

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

**CARRERA: INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

TEMA:

**EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LA MICROALGA
Chlorella sp. A LA PRESENCIA DE METAL CROMO (VI) EN AGUAS
SINTÉTICAS.**

AUTORA:

DANIELA VICTORIA MENA BOLAÑOS

TUTORA:

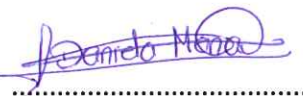
MARÍA FERNANDA GUEVARA

Quito, junio del 2019

Cesión de derechos de autor

Yo Daniela Victoria Mena Bolaños, con documento de identificación N° 1723076111, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del trabajo de titulación intitulado: EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA FISIOLÓGICA DE LA MICROALGA *Chlorella* sp. A LA PRESENCIA DE METAL CROMO (VI) EN AGUAS SINTÉTICAS, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en biotecnología de los recursos naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor/es me/nos reservó/reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.




.....
Daniela Victoria Mena Bolaños

Cédula: 1723076111

Declaratoria de coautoría del docente tutor/a

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “Evaluación de la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de metal cromo (VI) en aguas sintéticas” realizado por Daniela Victoria Mena Bolaños, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, junio 2019



María Fernanda Guevara Granja

Cédula de identidad: 1002454948

Dedicatoria

A Dios por darme el coraje y la fuerza para seguir adelante cada día a pesar de las
adversidades.

A mis padres Victoria y Antonio por ser mi mayor ejemplo de amor, superación y
perseverancia brindándome su apoyo en cada decisión tomada y siendo mi mayor
fortaleza para salir adelante en cualquier momento.

A mi hermana Antonella por ser mi compañera, amiga y cómplice en cada momento
de mi vida, siendo parte fundamental de mi crecimiento personal.

Daniela Mena

Agradecimiento

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirme cumplir esta meta,
permitiéndome crecer profesional y personalmente.

A mi tutora María Fernanda Guevara por su confianza, orientación, paciencia y
predisposición, compartiendo sus conocimientos a lo largo del desarrollo de este
proyecto de investigación.

A Isabel Maldonado por su amistad, apoyo, compromiso y perseverancia a lo largo
de este proceso lleno de retos.

A la ingeniera Carina Hidalgo para su apoyo y colaboración durante el desarrollo de
la parte experimental del proyecto, al ingeniero Janss Beltrán por su asesoría con los
resultados obtenidos del proyecto.

Índice

Introducción	1
Capítulo I.....	5
Marco conceptual.....	5
1.1 Microalgas.....	6
1.1.1 <i>Chlorella</i> sp.....	7
1.2 Pigmentos de microalgas	8
1.2.1 Extracción de pigmentos de <i>Chlorella</i> sp.....	10
1.2.2 Longitudes de onda de pigmentos algales	11
1.3 Adsorción de metales pesados por <i>Chlorella</i> sp.	12
1.4 <i>Chlorella</i> sp. en la cadena trófica	13
1.5 Bioensayos con <i>Chlorella</i> sp.	14
1.6 Concentración Letal 50 y <i>Chlorella</i> sp.....	14
1.7 Influencia de la intensidad lumínica	16
1.8 Influencia del pH.....	17
1.9 Potencial de Oxidación Reducción (ORP).....	18
1.10 Oxígeno disuelto (DO).....	19
Capítulo II	20
Marco metodológico	20
2.1 Masificación de cultivo biosorbente (<i>Chlorella</i> sp.).....	20
2.2 Cuantificación de pigmentos liposolubles de <i>Chlorella</i> sp. en aguas sintéticas con diferentes concentraciones de cromo (VI) y tres valores de pH.....	20
2.3 Curva de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp.	24
2.4 Determinación de la concentración letal media (CL ₅₀).....	25

Capítulo III.....	26
Resultados y Discusión	26
3.1 Masificación de cultivo de <i>Chlorella</i> sp.....	26
3.2 Cuantificación de pigmentos liposolubles de <i>Chlorella</i> sp.....	26
3.3 Crecimiento celular de <i>Chlorella</i> sp. en aguas sintéticas con diferentes concentraciones de cromo (VI) y en tres valores de pH.	34
3.4 Concentración letal media CL ₅₀ de <i>Chlorella</i> sp. para pH 4,6 y 8	44
3.5 Oxígeno Disuelto (OD) en cultivos de <i>Chlorella</i> sp.....	46
3.6 Potencial de óxido-reducción (ORP) en cultivos de <i>Chlorella</i> sp.	50
Conclusiones	52
Referencias Bibliográficas	55
Anexos	64

Índice Tablas

Tabla 1. Diferencia pigmentos entre 0 h y 96 h del pH 4.	34
Tabla 2. Porcentaje Mortalidad celular 96 h	45
Tabla 3. Oxígeno disuelto de cada valor de pH.	48
Tabla 4. Potencial de óxido-reducción de cada valor de pH.....	51

Índice Figuras

Figura 1. Montaje de los 18 tratamientos con diferentes concentraciones de Cr (VI) y valores de pH.....	21
Figura 2. Diferencia de color <i>Chlorella</i> sp. 96 horas, pH 4, 60 mg/L de Cr (VI).....	27
Figura 3. Diferencia de pigmentos de pH 4 de <i>Chlorella</i> sp.....	29
Figura 4. Diferencia de pigmentos pH 6 de <i>Chlorella</i> sp.	30
Figura 5. Diferencia de pigmentos de pH 8 de <i>Chlorella</i> sp.....	31
Figura 6. Curvas de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. durante 96 horas en los tres valores de pH la microalga fue expuesta a 5 concentraciones de metal y un testigo (Origin Lab, 2019).	36
Figura 7. Porcentaje de densidad celular viva de <i>Chlorella</i> sp. después de los ensayos, dividida por concentración de cromo y valores de pH (Origin Lab, 2019).	39
Figura 8. Cantidad de pigmentos a las 0 y 96 horas mediante una extrapolación con 10×10^6 cel/mL de <i>Chlorella</i> sp. (Origin Lab, 2019).	43
Figura 9. Porcentaje de mortalidad en un ensayo de 96 h, además de las concentraciones letales medias calculadas con Infostat 2008 para cada pH (Origin Lab, 2019).	49

Índice Anexos

Anexo 1. <i>Chlorella</i> sp. en microscopio, cámara de Neubauer a 40X.	64
Anexo 2. Soluciones buffer valores de pH a 25 °C	65
Anexo 3. Valores de clorofila a, b y carotenoides de pH 4.....	67
Anexo 4. Valores de clorofila a, b y carotenoides de pH 6.....	68
Anexo 5. Valores de clorofila a, b y carotenoides de pH 8.....	69
Anexo 6. Análisis de varianza diferencia entre 0 horas y 96 horas de clorofila a en InfoStat 2008.....	70
Anexo 7. Análisis de varianza diferencia entre 0 horas y 96 horas de clorofila b en InfoStat 2008.....	71
Anexo 8. Análisis de varianza diferencia entre 0 horas y 96 horas de carotenoides en InfoStat 2008.....	72
Anexo 9. Análisis Probit pH 4 en InfoStat 2008.....	73
Anexo 10. Análisis Probit pH 6 en InfoStat 2008.....	73
Anexo 11. Análisis Probit pH 8 en InfoStat 2008.....	73

Resumen

Los metales pesados como el cromo se encuentran entre los contaminantes más tóxicos que afectan los recursos hídricos como consecuencia de las actividades textiles y de curtiembre, ocasionando así daños en las microalgas que conforman en el primer eslabón de la cadena trófica. En el presente trabajo se evalúa la respuesta fisiológica de *Chlorella* sp. en presencia de cromo (VI) en aguas sintéticas, para esto se cuantificó clorofila a, b y carotenoides por métodos espectrofotométricos y el porcentaje de mortalidad de la microalga mediante conteos en cámara de Neubauer al ser expuesta a cinco concentraciones de Cr (VI), durante un período de 96 horas a pH 4, 6 y 8. Se determinó la inhibición de la síntesis de pigmentos y muerte celular cuando la microalga está expuesta a concentraciones mayores a 15 mg/L de metal, en tanto a concentraciones bajas existe un incremento de densidad celular y pigmentos en pH de 6 y 8. El pH 4 afectó a la microalga con una mortalidad de 67 % en 60 mg/L de cromo, mientras que para pH 6 y 8 fue 27 % y 17 % respectivamente. Mediante una extrapolación a 10×10^6 cel/mL se confirmó que los factores de pH y concentración de metal son fundamentales en la fisiología de *Chlorella* sp. ya que pH 4 y 6 afectaron la producción de pigmentos y pH 8 fue el óptimo para que la microalga pueda resistir a altas concentraciones de metal.

Palabras clave: *Chlorella* sp., cromo, pigmentos, densidad celular, mortalidad.

Abstract

Heavy metal as chromium are among the most toxic contaminants that affect the water resources due of the textile and tannery activities involve damage in the microalgae that shape the first links of the trophic chain. The present work evaluates the physiological response of the *Chlorella* sp. in the presence of chromium (VI) in synthetic waters. For this was quantified chlorophyll a, b and carotenoids for spectrophometers methods and the mortality percent through counts in Neubauer chamber, the microalgae was exposed to five concentrations of Cr (VI) in a period of 96 hours at pH 4, 6 and 8. The inhabitation synthesis of pigments and cellular death were determined for the concentrations higher than 15 mg/L of chromium meanwhile lower concentrations increase the cell density and pigments. The pH 4 affects *Chlorella* sp. with a mortality percent of 67 % whit a metal concentration to 60 mg/L while pH 6 and 8 had a mortality percent to 27 % and 17% respectively. The facts of pH and metal concentration have been fundamental since in an a extrapolation with 10×10^6 cell/mL it was observed that the physiology of microalgae was affected in pH 4 and 6 with less production of pigments and pH 8 was optimum for that *Chlorella* sp. can resist high concentrations of metal.

Key words: *Chlorella* sp., Chromium, pigments, cell density, mortality.

Introducción

La contaminación del agua es una de las principales afecciones ambientales que se da como resultado de las diferentes industrias manufactureras (Negm, Abd, Hassan, & Abou, 2018). Los metales pesados se encuentran entre los contaminantes más tóxicos de la fauna acuática (Liu et al., 2014; Qian et al., 2013), el cromo es uno de los metales pesados que presenta una gran amenaza para estos sistemas (Priya, Gurung, Mukherjee, & Bose, 2016), ya que cuando se encuentra en altas cantidades interfiere con el desarrollo normal de la vida acuática llegando a afectar a las microalgas que forman el primer eslabón de la cadena trófica (Rubio, Manjarrez, Muñoz, & Lache, 2015).

Al ingresar a la cadena alimentaria estos metales pesados interrumpen los procesos biológicos y por lo tanto, representan una grave amenaza para la salud humana (Jiang, Shi, Cui, & Li, 2014; Priya et al., 2016). El cromo es un metal pesado común que se encuentra en el ambiente, de dos formas predominantes, Cr (III) y Cr (VI) (Yen, Chen, Hsu, & Lee, 2016). El Cr (VI) tiene efectos tóxicos y teratogénicos (Plugaru, Sarb, Horcsik, & Rusu, 2016), siendo un contaminante del agua que ha demostrado ser carcinógeno (Huang, Liu, Huo, & Yang, 2017; Sánchez et al., 2011; Sukla, Subudhi, & Pradhan, 2018).

Las microalgas como *Chlorella* sp. tienen un gran potencial para eliminar el Cr (VI) del agua, debido a sus procesos fotosintéticos y metabólicos (Londoño, Londoño, & Muñoz, 2016), los metales pesados pueden ser secuestrados por las paredes celulares de *Chlorella* sp. siendo altamente efectiva y confiable para eliminarlos de soluciones

acuosas, además de su bajo requerimiento de energía (Priya et al., 2016; Yen et al., 2016).

Sin embargo, los metales pesados afectan las propiedades celulares de *Chlorella* sp., (Díaz, Bustos, & Espinosa, 2004), el cromo causa toxicidad a la microalga en agua dulce afectando su fisiología pues compromete la viabilidad celular y la estructura de la membrana, en función a la concentración y tiempo de exposición al metal (Gosset, Durrieu, Orias, Bayard, & Perrodin, 2017; Qian et al., 2013). Se ha observado que la interacción del cromo con *Chlorella* sp. en el caso de concentraciones bajas del metal, se ha obtenido crecimiento y efecto estimulante de la fotosíntesis (Lewis & Thursby, 2018; Yen et al., 2016), mientras que en el caso de concentraciones más altas se da una disminución de la reproducción y tamaño de las células, así como la inhibición de la síntesis de pigmentos (Long et al., 2013; Plugaru et al., 2016).

La exposición de *Chlorella* sp. a elevadas concentraciones de cromo, conduce a la destrucción de los centros de reacción del alga, por un aumento del estrés oxidativo y peroxidación de lípidos (Gosset, Durrieu, Orias, Bayard, & Perrodin, 2017; Qian et al., 2013; Yen et al., 2016), coincidiendo con, Hörcsik et al., (2006) que al trabajar con la misma observó que el metal afectó la densidad celular y la cantidad de pigmentos fotosintéticos de la microalga. Por lo mencionado anteriormente, se plantea la siguiente interrogante: ¿Qué tan efectiva es la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia del metal Cromo (VI) en aguas sintéticas?

El cromo es uno de los contaminantes más tóxicos de los organismos vivos en ambientes acuáticos, debido a que se acumula en el medio ambiente a causa de aguas residuales de las diferentes industrias (Liu et al., 2014). Ecuador también se ha visto afectado por este tipo de contaminación ya que en un estudio realizado por Fundación

Natura en 1995 determinó que cuatro ciudades del país (Quito, Guayaquil, Ambato y Esmeraldas) presentaban altos niveles de contaminación de los recursos hídricos con metales pesados como el cromo, que superaba casi 400 veces los límites permisibles (Da Ros & Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Instituto de Investigaciones Económicas., 1995), esta situación no ha cambiado en los últimos años ya que según Correa et al., (2015) se determinó que la concentración de cromo en el río Santiago, en Esmeraldas aún superaba los límites permisibles de acuerdo a la Norma de la Estación de las Antonias.

Es de gran importancia el tratamiento de los recursos hídricos del país, ya que los metales pesados comprometen la vida de ambientes acuáticos (Chen, Song, & Wen, 2016).

Las microalgas han recibido gran atención debido a las características morfológicas y fisiológicas que presentan para este proceso (Londoño et al., 2016); además que al formar parte de la base de la cadena trófica de los sistemas acuáticos es importante cualquier cambio que afecte su respuesta fisiológica, ya que alteraría toda la estructura alimentaria en ecosistemas acuáticos pudiendo afectar a los niveles superiores como peces, aves y seres humanos con cambios funcionales y estructurales de los mismos (Esperanza, 2017).

En esta investigación se evaluará la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. expuesta a diferentes concentraciones de cromo, mediante el análisis de cambios que puede ocasionar el metal en la fotosíntesis de las microalgas, por medio de la cuantificación de pigmentos liposolubles y al crecimiento en base a sus curvas de crecimiento, lo cual permitirá determinar la concentración letal media (CL₅₀), con el fin de estimar, que concentración del metal causa la muerte de la mitad de la población de *Chlorella* sp., y de esta manera encontrar las condiciones adecuadas para un mayor

rendimiento en la biorremediación con *Chlorella* sp. optimizando el tiempo de vida de la microalga y el proceso como tal.

Esta investigación tiene como Objetivo general, evaluar la respuesta fisiológica de la microalga *Chlorella* sp. a la presencia de metal cromo (VI) en aguas sintéticas. Y como objetivos específicos: Comparar la diferencia en la actividad fotosintética de la microalga *Chlorella* sp. expuesta a distintas concentraciones del metal cromo (VI) y a diferentes valores de pH, por medio de la cuantificación de pigmentos liposolubles por métodos espectrofotométricos. Analizar las curvas de crecimiento de *Chlorella* sp. en diversos ambientes de concentración y pH mediante el conteo celular por cámara de Neubauer. Valorar la concentración letal media (CL₅₀) de cromo (VI) sobre la microalga *Chlorella* sp. mediante pruebas toxicológicas aplicando el análisis Probit en InfoStat 2008.

Capítulo I

Marco conceptual

La contaminación ambiental se encuentra en gran medida afectando los recursos hídricos como resultado de los procesos químicos tóxicos y nocivos que acarrear las diferentes industrias manufactureras (Negm et al., 2018). En todo el mundo varios países están orientados en controlar y reducir la contaminación del agua, enfocándose principalmente en el tratamiento de los metales pesados ya que se encuentran entre los contaminantes más tóxicos de los organismos vivos en ambientes acuáticos, como el cromo que es uno de los contaminantes más graves en los sistemas acuáticos el cual se acumula en el medio ambiente a causa de aguas residuales de las diferentes industrias (Liu et al., 2014; Qian et al., 2013).

El cromo es uno de los metales más abundantes que se produce naturalmente, se encuentra entre los metales pesados que son esenciales como requerimientos nutricionales en cantidades mínimas para muchos organismos pero que son tóxicos cuando están presentes en cantidades superiores a las permisivas (Priya et al., 2016).

Principalmente se encuentra en dos formas Cr trivalente (III) y Cr hexavalente (VI) (Ahamed, Rajeshkumar, Ragul, Anand, & Kaviyarasu, 2018), el Cr (III) es menos reactivo y tóxico y puede precipitarse fácilmente (Yen et al., 2016; Ahamed et al., 2018), es esencial para los seres humanos y otros seres vivos además desempeña un papel importante en el funcionamiento normal del metabolismo de los lípidos y la glucosa (Plugaru et al., 2016), por otro lado la mayoría de sus efectos adversos del cromo son causados por el Cr (VI) debido a su solubilidad, movilidad y alto potencial de oxidación (Huang et al., 2017; Sánchez et al., 2011; Sukla et al., 2018) lo que a su

vez causa una mayor toxicidad afectando a la salud pudiendo ocasionar daño hepático, congestión pulmonar, vómitos y diarrea severa (Plugaru, Sarb, Horcsik, & Rusu, 2016; Ahamed et al., 2018).

Ya que este contaminante afecta los recursos hídricos convirtiéndose en un peligro potencial para la salud humana ya que al llegar a las microalgas que conforman el primer eslabón de la cadena trófica, estos metales pesados interrumpen profundamente los procesos biológicos y por lo tanto, representan una grave amenaza para las formas de vida superiores (Jiang et al., 2014; Priya et al., 2016).

