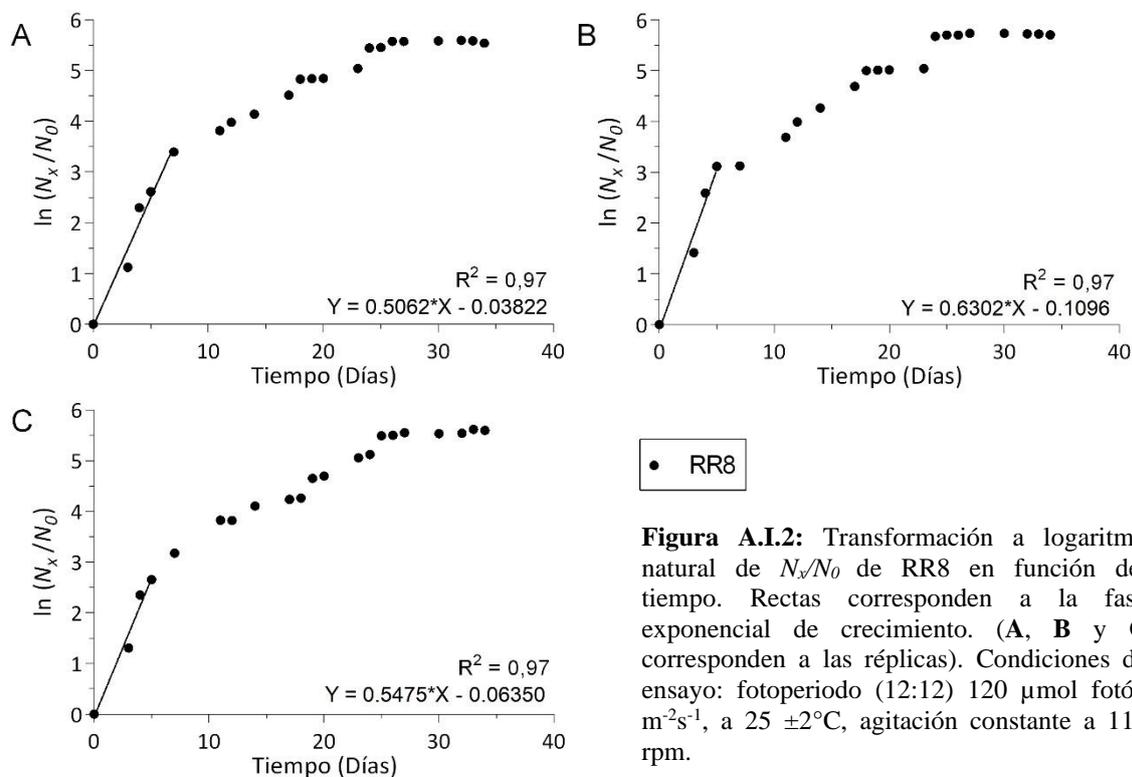
- [155] Zhao Y, Wang B, Liu C, Wu Y. Biosorption of trace metals from aqueous multimetal solutions by green microalgae. *Chin J Geochem* 2013;32:385–91. <https://doi.org/10.1007/s11631-013-0646-y>.
- [156] Mallick N. Biotechnological potential of *Chlorella vulgaris* for accumulation of Cu and Ni from single and binary metal solutions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003;19:695–701.
- [157] Mehta SK, Tripathi BN, Gaur JP. Influence of pH, temperature, culture age and cations on adsorption and uptake of Ni by *Chlorella vulgaris*. *European Journal of Protistology* 2000;36:443–50. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(00\)80050-4](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(00)80050-4).
- [158] Ghaedi M, Hajati S, Karimi F, Barazesh B, Ghezlbash G. Equilibrium, kinetic and isotherm of some metal ion biosorption. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2013;19:987–92. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2012.11.021>.
- [159] Bakatula EN, Cukrowska EM, Weiersbye IM, Mihaly-Cozmuta L, Peter A, Tutu H. Biosorption of trace elements from aqueous systems in gold mining sites by the filamentous green algae (*Oedogonium* sp.). *Journal of Geochemical Exploration* 2014;144:492–503. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.02.017>.
- [160] Kumar M, Singh AK, Sikandar M. Biosorption of Hg (II) from aqueous solution using algal biomass: kinetics and isotherm studies. *Heliyon* 2020;6:e03321. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03321>.
