

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Arquitectura e Ingenierías Civil y del Ambiente
Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental



Remoción de azul de metileno y rojo congo mediante biomasa viable e inactiva de *chlorella vulgaris*

Tesis presentada por el Bachiller:

Fernandez Rueda, Renato Andrés

ORCID: 0009-0002-8373-0027

para optar el Título Profesional de Ingeniero Ambiental

Asesor (a):

Mg. Tejada Meza, Kevin

ORCID: 0000-0002-9716-7821

Arequipa - Perú

2024

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA AMBIENTAL

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 03 de Abril del 2024

Dictamen: 010212-C-EPIA-2024

Visto el borrador del expediente 010212, presentado por:

2016220051 - FERNANDEZ RUEDA RENATO ANDRES

Titulado:

**REMOCIÓN DE AZUL DE METILENO Y ROJO CONGO MEDIANTE BIOMASA VIABLE E INACTIVA
DE CHLORELLA VULGARIS.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO AMBIENTAL

**29611452 - ARENAZAS RODRIGUEZ ARMANDO JACINTO
DICTAMINADOR**



**46769238 - CHANOVE MANRIQUE ANDREA MARIETA
DICTAMINADOR**



**43606549 - CARDENAS PILLCO BERLY EDINSSON
DICTAMINADOR**



Remoción de azul de metileno y rojo congo mediante biomasa viable e inactiva de *Chlorella vulgaris*

ORIGINALITY REPORT

4%

SIMILARITY INDEX

6%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

- 1** Submitted to Universidad Católica de Santa María
Student Paper 1%
- 2** tesis.ucsm.edu.pe
Internet Source 1%
- 3** Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru
Student Paper 1%
- 4** Peter Olusakin Oladoye, Oyedolapo Mutiat Bamigboye, Olutobi Daniel Ogunbiyi, Mary Taiwo Akano. "Toxicity and decontamination strategies of Congo red dye", Groundwater for Sustainable Development, 2022
Publication 1%
- 5** dergipark.org.tr
Internet Source 1%
- 6** V. Sivasubramanian, Majeti Narasimha Vara Prasad. "Phycoremediation and business prospects", Elsevier BV, 2024
Publication 1%

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Andrés y Patricia por su ejemplo, guía permanente y apoyo incondicional. A mi abuela Ana por su interés y perseverancia en mi titulación y a mi enamorada Renata, por la motivación, ayuda y enfoque en mi vida.



AGRADECIMIENTO

Agradecer a la Universidad Católica de Santa María por haberme educado e inculcado valores íntegros para ser un gran profesional



RESUMEN

Las industrias que usan colorantes a nivel mundial generan problemas ambientales y sociales, que obstaculizan el desarrollo sostenible, el azul de metileno (AM) y rojo congo (RC) son dos colorantes ampliamente utilizados en la industria textil, farmacéutica y otras, la presente tesis investigó, en un primera etapa, la biodecoloración de AM y RC, utilizando biomasa viable de *C. vulgaris*, en la que se pudo demostrar que la microalga tiene mejores capacidades para remover RC en comparación con AM. Se optimizó el proceso de biorremoción de RC, utilizando temperatura ambiente de laboratorio (21 ± 2), agitación neumática y la más alta concentración de RC, alcanzado un 91 % de remoción. Por otro lado, se evaluó y optimizó el proceso de bioadsorción de AM y RC utilizando un bio-adsorbente de bajo costo a base de biomasa microalgal, donde se logró altos porcentajes de remoción (87 %) para RC. Los nuevos procesos de remoción de tintes o colorantes deben ser considerados debido a su alta eficiencia y bajo costo.

Palabras clave: azul de metileno, bioadsorción, *Chlorella vulgaris*, decoloración y rojo congo

ABSTRACT

Industries that use dyes worldwide generate environmental and social problems, which hinder sustainable development, methylene blue (AM) and Congo red (RC) are two dyes widely used in the textile, pharmaceutical and other industries, this thesis investigated, in a first stage, the biodecoloration of AM and RC, using viable biomass of *C. vulgaris*, in which it was possible to demonstrate that the microalgae has better abilities to remove RC compared to AM. The RC bioremoval process was optimized, using laboratory room temperature (21 ± 2), pneumatic agitation and the highest RC concentration, achieving 91% removal. On the other hand, the bioadsorption process of AM and RC was evaluated and optimized using a low-cost bioadsorbent based on microalgal biomass, where high removal percentages (87%) were achieved for RC. New dye or colorant removal processes should be considered due to their high efficiency and low cost.

Keywords: Methylene blue, bioadsorption, *Chlorella vulgaris*, decolorization and Congo red

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | V |
| ABSTRACT | VI |
| INTRODUCCIÓN..... | 14 |
| 1. CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 16 |
| 1.1. Problemática de la investigación. | 16 |
| 1.2. Justificación. | 17 |
| 1.3. Objetivo general..... | 18 |
| 1.4. Objetivos específicos. | 18 |
| 1.5. Hipótesis. | 18 |
| 1.6. Variables | 19 |
| 2. CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO..... | 21 |
| 2.1. Antecedentes de la investigación..... | 21 |
| 2.2. Marco teórico..... | 24 |
| 2.2.1. Contaminación del ambiente acuático..... | 24 |
| 2.2.2. Industria textil y sus efectos al ambiente acuático. | 24 |
| 2.2.3. Colorantes azoicos | 27 |
| 2.2.4. Biodegradación de colorantes..... | 30 |
| 2.2.5. Microalgas en la decoloración de colorantes azoicos | 31 |
| 2.2.6. Bioadsorción de colorantes. | 32 |
| 2.2.7. Adsorción de colorantes con biomasa microalgal pulverizada y seca. | 33 |
| 2.3. Marco legal | 33 |
| 3. CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS | 35 |
| 3.1. Lugar de ejecución..... | 35 |
| 3.2. Tipo y nivel de investigación..... | 35 |
| 3.3. Métodos de investigación. | 35 |

| | | |
|---------------|---|-----------|
| 3.3.1. | Determinación de los parámetros normales de crecimiento microalgal de <i>Chlorella vulgaris</i> utilizando medio Bold's Basal Medium (BBM)..... | 35 |
| 3.3.2. | Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de azul de metileno y rojo Congo sobre la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> | 36 |
| 3.3.3. | Optimización de la decoloración de azul de metileno y rojo congo a través de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> variando tipo de agitación y temperatura..... | 37 |
| 3.3.4. | Evaluación de la remoción de azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa inactiva de <i>Chlorella vulgaris</i> | 38 |
| 3.3.5. | Cuadro comparativo de alternativas para la metodología aplicada en la tesis | 39 |
| 4. | CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 40 |
| 4.1. | Determinación de los parámetros normales de crecimiento microalgal de <i>Chlorella vulgaris</i> utilizando medio BBM..... | 40 |
| 4.2. | Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de azul de metileno y rojo Congo sobre la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> | 42 |
| 4.2.1. | Evaluación del efecto de la concentración de AM sobre parámetros de crecimiento de <i>Chlorella vulgaris</i> | 42 |
| 4.3. | Optimización de la decoloración de azul de metileno y rojo congo a través de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> variando tipo de agitación y temperatura..... | 44 |
| 4.3.1. | Optimización de la decoloración de AM. | 44 |
| 4.3.1. | Optimización de la decoloración de RC. | 48 |
| 4.4. | Evaluación de la remoción de azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa inactiva de <i>Chlorella vulgaris</i> | 52 |
| 4.4.1. | Capacidad de adsorción de AM y RC con biomasa inactiva de <i>C. vulgaris</i>. | 52 |
| 4.4.2. | Optimización de la remoción de RC utilizando un diseño experimental de Box Behnken. | 54 |
| 5. | CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 61 |
| | RECOMENDACIONES | 62 |