1.1 Microalgas

Las microalgas representan un grupo diverso de organismos unicelulares, de los cuales existen aproximadamente 300,000 especies diferentes en el planeta (Lewandowski et al., 2018). Hasta ahora, se han descrito alrededor de 40,000 especies, y algunas se han analizado en detalle, incluye cianobacterias procarióticas, así como especies de microalgas eucariotas capaces de crecer en diversos ambientes como océanos, lagos y ríos, además de diferentes tipos de superficies terrestres (Lewandowski et al., 2018). Las microalgas son organismos unicelulares productores primarios capaces de convertir la radiación solar en energía química a través de la fotosíntesis.

Las clorófitas una división de algas verdes abundan en las fuentes de agua dulce y su distribución está influenciada por factores físicos, químicos y biológicos (Duppeti, Chakraborty, Das, Mallick, & Kotamreddy, 2017). Cuando se cultivan en condiciones fotoautotróficas, capturan la luz y utilizan su energía para convertir el dióxido de carbono (CO₂), a través de la fotosíntesis en energía química en forma de biomasa, es decir, en materia viva rica en carbono (Lewandowski et al., 2018).

Se estima que alrededor del 50 % del oxígeno global es producido por microalgas, al igual que las plantas terrestres, las microalgas requieren nitrógeno y fósforo para un crecimiento óptimo. Sin embargo, en comparación con las plantas superiores, su cultivo tiene un número considerable de ventajas (Lewandowski et al., 2018) en comparación a los cultivos de origen vegetal. Las microalgas también se pueden adaptar a una variedad más amplia de recursos hídricos incluyendo aguas salobres y aguas residuales (Gao et al., 2018).

En consecuencia de la producción de compuestos de alto valor como ácidos grasos omega-3 o colorantes antioxidantes se ha impulsado la producción industrial de microalgas contribuyendo así a la producción global de oxígeno (Lewandowski et al., 2018), ya que el proceso fotosintético de las microalgas supera en un 10 % a las plantas terrestres, incrementa entre 10 a 50 veces la cantidad de oxígeno (Gao et al., 2018). El gran número de cepas de microalgas difieren fundamentalmente en el tamaño celular, la formación de la pared celular y la composición de la biomasa (Lewandowski et al., 2018). Es así que se han convertido en un importante recurso de biomasa a nivel mundial ya que pueden usarse comercialmente para la producción de alimentos, productos para la salud, productos farmacéuticos, compuestos bioquímicos específicos y biocombustibles debido a su alta productividad y neutralidad hacia los entornos naturales (Gao et al., 2018; Lewandowski et al., 2018).

1.1.1 Chlorella sp.

Chlorella sp. es un alga verde unicelular, que tiene un solo cloroplasto, pared celular rígida y carece de flagelos, se distribuye a nivel mundial, incluida la Antártida. En general, esta microalga habita en suelos y otros ambientes sin hielo, sin embargo

también se puede encontrar en la nieve durante la temporada de fusión del verano (Rivas, Navarro, Huovinen, & Gómez, 2016).

Las microalgas como *Chlorella* sp. han mostrado una alta capacidad de unión a metales, esta propiedad se atribuye a la presencia de polisacáridos, proteínas o lípidos en la superficie de sus paredes celulares, que a su vez contienen algunos grupos funcionales como amino, hidroxilo, carboxilo y sulfato, que pueden actuar como sitios de unión para los metales (Priya et al., 2016). De esta manera, los metales pesados pueden ser secuestrados por las paredes celulares de *Chlorella* sp. y por lo tanto su biomasa se considera altamente efectiva y confiable para eliminar metales pesados de soluciones acuosas (Priya et al., 2016).

En general, la biomasa de la microalga se considera un adsorbente óptimo durante el proceso de eliminación de cromo (Yen et al., 2016), ya que el proceso de adsorción es seguido por un proceso de reducción de Cr (VI), debido a que la microalga utiliza los desechos como fuentes nutricionales y degradan los contaminantes enzimáticamente, es así que la biosorción ha surgido como un método potencial para eliminar metales pesados del agua por lo cual se ha ganado atención en los últimos años en procesos de remediación (Priya et al., 2016).

1.2 Pigmentos de microalgas

Las microalgas son biofactorías celulares impulsadas por el sol que convierten el dióxido de carbono en varios biocomponentes celulares como pigmentos, proteínas, lípidos, polisacáridos y vitaminas; a través del transporte de electrones inducido por la luz (Duppeta et al., 2017). El contenido de pigmentos es casi el mismo en todos los grupos de algas, la clorofila a es el principal pigmento fotosintético que se encuentra

en todas las especies de algas (Duppeti et al., 2017) mientras que la clorofila b y c, al igual que el nivel de carotenoides van a variar según las especies de algas y las condiciones ambientales. Aunque el papel de los pigmentos de caroteno en las algas no se conocía exactamente, se ha sugerido que funcionaron como un filtro de protección pasivo de la luz y que tienen el papel de pigmentos accesorios que transfieren energía y oxígeno (Wheeler, 2008).

Los cloroplastos son los encargados de contener la clorofila de las microalgas fotosintéticas, estos compuestos tienen una forma similar a la de la hemoglobina, existen diversos tipos de clorofila, el pigmento primario en todas las algas es la clorofila a la cual tiene la función de receptor de luz del fotosistema I y representa entre el 0,3 % y el 3,0 % del peso seco de la microalga.

Además de ayudar en la fotosíntesis, estos pigmentos poseen actividades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, antiobesidad, antiangiogénicas y neuroprotectoras por lo cual están ganando atención en la fabricación de alimentos, salud, productos cosméticos y también para otras aplicaciones biotecnológicas (Duppeti et al., 2017).

Los carotenoides son una clase de pigmentos terpenoides coloreados no nitrogenados que se producen en dos tipos principales, la clase de hidrocarburos (carotenos) y la clase oxigenada (xantofilas) con una fuerte propiedad antioxidante. La producción de carotenoides a base de microalgas está despertando interés en los últimos tiempos debido a la facilidad del cultivo escalable en diversas condiciones con una buena productividad en períodos cortos. Varias especies de microalgas incluyendo a *Chlorella* sp. han mostrado una buena capacidad de producción de carotenoides. Los carotenoides tienen múltiples aplicaciones en el sector de la industria alimentaria,

farmacéutica, nutracéutica, sanitaria y cosmética, debido a su alto valor comercial (Rajesh, Rohit, & Venkata Mohan, 2017).

1.2.1 Extracción de pigmentos de *Chlorella* sp.

Los métodos para la extracción de pigmentos de microalgas son principalmente técnicas fotoquímicas y su selección va a estar sujeta a las variables a estudiar, como la naturaleza bioquímica, la rapidez, la toxicidad y la disponibilidad de solventes para uso, reproducibilidad, eficiencia de extracción, selectividad, prevención de compuestos extraídos de la transformación química y costo (Duppeti et al., 2017).

Entre los disolventes utilizados para la extracción de pigmentos de microalgas se ha trabajado con acetona, cloroformo, éter dietílico y metanol, siendo este último es más efectivo sobre la homogenización, presentando un porcentaje de extracción mayor al resto de disolventes lo cual se debe a la estructura porosa de la pared celular de las microalgas pero a su vez puede llegar a ser tóxico para algunas especies de algas (Wheeler, 2008).

Los métodos espectrofotométricos se caracterizan por su gran versatilidad, sensibilidad y precisión son ampliamente usados para la determinación de los elementos químicos, se encuentran entre los métodos instrumentales de análisis químicos más precisos. Un espectrofotómetro es más barato que la mayoría de los otros instrumentos fundamentales utilizados en el análisis. Los espectrofotómetros no miden ni comparan el color, sino que miden la absorbancia de las soluciones están equipados con microprocesadores que permiten el procesamiento rápido de espectros de absorción ha llevado a un desarrollo muy rápido de métodos espectrofotométricos (Marczenko, 2000). Con los ensayos espectrofotométricos se permite la cuantificación de clorofila a, b y carotenoides, en esta técnica se utilizan los espectros de absorbancia

de la región visible, donde mediante la implementación de ecuaciones simultaneas donde la concentración de pigmento va a estar dada en función de la absorbancia medida en longitudes de onda establecidas específicamente para cada pigmento (Thrane et al., 2015). La definición de espectrofotometría de los pigmentos fotosintéticos se fundamenta en que la energía de la luz se convierta en energía química en todos los organismos fotosintéticos (Duppeti et al., 2017), este proceso va a estar conectado con las propiedades de absorción de los pigmentos para facilitar el análisis cualitativo y cuantitativo de los mismos. En la definición del contenido de pigmento de agua dulce y algas marinas, se han utilizado diversos métodos y disolventes y se determinó que el nivel de pigmento estaba influenciado por factores limitantes como la falta de nitrógeno y un nutriente limitado (Wheeler, 2008).

1.2.2 Longitudes de onda de pigmentos algales

La determinación de la concentración de pigmentos fotosintéticos permite estimar la biomasa algal. Se ha determinado que los pigmentos algales (clorofila a y b), presentan dos picos de absorción en el espectro visible, uno en el entorno de la luz azul (400-500 nm de longitud de onda), y otro en la zona roja del espectro (600-700 nm).

Este tipo de pigmento es insoluble en agua y éter de petróleo pero soluble en alcohol, dietil éter, benceno y acetona. El pigmento tiene dos bandas de absorción principales *in vitro*, una banda en la región de luz roja a 663 nm y la otra a 430 nm. Los otros tipos de clorofila van a encontrarse de manera mas restringida en las microalgas y van a funcionar como pigmentos accesorios. Chlorophyta va a tener clorofila b que va actuar como recolector de luz además de transferir la energia luminosa hacia la clorofila a, este pigmento presenta gran solubilidad en metanol en niveles de absorción de 645 nm y 435 nm (Rajesh et al., 2017). El plástido se va a encargar de producir los carotenoides pigmentos que se encuentran en colores rojizos, las microalgas van a tener en mayor

concentración el β - caroteno, estos pigmentos son solubles en alcoholes, benceno y acetona, pero insolubles en agua (Lee, 2018; Zia, Mahmood, & Mohammad, 2017).

1.3 Adsorción de metales pesados por *Chlorella* sp.

El cromo del medio acuático es adsorbido por las algas gracias al cloroplasto por lo cual acarrea una disminución en el contenido de la clorofila (Gosset et al., 2017; Qian et al., 2013). Sin embargo, los metales pesados así acumulados afectan una amplia gama de propiedades celulares de *Chlorella* sp., incluida la viabilidad celular, la estructura de la membrana y otras actividades. Por lo tanto, debido a esta tendencia a absorber metales tóxicos, las microalgas generalmente no se recomiendan como alimentos (Priya et al., 2016), a menos que sea cultivada en condiciones controladas.

El cromo causa toxicidad a *Chlorella* sp. en agua dulce afectando la fisiología de las algas y su estructura, además el metal pesado inhibe el crecimiento de la mismas en función a la concentración y tiempo de exposición al metal (Gosset et al., 2017; Qian et al., 2013).

Como resultado de la interacción del cromo con *Chlorella* sp. en el caso de concentraciones bajas del metal, se ha observado un crecimiento y un efecto estimulante de la fotosíntesis, mientras que en el caso de concentraciones más altas se observó una disminución de la reproducción y el tamaño de las células, así como la inhibición de la síntesis de clorofila (Long et al., 2013; Plugaru et al., 2016), esto se pudo evidenciar en un estudio en el que Cr (VI) en agua, afecta a *Chlorella* sp., lo cual se demostró en una disminución de la densidad de biomasa al final del ensayo (Lewis & Thursby, 2018; Yen et al., 2016).

La mortalidad de *Chlorella* sp., después de ser expuesta a cromo (VI) es causada por la destrucción los centros de reacción del alga, por un aumento del estrés oxidativo y

peroxidación de lípidos, coincidiendo con, Hörcsik et al., (2006) que al trabajar con la misma observó que el metal afectó tanto la densidad celular como la cantidad de pigmentos fotosintéticos de la microalga, ocasionando una disminución al momento de cuantificar el contenido de clorofila a y b.

1.4 *Chlorella* sp. en la cadena trófica

La base de la cadena trófica de ecosistemas acuáticos son las microalgas, que en condiciones favorables pueden llegar a aumentar en concentraciones celulares altas llegando a formar eflorescencias visibles en las superficies de cuerpos acuáticos. Tienen alta capacidad de adaptación y defensa lo cual se ha evidenciado en los últimos años a raíz del cambio climático, ya que como respuesta a las condiciones de estrés a las que han sido expuestas han cambiado su metabolismo; y sus metabolitos secundarios que comúnmente eran inofensivos para los ecosistemas acuáticos se han visto modificados volviéndolos potencialmente tóxicos (Levine & Fleurence, 2018).

Hasta el momento se han identificado 200 especies de microalgas que producen toxinas debido a los cambios estructurales que causan las condiciones de estrés que ocasionan los cambios climáticos, las toxinas pueden ocasionar la muerte de fauna marina por anoxia debido a las altas concentraciones, bioacumulación de toxinas en eslabones más altos de la cadena, toxina hemolíticas y toxinas de impacto respiratorio y tóxico (Levine & Fleurence, 2018).

Por tanto, es de vital importancia determinar como la toxicidad del cromo pueda llegar a causar efectos adversos sobre *Chlorella* sp., porque al formar parte de la base de la cadena trófica de los sistemas acuáticos es importante determinar cualquier cambio que afecte su respuesta fisiológica (Esperanza, 2017).

1.5 Bioensayos con *Chlorella* sp.

Debido al incremento de la contaminación, sobre todo acuática de los últimos años como consecuencia del mal manejo de las aguas residuales, producto de las diferentes industrias es necesario realizar pruebas de toxicidad acuática para establecer los potenciales daños que los organismos de estos entornos pueden presentar. Es por ello, que se implementan los ensayos biológicos basados en cultivos celulares como las microalgas que tienen como finalidad evaluar la respuesta fisiológica que presentan éstas al estar expuestas a sustancias a potenciales contaminantes con el fin de generar una respuesta gradual que servirá como base para establecer comportamientos que pueden afectar a los microorganismos utilizados y sus posibles daños en niveles superiores de vida.

Adicionalmente, con la información que nos proporcionan este tipo de bioensayos se puede determinar el grado de afección de la sustancia a tratar de acuerdo a la concentración en la que esta se encuentre en un entorno, este tipo de ensayos son necesarios ya que al contar con datos como la capacidad que tiene cierta sustancia de dañar a un organismo vivo de diferentes maneras, ya sea a corto o largo plazo, afectando el metabolismo y las funciones biológicas normales, daños que van a estar influenciados por variables como la estructura, propiedades y tiempos de exposición de la sustancia así como condiciones ambientales específicas (Agudelo, Gaviria, & Barrios, 2018; Chacón, Villamarín, & Álvarez, 2014)

1.6 Concentración Letal 50 y *Chlorella* sp.

Se trata de la concentración de una sustancia potencialmente peligrosa para un entorno, que pueda causar la muerte del 50 % del total de la población de organismos presentes

en el medio, ya sea inmediatamente después de aplicar la sustancia o en un tiempo establecido, bajo condiciones definidas, la determinación de esta concentración se da por métodos estadísticos y su valor está en unidades de mg/L (Agudelo et al., 2018; FAO, 2016).

El método estadístico usado para la determinación de CL_{50} es el análisis Probit mediante el programa Infostat, el cual se basa en la relación dosis-respuesta que permite determinar la tolerancia que posee el organismo utilizado basándose en la probabilidad mediante la ecuación:

$$\pi = C + (1 - C) * F(\beta_0 + X\beta_1)$$

Donde:

π = probabilidad de éxito

$F(Y)$ = función de distribución de la variable aleatoria; $Y = \beta_0 + \beta_1 X$

β_0 = término constante

X = variable de estrés

β_1 = coeficiente asociado a la variable de estrés

C = tasa de fallo natural

Con base en la anterior ecuación, para determinar la concentración letal media se produce la predicción $\pi = 0,5$ (equivalente al 50 % de la población celular) para la probabilidad de éxito, tomando el coeficiente asociado a la variable de estrés (β_1) y el término constante (β_0), para obtener la ecuación:

$$X_{50} = -\frac{\beta_0}{\beta_1}$$

Que permitió obtener el valor de la concentración necesaria para causar la muerte del 50 % de la población (Rienzo, 2010).

Las microalgas como *Chlorella* sp. se han utilizado en evaluaciones de ecotoxicidad ya que se consideran indicadores importantes de los ambientes acuáticos debido a que forman parte de los productores primarios de la cadena trófica y se encargan del paso de la energía al ecosistema, además presentan características comprobadas de sensibilidad en bioensayos de aguas residuales de industrias de curtiembre con altas concentraciones de cromo hexavalente, siendo la principal industria responsable de la contaminación de los ambientes acuáticos con este metal (Agudelo et al., 2018; Forero-Cujiño, Ruiz, Pinilla-Agudelo, & Melgarejo-Muñoz, 2016).

1.7 Influencia de la intensidad lumínica

Las condiciones de luz es uno de los principales factores que afectan tanto la fisiología como la fotosíntesis microalgal (Benavente, Aguilar, Contreras, Méndez, & Montañez, 2016), la fotosíntesis se realiza gracias a la utilización de la luz como fuente de energía permitiendo así un crecimiento de las microalgas como *Chlorella* sp. por lo tanto la productividad de la densidad celular va a estar asociada a la efectiva captación de luz (Rada, Lens, van der Steen, & López, 2018).

El régimen de luz determina la cantidad y calidad de energía luminosa disponible para que los organismos fotosintéticos conduzcan su actividades metabólicas, cumpliendo un papel fundamental sobre la producción de microalgas de pigmentos, ácidos grasos insaturados, carbohidratos y proteínas (Benavente et al., 2016). Las microalgas van a ser capaces de captaran la luz que se encuentra en una radiación fotosintéticamente activa que se encuentra en un rango entre 400-700 nm, generalmente la fuente de luz es el sol pero en cultivos industrializados se puede utilizar lámparas de sodio, lámparas

halógenas de tungsteno, tubos fluorescentes y luces LED como fuente de energía (Benavente et al., 2016).

La intensidad lumínica tiene que estar administrada de acuerdo a la densidad celular del cultivo de las microalgas ya que cuando la concentración celular es muy elevada no existe una distribución adecuada de la luz, dando lugar a zonas oscuras dentro del cultivo y por lo tanto inhibiendo el desarrollo correcto del mismo y afecta su respiración (Rada et al., 2018), además los rendimientos de producción responden a los incrementos o decrementos en intensidad lumínica, por lo cual para el crecimiento algal es muy importante la cantidad total de luz por día y esto puede ser controlado por el fotoperíodo (Benavente et al., 2016).