- [161] Arief VO, Trilestari K, Sunarso J, Indraswati N, Ismadji S. Recent Progress on Biosorption of Heavy Metals from Liquids Using Low Cost Biosorbents: Characterization, Biosorption Parameters and Mechanism Studies. *Clean Soil Air Water* 2008;36:937–62. <https://doi.org/10.1002/clen.200800167>.
- [162] Doshi H, Ray A, Kothari IL. Bioremediation potential of live and dead *Spirulina*: Spectroscopic, kinetics and SEM studies. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:1051–63. <https://doi.org/10.1002/bit.21190>.
- [163] Fraile A, Penche S, González F, Blázquez ML, Muñoz JA, Ballester A. Biosorption of copper, zinc, cadmium and nickel by *Chlorella vulgaris*. *Chemistry and Ecology* 2005;21:61–75. <https://doi.org/10.1080/02757540512331334933>.
- [164] Aksu Z. Determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of the batch biosorption of nickel(II) ions onto *Chlorella vulgaris*. *Process Biochemistry* 2002;38:89–99. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00051-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00051-1).
- [165] Mehta SK, Tripathi BN, Gaur JP. Enhanced sorption of Cu<sup>2+</sup> and Ni<sup>2+</sup> by acid-pretreated *Chlorella vulgaris* from single and binary metal solutions 2002:8.
- [166] Bayramoğlu G, Yakup Arica M. Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): Kinetics and equilibrium studies. *Bioresource Technology* 2009;100:186–93. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.050>.
- [167] Romera E, González F, Ballester A, Blázquez ML, Muñoz JA. Comparative study of biosorption of heavy metals using different types of algae. *Bioresource Technology* 2007;98:3344–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.026>.

- [168] Zhou G-J, Peng F-Q, Zhang L-J, Ying G-G. Biosorption of zinc and copper from aqueous solutions by two freshwater green microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. *Environ Sci Pollut Res* 2012;19:2918–29. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0800-9>.
- [169] Basha S, Murthy Z, Jha B. Biosorption of hexavalent chromium by chemically modified seaweed, *Cystoseira indica*. *Chemical Engineering Journal* 2008;137:480–8. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2007.04.038>.
- [170] Valla Ramirez de Arellano G. Utilización de microalgas para la remoción de cadmio y zin de elfuentes de aguas residuales urbanas. Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias. 2007.
- [171] Gong Q, Feng Y, Kang L, Luo M, Yang J. Effects of Light and pH on Cell Density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia* 2014;61:2012–5.
- [172] Zheng Y, Chi Z, Lucker B, Chen S. Two-stage heterotrophic and phototrophic culture strategy for algal biomass and lipid production. *Bioresource Technology* 2012;103:484–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.122>.
- [173] Zhang X, Amendola P, Hewson JC, Sommerfeld M, Hu Q. Influence of growth phase on harvesting of *Chlorella zofingiensis* by dissolved air flotation. *Bioresource Technology* 2012;116:477–84. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.04.002>.
- [174] Wang L, Min M, Li Y, Chen P, Chen Y, Liu Y, et al. Cultivation of green algae *Chlorella* sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;162:1174–86. <https://doi.org/10.1007/s12010-009-8866-7>.
- [175] Wong Y. Growth Medium Screening for *Chlorella vulgaris* Growth and Lipid Production. *JAMB* 2017;6. <https://doi.org/10.15406/jamb.2017.06.00143>.
- [176] Lopez Sulla K. Efecto de tres medios de cultivo en el perfil de ácidos grasos de tres especies de microalgas oleaginosas amazónicas. UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL PERÚ Facultad de Ciencias e Ingeniería Escuela Profesional de ingeniería ambiental 2016:60.
- [177] Ali HAA-S, Ehsan A, Najeeb KNA-S, Mohd SK. Growth of *Scenedesmus dimorphus* in different algal media and pH profile due to secreted metabolites. *Afr J Biotechnol* 2014;13:1714–20. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13455>.
- [178] Kim S, Park J, Cho Y-B, Hwang S-J. Growth rate, organic carbon and nutrient removal rates of *Chlorella sorokiniana* in autotrophic, heterotrophic and mixotrophic conditions. *Bioresource Technology* 2013;144:8–13. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.06.068>.
- [179] Essmann Prieto M. Determinación de parámetros biológicos de la microalga *Isochrysis* aff. *galbana* comparación de un fotobioreactor continuo versus un cultivo batch. Tesis para Optar al Título de Ingeniero en Acuicultura. Universidad Austral de Chile, 2011.