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS63

ANEXOS76



ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Diagrama de flujo del procesamiento húmedo textil y generación de aguas residuales..... | 26 |
| Figura 2. Estructura química del azul de metileno. | 28 |
| Figura 3. Estructura química del rojo congo..... | 29 |
| Figura 4. Biodegradación del enlace azo de los colorantes azoicos. | 32 |
| Figura 5. Curva de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> en medio BBM..... | 40 |
| Figura 6. Curvas de crecimiento con diferentes concentración de AM..... | 42 |
| Figura 7. Curvas de crecimiento con diferentes concentración de RC..... | 43 |
| Figura 8. Gráficos de superficie de las interacción de los factores (A) Tipo de agitación y temperatura, (B) Tipo de agitación y concentración de colorante AM, (C) temperatura y concentración de colorante..... | 47 |
| Figura 9. Rampas de optimización para la remoción de AM. | 48 |
| Figura 10. Gráficos de superficie de las interacción de los factores (A) Tipo de agitación y temperatura, (B) Tipo de agitación y concentración de colorante RC, (C) temperatura y concentración de colorante..... | 50 |
| Figura 11. Rampas de optimización para la remoción de RC..... | 52 |
| Figura 12. Capacidad de adsorción de AM y RC por <i>C. vulgaris</i> en función de la concentración inicial de colorante. | 53 |
| Figura 13. Validación de supuestos estadísticos del modelo ajustado. (A) normalidad, (B) homocedasticidad y (C) independencia..... | 57 |
| Figura 14. (A) Gráfico de respuestas predichas frente a respuestas reales del modelo. (B) perturbación del % de remoción de RC frente a la desviación del punto de referencia..... | 58 |
| Figura 15. Gráficos de respuesta superficial 3D de (A) AB, (B) AC y (C) BC. | 59 |
| Figura 16. Rampas de optimización para la remoción de RC con biomasa seca de <i>C. vulgaris</i> | 60 |
| Figura 17. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados de la optimización de la decoloración de AM..... | 77 |

Figura 18. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados de la optimización de la decoloración de RC. 78

Figura 19. Cultivo de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de AM, apariencia al primer día (A) y al día cinco (B)..... 79

Figura 20. Cultivo de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de RC, apariencia al primer día (A) y al día cinco (B)..... 79



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Cuadro de operacionalización de variables. | 19 |
| Tabla 2. Algunas propiedades fisicoquímicas del azul de metileno. | 28 |
| Tabla 3. Algunas propiedades fisicoquímicas del rojo congo. | 30 |
| Tabla 4. Diseño experimental factorial completo 2^3 | 37 |
| Tabla 5. Diseño experimental de Box – Behnken para la remoción de colorantes con biomasa inactiva de <i>C. vulgaris</i> | 38 |
| Tabla 6. Cuadro de comparación de alternativas de metodología. | 39 |
| Tabla 7. Resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> cultivada en agitación neumática y orbital. | 41 |
| Tabla 8. Resultados del diseño experimental 2^3 AM..... | 44 |
| Tabla 9. ANOVA para el modelo factorial 2^3 AM. | 45 |
| Tabla 10. Resultados del diseño experimental 2^3 RC..... | 48 |
| Tabla 11. ANOVA para el modelo factorial 2^3 RC..... | 49 |
| Tabla 12. Matriz experimental de Box Behnken para la optimización de remoción de AM con biomasa de <i>C. vulgaris</i> | 55 |
| Tabla 13. ANOVA del diseño experimental Box Behnken para la optimización de la remoción de RC con biomasa seca de microalga. | 56 |
| Tabla 14. ANOVA de velocidad de crecimiento específico Vs tipo de agitación..... | 76 |
| Tabla 15. Agrupaciones de velocidad de crecimiento específico Vs tipo de agitación. | 76 |
| Tabla 16. ANOVA de tiempo de duplicación Vs tipo de agitación..... | 76 |
| Tabla 17. Agrupaciones de tiempo de duplicación Vs tipo de agitación. | 76 |
| Tabla 18. ANOVA de productividad Vs tipo de agitación. | 77 |
| Tabla 19. Agrupaciones de productividad Vs tipo de agitación. | 77 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo 1. Procesamientos estadísticos. | 76 |
| Anexo 2. Galería fotográfica..... | 79 |



INTRODUCCIÓN

Durante el último siglo, el tremendo crecimiento de la industria de producción textil ha provocado una grave contaminación del agua que posteriormente ejerce un impacto perjudicial en el ecosistema acuático (Salierno et al., 2021). La contaminación del agua originada por la industria textil se atribuye principalmente los tintes de las aguas residuales vertidas a los alrededores. Dado que el tinte es el elemento esencial e indispensable en la producción de textiles, suele aparecer como uno de los componentes principales en las aguas residuales vertidas por la industria textil y es extremadamente perjudicial para el medio ambiente (Oke & Mohan, 2022). De hecho, el Banco Mundial mencionó que alrededor del 17-20% de los problemas de contaminación del agua industrial se originan en el proceso de teñido y tratamiento de acabado de los textiles (Hamous et al., 2021). Aparte de eso, la descarga antropogénica de colorantes orgánicos también ha reducido considerablemente la calidad del agua dulce, que es crucial para preservar la biodiversidad del ecosistema.

En este sentido, las aguas residuales coloreadas deben tratarse de manera que la concentración de tinte se reduzca a un nivel aceptable antes de descargarse al entorno, para evitar que las aguas residuales coloreadas dañen el medio ambiente y al mismo tiempo cumplir con las leyes de protección ambiental (Husien et al., 2022). En general, existen muchas tecnologías de tratamiento de agua que han sido propuestas e investigadas por investigadores de todo el mundo para tratar las aguas residuales que contienen colorantes, que generalmente se pueden clasificar en tres grupos principales: método físico, método químico y método biológico.

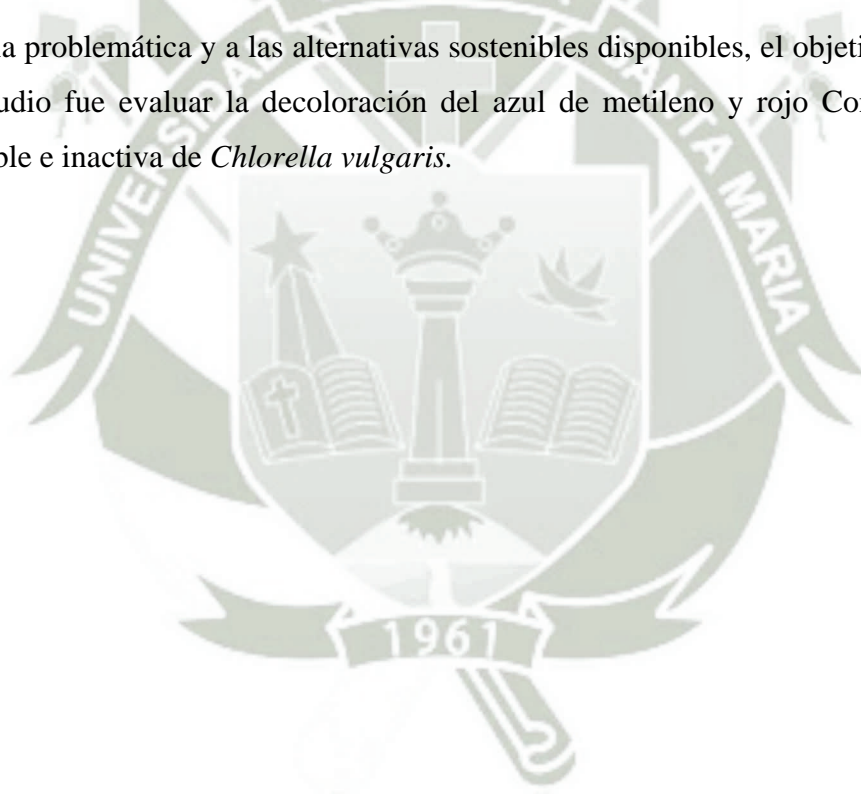
La eliminación de tinte mediante carbón activado, filtración por membrana y coagulación electrocinética se clasifican como métodos físicos. El carbón activado puede eliminar una amplia variedad de colorantes y logra una capacidad de eliminación de azul de metileno de hasta 958,9 mg/g (Baysal et al., 2018). Desafortunadamente, la producción de carbón activado en sí es costosa y consume mucha energía (Khan et al., 2022).