1.8 Influencia del pH

En el cultivo de microalgas uno de los factores principales es el pH ya que afecta directamente al metabolismo, eliminación de nutrientes y además que está estrechamente relacionado con la solubilidad del dióxido de carbono debido al proceso de fotosíntesis y respiración. Las microalgas se pueden ver afectas cuando los valores de pH son inferiores a 6 ya que se presentan limitaciones en su crecimiento, mientras que valores superiores a 10 afectan a la volatilización del amonio y precipitación de fosforo por lo cual la microalga va a morir debido a la falta de nutrientes, determinándose que un rango óptimo para el desarrollo de la microalga está en un rango de pH de 7 y 9 (Rada et al., 2018).

El pH es un factor importante que afecta la biosorción de metales pesados y existen numerosos estudios que mostraron un aumento de la absorción de metales al aumentar

el pH de la solución (Wan Maznah, Al-Fawwaz, & Surif, 2012). El pH de la solución ha sido identificado como uno de los parámetros más importantes que rigen la absorción de metales. La dependencia de la captación de metal en el pH está relacionada tanto con los grupos funcionales de superficie del biosorbente como con la química del metal en solución (Sari, Uluozlü, & Tüzen, 2011).

Debido a la ionización de los grupos funcionales de la pared celular de *Chlorella* sp. la carga negativa de la superficie de la misma aumenta a medida que se incrementa el pH, debido a esto cuando el potencial de hidrógeno se encuentra en un rango de 7 a 9 la capacidad de sorción de la microalga es la más alta, pero al sobrepasar un pH 10 disminuye, por lo tanto este factor es fundamental al cuando se implementa la microalga como biosorbente (Wan Maznah et al., 2012).

1.9 Potencial de Oxidación Reducción (ORP)

El ORP es el potencial de oxidación-reducción que posee el agua, este parámetro permite medir la energía química de una solución acuosa, mediante un potencial eléctrico expresado milivoltios que permite obtener información acerca de la actividad de los electrones, definiendo la predisposición que tiene una sustancia para perder o ganar electrones (Dāsa, 2015).

El potencial de óxido reducción está estrechamente relacionada con el potencial de hidrogeno (pH), ya que en valores alcalinos están presentes más agentes reductores dando como valores negativos de potencial eléctrico, mientras que para valores de pH ácidos al tener agentes que se oxidan, el ORP será un valor positivo. El potencial de óxido reducción con valores altos mayores a 50 mV va a encontrarse en ambientes anaerobios, cuando los valores oscilan entre 50 y -50 mV van a indicar entornos

anóxicos con nitratos y nitritos, y cuando se obtienen valores de -50 mV se está en presencia de un entorno reductor (Dāsa, 2015).

1.10 Oxígeno disuelto (DO)

El oxígeno disuelto es la forma de determinar la cantidad de oxígeno que se encuentra en el agua y que representa un factor primordial para la vida de ecosistemas acuáticos viables ya que variaciones en los mismos son un indicador de contaminación y daños que comprometan la vida de los mismos, teniendo como base que a niveles altos de oxígeno disuelto la calidad del agua es mejor mientras que niveles bajos pueden comprometer la vida de peces y otros organismos acuáticos de sobrevivir. Una de las fuentes de DO son los microorganismos que conforman el primer eslabón de la cadena trófica como lo son las microalgas como *Chlorella* sp. ya que en el proceso de fotosíntesis se elimina el dióxido de carbono y se lo reemplaza con oxígeno por lo tanto va a estar relacionado con el pH (Vymazal, 2010).

Capítulo II

Marco metodológico

2.1 Masificación de cultivo biosorbente (*Chlorella* sp.)

Chlorella sp. se masificó mediante cultivos en recipientes plásticos de 1000 mL previamente esterilizados por radiación UV por 15 minutos en conjunto con las mangueras plásticas.

Se utilizó agua esterilizada, 3 mL/L de fertilizante Nitrofoska, proporcionándoles aireación con bombas de pecera JAD modelo SE-314, con 12 horas luz y 12 horas oscuridad y a temperatura ambiente. A estos cultivos se les realizó un registro de cinética de crecimiento mediante conteo en cámara de Neubauer.

2.2 Cuantificación de pigmentos liposolubles de *Chlorella* sp. en aguas sintéticas con diferentes concentraciones de cromo (VI) y tres valores de pH.

Para evaluar el efecto que causa el metal a la fisiología de *Chlorella* sp., se estableció que la duración de los bioensayos en un período 96 horas

Para el planteamiento del diseño experimental se establecieron condiciones controladas de exposición a la luz, temperatura y pH además de concentraciones de reactivos iguales para todos los tratamientos en el proceso de evaluación de la respuesta fisiológica de *Chlorella* sp. para los ensayos se expuso a una concentración celular inicial de 30×10^6 células por mililitro de la microalga, la cual fue obtenida mediante un conteo celular previo con cámara de Neubauer, el volumen de cultivo calculado se colocó en balones de base redonda en conjunto con 1,5 mL/L de

fertilizante Nitrofoska-completo y el volumen de solución madre de cromo (VI) de 1000 ppm necesario, para las diferentes concentraciones (3,75; 7,50; 15,00; 30,00 y 60,00 mg/L), fueron establecidas previamente mediante ensayos con diferentes concentraciones del metal, mostrando que al exponer a la microalga a concentraciones más altas *Chlorella* sp. moría en menos de 24 horas; después se aforo hasta llegar a un volumen del 250 mL por balón. Para cada concentración de metal se realizaron 3 repeticiones.

Para los cultivos control (0 mg/L de Cr (VI)), se colocó el volumen de cultivo de *Chlorella* sp. para la concentración inicial de 30×10^6 células por mililitro, 1,5 mL/L de Nitrofoska y agua estéril hasta aforar a 250 mL para cada balón, este procedimiento se lo realizo por triplicado.

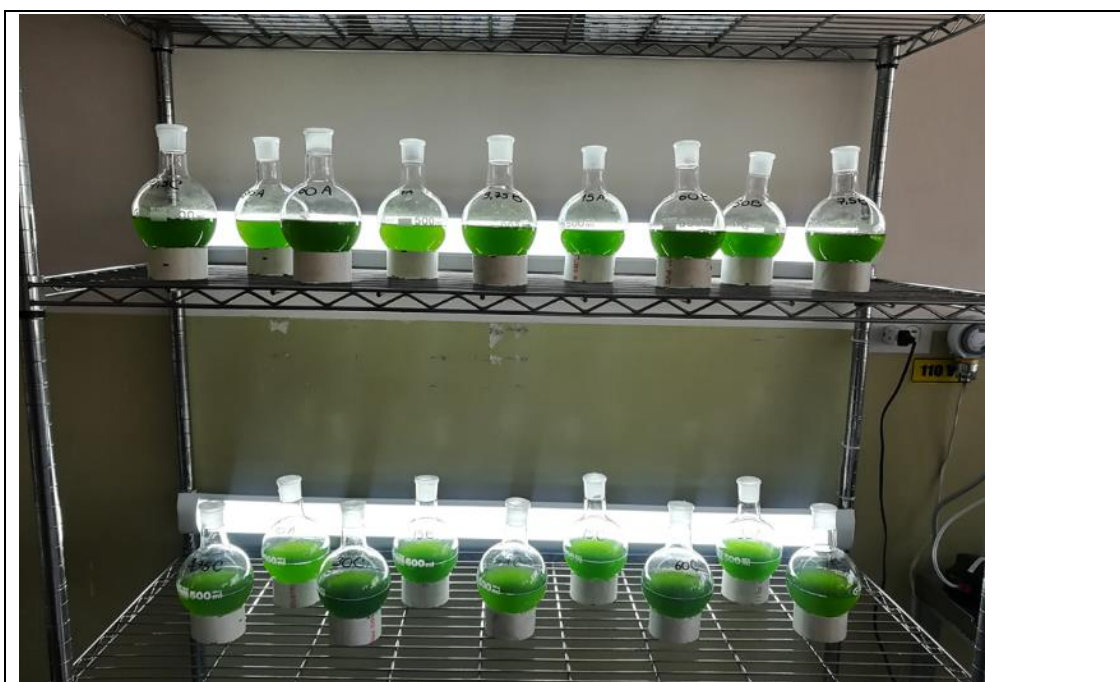


Figura 1. Montaje de los 18 tratamientos con diferentes concentraciones de Cr (VI) y valores de pH.
Fuente: La Autora, 2019.

Se montaron un total de 18 balones con las diversas concentraciones de metal y los testigos del ensayo. Los tratamientos fueron colocados en una estantería de dos pisos, dividiéndolos en dos grupos de 9 balones en cada piso en un diseño completamente azar (DCA), con condiciones controladas de luz artificial 12:12 h, la cual fue medida dos veces al día con el luxómetro MW700 Standard Portable Lux Meter, además los balones tuvieron agitación manual tres veces al día, y se realizaron dos mediciones al día de O₂ disuelto (DO) y potencial de óxido reducción (ORP), durante la duración del ensayo que fue de 96 h.

En este ensayo se evaluaron tres valores de pH (4, 6 y 8); con las condiciones y metodología para la preparación de soluciones de metal y la de los testigos establecidos anteriormente, cada valor de pH se ajustó con una solución buffer específica (Anexo 1). Cada 24 horas se midió el pH de cada balón tanto de las diferentes concentraciones de Cr (VI) como del testigo para verificar que el Buffer fuera efectivo.

Los valores del pH y ORP fueron obtenidos mediante el equipo Mettler Toledo™ medidor de pH de sobremesa FE20 FiveEasy™ de 4,54 kg, mientras que los valores de DO mediante el equipo Mettler Toledo™ SevenGo pro™ SG6 Dissolved Oxygen Meter.

La evaluación de la producción de pigmentos se determinó mediante lecturas en el espectrofotómetro de UV-visible Jasco V-730, en el cual se obtendrán datos para determinar la cantidad de clorofila a, b y carotenoides (Domínguez & Carmen, 2013), para estas lecturas se tomó una muestra a las 0 h y a las 96 h de cada uno de los 18 tratamientos de cada pH, incluyendo las concentraciones del metal como del testigo.

El primer día (0 horas) de cada balón se tomaron dos muestras de 5 mL del cultivo las cuales se colocaron en tubos de ensayo con tapa de rosca, obteniendo un total de 36 muestras que fueron centrifugados por 25 minutos a 331 RCF x g (1605 rpm) por

medio de la centrifuga Gemmy Industrial Group modelo PLC-05, para obtener una pastilla celular (pellet) de *Chlorella* sp. además de un sobrenadante que se descartó con la ayuda de una pipeta Pasteur, después se procedió a colocar 3 mL de metanol en el tubo de ensayo que contenía el pellet, para evitar la fotooxidación se tapó cada tubo con papel aluminio; la muestra se agitó vigorosamente en vórtex por 10 segundos, posteriormente se sonicó en baño de hielo dos ciclos durante cinco minutos en el equipo Fisherbrand FS60D Tabletop Ultrasonic Cleaner. Se dejó las muestras en reposo a 4 °C durante 72 horas antes de proceder con la primera lectura de pigmentos en el espectrofotómetro. Después de transcurridas las 72 horas en refrigeración, se sonicó nuevamente en baño de hielo dos ciclos durante cinco minutos, se centrifugó por 20 minutos.

Para la lecturas se utilizó el espectrofotómetro de UV-visible Jasco V-730 para lo cual se separó el extracto de pigmentos (sobrenadante) con una micropipeta, tomando en cuenta el volumen del extracto, se colocó en una celda de vidrio y posteriormente se realizó la lectura en un espectrofotómetro previamente calibrado con metanol a las longitudes 665 nm, 652 nm, y 470 nm (Arredondo Vega & Voltolina, 2007). Posteriormente a la lectura, al pellet celular se colocó nuevamente 3 mL de metanol, se tapó con papel aluminio, se agitó en vórtex, se sónico en baño de hielo dos ciclos durante 5 minutos. Se volvió a dejar las muestras en reposo a 4°C durante 24 horas para realizar la segunda lectura. Al cabo de 24 horas se repitió el mismo procedimiento para leer las muestras en el espectrofotómetro y se volvió a dejar en reposo siguiendo los pasos anteriores después de la lectura hasta la refrigeración. El reposo para la última lectura es de 72 horas. Una vez transcurridas las 72 horas se lee las muestras en el espectrofotómetro por última vez. El procedimiento para las 3 lecturas de pigmento

antes descrito se repite para las 36 muestras tomadas el último día (96 h). Esta metodología establecida se aplicó para pH 4, pH 6 y finalmente con el pH 8.

Para comparar la actividad fotosintética de la microalga *Chlorella* sp. en función a las concentraciones de cromo (VI) y diferentes pH, los valores obtenidos en las longitudes de onda 665 nm, 652 nm, y 470 nm en el espectrofotómetro fueron utilizados para obtener la cantidad pigmentos (clorofila a, clorofila b y carotenoides) mediante el uso de las siguientes fórmulas (Rosales, 2018):

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g mL}^{-1}) = ((DO_{665} \times 15,65) - (DO_{652} \times 7,34)) \times \frac{VE}{VM}$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g mL}^{-1}) = ((DO_{652} \times 27,05) - (DO_{665} \times 11,21)) \times \frac{VE}{VM}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g mL}^{-1}) = (DO_{470} \times 4) \times \frac{VE}{VM}$$

Donde:

VE: Volumen del extracto

VM: Volumen de la muestra

2.3 Curva de crecimiento de *Chlorella* sp.

La exposición de la microalga al cromo afectará en su desarrollo; por lo tanto, para evaluar esta variable se realizará la curva de crecimiento de la microalga *Chlorella* mediante el conteo celular en cámara de Neubauer (Forero-Cujiño et al., 2016).

Para este proceso cada 24 h se tomó 1 mL de muestra de cada uno de los 18 balones en un tubo Falcon con una gota de lugol para detener el crecimiento celular, luego se procedió a colocar una gota en la cámara de Neubauer con la ayuda de una pipeta Pasteur y observo al microscopio para el respectivo conteo cuando la concentración

celular era alta se realizaron diluciones 1:10; el volumen de cultivo tomado para los conteos de cada balón se repuso con agua estéril y se tapó con Parafilm.

Con los datos obtenidos se establecieron curvas de crecimiento de cada una de las concentraciones del metal y del testigo, así como también se pudo establecer las curvas de crecimiento con referencia al pH, desde las 0 h hasta las 96 h; para observar así la influencia que cada factor tiene sobre *Chlorella* sp.

2.4 Determinación de la concentración letal media (CL₅₀)

Esta metodología busca establecer cuál es la concentración de cromo (VI) que puede matar a la mitad de células de *Chlorella* sp. para este proceso una vez realizado el conteo en cámaras de Neubauer, durante el ciclo de 96 horas (Agudelo et al., 2018); se procedió a calcular el porcentaje de mortalidad de *Chlorella* sp.; tomando en cuenta la concentración celular inicial y final, una vez expuesta a diferentes concentraciones del metal y diferentes valores de pH.

El método estadístico por el cual se estima esta concentración letal media es un análisis Probit, que permitió determinar la concentración de cromo (VI) en la cual las microalgas van a morir en un 50 % (Cordero, Guevara, Morales, & Lodeiros, 2005), además que permitió establecer que el pH puede ser un factor importante al momento de establecer la concentración letal media de *Chlorella* sp.

Capítulo III

Resultados y Discusión

3.1 Masificación de cultivo de *Chlorella* sp.

Partiendo de cultivos de *Chlorella* sp. de 1×10^6 cel/mL se pudo establecer la cinética de crecimiento de la microalga, logrando alcanzar la fase exponencial a partir del día 30 con una densidad celular de 50×10^6 cel/mL, esto bajo las condiciones de laboratorio controladas con un fotoperíodo 12:12 y la temperatura ambiente 25 °C. Estableciendo que el fotoperíodo y la temperatura aplicados permitieron un correcto desarrollo de la cinética de la microalga (Benavente et al., 2016; Qiu, Gao, Lopez, & Ogden, 2017) dejando que estos microorganismos fotosintéticos pudieran realizar sus actividades metabólicas normales.

3.2 Cuantificación de pigmentos liposolubles de *Chlorella* sp.

Los bioensayos son pruebas que permiten que organismos como microalgas por medio de ensayos toxicológicos brinden información acerca de la acción desconocida de sustancias estableciendo los efectos que ocasionan fisiológicamente sobre los organismos de prueba en periodos de tiempo de hasta 96 horas (Agudelo et al., 2018; Chacón et al., 2014). Entre las diferentes especies de microalgas, *Chlorella* sp. es un típico unicelular con una capacidad prominente para acumular altas cantidades de lípidos y proteínas (Xie et al., 2018). Para la extracción de pigmentos como clorofila a, clorofila b y carotenoides que son los encargados de las actividades fotosintéticas de microalgas como *Chlorella* sp. debido a que estas clorofilas cumplen la función de receptores de luz mientras que los carotenoides van a encargarse de la protección de

las clorofilas, estos tres pigmentos van a ser solubles en alcohol, metanol, benceno y acetona, mientras que son insolubles en agua y éter de petróleo (Lee, 2018; Zia et al., 2017). En pruebas previas al bioensayo se determinó que el solvente que más pigmentos extrajo al compararlo con acetona, acetona: metanol y metanol, fue el último por lo tanto para este trabajo se utilizó el metanol.

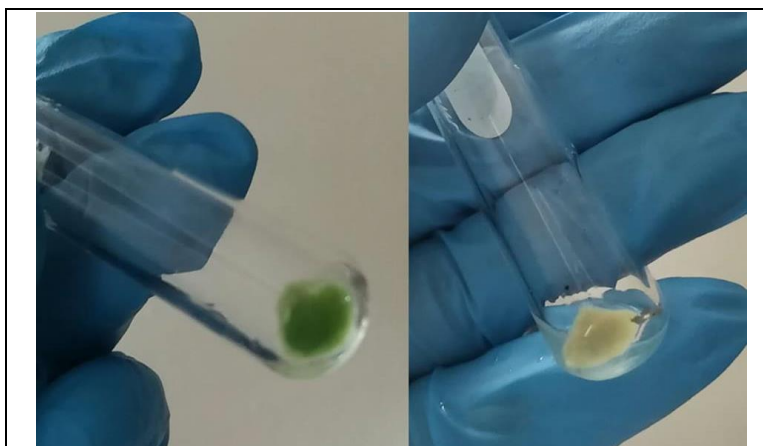


Figura 2. Diferencia de color *Chlorella* sp. 96 horas, pH 4, 60 mg/L de Cr (VI).

Nota: Izquierda Hora extracción de pigmentos, derecha Hora 96 extracción pigmentos.