- [180] Powell EE, Mapiour ML, Evitts RW, Hill GA. Growth kinetics of *Chlorella vulgaris* and its use as a cathodic half cell. *Bioresource Technology* 2009;100:269–74. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.05.032>.

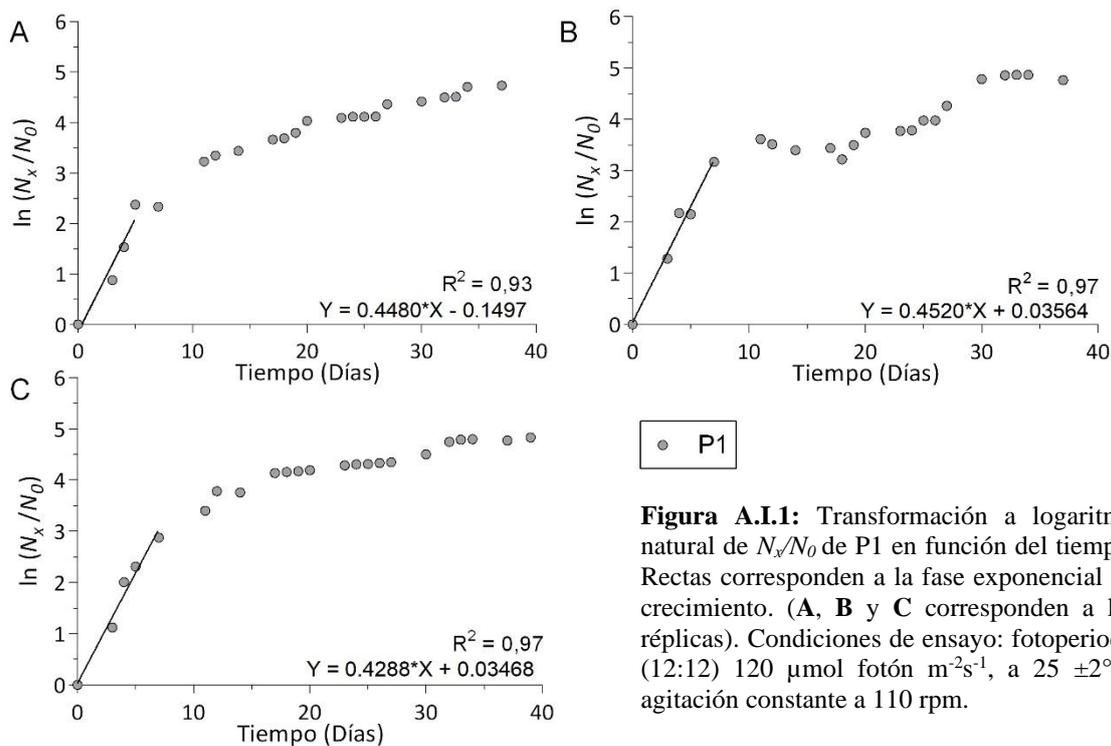
- [181] Westerhoff P, Hu Q, Esparza-Soto M, Vermaas W. Growth parameters of microalgae tolerant to high levels of carbon dioxide in batch and continuous-flow photobioreactors. *Environmental Technology* 2010;31:523–32. <https://doi.org/10.1080/09593330903552078>.
- [182] Quevedo C, Morales SP, Acosta A. Crecimiento de *Scenedesmus* sp. en diferentes medios de cultivo para la producción de proteína microalgal. *Vitae* 2008;15(1):25–31.
- [183] Kumar M, Singh AK, Sikandar Mohd. Study of sorption and desorption of Cd (II) from aqueous solution using isolated green algae *Chlorella vulgaris*. *Appl Water Sci* 2018;8:225. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0871-y>.
- [184] Daliry S, Hallajani A, Mohammadi Roshandeh J, Nouri H, Golzary A. Investigation of optimal condition for *Chlorella vulgaris* microalgae growth. *GJESM* 2017;3. <https://doi.org/10.22034/gjesm.2017.03.02.010>.
- [185] Toranzo R, Ferraro G, Beligni MV, Perez GL, Castiglioni D, Pasquevich D, et al. Natural and acquired mechanisms of tolerance to chromium in a *Scenedesmus dimorphusa* strain. *Algal Research* 2020;52:102100. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102100>.