El método de filtración por membrana puede eliminar todo tipo de colorantes y logró una eliminación de hasta el 95 % de tintes en agua residual textil real, pero genera problemas de incrustaciones (*Fouling*) (Flores Alarcón et al., 2022). Por último, pero no menos importante, la eliminación del tinte también se puede realizar mediante técnicas biológicas como la decoloración del tinte por bacterias y hongos de pudrición blanca, así como la adsorción por biomasa de microalgas vivas o muertas. La eliminación del tinte mediante el uso de bacterias es bastante eficiente, por lo que se puede lograr una eliminación del 90% con 100 mg/L de tinte

rojo Congo después de 3 días. Este método es más rentable, pero requiere unas condiciones de crecimiento adecuadas para el cultivo de bacterias (Abo-State et al., 2017). La ventaja de los hongos de pudrición blanca es que utilizan enzimas para degradar el tinte y pueden lograr hasta un 99,99% de eliminación de 600 mg/L de tinte rojo Congo después de 2 días (Abo-State et al., 2017). Una revisión de la literatura revela que se han descrito extensos estudios con respecto a la adsorción de RC utilizando bioadsorbentes de origen vegetal (Manzoor et al., 2022).

Las microalgas han sido conocidas como una de las fuentes de biomasa renovables prometedoras debido a la amplia abundancia con cultivo simple, alta productividad de la biomasa y ventajas en la fijación de carbono para la mitigación de gases de efecto invernadero (J. Q. Xiong et al., 2023; Zahra et al., 2023), una mayor utilización de la biomasa de microalgas y biocarbón residual, connota un enfoque de biorrefinería de microalgas para aplicaciones de valor agregado como adsorbentes (Chin et al., 2020).

Entorno a la problemática y a las alternativas sostenibles disponibles, el objetivo general del presente estudio fue evaluar la decoloración del azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa viable e inactiva de *Chlorella vulgaris*.



CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Problemática de la investigación.

El mundo viene enfrentando problemas muy graves relacionados a la contaminación del ambiente por actividades industriales (Long et al., 2021). actualmente, se producen alrededor de diez mil tintes diferentes, junto con el sector de la confección que utiliza aproximadamente 8×10^5 toneladas de tintes sintéticos al año (Bekhit et al., 2022). Los procesos de teñido y acabados de textiles, según estimaciones del Banco Mundial, representan entre el 17 y el 20 % de la contaminación por aguas residuales industriales (Tomar et al., 2023). Los colorantes, en su mayoría compuestos orgánicos, son sustancias colorantes utilizadas por diversas industrias de producción como la textil, del cuero, alimentaria, papelera, farmacéutica, cosmética, etc., como agente decorativo o estético, o con fines artísticos (Kumar & Bharadvaja, 2020). La coloración de un sustrato se facilita debido a la presencia de varios grupos cromóforos y auxocromos. Los grupos cromóforos (azo, antraquinona, carbonilo, índigo, xanteno, arilmetano, derivados de ftalocianina, nitro, etc.) son los responsables de la coloración, mientras que los grupos auxocromos (amina, carboxilo, sulfonato, hidroxilo, etc.) se utilizan para unir estos grupos cromóforos en la superficie del sustrato (Holkar et al., 2016).

Los impactos ecológicos se atribuyen a ciertas propiedades de los tintes que incluyen (Lekhak, 2023) i. persistencia, ii. naturaleza xenobiótica, iii. acumulación en sedimentos, iv. bioacumulación en peces y otra flora y fauna acuática, v. descomposición en formas altamente tóxicas, cancerígenas y mutagénicas, vi. obstinación por la degradación, vii. degradación menos oxidativa y más anaeróbica que conduce a la producción de peligrosas aminas secundarias y aromáticas, viii. acción sinérgica de tintes y otros contaminantes deseables de la industria de teñido y estampado y ix. debido a las impurezas de los tintes disponibles comercialmente (Lekhak, 2023).

Los tintes/efluentes que contienen tintes no solo afectan las cualidades estéticas del medio ambiente, sino que también muestran la bioacumulación y la biomagnificación en las formas vivas. Los daños directos incluyen, i. Menos penetración de la luz solar, ii. Agotamiento del oxígeno disuelto, iii. Contaminación de las aguas subterráneas y iv. Cuestiones estéticas (H. M. Ali et al., 2016).

La industria textil en el Perú y en específico en Arequipa solo en su proceso genera aguas residuales coloreadas que contienen alto contenido de materia orgánica y sales inorgánicas, así como elevada DBO_5 (demanda bioquímica de oxígeno), DQO (demanda química de oxígeno),

grasas, sulfuros, y otros que dañan el sistema de alcantarillado, canales de regadío, generando riesgo potencial a la salud de las personas si se vierten sin tratamiento alguno (Guillén Zevallos et al., 2020).

En la ciudad de Arequipa la mayoría de las empresas de la industria textil no realizan el tratamiento adecuado a sus efluentes (Guillén Zevallos et al., 2020). Las aguas residuales textiles tienen una composición compleja que requiere el desarrollo de nuevos métodos eficientes para eliminar sus contaminantes. Esto representa un desafío actual en este campo. La relevancia de este tema se refleja en el número de publicaciones en la base de datos SCOPUS, que han aumentado en un 69% en 2023, al buscar los términos " dye AND removal AND industry". Algunos métodos reportados corresponden a adsorción, intercambio iónico, fotocátalisis de oxidación química, degradación microbiológica y filtración por membrana (Flores Alarcón et al., 2022). La pregunta de investigación para este estudio sería: ¿Se puede remover eficientemente colorantes azoicos como azul de metileno y rojo congo utilizando la microalga *C. vulgaris* viable e inactiva?

1.2. Justificación.

Ambiental: La descomunal contaminación ocasionada por la industria textil, nos enfrenta a problemáticas cada vez más complejas para resolver, por lo tanto es necesario explorar procesos biológicos y de adsorción para remover o descontaminar tintes y aguas residuales generadas por este tipo de industria (Flores Alarcón et al., 2022), por otro lado los ODS 2030, específicamente en el ODS 6 nos indica que debemos tomar acciones para el aseguramiento del agua limpia para toda la población (ONU, 2022). Este trabajo al proponer un posible tratamiento biológico es una alternativa muy sostenible y que podría mejorar las condiciones de los ecosistemas, para que de esta forma no se pierdan los servicios ecosistémicos que brinda a la humanidad.

Social: La contaminación que genera la industria textil, ocasiona efectos directos en las comunidades, entre estos efectos tenemos malas condiciones de vida, reducción de los recursos naturales y enfrentamientos con las industrias responsables (Pattnaik & Dangayach, 2019), una industria textil responsable y un correcto tratamiento de las aguas residuales textiles reduciría significativamente estos efectos negativos en la sociedad. Asimismo, el ODS 12 nos insta a una producción y consumo responsables y el ODS 10 nos indica que debemos reducir las desigualdades sociales (ONU, 2022).

Económica: La repercusión económica de la contaminación por la industria textil se refiere a

los efectos negativos en los usuarios del recurso hídrico para la producción agrícola, ganadera, artesanía, recreación e incluso la misma industria, un agua contaminada con colorantes y otros compuestos, es de mínima calidad y requiere de inversión económica para su tratamiento (Hernández-Sancho et al., 2015). Un tratamiento biológico o basado en adsorción resulta económico y eficiente para varios tipos de aguas residuales textiles de esta forma contribuimos a un mejor desarrollo económico de la zona (Asiandu & Wahyudi, 2021).

Tecnológica: La industria textil en el Perú y en general en los países en vías de desarrollo actualmente carece de tecnología eficaz y económica para el tratamiento de sus residuos o efluentes (Nieto et al., 2021; Pacheco et al., 2022), el desarrollo de tecnología eficaz basada en el aprovechamiento de microalgas y sus derivados como adsorbentes podría brindar una solución tecnológica para la industria (Khan et al., 2022; Premaratne et al., 2021).

1.3. Objetivo general.

Evaluar la decoloración del azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa viable e inactiva de *Chlorella vulgaris*

1.4. Objetivos específicos.

- Determinar los parámetros normales de crecimiento microalgal de *Chlorella vulgaris* utilizando medio Bold's Basal Medium (BBM).
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de azul de metileno y rojo Congo sobre la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris*.
- Optimizar la decoloración de azul de metileno y rojo congo a través de la microalga *Chlorella vulgaris* variando tipo de agitación y temperatura.
- Evaluar la remoción de azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa inactiva de *Chlorella vulgaris*.