Fuente: La autora, 2019

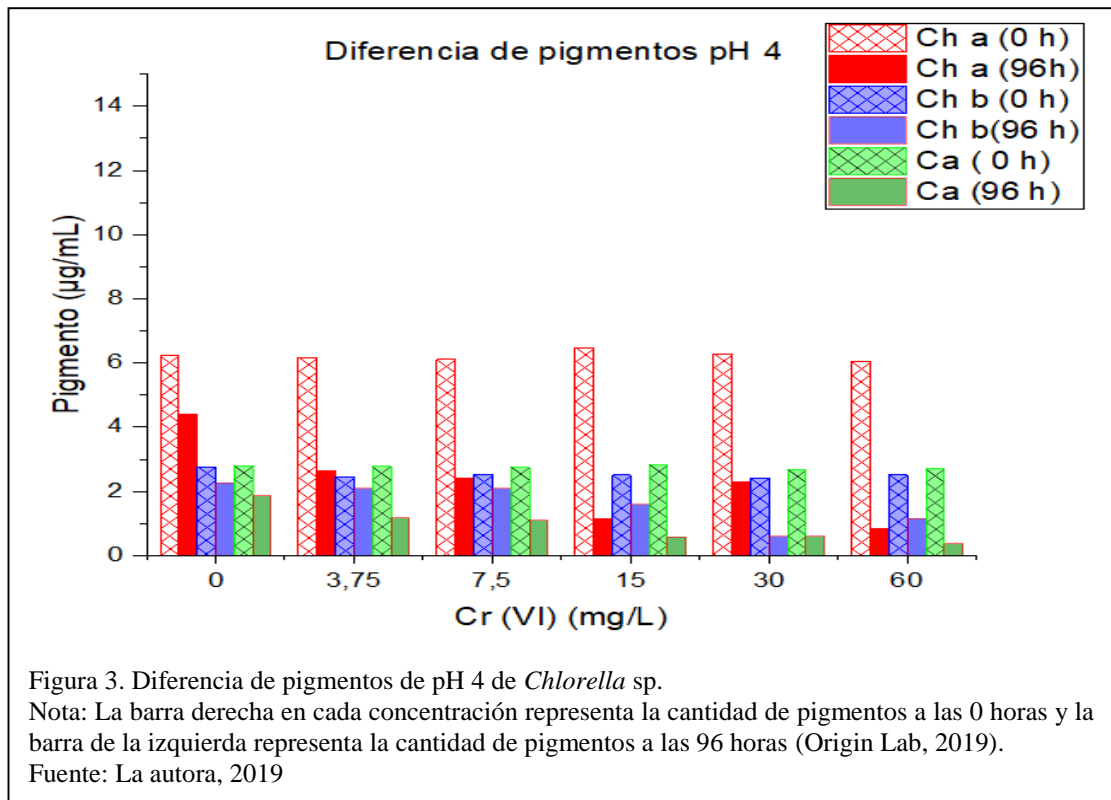
Se cuantificó la cantidad de clorofila a, b y carotenoides de la *Chlorella* sp. mediante métodos espectrofotométricos, para estas lecturas se tomó dos muestra de cada uno de los 18 tratamientos con una concentración celular inicial de 30×10^6 células por mililitro de *Chlorella* sp. se evaluó la cantidad de pigmentos de la microalga en presencia de las cinco concentraciones de metal (3,75; 7,50; 15,00; 30,00 y 60,00 mg/L) y un testigo cada uno con tres repeticiones, las muestras se tomaron a las 0 h y a las 96 h incluyendo las concentraciones del metal y el testigo, este procedimiento se replicó con cada pH. Mediante la cuantificación de pigmentos se pudo comprobar que el pH es una factor fundamental como se aprecia en el diagrama de barras de las figura 2,3 y 4, ya que el volumen de pigmentos es notablemente menor en el pH 4 llegando a un máximo de alrededor de 6 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el pH 6 llega a 10 $\mu\text{g/mL}$ y el pH 8 a 14 $\mu\text{g/mL}$.

de los tres pigmentos, la gran adaptabilidad que presenta *Chlorella* sp. en pH 6 y 8 se corrobora con el hecho que la mayoría de medios de cultivo donde se desarrollan algas verdes son alcalinos de hasta 10 ya que si superan este valor el desarrollo de la microalga va a verse afectado (Qiu et al., 2017; Xie et al., 2018).

Los factores de pH y concentración de Cr (VI) van a influenciar considerablemente en la producción de los tres pigmentos analizados.

En un pH 4 el comportamiento de la clorofila *a* presentó una concentración inicial a las 0 horas de 6 µg/L en todas las concentraciones del metal mientras que hasta las 96 horas del ensayo se apreció que a medida que incrementaba la cantidad de cromo hexavalente en el solución la cantidad de pigmento se reducía, comportamientos también se pudo apreciar para la clorofila *b* y carotenoides que mostraron una concentración inicial de alrededor de 3 µg/L a las 0 horas la cual se redujo hasta las 96 horas de ensayo a medida que aumentaba la concentración de metal.

Con estos resultados se puede apreciar que el pH es fundamental para el desarrollo de *Chlorella* sp. ya que con valores menores a 6 afectan a la microalga considerablemente desde el primer momento de contacto ya que va a comprometer las estructuras encargadas de la producción de pigmentos (Rada et al., 2018) la disminución de los pigmentos hasta las 96 horas es debido a que el metal en este tiempo va a causar daños en los centros de reacción del alga, por un aumento del estrés oxidativo y peroxidación de lípidos ocasionando reducción de pigmentos liposolubles (Long et al., 2013; Plugaru et al., 2016)

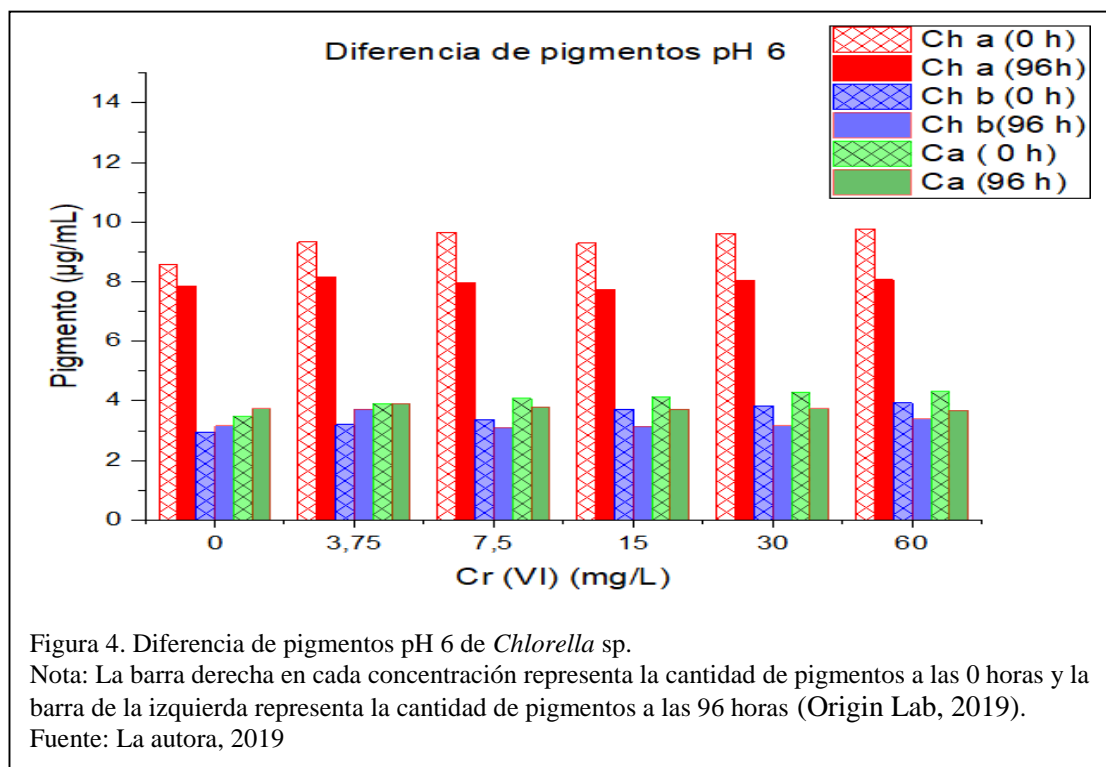


Con respecto al pH 6 se aprecia una mayor concentración inicial de todos pigmentos con respecto al pH 4, los tres pigmentos presentaron comportamientos diferentes en este pH hasta las 96 horas ya que la clorofila *a* mostró una reducción que aumentaba a medida que incrementaba la concentración del metal.

Mientras que la clorofila *b* y los carotenoides en 0 y 3,75 mg/L de metal incrementaron su concentración, mientras que para las concentraciones más altas de metal la reducción de pigmento fue tan grande como se observó en la clorofila *a*, demostrando como afectó la exposición de la microalga a un pH que no es el óptimo para su desarrollo y estableció que los pigmentos secundarios clorofila *b* y carotenoides actúan como auxiliares.

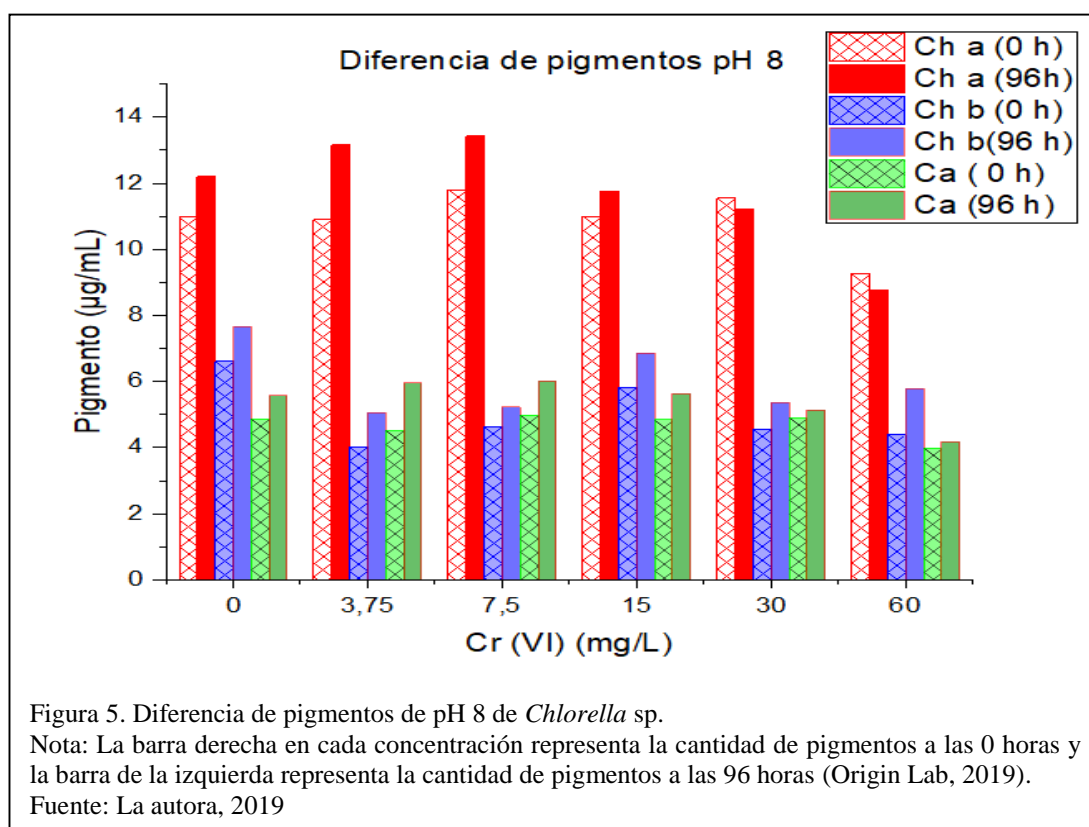
Ya que si se empieza a ver afectado el pigmento principal, la clorofila *a* que es el principal receptor de luz, intervienen la clorofila *b* que actúa como receptor secundario

de luz y los carotenoides que están involucrados en dos procesos fisiológicos principales debido a que ejercen como pigmentos accesorios en los complejos de captación de luz, y protegen la clorofila y la membrana de los tilacoides contra el daño fotooxidativo al absorber un exceso de energía, apagando las moléculas de clorofila del estado triplete y eliminando el oxígeno individual y otras especies de oxígeno tóxicas formadas dentro del cloroplasto (Rise, Cohen, Vishkautsan, Cojocar, & Gottlieb, 1994).



A pH 8 se muestra que la cantidad de pigmentos obtenida es la más alta de los tres valores de pH analizados, la clorofila a presenta un incremento después de las 96 horas en las concentraciones de hasta 15 mg/L mientras que se observa una reducción en las concentraciones más altas, el comportamiento de la clorofila b y carotenoides se puede apreciar que ambos pigmentos, en todas las concentraciones de metal, se mantienen e incluso aumentan en concentraciones menores a 30 mg/L.

A este pH se confirma que cuando la microalga se desarrolla en valores de pH alcalinos entre 7 y 10 su desarrollo es óptimo (Sari et al., 2011) y que con estos valores los grupos funcionales que se encuentran en la pared celular *Chlorella* sp. involucrados en el proceso de biosorción no se ven afectados sin comprometer las estructuras de la microalga encargadas de la fotosíntesis (Wan Maznah et al., 2012) por lo cual la cantidad de pigmentos no se ve comprometida en el bioensayo.



Las concentraciones de metal que afectaron considerablemente a *Chlorella* sp. independientemente del valor de pH fueron las mayores a 15 mg/L de Cr (VI) ya que con estas concentraciones la pared celular de la microalga que contiene algunos grupos funcionales como amino, hidroxilo, carboxilo y sulfato se ven afectados por la saturación del metal (Priya et al., 2016), alterando así la fisiología de la microalga e inhibiendo su crecimiento y producción normal de pigmentos.

La cantidad de pigmentos clorofila a, clorofila b y carotenoides están estrechamente relacionados al pH que es fundamental en el desarrollo de *Chlorella* sp. y su interacción con cromo debido a que tiene influencia con la solubilidad de nutrientes del medio y la biodisponibilidad del metal en la solución acuosa, ya que cuando se están trabajando en pH bajos los metales tienden a ser más fáciles que se incorporen a los procesos metabólicos de *Chlorella* sp. ocasionando que la saturación sea mayor y afectando así sus centros fotosintéticos (Vymazal, 2010).

La gran influencia que tiene el pH se puede corroborar con el comportamiento de los tratamientos testigo ya que las cantidades de pigmentos iniciales en los 3 valores de pH fueron iguales con todas las concentraciones de metal y hasta las 96 h del ensayo el testigo que estuvo expuesto a pH 4 fue el que mayor reducción presento, mientras que para pH 6 no existió una reducción alta y para pH 8 existió un aumento de la densidad celular hasta las 96 h.

Además de este ensayo, se realizó un Análisis de varianza (ANOVA) en el software Infostat 2008, para establecer si existe diferencia significativa para cada pigmento, para clorofila a (Anexo 6), clorofila b (Anexo 7) y carotenoides (Anexo 8). Se obtuvo que para los valores de pH y concentraciones de metal si existió diferencia significativa arrojando que el pH 8 es en el que menor diferencia hubo entre las 0 h y 96 h en cuanto a la cantidad de pigmento, seguido del pH 6 y por último el pH 4 en ambos pigmentos lo cual coincide con Vymazal (2010) que afirma que el pH va a ser factor fundamental en el comportamiento de la microalga determinando la saturación que puede ocasionar el metal a *Chlorella* sp. ya que de acuerdo al pH el cromo hexavalente va incorporarse a los procesos metabólicos de la microalga.

Al analizar las concentraciones de cromo hexavalente también existió diferencia significativa se obtuvo que el testigo en conjuntos con las dos concentraciones más bajas de metal presentan las menores reducciones, mientras que 60 mg/L es la concentración que más afecta la cantidad de los pigmentos, para los carotenoides se observó diferencia significativa en cuanto a la interacción de pH y concentración de metal, mostrando que un pH de 8 tanto el testigo con concentraciones de metal de hasta 15 mg/L no existió reducción del pigmento, mientras que en pH de 4 las concentraciones desde 15 hasta 60 mg/L de Cr (VI) presentan los valores de reducción de carotenoides más alto corroborando lo que menciona Priya et al. (2016) que las concentraciones de metal van a presentar daños en la microalga ya que la pared celular de la misma va a verse afectados por la saturación del metal ocasionando un colapso de los centros fotosintéticos, encargados de la producción de pigmentos fotosintéticos de *Chlorella* sp. reduciendo significativamente los pigmentos de las microalgas tanto la clorofila *a* que es el pigmento principal como la clorofila *b* y carotenoides que actúan como auxiliares captando la luz cuando la clorofila *a* presenta algún daño (Rise et al., 1994).

Tabla 1.
Diferencia pigmentos entre 0 h y 96 h del pH 4.

		Testigo	3,75	7,5	15	30	60
pH 4	Ch <i>a</i>	1,8241	3,5172	3,6992	4,3149	3,9899	5,2152
	Ch <i>b</i>	0,4975	0,3512	0,4231	0,9111	1,8025	1,3697
	Carotenoides	0,9355	1,6067	1,6664	2,2388	2,0882	2,3378
pH 6	Ch <i>a</i>	0,7192	1,1907	1,6946	1,5647	1,5783	1,7217
	Ch <i>b</i>	-0,2147	-0,5372	0,2701	0,5935	0,6723	0,5318
	Carotenoides	-0,2571	0,0025	0,2825	0,4336	0,5708	0,6333
pH 8	Ch <i>a</i>	-1,2395	-2,2618	-1,6312	-0,7814	0,5051	0,7760
	Ch <i>b</i>	-1,9480	-1,0505	-0,5830	-0,9293	-1,399	-0,560
	Carotenoides	-0,6998	-1,4339	-1,0316	-0,7970	-0,189	-0,737

Nota: Los datos muestran la diferencia entre la cantidad de pigmentos: clorofila a (Ch *a*), clorofila b (Ch *b*) y carotenoides, obtenidos a las 0 h y 96 h, los valores que se muestran negativos representan que existió un aumento en la cantidad de pigmentos.

Fuente: La autora, 2019

3.3 Crecimiento celular de *Chlorella* sp. en aguas sintéticas con diferentes concentraciones de cromo (VI) y en tres valores de pH.