- [186] Abdel Ghafar HH, Abdel-Aty AM, Ammar NS, Embaby MA. Lead biosorption from aqueous solution by raw and chemically modified green fresh water algae *Scenedesmus obliquus*. *Desalination and Water Treatment* 2013;52:7906–14. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.856345>.
- [187] Cheng J, Yin W, Chang Z, Lundholm N, Jiang Z. Biosorption capacity and kinetics of cadmium(II) on live and dead *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol* 2017;29:211–21. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0916-2>.
- [188] Kushwaha S, Sudhakar PP. Sorption of uranium from aqueous solutions using palm-shell-based adsorbents: a kinetic and equilibrium study. *Journal of Environmental Radioactivity* 2013;126:115–24. <https://doi.org/10.1016/j.jenvrad.2013.07.021>.
- [189] Salama E-S, Roh H-S, Dev S, Khan MA, Abou-Shanab RAI, Chang SW, et al. Algae as a green technology for heavy metals removal from various wastewater. *World J Microbiol Biotechnol* 2019;35:75. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2648-3>.
- [190] Sulaymon AH, Mohammed AA, Al-Musawi TJ. Competitive biosorption of lead, cadmium, copper, and arsenic ions using algae. *Environ Sci Pollut Res* 2013;20:3011–23. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1208-2>.
- [191] Krzesłowska M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum* 2011;33(1):35–51.
- [192] Romero N, Visentini F, Márquez V, Santiago L, Castro G, Gagnetten A. Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. *Environmental Research* 2020:10.
- [193] Doshi H, Ray A, Kothari IL, Gami B. Spectroscopic and Scanning Electron Microscopy Studies of Bioaccumulation of Pollutants by Algae. *Curr Microbiol* 2006;53:148–57. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-0401-7>.

- [194] Ahmaruzzaman M. Industrial wastes as low-cost potential adsorbents for the treatment of wastewater laden with heavy metals. *Advances in Colloid and Interface Science* 2011;166:36–59. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.04.005>.
- [195] Pereira M, Bartolomé MC, Sánchez-Fortún S. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance. *Chemosphere* 2013;93:1057–63. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.078>.
- [196] Monteiro CM, Brandão TRS, Castro PML, Malcata FX. Modelling growth of, and removal of Zn and Hg by a wild microalgal consortium. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;94:91–100. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3826-x>.
- [197] Farooq U, Kozinski JA, Khan MA, Athar M. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents – A review of the recent literature. *Bioresource Technology* 2010;101:5043–53. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.030>.
- [198] Plaza Cazón J del C. Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Doctor en Ciencias Exactas, área Química. Universidad Nacional de La Plata, 2012. <https://doi.org/10.35537/10915/2770>.
- [199] Pinzón-Bedoya ML, Villamizar LEV. Modelamiento de la cinética de bioadsorción de Cr (III) usando cáscara de naranja. *Dyna* 2009:95–106.
- [200] Vijayaraghavan K, Balasubramanian R. Is biosorption suitable for decontamination of metal-bearing wastewaters? A critical review on the state-of-the-art of biosorption processes and future directions. *Journal of Environmental Management* 2015;160:283–96. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.06.030>.
- [201] Zhou G-J, Ying G-G, Liu S, Zhou L-J, Chen Z-F, Peng F-Q. Simultaneous removal of inorganic and organic compounds in wastewater by freshwater green microalgae. *Environ Sci: Processes Impacts* 2014;16:2018. <https://doi.org/10.1039/C4EM00094C>.