1.5. Hipótesis.

Se sabe que *Chlorella sp.* es una microalga con alta capacidad para la remoción de colorantes de uso industrial, asimismo la biomasa microalgal al tener gran cantidad de carbono puede ser un interesante medio poroso para la remoción de colorantes, por tal es que se puede remover

azul de metileno y rojo Congo de soluciones acuosas utilizando microalgas viables y biomasa inactiva.

1.6. Variables

Tabla 1. Cuadro de operacionalización de variables.

| Etapa/Objetivo | Tipo de Variable | Variable | Indicador/Unidad |
|---|-----------------------|---|--|
| Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de azul de metileno y rojo Congo sobre la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de biomasa de <i>Chlorella vulgaris</i> . | Independientes | Concentración de colorante | mg/L |
| | | Velocidad de crecimiento específica (μ) | Día ⁻¹ |
| | Dependientes | Tiempo de duplicación | Día |
| | | Productividad de biomasa | mg de biomasa/mL . día |
| Optimizar la decoloración de azul de metileno y rojo congo a través de la microalga <i>Chlorella vulgaris</i> . | Independientes | Remoción de Colorante | % |
| | | Tipo de agitación | Agitación orbital Agitación neumática |
| | Dependientes | Temperatura | °C |
| | | Remoción de colorante | % de remoción de colorante |
| Evaluar la remoción de azul de metileno y rojo congo utilizando biomasa inactiva de <i>Chlorella vulgaris</i> | Independientes | Dosis de adsorbente | mg |
| | | Concentración de colorante | mg/L |
| | | Velocidad de | RPM |

agitación



CAPÍTULO II: FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación.

El uso de biomasa de microalgas para la remoción de colorantes y otros contaminantes ha sido ampliamente estudiado por autores de todo el mundo, Hernández-Zamora et al. (2015) analizaron la capacidad de la biomasa activa e inactiva de la microalga *Chlorella vulgaris* para eliminar el colorante Congo Red (CR) de soluciones acuosas. Mediante procesos de biosorción y biodegradación, *Chlorella vulgaris* fue capaz de remover 83 y 58 % del colorante en concentraciones de 5 y 25 mg L⁻¹, respectivamente. Asimismo, muchas variables han sido estudiadas, por ejemplo, la temperatura, Noor S. & Jasim M. (2019), a través de experimentos demostraron el efecto de la variación de la temperatura en la eficacia de *Chlorella vulgaris* en la eliminación de los colorantes sintéticos cancerosos como el rojo Congo en solución acuosa. Los resultados mostraron que la mejor temperatura para la decoloración por *Chlorella vulgaris* fue (35°C) por un periodo de (9 días) y concentración (50) ppm con la remoción completa (100%), la capacidad de *Chlorella vulgaris* para sobrevivir y crecer en presencia de altas concentraciones del colorante rojo congo, muestra que esta cepa puede tener potencial para ser utilizada en la biorremediación de ambientes contaminados con colorantes.

Se sabe que las aguas residuales contienen grandes cantidades de nutrientes como nitrógeno y fósforo, si estas aguas llegan a cuerpos de agua natural pueden ocasionar eutrofización (Ngatia et al., 2019), las microalgas han demostrado ser una buena opción para esta problemática, Fazal et al., 2021, encontraron que la biodegradación de colorantes con *Chlorella vulgaris* alcanzó hasta un 99,7 % de remoción del azul de metileno, eliminando simultáneamente >80 % de nitrógeno y fósforo. El tratamiento de aguas residuales dirigido por microalgas es un enfoque de biorrefinería prometedor para promover la sostenibilidad ambiental y económica. Sin embargo, las aguas residuales textiles reales pueden tener componentes que generen toxicidad o reduzca la eficiencia de las microalgas, Majhi et al. (2021), estudiaron el potencial comportamiento de adsorción de las células de algas (*Chlorella pyrenoidosa*) para la decoloración de las aguas residuales de la industria de tintes, se notó entre un 52% y un 87% de decoloración con microalgas y concentraciones a temperatura ambiente. Sin embargo, la decoloración máxima (98 %) se obtuvo a 50 °C con la forma inmovilizada de células de algas.

La microalga *Chlorella vulgaris* ha demostrado tener un alto potencial para la remoción de colorantes de la industria textil, Mojtaba et al. (2022), determinaron la capacidad de biorremediación de colorantes azoicos en características simuladas de aguas residuales textiles

de la microalga *Chlorella vulgaris*. Las microalgas fueron expuestas a diferentes concentraciones del colorante azoico (30, 70 y 130 ppm) y un pH inicial de 9. El mayor porcentaje de remoción fue del 91,7% y este se obtuvo con una concentración de 70 ppm y un pH inicial de 9, mientras que el menor porcentaje de remoción fue del 51,5% con una concentración de 130 ppm de la Erionyl Turquoise y un pH inicial de 9. Las microalgas tienen la capacidad de decolorar aguas contaminadas con colorantes azoico debido a la actividad azo reductasa que poseen (Hernández-Zamora et al., 2015).

El rojo Congo y el azul de metileno son colorantes azoicos muy comunes y utilizados para muchos fines, el uso de microalgas y otros organismos para la remoción de rojo Congo ha sido demostrado por Moreno & Herrera (2022), que emplearon dos especies de microorganismos, algas (*Chlorella vulgaris*) y bacterias (*Bacillus subtilis*), en la remoción de colorantes industriales tóxicos (rojo Congo) y tratar el efecto de la variación del pH sobre la actividad de estos organismos para remediar y reducir de colorante in vitro. Los resultados mostraron que el mejor pH para la remoción de *Chlorella vulgaris* fue (7) durante un período de (13 días) a una concentración (150) mg/l y con la eliminación completa (75 %) y *Bacillus subtilis* mejor pH (7) eliminación completa (98 %) a una concentración (50) mg/L. La eficiencia de *Chlorella vulgaris* y *Bacillus subtilis* en la remoción de contaminantes aumentó con el alto valor de muchos factores ambientales como el pH. Chin et al. (2020), utilizaron *Chlorella vulgaris* para remover dos colorantes sintéticos (es decir, azul de metileno con carga positiva y naranja ácido 7 con carga negativa) del agua. Los resultados mostraron que *C. vulgaris* es capaz de eliminar el azul de metileno por adsorción superficial a través de la interacción electrostática. Sin embargo, se logró una remoción pobre o incluso nula para el naranja ácido 7. Aparentemente, la adsorción del colorante en *C. vulgaris* está orientada por el efecto de la carga superficial. En el caso del azul de metileno, la mayor eficiencia de eliminación se alcanzó a una concentración inicial de colorante de 100 mg/L, por lo que se registró un $83,04 \pm 2,94$ % de eliminación después de 3 días de adsorción. Dando mayor valor al uso de *C. vulgaris* biológicamente activa para la remoción es el uso de sus productos, recientemente Abdelghaffara et al. (2021), revelaron que *C. vulgaris* contiene 12,0 % de contenido de aceite y 55,4% de ácidos grasos saturados que aumentan su potencialidad para la producción de biodiesel. La capacidad máxima de adsorción fue de 21 mg/g a la concentración inicial de colorante de 50 mg/l.

Anteriormente se han descrito varios estudios previos que dan viabilidad al uso de *C. vulgaris* para la remoción de colorantes azoicos como azul de metileno y rojo congo, sin embargo, el uso de la biomasa inactiva de microalgas también ha sido estudiada, Lebron et al. (2019), evaluaron la biomasa de tres especies de macro y microalgas, *Fucus vesiculosus*, *Spirulina maxima* y *Chlorella pyrenoidosa*, para adsorber el azul de metileno de las soluciones acuosas, los mejores resultados en términos de capacidad máxima de biosorción después de la modificación química se obtuvieron para las muestras de *F. vesiculosus* modificadas con H_3PO_4 ($1162,9 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$) y *C. pyrenoidosa* modificada con $ZnCl_2$ ($212,0 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$), consiguiendo un aumento del 39,9% y 85,9%, respectivamente. Para el alga verde *S. maxima* se observó una reducción de 40.6% y 22.2% luego del proceso de activación con H_3PO_4 y $ZnCl_2$, el equilibrio se logró después de 40 min de muestra de *F. vesiculosus* modificada con H_3PO_4 . Para *C. pyrenoidosa* y *S. maxima* modificadas con $ZnCl_2$ el equilibrio se logró después de 15 y 30 min, en general, las muestras modificadas presentaron un desempeño superior, por lo que se las considera una alternativa eficiente a las formas de tratamiento convencionales. También es posible usar la biomasa sin ningún tipo de modificación para procesos de adsorción, por ejemplo, S. Kumar et al. (2019), se estudió el potencial de decoloración de la biomasa pulverizada de *Chlorella vulgaris* utilizando diferentes concentraciones de colorante Orange-G. Los datos de FTIR mostraron que cinco grupos funcionales probablemente estaban involucrados en la adsorción del colorante. El proceso de biosorción utilizando algas (incluyendo *C. vulgaris*) ofrece un excelente biosistema para la remediación de vertidos finales de efluentes textiles. da Rosa et al. (2018), usaron *Chlorella pyrenoidosa* para la remoción del colorante rodamina B de los efluentes de teñido de piedras. La biosorción se llevó a cabo para evaluar los efectos del pH, el tiempo de contacto y la temperatura. Los resultados indicaron que la biosorción con *Chlorella pyrenoidosa* tiene un gran potencial para la eliminación de rodamina B de los efluentes de piedras para teñir.