Una vez planteados los 18 balones con una concentración celular inicial de 30×10^6 células por mililitro de *Chlorella* sp. se evaluó la densidad celular de la microalga en presencia de las cinco concentraciones de metal (3,75; 7,50; 15,00; 30,00 y 60,00 mg/L) y un testigo cada uno con tres repeticiones, expuestos a una intensidad lumínica promedio de 1638 lux, la cual está dentro del rango óptimo de 10000 a 50000 luxes (Santhanam, Thirunavukkarasu, & Perumal, 2015) para trabajar con volúmenes de 250

mL ya que con esta intensidad la luz puede penetrar en el cultivo y no formar zonas oscuras que puedan representar influencia al momento del desarrollo de *Chlorella* sp. Se realizaron conteos celulares cada 24 horas en cámara de Neubauer de cada uno de los balones durante las 96 horas del ensayo, los datos obtenidos de cada repetición fueron promediados para obtener las curvas de crecimiento que se observa en figura 5, la cual muestra tiempo de exposición vs. % densidad celular. Al observar las curvas con respecto a las concentraciones de metal independientemente del valor de pH, *Chlorella* sp. tiene un comportamiento similar, al estar expuesta a bajas concentraciones de Cr (VI) de hasta 7,5 mg/L se aprecia un aumento en su concentración celular incluso superando los valores del testigo, mientras que si incrementa la concentración del metal, a partir de 15 mg/L se observa una reducción de la biomasa siendo los 60 mg/L de Cr (VI) los que afectan en mayor medida la actividad de *Chlorella* sp. este comportamiento se asocia con el metal usado ya que el cromo pertenece a los metales que son esenciales como requerimientos nutricionales en cantidades mínimas para muchos organismos pero que son tóxicos cuando están presentes en altas dosis (De Paiva, Da Costa, Fernandes, & Forsin, 2014; Priya et al., 2016; Vignati, Dominik, Beye, Pettine, & Ferrari, 2010).

El impacto que tiene el pH y la concentración de cromo hexavalente juntos se puede apreciar a medida que transcurre el tiempo, pues en un pH de 4 en 24 horas se aprecia un notable decrecimiento que avanza a medida que aumenta el tiempo hasta llegar a las 96 horas. Adicionalmente se puede observar en cuanto a las concentraciones del metal, que las curvas de crecimiento desde 3,75 hasta 15 mg/L incluyendo el testigo presentaron un comportamiento similar, mientras que para las concentraciones más altas a las que fueron expuestas la microalga de 30 y 60 mg/L se redujo la densidad poblacional.

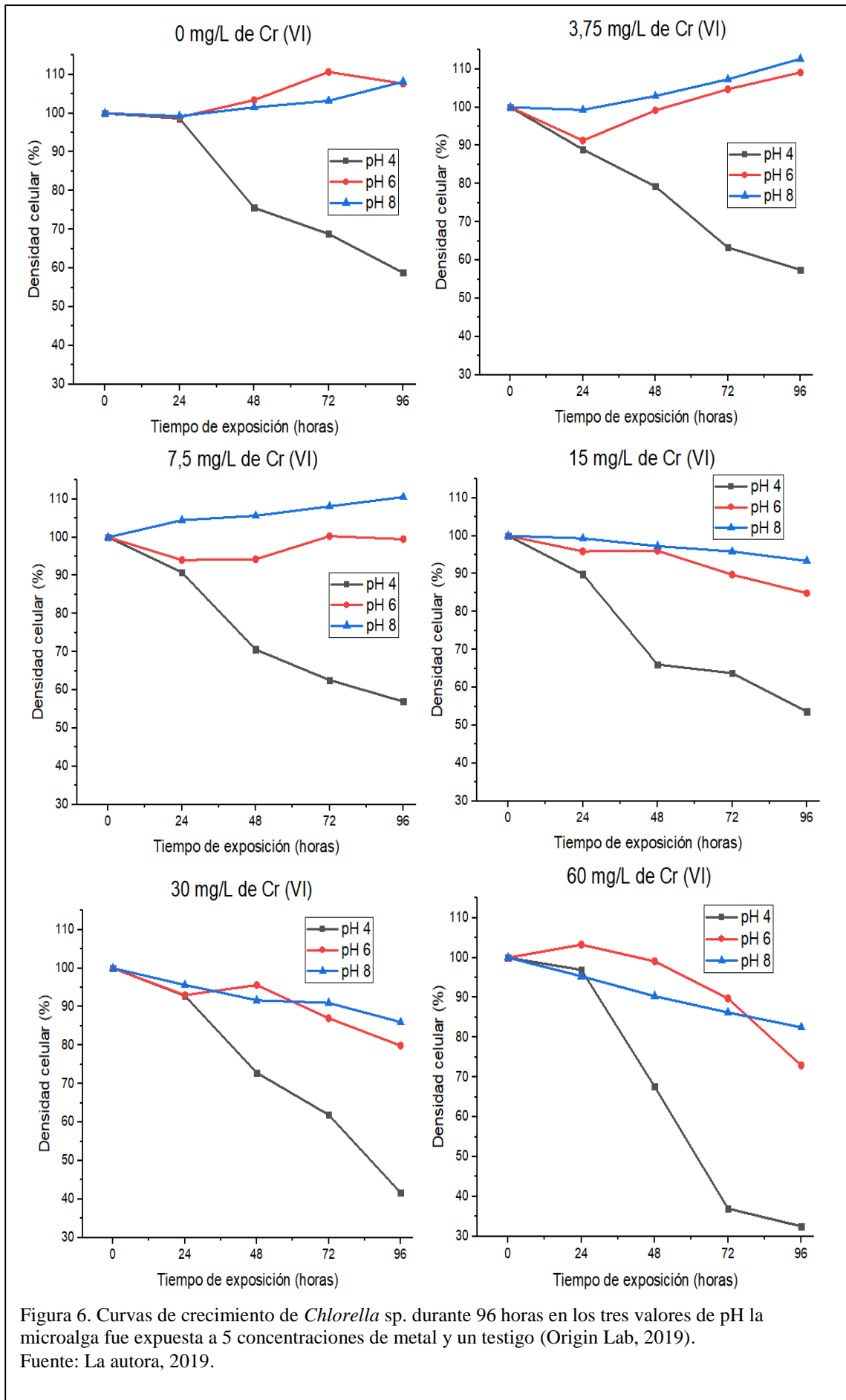


Figura 6. Curvas de crecimiento de *Chlorella* sp. durante 96 horas en los tres valores de pH la microalga fue expuesta a 5 concentraciones de metal y un testigo (Origin Lab, 2019).
Fuente: La autora, 2019.

Cuando *Chlorella* sp. estuvo en un pH de 6 se observa que hasta las 48 horas los valores del porcentaje de densidad poblacional se encontraron similares para las 5 concentraciones de metal y el testigo, mientras que al llegar a las 72 horas se observa una diferencia entre el comportamiento de las concentraciones de 0; 3,75 y 7,5 mg/L de Cr (VI) que tienden a mantenerse o aumentar en su porcentaje de densidad celular.

Mientras que las microalgas que fueron expuestas a concentraciones de más de 15 mg/L se observa una disminución de la densidad celular, este comportamiento se mantiene constante a las 96 horas ya que las concentraciones menores siguen aumentando y las mayores presentan más afección.

El comportamiento de *Chlorella* sp. en este pH es similar al que se obtuvo para el pH 8 donde de igual manera se aprecia notables diferencias entre las concentraciones menores a 7,5 mg/L que incrementan su densidad celular mientras que a concentraciones mayores a 15 mg/L la microalga se ve afectada a medida que transcurren las 96 horas.

Mediante las curvas de crecimiento se confirma la importancia del pH para el desarrollo de *Chlorella* sp. debido a que su desarrollo se va a ver comprometido en pH ácido ya que al afectar las estructuras de la microalga así como los pigmentos de la microalga al comprometer los centros encargados de la fotosíntesis como se observó en la cuantificación de pigmentos pues los bajos niveles clorofila a, clorofila b y carotenoides en este pH nos indica que afecta drásticamente a la *Chlorella* sp. desde el momento que se encuentra en contacto con el mismo (Rada et al., 2018).

En los valores de pH de 6 y 8 el crecimiento celular y el desarrollo de la fotosíntesis es óptimo, ya que no se ve afectada la pared celular de la microalga con polisacáridos, proteínas o lípidos (Priya et al., 2016) favoreciendo así la resistencia de la misma con el cromo que se apreció que a concentraciones menores de hasta 7,5 mg/ L ya que con bajas tiene un efecto estimulante para el crecimiento celular y fotosintético (Long et al., 2013; Plugaru et al., 2016), mientras al tratar con concentraciones elevadas mayores a 15 mg/L disminuye la reproducción de la microalga.

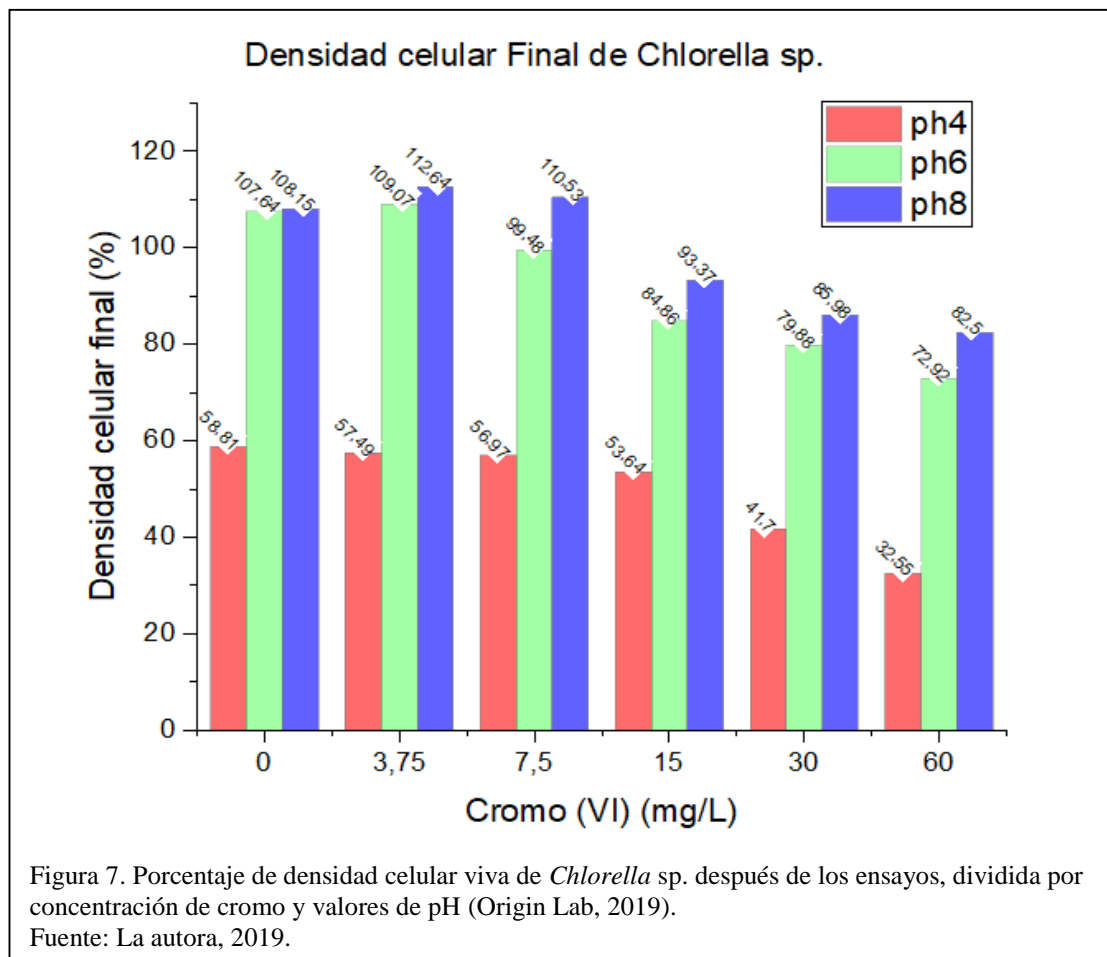
Además que presenta reducción de tamaño en inhibición de la síntesis de clorofila, dañando así el complejo captador de luz de la microalga y concluyendo en la muerte de la misma (Lewis & Thursby, 2018; Yen et al., 2016), esto se da principalmente por el daño que causa el metal mediante un estrés oxidativo y peroxidación de lípidos que afecta la densidad celular y disminución de pigmentos liposolubles (Hörcsik et al., 2006).

Para analizar el porcentaje de crecimiento de *Chlorella* sp, durante el ensayo se determinó que 30 millones de células se establecían como 100% ya que esta concentración de microalgas varió ligeramente entre los tratamientos, al finalizar el ensayo se obtuvieron los porcentajes de densidad celular de la figura 6 donde se aprecia que el grupo de microalgas que fueron expuestas a un pH 4 en todas las concentraciones de metal incluyendo el testigo, presentaron la densidad celular más baja con respecto a los pH de 6 y 8.

Mostrando que el desarrollo apropiado de la microalga para un rendimiento adecuado de biomasa será en condiciones alcalinas ya que a medida que el valor de pH aumenta la densidad celular también lo hace (Gong, Feng, Kang, Luo, & Yang, 2015), el pH es una de las condiciones ambientales más críticas en el cultivo de microalgas que

determina la solubilidad y la disponibilidad de CO₂ y nutrientes, y tiene una influencia significativa en el metabolismo de las microalgas (Altenburger, Krüger, & Eisenträger, 2010; Qiu et al., 2017).

Los valores de pH óptimos para un cultivo de microalgas como *Chlorella* sp. son alcalinos y van desde 7 a 10, al no estar dentro de este rango los cultivos celular tienen una alta probabilidad de colapsar ya que se verán comprometidos los procesos celulares ya que buscarán mantener un pH acorde a sus necesidades (Rada et al., 2018; Santhanam et al., 2015).



En la figura 6 también se puede observar que el crecimiento de la *Chlorella* sp. para los pH 6 y 8 en las concentraciones de hasta 7,5 mg/L de cromo ya que la densidad celular aumento hasta una 12 % del en pH 8, y hasta un 9 % para pH 6 en el periodo

de 96 h, mientras que el pH 4 afecta drásticamente a la microalga en las concentraciones de metal más bajas pues existe una reducción de casi el 40 % viéndose afectado incluso el testigo, para los tres valores de pH las concentraciones de metal que superan los 15 mg/L van a afectar a la microalga pero en diferentes grados ya que pH 4 con la concentración de metal de 60 mg/L la densidad celular se redujo hasta 32,55 % mientras que pH 6 y 8, finalizó con densidad celulares de 72,93 % y 82,51 % respectivamente.

Con respecto a la producción de pigmentos el pH 4 va a afectar uniformemente a todas las concentraciones de metal pues presenta la cantidad de pigmentos más bajas de los 3 valores de pH, el testigo en comparación con las 5 concentraciones de cromo presentó aumento de los 3 pigmentos al final del ensayo, mientras que para el metal la cantidad de pigmento luego de las 96 horas disminuyen la clorofila *a* y carotenoides mientras que la clorofila *b* presenta un incremento eso es debido a que este pigmento es un auxiliar de la clorofila *a* y al verse afectado el captador de luz principal por los daños este pigmento va actuar para que no colapse completamente el sistema fotosintético (Rajesh et al., 2017).

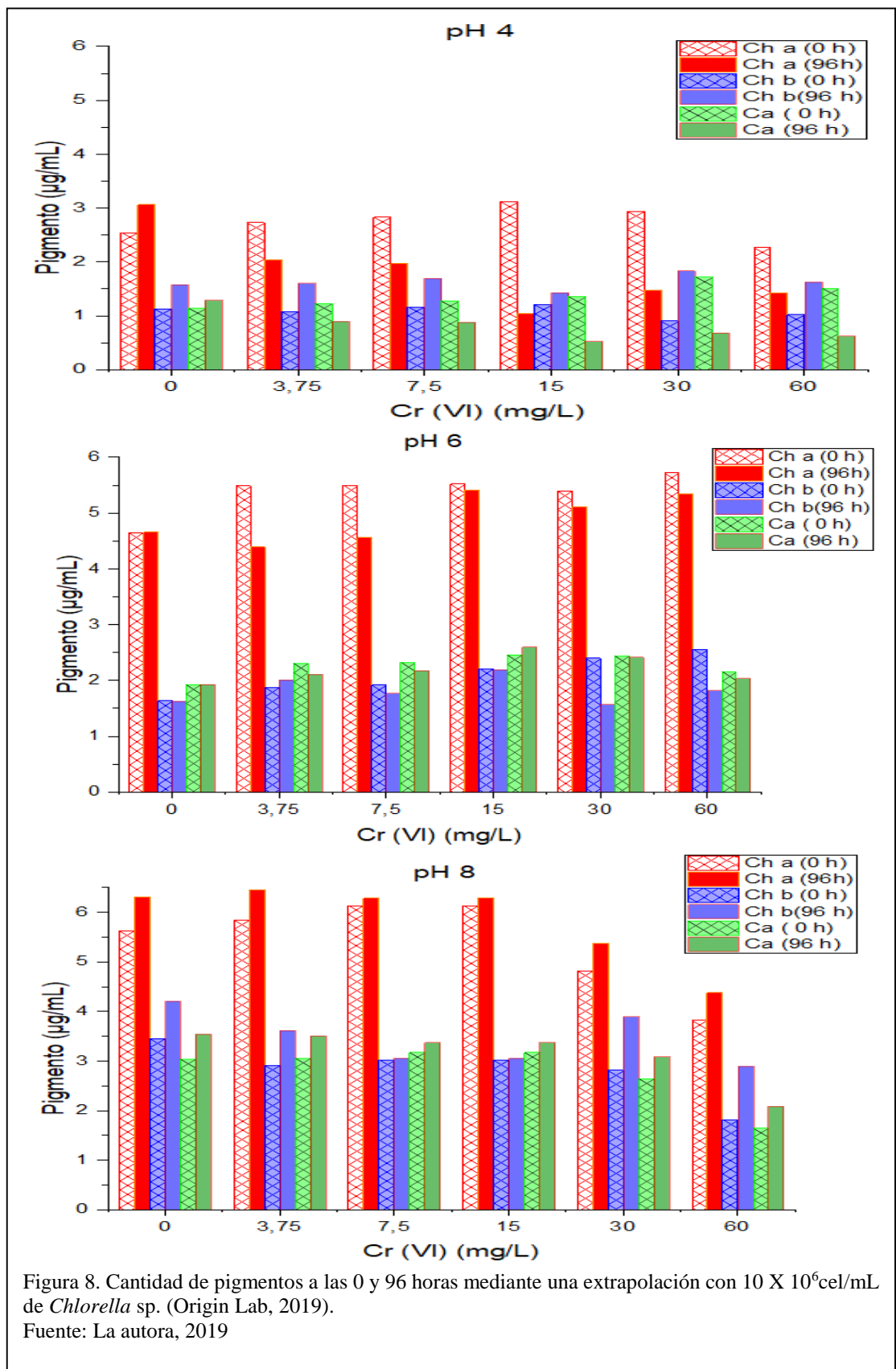
Los daños causados a la microalga son debido a que en un pH ácido la probabilidad de que colapsen los sistemas fotosintéticos como se observó en el testigo de este pH que fue el que menor cantidad de pigmentos presentó en comparación con pH 6 y 8 (Rada et al., 2018; Santhanam et al., 2015) este factor en conjuntos con que el metal va a causar en la microalga daños por el estrés oxidativo y peroxidación comprometiendo la producción de pigmentos como se vio en las diferentes concentraciones de cromo (Hörtsik et al., 2006), es así que se establece que en este valor de pH compromete la fisiología de la microalga.