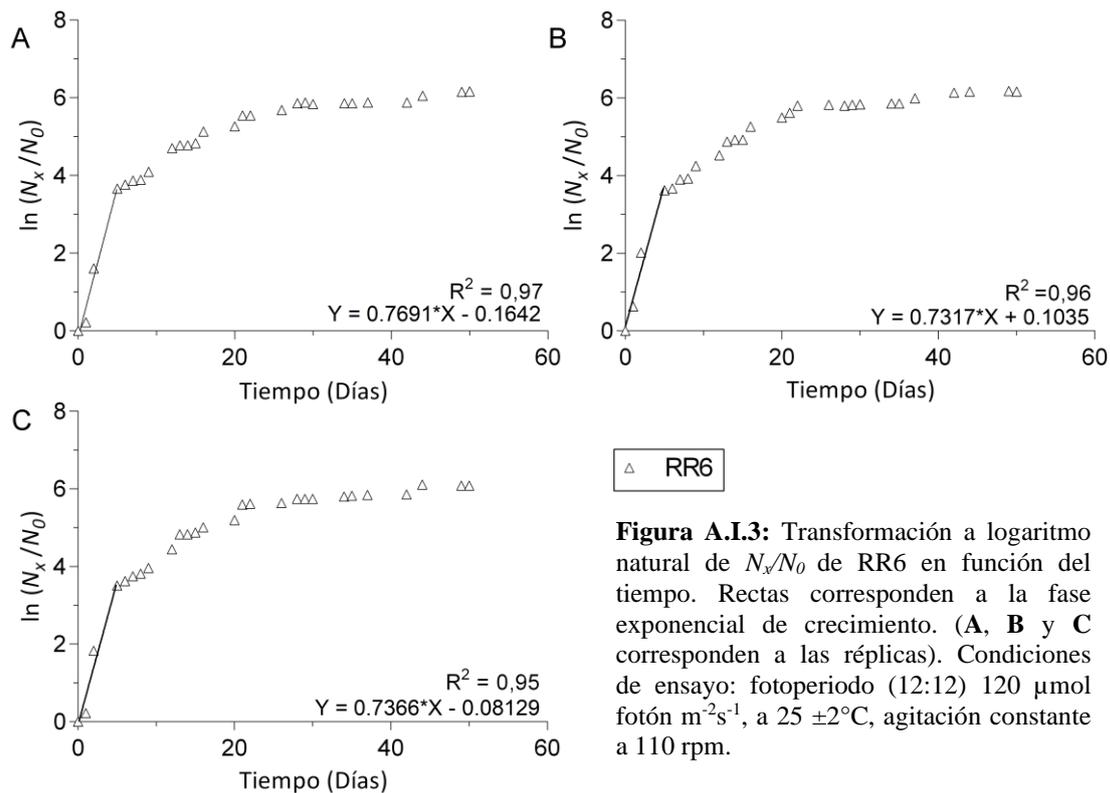
## Anexo I: Caracterización del crecimiento



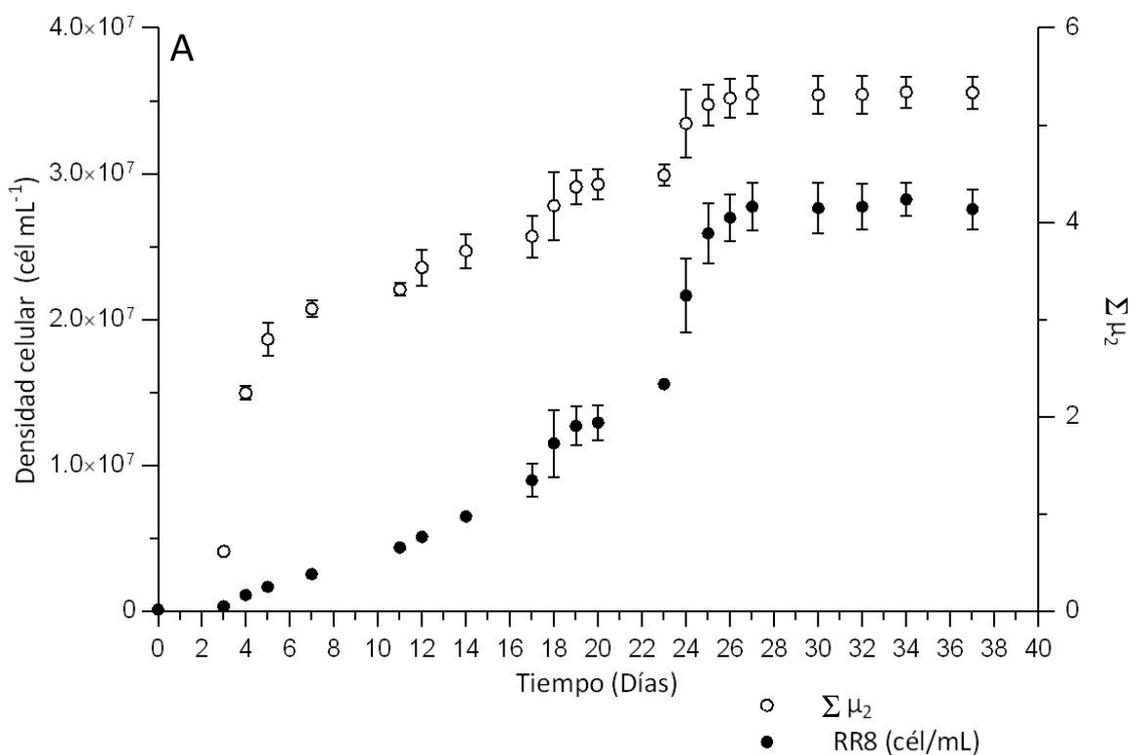
**Figura A.I.2:** Transformación a logaritmo natural de  $N_x/N_0$  de RR8 en función del tiempo. Rectas corresponden a la fase exponencial de crecimiento. (A, B y C corresponden a las réplicas). Condiciones de ensayo: fotoperiodo (12:12) 120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación constante a 110 rpm.