La revisión de antecedentes nos permitió saber que a la fecha no hay ningún estudio publicado sobre la comparación de la eficiencia de remoción de colorantes utilizando *C. vulgaris* viable (estudio de biorremoción) y el uso de su biomasa inviable (estudio de bioadsorción de colorantes), cada proceso tiene sus ventajas y desventajas, lo que se presente hacer en el presente estudio es hallar la forma más eficiente y económica para remover los colorantes azul de metileno y rojo congo.

2.2. Marco teórico.

2.2.1. Contaminación del ambiente acuático.

El agua es la arteria de la vida en la tierra. Es uno de los principales requisitos primarios necesarios para el sustento en nuestro planeta. Cubre más del 71% de la superficie terrestre y representa alrededor del 70% de su masa (Eisenberg & Kauzmann, 2005). Es la única sustancia en la tierra que existe naturalmente en tres estados físicos. No se puede ignorar la necesidad primordial de agua pura (Eisenberg & Kauzmann, 2005). Lamentablemente, en las últimas décadas, la expansión descontrolada de la población y la invasión industrial han generado una enorme presión sobre los limitados recursos hídricos (Elgarahy et al., 2021). Lo que es peor, innumerables contaminantes se liberan simultáneamente en los cuerpos acuáticos. Provoca un deterioro dramático severo y acelerado en la calidad del agua. La contaminación del agua como problema crucial se ha convertido considerablemente en un motivo de preocupación mundial (Elgarahy et al., 2021).

Recientemente, la sobreutilización de los recursos hídricos y la contaminación del agua se producen simultáneamente como consecuencia de la codicia descontrolada asociada a la civilización humana. Desafortunadamente, donde la gente vive y trabaja, siempre se encuentran aguas residuales. Varias industrias son fuertes productoras de aguas residuales cargadas de una gran diversidad de contaminantes. Estos contaminantes incluyen colorantes, metales pesados, fenoles, pesticidas, insecticidas y medicamentos. La descarga de estos efluentes contaminados al medio acuático tiene impactos extremadamente tremendos en nuestra biosfera. Presenta características inmunogénicas, teratogénicas, mutagénicas y cancerígenas (Azari et al., 2019). Es bien sabido que alrededor del 70% al 80% de todos los casos de enfermedades en los países en desarrollo están relacionados con la contaminación del agua (Qadri & Faiq, 2020).

2.2.2. Industria textil y sus efectos al ambiente acuático.

Los tintes, que pueden ser naturales o sintéticos, son esenciales para el proceso de fabricación de muchas industrias, como la industria textil. (Choudhury, 2017). Pueden adsorberse a sustratos en soluciones acuosas formando enlaces covalentes, interacciones iónicas e interacciones de van der Waals. Los tintes textiles sintéticos son populares en la industria del teñido porque son resistentes a la biodegradación. Como resultado, se convierten en importantes contaminantes ambientales durante el proceso de teñido de textiles (Adinew, 2012).

La baja eficiencia en el proceso de teñido de textiles ocasiona que, alrededor de 200.000 toneladas de tintes sean descargados al medio ambiente. La mayoría de estos tintes escapan a los tratamientos de aguas residuales actuales porque son muy resistentes a la luz, la temperatura y los productos químicos. (Holkar et al., 2016). La tecnología tradicional de teñido de textiles también requiere una gran cantidad de agua y libera una gran cantidad de aguas residuales que contienen productos químicos peligrosos y tóxicos para el medio ambiente, lo que genera problemas de salud y seguridad, inflando los costos de tratamiento de los efluentes y el cuidado del agua (Pattnaik & Dangayach, 2019).

En comparación con otras industrias, el teñido y el acabado de textiles son extremadamente intensivos químicamente. Más de 8000 productos químicos se utilizan en el teñido y estampado de textiles, muchos de los cuales son dañinos directa o indirectamente para la salud humana. (P. B. Ramos et al., 2018). La Figura 1 muestra el diagrama de flujo del procesamiento húmedo de textiles y la generación de aguas residuales. Debido a la toxicidad y los impactos nocivos de los tintes sintéticos en el medio ambiente y el ecosistema, en los últimos años ha surgido un interés creciente en el uso de tintes naturales. Sin embargo, los tintes naturales también pueden ser muy tóxicos si se utiliza un tipo específico de mordientes como el cromo para fijar el tinte sobre el tejido (Wang et al., 2022).

Los colorantes naturales también requieren grandes cantidades de agua, casi igual o el doble del peso de las fibras, para el proceso de teñido. Los tintes naturales, principalmente de productos agrícolas, desechos y subproductos de la agricultura y la silvicultura, y desechos de la industria alimentaria, son alternativas no tóxicas, renovables y sostenibles a los tintes sintéticos y, en general, se supone que tienen un impacto ambiental mínimo (Yaseen & Scholz, 2019).

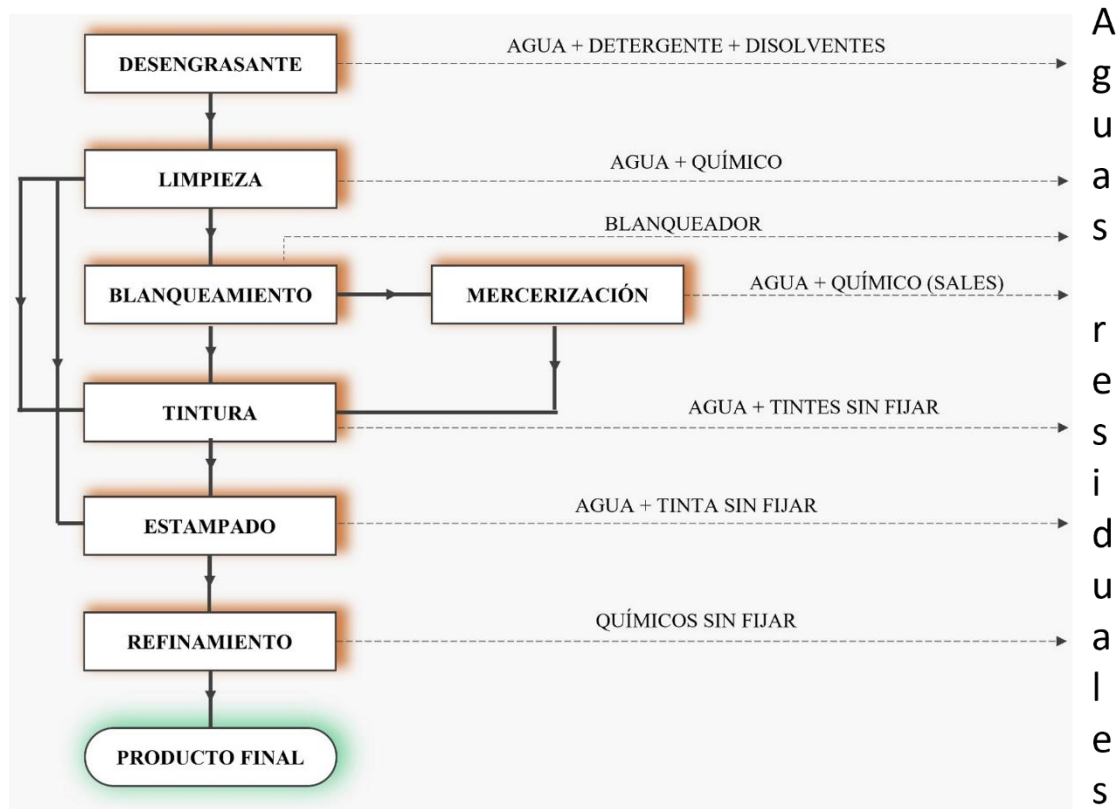


Figura 1. Diagrama de flujo del procesamiento húmedo textil y generación de aguas residuales.