En el pH 6 se observa que en el testigo la producción de pigmentos se mantuvo tanto al inicio como al final del ensayo sin mostrar daño en los sistemas fotosintéticos, mientras que para las concentraciones de metal, el pigmento más afectado es la clorofila a que presenta una disminución en la células tomadas a las 96 horas mientras que la clorofila b y los carotenoides se reducen en mayor cantidad con las concentraciones de 30 y 60 mg/L de cromo, esto puede ser debido a que al estar un pH cercano al óptimo la microalga no se ve afectada el pigmento principal (Rada et al., 2018; Santhanam et al., 2015) pero si existen daños en sistemas complementarios como lo son clorofila b y carotenoides ya que al no está en un pH de 7 a 10 si existe un daño menor de la fisiología de la microalga que si bien no compromete el mecanismo fotosintético en general si puede afectar los auxiliares ya que esta va a buscar desarrollarse con normalidad.

Con respecto al pH 8 se observa la fisiología de la microalga no se ve afectada en gran medida ya que en todas las concentraciones incluidas el testigo existe un incremento en clorofila *a*, *b* y carotenoides, estableciendo que la microalga se desarrolla con normalidad (Gong et al., 2015) la cantidad de pigmentos se ve afectada cuando la concentración de metal es de 30 y 60 mg/L ya que la cantidad de pigmentos es menor en la hora 0 en comparación al resto de concentraciones, debido a que las altas concentraciones del metal van a causar un estrés oxidativo y peroxidación de lípidos (Höröcsik et al., 2006) pero el pH 8 permite que aun exista producción de pigmentos ya que estabiliza a la microalga para que a pesar de la reducción de pigmentos pueda desarrollarse con normalidad (Rada et al., 2018; Santhanam et al., 2015).

Con esta extrapolación se confirman los resultados obtenidos anteriormente ya que la respuesta de *Chlorella* sp. va a estar sujeta al valor de pH y la concentración de cromo a la que se le exponga, ya que el pH al ser una de los principales factores que se tienen

en cuenta al momento de los cultivos de microalgas debido a que van a afectar la densidad, comportamiento y desarrollo de la microalga por que va a causar daños o beneficiar los sistemas fotosintéticos de acuerdo al rango en el que se encuentre, siendo entre 7 y 10 los valores favorables para un correcto funcionamiento de la misma mientras que en rangos ácidos este microorganismo va a comprometer su desarrollo (Gong et al., 2015), la concentración de cromo es fundamental ya que este metal se encuentra entre los micronutrientes necesarios para el desarrollo de microalgas observándose que a concentraciones menores a 7,5 mg/L pueden incluso mantener o incrementar la producción de pigmentos mientras que a partir de 15 mg/L va a comprometer la fisiología de la microalga debido a la peroxidación de lípidos que provoca como se pudo apreciar en los tres valores de pH (Hörcksik et al., 2006).



3.4 Concentración letal media CL₅₀ de *Chlorella* sp. para pH 4,6 y 8

Con el fin de detectar y evaluar los efectos potencialmente tóxicos que agentes químicos pueden ocasionar en organismos acuáticos se realizan pruebas de toxicidad acuática la cual tiene como fin evaluar los riesgos de estos agentes y las condiciones de exposición, se corrieron ensayos durante el transcurso de la prueba con una duración de 96 horas (Altenburger et al., 2010; Chacón et al., 2014). El cromo (VI) al ser un elemento inorgánico presente en los recursos acuáticos debido a las aguas residuales de las industrias es una preocupación pues es uno de los contaminantes inorgánicos de gran preocupación y el pH se describe para modificar las propiedades de transporte aparentes de la absorción intracelular (Altenburger et al., 2010).

Con los valores del porcentaje de densidad celular de la microalga al ser expuesta a las diferentes concentraciones de Cr (VI), se obtuvo el porcentaje de mortalidad de *Chlorella* sp. lo cual permitió determinar la concentración letal media del Cr (VI) de la microalga mediante una prueba de toxicidad agua realizada en bioensayos de 96 horas (CL₅₀-96 h) con tres valores de pH 4, 6 y 8. En los conteos celulares realizados se tomó en cuenta como factor de descarte deformidades en la microalga como bordes dentados y ruptura y en cuanto al color no se tomaron en cuenta microorganismos que presentaran necrosis.

Con los datos de la tabla 2. se procedió a realizar el análisis estadístico Probit mediante Infostat 2008, donde se obtuvo que la concentración letal varió de acuerdo al pH ya que para un pH de 4 la CL₅₀ - 96 h fue de 24 mg/L, mientras que para el pH 6 y 8 fue de 89 y 101 mg/L respectivamente, estos resultados obtenidos mediante un análisis Probit en Infostat corroboran los datos obtenidos anteriormente en las curvas de crecimiento y la cuantificación de clorofila a, b y carotenoides ya que en el pH 4 la afección que se presentó fue bastante notoria ya que como muestra la tabla 2. a 15

mg/L se obtuvo un porcentaje de mortalidad de 46,35 % y a 30 mg/L se obtuvo 58,3 mg/L. Mientras que en pH 6 y 8 se observa que no se alcanza más del 27,07 % y 17,49 % respectivamente con la concentración más alta de 60 mg/L de Cr (VI) a la que fue expuesta la microalga en este ensayo.

Por lo tanto un factor importante para el correcto desarrollo de *Chlorella* sp. es el pH ya que de acuerdo al mismo va a tener que variar tanto la densidad celular ya que al aumentar o disminuir la misma la resistencia va a variar como la concentración de metal en este caso cromo hexavalente que actúa como factor de estrés provocando un grado de inhibición de crecimiento para la microalga ya que altera el equilibrio de la misma (Altenburger et al., 2010).

Tabla 2.

Porcentaje Mortalidad celular 96 h

mg/L Cr (VI)	pH 4	pH 6	pH 8
0	41,184	0	0
3,75	42,501	0	0
7,5	43,024	0,512	0
15	46,358	15,134	6,625
30	58,300	20,117	14,018
60	67,447	27,075	17,492

Nota: Valores en porcentaje de la mortalidad que presentaron las diferentes concentraciones de metal a los tres valores de pH. Los valores de cero son debido al crecimiento celular de la microalga, para pH 6 en las concentraciones de 0 y 3,75 mg/L de Cr (VI) existió un aumento de 7,64 y 9,076 % respectivamente, mientras que para pH 8 en 0, 3,75 y 75 mg/L de metal el crecimiento aumento 8,15; 12,64 y 10,53 % respectivamente.

Fuente: La autora, 2019

3.5 Oxígeno Disuelto (OD) en cultivos de *Chlorella* sp.

El DO es uno de los indicadores del estado de la vida en ecosistemas acuáticos, asociado principalmente a la fotosíntesis y el grado de oxidación que posee la materia orgánica y nutrientes del medio (Capó, 2007), los valores de oxígeno disuelto que se obtuvieron al trabajar con tres pH de 4, 6 y 8 no superan el 1 mg/L, que es el valor mínimo requerido para las formas de vida que siguen a las microalgas en la cadena trófica puedan desarrollarse en un entorno acuático, en la tabla 3 podemos observar el comportamiento que tuvo *Chlorella* sp. en presencia de diferentes concentraciones de metal y en ninguna supera el valor mínimo requerido para que se pueda desarrollar vida pues al existir únicamente *Chlorella* sp. en aguas sintéticas no existen interacciones con otros organismos por lo tanto las microalgas van a reducir drásticamente los niveles de oxígeno disuelto ya que van a consumir el oxígeno del medio para su desarrollo (López & Fornés, 2009; Peterson & Risberg, 2009) esta situación acompañada de la característica oxidante que posee el cromo (Concha & García, 2017) establecen parámetros para los bajos valores de oxígeno disuelto.

Los niveles de OD en el pH 4 son más altos que en el resto de pH, ya que cuando el entorno acuático está conformado únicamente por microalgas están van a consumir el oxígeno del medio para su desarrollo pero debido a que este pH es uno de los que afecta directamente el funcionamiento normal de la microalga siendo muy complicado que la microalga realice sus actividades metabólicas normales, los valores obtenidos se puede ser debido a que otro de los factores que influye en el consumo de oxígeno en menor proporción es la muerte celular de microalgas. Mientras que para los pH de 6 y 8 los valores de OD son más bajos debido a que no existe un daño en el funcionamiento de la microalga por lo cual permite que su desarrollo se de en forma

normal y el consumo de oxígeno aumenta para poder cumplir con el metabolismo normal y la tasa de mortalidad celular es menor (López & Fornés, 2009; Peterson & Risberg, 2009; Santhanam et al., 2015).

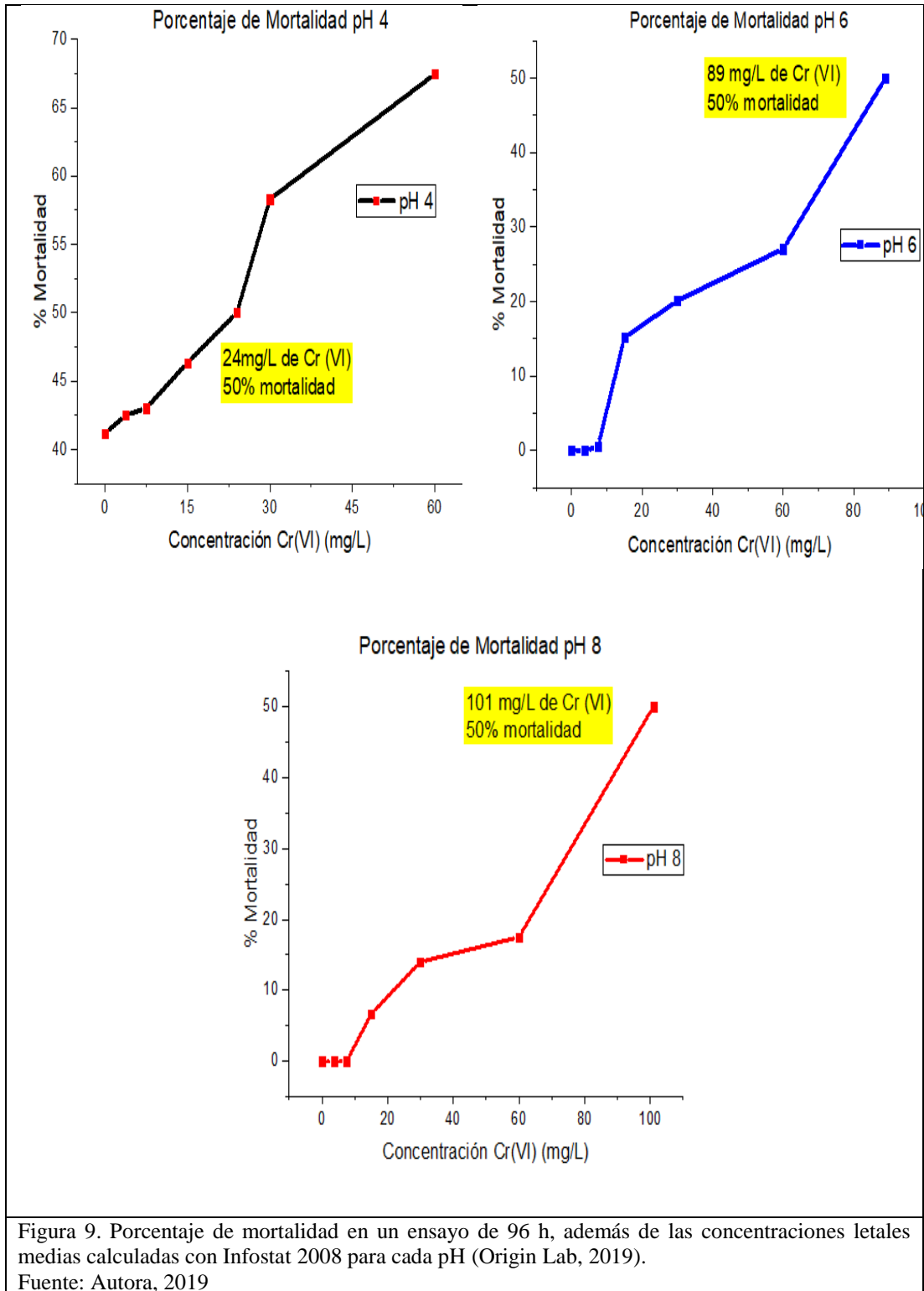
Este mismo comportamiento se observa entre las concentraciones de metales ya que en 60 mg/L se observa los valores mas altos de oxígeno disuelto debido a que el metal se convierte en un factor importante que afecta al desarrollo de la microalga pues afecta las estructuras de *Chlorella* sp. que se encargan del desarrollo de la fotosíntesis causando la muerte celular de las microalgas permitiendo que la cantidad de oxígeno disuelto en el medio sea mayor (Concha & García, 2017; Santhanam et al., 2015), mientras que en concentraciones mas bajas al existir un crecimiento celular para pH 6 y 8 estos valores son menores que para un pH 4 donde se observó una mortalidad de casi el 42 % en conjunto con la disminución de pigmento por lo cual al existir mortalidad el consumo de oxígeno no es tan alto como cuando la microalga lo utiliza para su desarrollo.

Tabla 3.
Oxígeno disuelto de cada valor de pH.

DO mg/L			
mg/L Cr(VI)	pH 4	pH 6	pH 8
0	0,406	0,354	0,341
3,75	0,441	0,381	0,371
7,5	0,473	0,374	0,404
15	0,473	0,444	0,404
30	0,503	0,427	0,437
60	0,600	0,474	0,534

Nota: Los valores de Oxígeno disuelto permanecieron constante durante las 96 horas del bioensayo.

Fuente: La autora, 2019



3.6 Potencial de óxido-reducción (ORP) en cultivos de *Chlorella* sp.

Al evaluar el ORP que contenían los diferentes tratamientos, el pH 8 es el que presenta valores negativos debido a que en estas condiciones los agentes reductores se van a encontrar presentes en mayor cantidad, mientras que para el pH 4 y 6 se obtuvieron valores positivos debido a que en medios donde el valor del potencial de hidrogeno sea más bajo que 7 va a contener mayor cantidad de agentes oxidantes.

Los valores obtenidos en pH 4 para todas las concentraciones de Cr (VI) estuvieron entre 151,59 y 155,97 mV, estos valores nos indican que el entorno es anaerobio que no permite que exista crecimiento de microalgas, por otro lado, el ORP del pH 6 con valores cercanos a 40 mV, se tratan de entornos anóxicos con nitratos y nitritos que permiten un desarrollo de las microalgas.

Mientras que los valores negativos de ORP en pH 8, están asociado principalmente al crecimiento de *Chlorella* sp. ya que uno de los factores fundamentales para esta característica es la presencia de algas verdes en el medio, este valor negativo nos indica que el tratamiento a un pH de 8 tiene una baja afinidad por los electrones, por lo tanto, se está hablando de aguas altamente reductoras con bajos niveles de oxígeno disuelto.

Al asociar esto con el metal, las concentraciones de cromo donde se observó diferencia en el comportamiento de los tratamientos fue en pH 8 ya que se puede ver que a medida que aumenta la concentración del metal los valores de ORP negativo disminuyen debido a que al aumentar la concentración del metal este tiende a tomar más control del entorno volviendo a recuperar su característica oxidante y llevando a que este pueda llegar a valores positivos como se puede ver en los otros dos valores de pH donde el ORP se mantuvo constante en todas las concentraciones de metal, ya que en

medios ácidos el cromo puede llegar a tener un potencial de óxido reducción de hasta 13300 mV (Dāsa, 2015; López, 2013).

Tabla 4

Potencial de óxido-reducción de cada valor de pH.

ORP (mV)			
	pH 4	pH 6	pH 8
0	151,593	40,907	-92,991
3,75	152,540	40,253	-89,176
7,5	153,040	38,967	-87,991
15	152,607	39,320	-88,443
30	154,127	39,880	-25,091
60	155,940	42,093	-7,571

Nota: Valores de ORP medidos en milivoltios

Fuente: La autora, 2019

Conclusiones

La fisiología de *Chlorella* sp. va a depender de varios factores como la temperatura, iluminación y pH, este último va a ser de gran importancia ya que va a afectar directamente como interacciona la microalga en un entorno.

La producción de pigmentos de *Chlorella* sp. en los tres valores de pH varió considerablemente ya que el pH 4 fue el que presentó una cantidad de pigmentos menor desde la hora 0; en el pH 6 la producción de pigmentos fue mayor pero se redujo hasta las 96 horas; mientras que el pH 8 fue el mejor ya que presentó la mayor cantidad de pigmentos desde las 0 horas y aumento al final del ensayo, este comportamiento se observó incluso en el testigo, mientras con respecto a la concentración de cromo desde 15 mg/L en adelante fueron las que más afectaron la producción de pigmentos.

Es así que para que exista un correcto desarrollo de las actividades de *Chlorella* sp. en presencia de cromo hexavalente sin que se presentes daños a los sistemas fotosintéticos comprometiendo la viabilidad y producción de pigmentos es necesario que esta se encuentre en pH alcalinos y en concentraciones de metal menores a 15 mg/L de metal.

El comportamiento de los pigmentos al igual que la densidad celular de *Chlorella* sp., va a estar asociado al pH ya que un pH ácido va a ocasionar en daños en los sistemas fotosintéticos ocasionando una reducción de los pigmentos y a su vez un colapso del funcionamiento general de *Chlorella* sp. generando altas tasas de mortalidad que en compañía de altas concentraciones de cromo, que es el causante de estrés oxidativo y peroxidación de sistemas fotosintéticos, van a ser letales para la microalga.