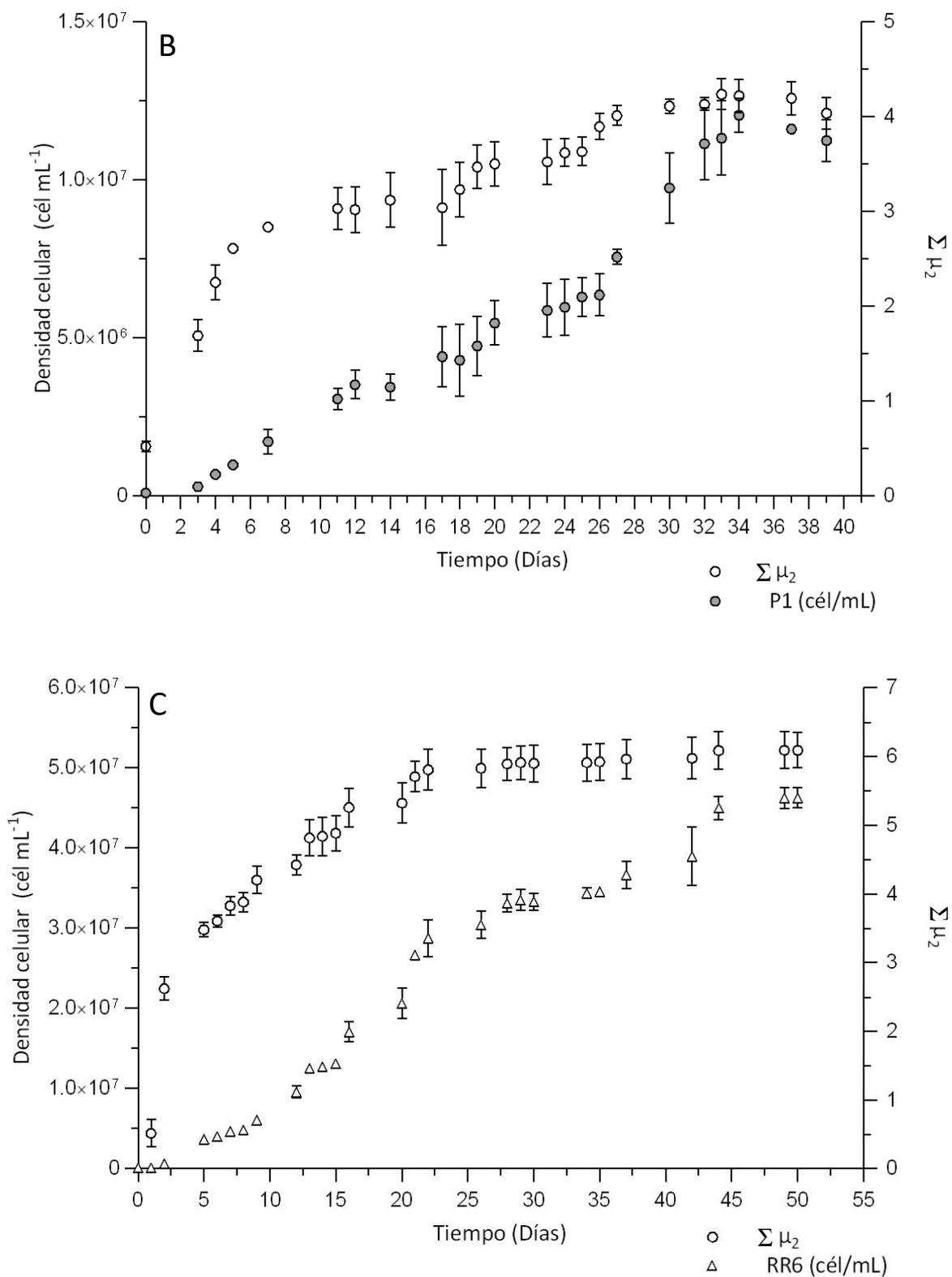
**Figura A.I.1:** Transformación a logaritmo natural de  $N_x/N_0$  de P1 en función del tiempo. Rectas corresponden a la fase exponencial de crecimiento. (A, B y C corresponden a las réplicas). Condiciones de ensayo: fotoperiodo (12:12) 120  $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación constante a 110 rpm.