Fuente: Saremi et al. (2022)

Debido a los grandes volúmenes de agua utilizados en el teñido y acabado textil, la industria textil es la principal responsable de la contaminación ambiental, que se ha convertido en uno de los problemas más preocupantes de los últimos años (M. D. N. Ramos et al., 2020). La producción a gran escala y el uso generalizado de tintes sintéticos y productos químicos en la industria textil han causado considerables preocupaciones ambientales, de seguridad y de salud, un aproximado de 280.000 toneladas de tintes textiles se descargan en el medio ambiente en todo el mundo cada año (Tigini et al., 2011). La liberación de colorantes y productos químicos en las aguas residuales se debe a la limitación del proceso de teñido y puede variar del 2% para los tintes básicos al 50% para los colorantes reactivos (Hasanbeigi & Price, 2015). Los tintes ácidos también consumen mucho agua, energía, productos químicos y efluentes, al igual que muchos otros tintes. Sin embargo, el porcentaje de contaminantes liberados en el teñido de poliamida (natural y sintético) es mucho menor que en el teñido de algodón. Estos desechos son muy complejos y contienen una variedad de aditivos colorantes (Azanaw et al., 2022).

La composición regular promedio de las aguas residuales de teñido de lana es la siguiente: DQO: 920 mg.L⁻¹, DBO: 400–2000 mg.L⁻¹, color: 2225 mg.L⁻¹, pH: 4.6–8, y el uso de agua es de 40–150 L.kg⁻¹ de tela (Bisschops & Spanjers, 2003). Es difícil encontrar tratamientos efectivos y viables, además en países en vías de desarrollo, la industria textil no trata adecuadamente sus aguas residuales y termina liberando agua coloreada con una alta carga orgánica a los cuerpos de agua naturales, lo que puede causar graves daños a la salud humana y a la flora y la fauna. (Chequer et al., 2013).

2.2.3. Colorantes azoicos

Azul de metileno (AM)

El azul de metileno (3,7-bis(dimetilamino) fenotiazina cloruro tetrametilitionina cloruro) es uno de los tintes sintéticos que se aplica en gran cantidad como colorante para papeles, en lana, seda y algodón (Ferreira et al., 2020). Además, las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica no se quedan atrás en el consumo de una gran cantidad de colorante AM para sus producciones (Neethu & Choudhury, 2018). Aunque se ha demostrado que el metilbromuro posee algunos efectos medicinales, ocurre cuando se usa de manera segura según las instrucciones/prescripciones clínicas (Prashant & Jyothi, 2010)

Sin embargo, la descarga de aguas residuales contaminadas con colorante AM parcialmente o sin tratar de cualquiera de las industrias antes mencionadas podría causar muchos riesgos para la salud. Por ejemplo, en humanos, el colorante AM puede inducir diversas dolencias como cianosis, necrosis tisular, formación de cuerpos de Heinz, vómitos, ictericia, shock, aumento de la frecuencia cardíaca, entre otras (Kofidis et al., 2001). Además, con respecto a las plantas, la presencia de AM se ha convertido en un desafío importante, por lo tanto, los efectos negativos asociados con las aguas residuales cargadas con colorante AM justifican la necesidad de una eliminación efectiva antes de la descarga industrial (Prashant & Jyothi, 2010).

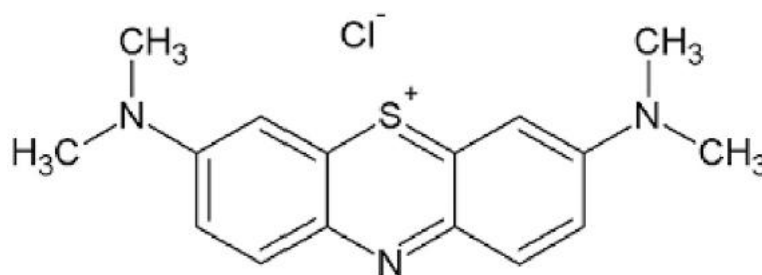


Figura 2. Estructura química del azul de metileno.

Fuente: Oladoye et al. (2022)

El colorante azul de metileno es un compuesto químico aromático heterocíclico de estructura plana (Oladoye et al., 2022). Tiene un peso molecular y una fórmula química de 319,85 g/mol y $C_{16}H_{18}N_3S_1$ respectivamente (Ong et al., 2005); en la Figura 2 se presenta la estructura química del AM. El colorante AM es un tipo de colorante predominantemente azul, catiónico y de tiazina que se ha aplicado ampliamente en la industria textil como agente colorante de fibras (Ong et al., 2005), y también en el campo de la medicina como agentes colorantes y para uso profiláctico y terapéutico (Oladoye et al., 2022). La Tabla 2 presenta algunas propiedades fisicoquímicas del colorante AM.

Tabla 2. Algunas propiedades fisicoquímicas del azul de metileno.

| Parámetro | Valor/nombre |
|--------------------------------------|--------------|
| Longitud de onda de absorción máxima | 664 nm |
| Otro nombre | Swiss blue |
| Ionización | Básica |
| Grado de solubilidad | 3.55 % |
| Nombre de índice de color | Basic blue 9 |
| Numero de índice de color | 52015 |
| pH acuoso | 2.0 – 3.5 |

Fuente: Oladoye et al. (2022)

Rojo Congo (RC)

El rojo Congo (RC) es un colorante azoico aniónico popular, que es un tinte estable frente a la fotodegradación y la biodegradación (Hernández-Zamora et al., 2014a). Es reconocido como carcinógeno porque contiene aminas aromáticas en su estructura (Iaich et al., 2021). La presencia de estructuras aromáticas hace que los colorantes azoicos sean resistentes a la degradación natural (Harja et al., 2022). El RC se metaboliza a bencidina y, por lo tanto, tiene el potencial de bioacumulación y es difícil de eliminar del agua (Deng et al., 2018). RC es un colorante bis azo o di azo aniónico a base de bencidina, que presenta grupos aromáticos que conducen a una alta toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad para la vida en el agua y en los seres humanos por igual (Ahmad & Ansari, 2021). La toxicidad del RC puede causar daño al sistema nervioso, irritación respiratoria, diarrea, vómitos, mareos, daño a las mucosas y membranas (Harja et al., 2022). Para prevenir tales daños, la eliminación de los componentes peligrosos del tinte del agua es muy importante (Deng et al., 2018; Zheng et al., 2021).

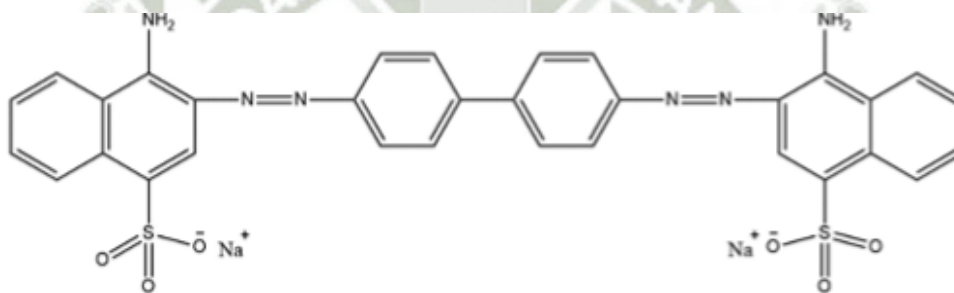


Figura 3. Estructura química del rojo congo.

Fuente: Cruz et al. (2023).