No obstante, pH 6 que está cercano al rango óptimo (pH de 7 a 9) para el desarrollo de *Chlorella* sp. se observó una reducción de los pigmentos, pero en menor medida que en pH 4, en especial de la clorofila a que es el pigmento principal, ocasionando que la clorofila b y carotenoides aumenten ya que al ser pigmentos auxiliares tratan de reparar el daño ocasionado en la microalga. Por otra parte, a pH 8, que está dentro del rango óptimo, se ve un aumento de los pigmentos hasta las 96 horas del ensayo.

Concentraciones bajas de metal (3,75 y 7,5 mg/L) permiten un incremento celular mayor que a concentraciones de cromo superiores (15, 30 y 60 mg/L), de manera que, al pasar los 15 mg/L del metal va a presentarse un daño en la producción de pigmentos desde el primer momento en el que la microalga está en contacto con el metal.

Con un pH 4 la cantidad de los tres pigmentos es baja al inicio en comparación a pH 6, mientras que pH 8 presenta mayor cantidad de pigmentos desde el inicio y se incrementan al final del ensayo; con respecto a la concentración de metal desde 15 mg/L en adelante fueron las que más afectaron la producción de pigmentos. Este comportamiento que presentó *Chlorella* sp. se evaluó mediante una extrapolación con 10×10^6 cel/mL para analizar la producción de pigmentos luego de ser expuesta a diferentes concentraciones de metal y valores de pH.

Los valores de oxígeno disuelto menores a 1 mg/L nos indican que debido a que no existe una interacción de *Chlorella* sp. con otros organismos, la microalga va a consumir todo el oxígeno para sus procesos metabólicos reduciendo completamente este recurso del medio.

El potencial de óxido-reducción nos muestra que valores de pH alcalinos van a establecer ambientes reductores causando la proliferación de microalgas, mientras que ambientes con pH ácido van a establecer ambientes oxidantes, la presencia de metal dentro de estos ambientes va a ocasionar que el medio tienda a convertirse de reductor en oxidante o aumentar la oxidación según corresponda.

Se establece que el pH va a ser fundamental para la mortalidad de la microalga ya que en los valores de pH 6 y 8, que están cercanos o dentro del rango óptimo, *Chlorella* sp. es más resistente, de manera requiere mayor concentración de metal para matar a la mitad de la población mientras que en presencia de pH 4, la concentración de metal va a ser muy bajo, mostrando así que pH alcalino le proporciona al microalga tolerancia al metal.

Referencias Bibliográficas

- Agudelo, E., Gaviria, L., & Barrios, L. (2018). Techniques to determine toxicity in industrial wastewater contaminated with dyes and pigments, *85*(207), 316–327.
- Ahamed, M., Rajeshkumar, S., Ragul, V., Anand, S., & Kaviyarasu, K. (2018). South African Journal of Chemical Engineering Chromium remediation and toxicity assessment of nano zerovalent iron against contaminated lake water sample (Puliyanthangal Lake , Tamilnadu , India). *South African Journal of Chemical Engineering*, *25*, 128–132. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2018.04.004>
- Altenburger, R., Krüger, J., & Eisenträger, A. (2010). Proposing a pH stabilised nutrient medium for algal growth bioassays. *Chemosphere*, *78*(7), 864–870. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.046>
- Arredondo Vega, B. O., & Voltolina, D. (2007). *Métodos y herramientas analíticas en la evaluación de la biomasa microalgal*. La Paz, Baja California Sur, México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.
- Bates, R. G., & Bower, V. E. (1956). Alkaline solutions for pH control. *Analytical Chemistry*, *8*, 1322–1324.
- Benavente, J., Aguilar, C., Contreras, J., Méndez, A., & Montañez, J. (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*, *10*, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.04.001>
- Capó, M. (2007). *Principios de ecotoxicología : [diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente]*. Tébar. Retrieved from

https://books.google.com.ec/books?id=86oL_Ybnwn8C&dq=oxigeno+disuelto+cromo+alga&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Chacón, M., Villamarín, S., & Álvarez, R. (2014). Pruebas de toxicidad aguda cl (i) 50 en camarones marinos (*Litopenaeus schmitti* Y *L . vannamei*) utilizando efluentes industriales a la bahía de Cartagena , Colombia, *12*(2), 40–59.

Chen, Z., Song, S., & Wen, Y. (2016). Reduction of Cr (VI) into Cr (III) by organelles of *Chlorella vulgaris* in aqueous solution: An organelle-level attempt. *Science of the Total Environment*, *572*, 361–368.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.217>

Concha, C., & García, T. (2017). Análisis de la concentración de cromo hexavalente (VI) con relación al pH en las aguas superficiales de las quintas en la ciudad de Cartagena de Indias., (Vi).

Cordero, J., Guevara, M., Morales, E., & Lodeiros, C. (2005). Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). *Revista de Biología Tropical*, *53*(3–4), 325–330.

Correa, M., Bolaños, M., Rebolledo, E., Rubio, D., & Salinas, E. (2015). Análisis Del Contenido De Metales En Aguas, Sedimentos Y Peces En La Cuenca Del Río Santiago, Provincia De Esmeraldas, Ecuador. *Investigación y Saberes*, *4*(2), 32–42. Retrieved from <http://www.utelvt.edu.ec/ojs/index.php/is/article/view/103>

Da Ros, G., & Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Instituto de Investigaciones Económicas. (1995). *La contaminación de aguas en Ecuador*. Instituto de Investigaciones Económicas, P.U.C.E.

Dāsa, D. (2015). *Algal biorefinery : an integrated approach*.

- De Paiva, D., Da Costa, M., Fernandes, D., & Forsin, D. (2014). Selecting a sensitive battery of bioassays to detect toxic effects of metals in effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *110*, 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.08.019>
- Díaz, M. J., Bustos, M., & Espinosa, A. (2004). Pruebas de toxicidad acuática: fundamentos y métodos., *29*(1), 2009. <https://doi.org/10.1016/j.rlds.2015.06.005>
- Domínguez, R., & Carmen, M. del. (2013). Evaluación del enriquecimiento en lípidos de valor energético en microalgas.
- Duppeti, H., Chakraborty, S., Das, B. S., Mallick, N., & Kotamreddy, J. (2017). Rapid assessment of algal biomass and pigment contents using diffuse reflectance spectroscopy and chemometrics. *Algal Research*, *27*(March), 274–285. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.09.016>
- Esperanza, M. (2017). Toxicidad ejercida por contaminantes acuáticos sobre microalgas de agua dulce. Retrieved from <http://www.tdx.cat/handle/10803/458501>
- FAO, C. alimentarius. (2016). Comisión del Codex Alimentarius. Documento de debate sobre los criterios para la aprobación de métodos biológicos destinados a la detección de productos químicos de Interés.
- Forero-Cujiño, M. A., Ruiz, L. C. M., Pinilla-Agudelo, G. A., & Melgarejo-Muñoz, L. M. (2016). Inmovilización de las microalgas *Scenedesmus ovalternus* (Scenedesmaceae) y *Chlorella vulgaris* (Chlorellaceae) en esferas de alginato de calcio. *Acta Biológica Colombiana*, *21*(2), 437–442. <https://doi.org/10.15446/abc.v21n2.51253>

- Gao, F., Peng, Y., Li, C., Yang, G., Deng, Y., Xue, B., & Guo, Y. (2018). Science of the Total Environment Simultaneous nutrient removal and biomass / lipid production by *Chlorella* sp . in seafood processing wastewater. *Science of the Total Environment*, 640–641, 943–953. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.380>
- Gong, Q., Feng, Y., Kang, L., Luo, M., & Yang, J. (2015). Effects of light and pH on cell density of *Chlorella vulgaris*. *Energy Procedia*, 61. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.12.064>
- Gosset, A., Durrieu, C., Orias, F., Bayard, R., & Perrodin, Y. (2017). Identification and assessment of ecotoxicological hazards attributable to pollutants in urban wet weather discharges. *Environmental Science: Processes and Impacts*, 19(9), 1150–1168. <https://doi.org/10.1039/c7em00159b>
- Hörsik, Z., Oláh, V., Balogh, Á., Mészáros, I., Simon, L., & Lakatos, G. (2006). Effect of chromium (VI) on growth, element and photosynthetic pigment composition of *Chlorella pyrenoidosa*. *Acta Biologica Szegediensis*.
- Huang, R., Liu, Q., Huo, J., & Yang, B. (2017). Adsorption of methyl orange onto protonated cross-linked chitosan. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2013.05.017>
- Jiang, D., Shi, X., Cui, Y., & Li, M. (2014). Acute toxicity of three typical pollutants to aquatic organisms and their water quality criteria. *Huanjing Kexue/Environmental Science*, 35(1), 279–285. Retrieved from <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84892895568&partnerID=40&md5=bdd77c074a910562e4a6f7b2759adc6d>

- Lee, R. (2018). *Phycology*. Cambridge University. Retrieved from https://books.google.com.ec/books?id=rHRJDwAAQBAJ&dq=methanol+pigments+algae&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Levine, I., & Fleurence, J. (2018). *Microalgae in health and disease prevention*.
- Lewandowski, I., Lippe, M., Montoya, J., Dickhöfer, U., Langenberger, G., Pucher, J., ... Lippert, C. (2018). Primary Production. In *Bioeconomy* (pp. 97–178). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68152-8_6
- Lewis, M., & Thursby, G. (2018). Aquatic plants: Test species sensitivity and minimum data requirement evaluations for chemical risk assessments and aquatic life criteria development for the USA. *Environmental Pollution*, 238, 270–280. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.03.003>
- Liu, J., Sun, Z., Lavoie, M., Fan, X., Bai, X., & Qian, H. (2014). Ammonium reduces chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, (7), 3249–3258. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6218-1>
- Londoño, L., Londoño, P., & Muñoz, F. (2016). Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145. [https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- Long, D., Tang, X., Cai, K., Chen, G., Chen, L., Duan, D., ... Chen, Y. (2013). Cr(VI) reduction by a potent novel alkaliphilic halotolerant strain *Pseudochrobactrum saccharolyticum* LY10. *Journal of Hazardous Materials*, 256–257, 24–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.04.020>
- López, J., & Fornés, J. (2009). *La geología e hidrogeología en la investigación de*

humedales.

Retrieved

from

https://books.google.com.ec/books?id=eBtY54CXoT0C&dq=blooms+de+algas+Oxigeno+disuelto&hl=es&source=gbs_navlinks_s

López, M. (2013). Estudio fisicoquímico del proceso de reducción-adsorción de Cr(VI) en medio acuoso sobre biomateriales de bajo coste., (Vi), 346. Retrieved from file:///C:/Users/maxpowell/Downloads/LopezGarcia_Marta_TD_2013.pdf

Marczenko, Z. (2000). *Separation, preconcentration, and spectrophotometry in inorganic analysis*. Elsevier Science B.V.

Negm, N., Abd, M., Hassan, A., & Abou, M. (2018). Feasibility of metal adsorption using brown algae and fungi: Effect of biosorbents structure on adsorption isotherm and kinetics. *Journal of Molecular Liquids*, 264, 292–305. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2018.05.027>

Origin Lab, C. (2019). Origin(Pro). Northampton, MA, USA.

Peterson, F., & Risberg, J. (2009). *Low Dissolved Oxygen in Water - Causes, Impact on Aquatic Life - An Overview*.

Plugaru, S., Sarb, A., Horcsik, T., & Rusu, T. (2016). the Effect of Chromium on the Growth of *Chlorella Pyrenoidosa* Algal Cultures, V(Iii), 2–5.

Priya, M., Gurung, N., Mukherjee, K., & Bose, S. (2016). Microalgae in Removal of Heavy Metal and Organic Pollutants from Soil. *Microbial Biodegradation and Bioremediation*, 522–539. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00023-6>

Qian, H., Sun, Z., Sun, L., Jiang, Y., Wei, Y., Xie, J., & Fu, Z. (2013). Phosphorus availability changes chromium toxicity in the freshwater alga *Chlorella vulgaris*.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.035>

- Qiu, R., Gao, S., Lopez, P., & Ogden, K. (2017). Effects of pH on cell growth , lipid production and CO₂ addition of microalgae *Chlorella sorokiniana*, 28(May), 192–199. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.11.004>
- Rada, A., Lens, P., van der Steen, P., & López, C. (2018). *Photo-Activated Sludge : a novel algal-bacterial biotreatment for nitrogen removal from wastewater.*
- Rajesh, K., Rohit, M., & Venkata Mohan, S. (2017). Microalgae-Based Carotenoids Production. *Algal Green Chemistry*, 139–147. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00007-2>
- Rienzo, J. A. Di. (2010). Análisis de Regresión Probit, 1–11.
- Rise, M., Cohen, E., Vishkautsan, M., Cojocar, M., & Gottlieb, H. (1994). Accumulation of Secondary Carotenoids in *Chlorella*. *Journal of Plant Physiology*, 144(3), 287–292. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81189-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81189-2)
- Rivas, C., Navarro, N., Huovinen, P., & Gómez, I. (2016). Photosynthetic UV stress tolerance of the Antarctic snow alga *Chlorella* sp. modified by enhanced temperature? *Revista Chilena de Historia Natural*, 89(1), 7. <https://doi.org/10.1186/s40693-016-0050-1>
- Rosales, N. (2018). *Extracción y cuantificación de pigmentos*. Quito: Pontificia universidad católica del Ecuador.
- Rubio, D., Manjarrez, C., Muñoz, L., & Lache, A. (2015). Efecto del glicerol como fuente de carbono adicional en la obtención de biomasa y ácidos grasos en

- cultivos *Chlorella vulgaris* en un fotobiorreactor de panel plano a escala de laboratorio. *Fundación Universidad de América*, 8, 8–20.
- Sánchez, N., Gigler, A., Cruz, J. A., Park, S.-H., Jordan, G., & Fernández, L. (2011). Growth of Calcium Carbonate in the Presence of Cr(VI). *Crystal Growth & Design*, 11(7), 3081–3089. <https://doi.org/10.1021/cg200357c>
- Santhanam, P., Thirunavukkarasu, A., & Perumal, P. (2015). *Advances in marine and brackishwater aquaculture*.
- Sari, A., Uluozlü, Ö., & Tüzen, M. (2011). Equilibrium, thermodynamic and kinetic investigations on biosorption of arsenic from aqueous solution by algae (*Maugeotia genuflexa*) biomass. *Chemical Engineering Journal*, 167(1), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.12.014>
- Sukla, L., Subudhi, E., & Pradhan, D. (2018). *The role of microalgae in wastewater treatment*. Singapur: Springer.
- Thrane, J., Kyle, M., Striebel, M., Haande, S., Grung, M., Rohrlack, T., & Andersen, T. (2015). Spectrophotometric analysis of pigments: A critical assessment of a high-throughput method for analysis of algal pigment mixtures by spectral deconvolution. *PLoS ONE*, 10(9), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137645>
- Vignati, D., Dominik, J., Beye, M., Pettine, M., & Ferrari, B. (2010). Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(5), 1034–1045. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.010>
- Vymazal, J. (2010). *Water and nutrient management in natural and constructed*

wetlands. Springer Science+Business Media B.V.

Wan Maznah, W. O., Al-Fawwaz, A. T., & Surif, M. (2012). Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. isolated from rivers in Penang, Malaysia. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 24(8), 1386–1393.
[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(11\)60931-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(11)60931-5)

Wheeler, T. L. (2008). Organization security metrics: Can organizations protect themselves? *Information Security Journal*, 17(5–6), 228–242.
<https://doi.org/10.1080/19393550802541200>

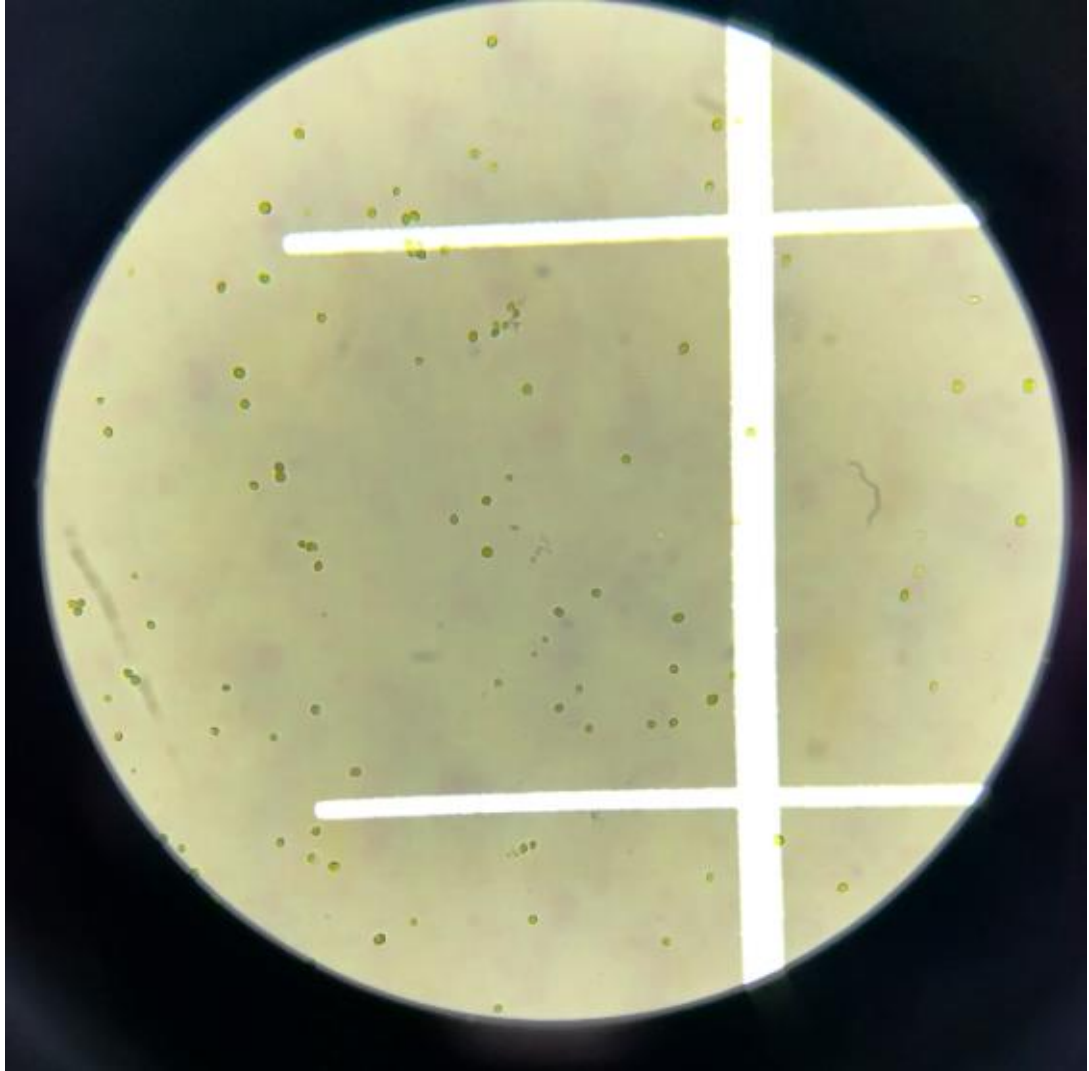
Xie, M., Qiu, Y., Song, C., Qi, Y., Li, Y., & Kitamura, Y. (2018). Optimization of *Chlorella sorokiniana* cultivation condition for simultaneous enhanced biomass and lipid production via CO₂ fixation, 2, 15–20.
<https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.03.006>

Yen, H., Chen, P., Hsu, C., & Lee, L. (2016). The use of autotrophic *Chlorella vulgaris* in chromium (VI) reduction under different reduction conditions. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 74, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.jtice.2016.08.017>

Zia, K., Mahmood, Z., & Mohammad, A. (2017). *Algae based polymers, blends, and composites : chemistry, biotechnology and materials science*. Elseiver. Retrieved from
https://books.google.com.ec/books?id=oAKqDQAAQBAJ&dq=methanol+pigments+algae&hl=es&source=gbs_navlinks_s

Anexos

Anexo 1. *Chlorella* sp. en microscopio, cámara de Neubauer a 40X.