**Figura A.I.3:** Transformación a logaritmo natural de  $N_x/N_0$  de RR6 en función del tiempo. Rectas corresponden a la fase exponencial de crecimiento. (**A**, **B** y **C** corresponden a las réplicas). Condiciones de ensayo: fotoperiodo (12:12)  $120 \mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , agitación constante a 110 rpm.

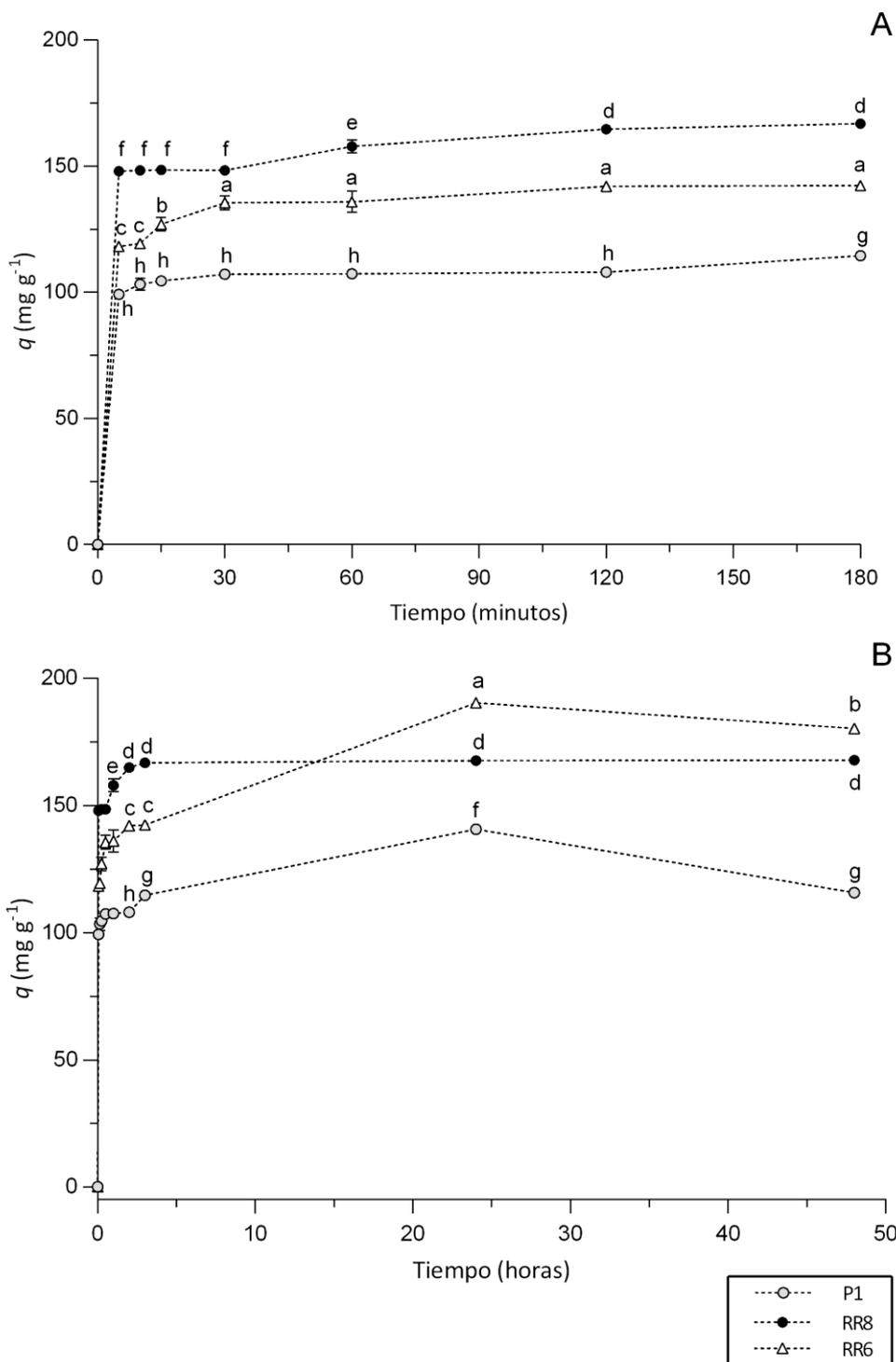


(Continúa la figura)

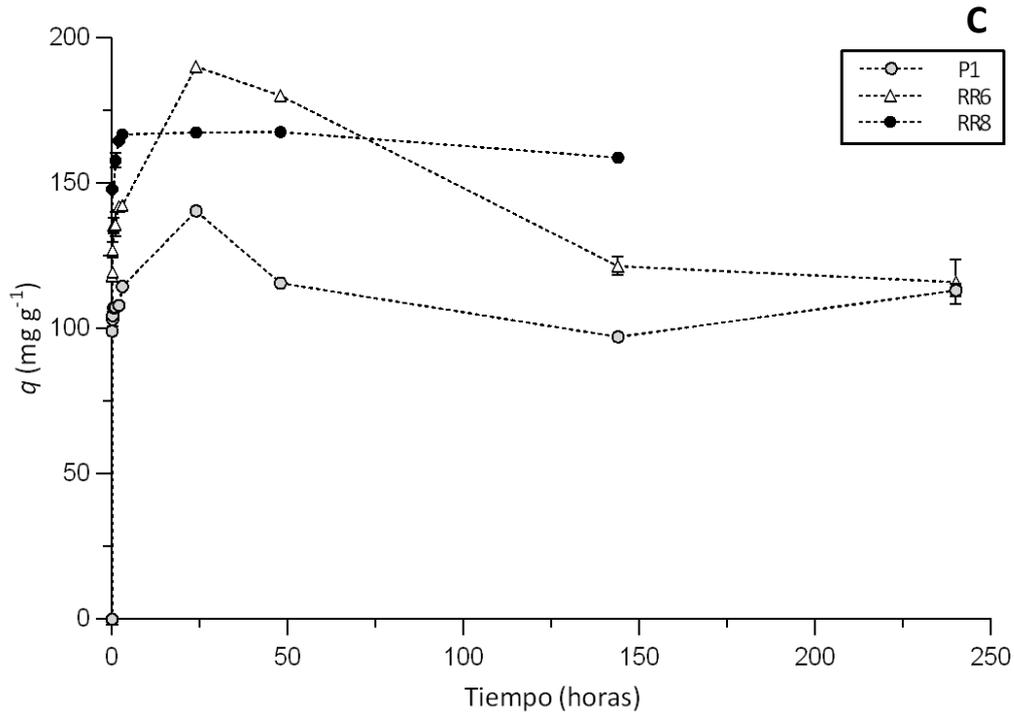


**Figura A.I. 4:** Densidad celular promedio (cél mL<sup>-1</sup>) y sumatoria progresiva de la tasa duplicaciones diarias ( $\Sigma \mu_2$ ) de biomasa en función del tiempo de cultivo (días) para las cepas **A.** RR8 (●), **B.** P1 (○) y **C.** RR6 (△). Las barras indican  $\pm$  error estándar.

## Anexo II: Efecto del tiempo de contacto



(Continúa la figura)



**Figura A.II. 5:** Valores promedio de la capacidad de remoción ' $q$ ' de  $\text{Ni}^{2+}$  de los cultivos de RR8 (●), P1 (○) (*Scenedesmus* sp.) y RR6 (△) (*Chlorella* sp.) a lo largo de **A.** 3 hs, **B.** 48 hs, **C.** 10 días de tiempo de contacto. Condiciones de ensayo: concentración inicial de  $55 \pm 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Ni}^{2+}$ . Las barras indican  $\pm$  desvío estándar. Las letras iguales indican que no hubo diferencias significativas (prueba de Tukey;  $\alpha = 0.05$ ,  $a > b$ ). Los análisis estadísticos se hicieron para cada cepa por separado.