El nombre IUPAC de RC es Ácido 1-naftalenosulfónico, 3,3 – (4, 4-bifenilebis (azo))bis (4-aminodisodio) sal (Cruz et al., 2023), su estructura química se presenta en la Figura 3, es de tipo aniónico y su peso molecular es de 696,67 g/mol. RC es un colorante azoico cuya fórmula química es $C_{32}N_{22}Na_2O_6S_2$ (Cruz et al., 2023), algunas propiedades del RC se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Algunas propiedades fisicoquímicas del rojo congo.

| Parámetro | Valor/nombre |
|--------------------------------------|--|
| Longitud de onda de absorción máxima | 498 nm (pH >5), 567 (pH 3.86), 560 (pH <3) |
| Otro nombre | Direct red 28, Cotton red |
| pKa | 4.1 |

Fuente: Cruz et al. (2023).

2.2.4. Biodegradación de colorantes

La descomposición de compuestos químicos mediada biológicamente se conoce como biodegradación. Este proceso depende de la energía y requiere la acción de varias enzimas para descomponer el tinte en varios subproductos. La biodegradación de los tintes sintéticos no solo decolora los tintes, sino que también descompone las moléculas del tinte en fragmentos más pequeños (H. Ali, 2010). Según Kaushik & Malik (2009), la decoloración del tinte ocurre cuando se escinde el centro cromóforo del tinte. Se han utilizado una variedad de microorganismos, como hongos, bacterias, levaduras y algas, para decolorar y degradar tintes artificiales. Estos tienen diferentes grados de capacidad para degradar varios tintes. La biodegradación de tintes sintéticos depende de varios grupos de microorganismos. Algunos grupos tienen particulares ventajas sobre otros. La adaptabilidad y la actividad de los microorganismos elegidos determinan la eficacia de la decoloración microbiana (Chen et al., 2003). El uso de una cepa seleccionada adecuada y su uso en condiciones favorables para aprovechar el potencial de degradación son necesarios para el desarrollo de una biotecnología efectiva para la degradación de colorantes (Novotný et al., 2004).

Los ecosistemas son espacios dinámicos con diversas condiciones abióticas, como pH, temperatura, presencia de oxígeno, metales y sales, entre otras. Los cambios en estos parámetros tienen un impacto en los microorganismos, que juegan un papel importante en los ciclos globales de C, N y S. y como resultado, sus actividades de descomposición también sufren. Por lo tanto, al evaluar la capacidad de varios microorganismos para degradar xenobióticos orgánicos específicos, se deben tener en cuenta los efectos de estos (H. Ali, 2010).

2.2.5. Microalgas en la decoloración de colorantes azoicos

Existen numerosos contaminantes orgánicos en las aguas residuales textiles, que contienen una variedad de grupos funcionales, incluidos OH, RCOO, NH₂ y PO₄³⁻ (Arteaga et al., 2018). Las microalgas tienen una gran superficie específica y la superficie de sus paredes celulares es rica en grupos funcionales (Chin et al., 2020). Los grupos funcionales transportados en la superficie de las microalgas se combinan fácilmente con los colorantes en las aguas residuales mediante electro-adsorción, para lograr el propósito de eliminar sustancias nocivas (da Rosa et al., 2018b). Se han encontrado especies de microalgas que pueden eliminar los tintes textiles tanto en ambientes de agua dulce como de agua de mar en fotobiorreactores con la generación de valiosa bioenergía (J.-Q. Xiong et al., 2023). La decoloración de los tintes por parte de las microalgas involucra diferentes mecanismos.

Las microalgas pueden utilizar cromóforos contaminantes como fuente de energía para su crecimiento; las microalgas pueden promover la conversión de sustancias cromóforas en sustancias no cromóforas; los cromóforos se pueden adsorber fácilmente en la biomasa de algas (Raymond & Kadiri, 2017). La enzima azo reductasa de las microalgas escinde el enlace azo (Hernández-Zamora et al., 2015). Una cianobacteria marina, *Oscillatoria curviceps* BDU92191, utilizó Acid Black 1 como fuente de nitrógeno para su crecimiento, que puede estar mediado por la nitrito reductasa y la glutamina sintasa (Priya et al., 2011). Por lo tanto, las microalgas pueden eliminar diferentes colorantes mediante biosorción, bioacumulación y biodegradación.

La ruta bioquímica involucrada consiste en la escisión del triple enlace nitrógeno (enlace azo), gracias a la enzima azo reductasa y un agente oxidante mediador. La azoreductasa (EC 1.7.1.6) es una enzima que descompone los colorantes azoicos convirtiéndolos en aminas sin color mediante una reacción reductora (Hernández-Zamora et al., 2015; Sarkar et al., 2017). Utiliza coenzimas como FADH o NADH para transferir electrones en una reacción redox. Puede ser clasificada en tres tipos según la coenzima que utiliza: solo NADH, solo NADPH o ambos. Esta enzima puede encontrarse tanto en el citoplasma como en la membrana celular externa. Su presencia es fundamental en el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes, aunque su efectividad puede verse afectada por la complejidad química de algunos colorantes comerciales (Serrano-Martínez et al., 2020).

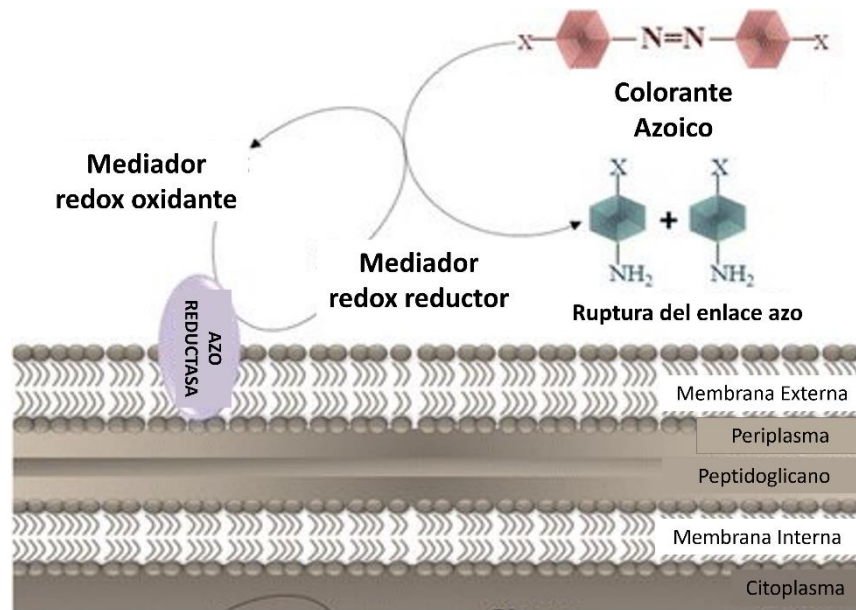


Figura 4. Biodegradación del enlace azo de los colorantes azoicos.

Fuente: Sarkar et al. (2017).

La enzima rompe el enlace azo ($-N=N-$) y transfiere cuatro electrones como parte de su proceso reductor (Sarkar et al., 2017). El colorante azo actúa como aceptor de electrones, lo que resulta en su decoloración y en la formación de una solución sin color. El producto intermedio resultante es una amina aromática tóxica que puede ser degradada aeróbicamente o en condiciones de microaerofilia (Sarkar et al., 2017). La representación gráfica y esquematizada de la ruta bioquímica se presente en la Figura 4.

2.2.6. Bioadsorción de colorantes.

La idea de la biosorción como un proceso multidimensional efectivo ha cambiado en los últimos años. Se considera una excelente opción para el tratamiento de aguas residuales en comparación con otros métodos convencionales (Demey et al., 2019). La sorción es un fenómeno fisicoquímico en el que las moléculas de sorbato se concentran en la superficie de otra sustancia (sorbente). Esto produce efluentes depurados superiores. El término "biosorción" también tiene una definición simple a pesar de usar el prefijo "bio" para denotar la participación de una entidad biológica. La biosorción y la bioadsorción tienen los mismos mecanismos de sorción (Elgarahy et al., 2021).

La absorción es cuando una sustancia se incorpora a otra en un estado diferente. Incluye la absorción de gases por un sólido o agua. Sin embargo, la adsorción es un tipo de unión física en la que el sorbato interactúa con un sorbente y crea una interfaz sorbente-sorbato (El-Sheekh

et al., 2019). La biosorción cubre todos los aspectos de la interacción entre cualquier sorbato y la matriz biológica (biosorbente). Es un proceso pasivo, metabólicamente independiente. En diversas disciplinas científicas, desempeña un papel fundamental en muchos procesos naturales (Elgarahy et al., 2021).