Fuente: La autora, 2019.

Anexo 2. Soluciones buffer valores de pH a 25 °C

A		B		C		D		E	
pH	x	pH	x	pH	x	pH	x	pH	x
1,00	67,00	2,20	49,50	4,10	1,30	5,80	3,60	7,00	46,60
1,10	52,80	2,30	45,80	4,20	3,00	5,90	4,60	7,10	45,70
1,20	42,50	2,40	42,20	4,30	4,70	6,00	5,60	7,20	44,70
1,30	33,60	2,50	38,80	4,40	6,60	6,10	6,80	7,30	43,40
1,40	26,60	2,60	35,40	4,50	8,70	6,20	8,10	7,40	42,00
1,50	20,70	2,70	32,10	4,60	11,10	6,30	9,70	7,50	40,30
1,60	16,20	2,80	28,90	4,70	13,60	6,40	11,60	7,60	38,50
1,70	13,00	2,90	25,70	4,80	16,50	6,50	13,90	7,70	36,60
1,80	10,20	3,00	22,30	4,90	19,40	6,60	16,40	7,80	34,50
1,90	8,10	3,10	18,80	5,00	22,60	6,70	19,30	7,90	32,00
2,00	6,50	3,20	15,70	5,10	25,50	6,80	22,40	8,00	29,20
2,10	5,10	3,30	12,90	5,20	28,80	6,90	25,90	8,10	26,20
2,20	3,90	3,40	10,40	5,30	31,60	7,00	29,10	8,20	22,90
		3,50	8,20	5,40	34,10	7,10	32,10	8,30	19,90
		3,60	6,30	5,50	36,60	7,20	34,70	8,40	17,20
		3,70	4,50	5,60	38,80	7,30	37,00	8,50	14,70
		3,80	2,90	5,70	40,60	7,40	39,10	8,60	12,20
		3,90	1,40	5,80	42,30	7,50	40,90	8,70	10,30
		4,00	0,10	5,90	43,70	7,60	42,40	8,80	8,50
						7,70	43,50	8,90	7,00
						7,80	44,50	9,00	5,70
						7,90	45,30		
						8,00	46,10		

F		G		H		I		J	
pH	x	pH	x	pH	x	pH	x	pH	X
8,00	20,50	9,20	0,90	9,60	5,00	10,90	3,30	12,00	6,00
8,10	19,70	9,30	3,60	9,70	6,20	11,00	4,10	12,10	8,00
8,20	18,80	9,40	6,20	9,80	7,60	11,10	5,10	12,20	10,20
8,30	17,70	9,50	8,80	9,90	9,10	11,20	6,30	12,30	12,80
8,40	16,60	9,60	11,10	10,00	10,70	11,30	7,60	12,40	16,20
8,50	15,20	9,70	13,10	10,10	12,20	11,40	9,10	12,50	20,40
8,60	13,50	9,80	15,00	10,20	13,80	11,50	11,10	12,60	25,60
8,70	11,60	9,90	16,70	10,30	15,20	11,60	13,50	12,70	32,20
8,80	9,60	10,00	18,30	10,40	16,50	11,70	16,20	12,80	41,20
8,90	7,10	10,10	19,50	10,50	17,80	11,80	19,40	12,90	53,00
9,00	4,60	10,20	20,50	10,60	19,10	11,90	23,00	13,00	66,00
9,10	2,00	10,30	21,30	10,70	20,20	12,00	26,90		
		10,40	22,10	10,80	21,20				
		10,50	22,70	10,90	22,00				
		10,60	23,30	11,00	22,70				
		10,70	23,80						
		10,80	24,25						

- A. 25 mL de KCl 0,2 molar + X mL de HCl 0,2 molar.
- B. 50 mL de ftalato de hidrógeno y potasio 0,1 molar + X mL de HCl 0,1 molar.
- C. 50 mL de ftalato de hidrógeno y potasio 0,1 + X mL de NaOH 0,1 molar.
- D. 50 mL de dihidrógeno fosfato de potasio 0,1 molar + X mL de molar 0,1 NaOH.
- E. 50 mL de tris (hidroximetil) aminometano 0,1 molar + X mL de 0,1 M HCl.
- F. 50 mL de bórax molar 0,025 + X mL de HCl 0,1 molar.
- G. 50 mL de bórax molar 0,025 + X mL de NaOH 0,1 molar.
- H. 50 mL de bicarbonato de sodio 0,05 molar + X mL de NaOH 0,1 molar.
- I. 50 mL de hidrogenofosfato disódico 0,05 molar + X mL de NaOH 0,1 molar.
- J. 25 mL de 0,2 molar KCl + X mL de NaOH 0,2 molar.

Fuente: (Bates & Bower, 1956)

Anexo 3. Valores de clorofila a, b y carotenoides de pH 4

INICIO (0 horas)					FINAL (96 horas)				
mg/L Cr(VI)		cha (µg/mL)	chb (µg/mL)	Carotenoides (µg/mL)	mg/L Cr(VI)		cha (µg/mL)	chb (µg/mL)	carotenoides (µg/mL)
Testigo	A	6,201	2,913	2,778	Testigo	A	4,646	2,353	1,939
	B	6,050	2,724	2,710		B	4,943	2,396	2,077
	C	6,448	2,653	2,892		C	3,637	2,050	1,557
3,75	A	6,064	2,471	2,760	3,75	A	2,733	2,181	1,215
	B	6,112	2,576	2,734		B	1,663	1,383	0,770
	C	6,314	2,257	2,825		C	3,542	2,686	1,514
7,5	A	6,186	2,613	2,845	7,5	A	3,509	2,347	1,509
	B	6,150	2,260	2,707		B	2,054	1,865	0,932
	C	6,019	2,658	2,700		C	1,695	2,050	0,812
15,0	A	6,357	2,520	2,702	15,0	A	1,110	1,841	0,622
	B	6,543	2,759	2,964		B	1,274	1,496	0,618
	C	6,522	2,232	2,801		C	1,094	1,441	0,510
30,0	A	6,064	2,525	2,656	30,0	A	0,894	1,116	0,432
	B	6,604	2,498	2,775		B	1,759	1,878	0,841
	C	6,173	2,197	2,627		C	4,218	-1,181	0,519
60,0	A	5,971	2,153	2,648	60,0	A	0,763	1,079	0,359
	B	6,163	2,944	2,822		B	0,793	1,068	0,339
	C	5,996	2,448	2,628		C	0,929	1,289	0,387

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 4. Valores de clorofila a, b y carotenoides de pH 6

INICIO					FINAL				
mg/L Cr (VI)		cha (µg/mL)	chb (µg/mL)	carotenoides (µg/mL)	mg/L Cr (VI)		cha (µg/mL)	chb (µg/mL)	carotenoides (µg/mL)
Testigo	A	7,880	3,000	3,657	Testigo	A	7,681	3,463	3,694
	B	7,789	2,933	3,375		B	8,082	2,789	3,772
	C	10,038	2,885	3,391		C	7,788	3,210	3,727
3,75	A	9,610	2,879	3,900	3,75	A	8,274	4,128	4,021
	B	9,065	3,884	4,064		B	8,054	3,901	3,855
	C	9,323	2,809	3,801		C	8,097	3,155	3,882
7,5	A	10,607	3,108	4,184	7,5	A	7,713	2,782	3,585
	B	9,256	3,302	4,039		B	8,183	3,546	3,954
	C	9,112	3,687	4,022		C	7,995	2,959	3,858
15,0	A	9,168	3,808	4,113	15,0	A	7,544	2,995	3,596
	B	9,288	3,748	4,128		B	7,768	3,173	3,756
	C	9,438	3,623	4,192		C	7,887	3,230	3,779
30,0	A	9,761	3,775	4,358	30,0	A	8,091	3,336	3,761
	B	9,623	3,766	4,260		B	8,126	3,113	3,760
	C	9,469	3,951	4,291		C	7,901	3,027	3,676
60,0	A	9,879	4,093	4,384	60,0	A	8,179	2,984	3,696
	B	9,693	4,200	4,305		B	7,979	3,277	3,540
	C	9,768	3,488	4,262		C	8,017	3,925	3,813

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 5. Valores de clorofila a, b y carotenoides de pH 8.

INICIO					FINAL				
mg/L de Cr (VI)		cha (µg/mL)	chb (µg/mL)	carotenoides (µg/mL)	mg/L de Cr (VI)		cha (µg/mL)	chb (µg/mL)	carotenoides (µg/mL)
Testigo	A	10,913	11,608	5,351	Testigo	A	12,884	4,613	5,938
	B	10,925	3,893	4,557		B	11,284	4,467	5,182
	C	11,073	4,309	4,722		C	12,460	4,885	5,609
3,75	A	10,323	3,793	4,286	3,75	A	14,357	4,923	6,424
	B	11,302	4,240	4,718		B	12,729	5,221	5,830
	C	11,064	4,002	4,571		C	12,389	5,044	5,623
7,5	A	11,650	4,603	4,944	7,5	A	11,810	4,874	5,350
	B	12,191	4,380	5,053		B	13,034	4,747	5,808
	C	11,557	4,953	4,968		C	15,448	6,063	6,903
15,0	A	12,375	4,464	5,288	15,0	A	11,395	4,946	5,890
	B	10,275	9,283	4,923		B	12,310	5,142	5,672
	C	10,318	3,711	4,314		C	11,607	4,581	5,355
30,0	A	12,717	5,115	5,415	30,0	A	10,445	3,875	4,649
	B	10,915	4,296	4,647		B	11,536	5,168	5,200
	C	11,010	4,256	4,678		C	11,619	7,036	5,580
60,0	A	9,615	5,072	4,265	60,0	A	8,685	5,103	4,114
	B	8,698	3,698	3,640		B	9,959	7,983	4,853
	C	9,468	4,395	4,032		C	7,621	4,276	3,538

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 6. Análisis de varianza diferencia entre 0 horas y 96 horas de clorofila a en InfoStat 2008.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	161,32	17	9,49	19,00	<0,0001
pH	132,59	2	66,30	132,71	<0,0001
ppm	16,30	5	3,26	6,53	0,0002
pH*ppm	12,42	10	1,24	2,49	0,0221
Error	17,98	36	0,50		
Total	179,30	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,57587

Error: 0,4995 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
3,00	0,15	18	0,17	A
2,00	1,43	18	0,17	B
1,00	3,93	18	0,17	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,00241

Error: 0,4995 gl: 36

ppm	Medias	n	E.E.	
1,00	0,88	9	0,24	A
2,00	1,57	9	0,24	A B
3,00	1,80	9	0,24	A B C
5,00	1,86	9	0,24	A B C
4,00	2,29	9	0,24	B C
6,00	2,62	9	0,24	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=2,16429

Error: 0,4995 gl: 36

pH	ppm	Medias	n	E.E.	
3,00	2,00	0,00	3	0,41	A
3,00	3,00	0,00	3	0,41	A
3,00	4,00	0,00	3	0,41	A
3,00	5,00	0,00	3	0,41	A
3,00	1,00	0,00	3	0,41	A
2,00	1,00	0,82	3	0,41	A
3,00	6,00	0,93	3	0,41	A
2,00	2,00	1,19	3	0,41	A
2,00	4,00	1,56	3	0,41	A B
2,00	5,00	1,58	3	0,41	A B
2,00	3,00	1,69	3	0,41	A B
2,00	6,00	1,72	3	0,41	A B
1,00	1,00	1,82	3	0,41	A B
1,00	2,00	3,52	3	0,41	B C
1,00	3,00	3,70	3	0,41	B C
1,00	5,00	3,99	3	0,41	C
1,00	6,00	5,22	3	0,41	C
1,00	4,00	5,32	3	0,41	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 7. Análisis de varianza diferencia entre 0 horas y 96 horas de clorofila b en InfoStat 2008

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	13,10	17	0,77	3,59	0,0006
pH	6,50	2	3,25	15,15	<0,0001
ppm	4,64	5	0,93	4,32	0,0035
pH*ppm	1,96	10	0,20	0,92	0,5295
Error	7,72	36	0,21		
Total	20,82	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,37731

Error: 0,2145 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
3,00	0,08	18	0,11	A
2,00	0,39	18	0,11	A
1,00	0,92	18	0,11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,65678

Error: 0,2145 gl: 36

ppm	Medias	n	E.E.	
2,00	0,16	9	0,15	A
1,00	0,18	9	0,15	A
3,00	0,26	9	0,15	A
4,00	0,50	9	0,15	A B
6,00	0,70	9	0,15	A B
5,00	0,96	9	0,15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,41806

Error: 0,2145 gl: 36

pH	ppm	Medias	n	E.E.	
3,00	3,00	0,00	3	0,27	A
3,00	1,00	0,00	3	0,27	A
2,00	2,00	0,00	3	0,27	A
3,00	2,00	0,00	3	0,27	A
3,00	4,00	0,00	3	0,27	A
3,00	6,00	0,04	3	0,27	A
2,00	1,00	0,05	3	0,27	A
2,00	3,00	0,35	3	0,27	A
3,00	5,00	0,41	3	0,27	A B
1,00	3,00	0,42	3	0,27	A B
1,00	2,00	0,49	3	0,27	A B
1,00	1,00	0,50	3	0,27	A B
2,00	4,00	0,59	3	0,27	A B
2,00	5,00	0,67	3	0,27	A B
2,00	6,00	0,68	3	0,27	A B
1,00	4,00	0,91	3	0,27	A B
1,00	6,00	1,37	3	0,27	A B
1,00	5,00	1,80	3	0,27	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 8. Análisis de varianza diferencia entre 0 horas y 96 horas de carotenoides en InfoStat 2008

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	38,01	17	2,24	68,08	<0,0001
pH	32,82	2	16,41	499,74	<0,0001
ppm	3,24	5	0,65	19,73	<0,0001
pH*ppm	1,94	10	0,19	5,92	<0,0001
Error	1,18	36	0,03		
Total	39,19	53			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14765

Error: 0,0328 gl: 36

pH	Medias	n	E.E.	
3,00	0,03	18	0,04	A
2,00	0,33	18	0,04	B
1,00	1,81	18	0,04	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25701

Error: 0,0328 gl: 36

ppm	Medias	n	E.E.	
1,00	0,31	9	0,06	A
2,00	0,56	9	0,06	A B
3,00	0,65	9	0,06	B C
5,00	0,89	9	0,06	C D
4,00	0,89	9	0,06	C D
6,00	1,05	9	0,06	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,55490

Error: 0,0328 gl: 36

pH	ppm	Medias	n	E.E.	
2,00	1,00	0,00	3	0,10	A
3,00	2,00	0,00	3	0,10	A
3,00	1,00	0,00	3	0,10	A
3,00	5,00	0,00	3	0,10	A
3,00	4,00	0,00	3	0,10	A
3,00	3,00	0,00	3	0,10	A
2,00	2,00	0,07	3	0,10	A B
3,00	6,00	0,16	3	0,10	A B C
2,00	3,00	0,28	3	0,10	A B C
2,00	4,00	0,43	3	0,10	A B C D
2,00	5,00	0,57	3	0,10	B C D
2,00	6,00	0,63	3	0,10	C D
1,00	1,00	0,94	3	0,10	D
1,00	2,00	1,61	3	0,10	E
1,00	3,00	1,67	3	0,10	E
1,00	5,00	2,09	3	0,10	E F
1,00	4,00	2,24	3	0,10	F
1,00	6,00	2,34	3	0,10	F

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 9. Análisis Probit pH 4 en InfoStat 2008.

<u>Parámetros</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>Wald LI(95%)</u>	<u>Wald LS(95%)</u>	<u>Wald Chi²</u>	<u>p-valor</u>
Constante	-0,24	0,09	-0,41	-0,07	7,87	0,0050
DOSIS	0,01	2,8E-03	0,01	0,02	18,40	<0,0001

	<u>Valor</u>	<u>gl</u>
Log Likelihood	-336,92	498
Deviance	0,65	498
Escala (fijada)	1,00	

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 10. Análisis Probit pH 6 en InfoStat 2008.

<u>Parámetros</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>Wald LI(95%)</u>	<u>Wald LS(95%)</u>	<u>Wald Chi²</u>	<u>p-valor</u>
Constante	-1,78	0,13	-2,04	-1,52	180,67	<0,0001
DOSIS	0,02	3,4E-03	0,02	0,03	41,13	<0,0001

	<u>Valor</u>	<u>gl</u>
Log Likelihood	-168,61	498
Deviance	28,63	498
Escala (fijada)	1,00	

Fuente: La autora, 2019.

Anexo 11. Análisis Probit pH 8 en InfoStat 2008.

<u>Parámetros</u>	<u>Est.</u>	<u>E.E.</u>	<u>Wald LI(95%)</u>	<u>Wald LS(95%)</u>	<u>Wald Chi²</u>	<u>p-valor</u>
Constante	-1,78	0,13	-2,04	-1,52	180,67	<0,0001
DOSIS	0,02	3,4E-03	0,02	0,03	41,13	<0,0001

	<u>Valor</u>	<u>gl</u>
Log Likelihood	-168,61	498
Deviance	28,63	498
Escala (fijada)	1,00	

Fuente: La autora, 2019.