2.2.7. Adsorción de colorantes con biomasa microalgal pulverizada y seca.

Debido a que los organismos muertos no pueden verse afectados por desechos tóxicos y no necesitan un suministro de nutrientes para crecer y regenerarse, el polvo de microalgas secas, que son células microbianas muertas, es más adsorbente de contaminantes del agua (Liu & Ruan, 2022). En comparación con otros materiales de biosorción, el adsorbente en polvo de microalgas secas tiene las ventajas de una gran superficie específica y una gran capacidad de adsorción. Por ejemplo, el alga verde azul *Spirulina platensis* contiene una variedad de grupos funcionales como hidroxilo, carboxilo, fosfato, sulfato y otros grupos cargados, que pueden unirse a muchos tipos de contaminantes (Dotto et al., 2012). Estas propiedades interesantes hacen que el polvo de biomasa de microalgas sea eficiente para la adsorción de colorantes y también metales debido a la gran cantidad de grupos funcionales que tiene en su masiva superficie (Çelekli & Bozkurt, 2011).

2.3. Marco legal

Constitución Política del Perú - Artículo N°2 “Derechos Fundamentales de las Personas”

El inciso N°22 el cual indica: Toda persona tiene derecho a goza de la paz, la tranquilidad, disfrute del tiempo libre y al descanso, así como gozar de un medio ambiente equilibrado y adecuado para el desarrollo de su vida. Esto indica que el Estado peruano debe garantizar el equilibrio ecológico y ecosistémico del medio ambiente en todo el territorio nacional, para el disfrute de cualquier ciudadano peruano o residente extranjero. Siendo entonces, de necesidad nacional, el tratamiento de los residuos sólidos capaces de alterar o contaminar el medio ambiente y, por consiguiente, la salud del ser humano.

Ley N°28611 - Ley General del Ambiente

Dentro de esta ley se establecen los lineamientos que debe adoptar el Estado peruano respecto a la protección, conservación y aprovechamiento del medio ambiente en nuestro territorio. Referente al ámbito de la presente investigación se puede nombrar al artículo N°1 el cual lleva por nombre “Del derecho y deber fundamental” y el artículo N°5 el cual lleva por nombre “Del

principio de sostenibilidad”, ambos relacionados en función a la gestión ambiental que el Estado debe garantizar y exigir a las empresas tanto públicas como privadas.

Decreto Supremo N° 023-2021-MINAM que aprueba la Política Nacional del Ambiente al 2030

Contiene la principal decisión de política ambiental del país. Define y orienta el accionar de las entidades del gobierno nacional, regional y local, del sector privado y la sociedad civil para los próximos 10 años y establece los objetivos, estrategias, servicios y actividades orientadas a afrontar los problemas críticos que afectan el ambiente y la sostenibilidad del desarrollo del País.

Decreto Supremo que aprueba el Reglamento de Valores Máximos Admisibles (VMA) para las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario

Este recurso legal aplica para la descarga de líquidos producidos por alguna actividad económica comercial e industrial, distinta a la generada por los usuarios domésticos, quienes descargan aguas residuales domésticas como producto de la preparación de alimentos, del aseo personal y de desechos fisiológicos. Dentro de estas actividades están incluidas las de industria textil, ya que al momento no se ha promulgado ninguna ley o decreto que regule directamente los efluentes textiles, así como ya existe para industrias minera, curtiembre, cervecera y papel.

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

Al ser un trabajo netamente experimental y a nivel laboratorio este trabajo se realizó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María que se encuentran ubicados en la ciudad de Arequipa, Perú. Los experimentos se desarrollaron entre los meses de julio – setiembre de 2023.

3.2. Tipo y nivel de investigación.

Es una investigación de tipo explicativo, ya que se trata de encontrar las condiciones óptimas de las variables establecidas (Hurtado, 2005) para alcanzar la máxima eficiencia en la remoción de colorantes azoicos. El nivel de investigación es comprensivo porque alude a la explicación de la situaciones que se generan (Hurtado, 2005).

3.3. Métodos de investigación.

3.3.1. Determinación de los parámetros normales de crecimiento microalgal de *Chlorella vulgaris* utilizando medio Bold's Basal Medium (BBM).

Obtención de la cepa y preparación del medio de cultivo BBM.

La cepa de *C. vulgaris* utilizada en la presente investigación fue donada por la Universidad Nacional de San Agustín. Las microalgas se cultivaron en 1 L de medio basal de Bold (BBM). Todos los componentes químicos del medio de ensayo utilizado se disolvieron en agua destilada y se ajustaron a pH 7,5 utilizando 2 M de NaOH y HCl. El medio BBM (Jasni et al., 2020), consistió en los siguientes componentes (g/l): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (25), K_2HPO_4 (75), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (75), H_3BO_3 (11.4), NaNO_3 (250), NaCl (25), $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$ (50), KH_2PO_4 (173.8), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (4.98), H_2SO_4 (1), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (8.82), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.44), MoO_3 (0.71), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.572), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.49). El cultivo se mantuvo a 20 ± 2 °C bajo una luz con iluminación continua ($440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones).

Inoculación y elaboración de la curva de crecimiento.

La concentración inicial de *C. vulgaris*, fue de $2,0 \times 10^5$ células mL^{-1} , esto se realizó empleando el método de dilución, la curva de crecimiento normal se realizará en frascos de laboratorio de 1000 mL e incubados a temperatura ambiente a (20 ± 2 °C), con aspersión de aire, con fotoperíodo de 12:12 h proporcionado por lámparas fluorescentes, con una intensidad

de luz de $440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones durante 7 días, se tomaron muestras de las células de algas en varias etapas de crecimiento (dos veces al día) y se contabilizó el número de células usando una cámara de Neubauer (Moheimani et al., 2012).

Producción de biomasa microalgas para la experimentación.

Posteriormente se procederá a producir constantemente biomasa de *C. vulgaris* para los siguientes experimentos respetando las condiciones estándar en cultivo con medio BBM.

3.3.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de azul de metileno y rojo Congo sobre la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

Se prepararon soluciones stock de azul de metileno y rojo congo en agua destilada autoclavada de 50 ppm, luego, aplicando la ecuación de la dilución se agregaron pequeños volúmenes al medio de cultivo BBM para crear soluciones que vayan de 0,5 a 6 ppm con cada colorante; se armó el sistema y se inoculó con 5 % de biomasa microalgal en fase de crecimiento exponencial. Posteriormente se elaboró la curva de crecimiento en cada concentración como se detalló anteriormente y luego se determinó la velocidad de crecimiento específico (μ) con la siguiente ecuación:

$$\mu_{max}(\text{día}^{-1}) = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde X_1 y X_2 simbolizan el número de células (células/ml) en el primer día y al final del cultivo, respectivamente, y t_1 y t_2 (días) son el momento de inicio y finalización del cultivo, respectivamente. La ecuación fue utilizada previamente por Salgueiro et al. (2016).

El tiempo de duplicación (td) se determinó con la siguiente ecuación (Coman et al., 2018):

$$Td(\text{días}) = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Para determinación de la producción de biomasa, se tomó una muestra de microalgas en medio de crecimiento (5 mL de suspensión) se centrifugó, se lavó dos veces y posteriormente se secó a 105°C durante 1 h, finalmente se pesó (Moheimani et al., 2012). La productividad (P) ($\text{g L}^{-1} \text{día}^{-1}$), durante el período de cultivo, se calculó a partir de la ecuación

$$P = \frac{(X_t - X_0)}{(t_x - t_0)}$$

Donde, X_t es la producción de biomasa (g L^{-1}) al final de la fase de crecimiento exponencial (t_x) y X_0 es la producción inicial de biomasa (g L^{-1}) en tiempo 0.

3.3.3. Optimización de la decoloración de azul de metileno y rojo congo a través de la microalga *Chlorella vulgaris* variando tipo de agitación y temperatura.

Se planteó un diseño experimental factorial completo 2^3 con 16 experimentos (8 corridas experimentales base, dos réplicas) en el cual se evaluaron las variables de concentración de colorante, tipo de agitación y temperatura con cada colorante. Ver la **Tabla 4**. Este diseño se aplicó para cada colorante por separado. La variable de respuesta fue principalmente el porcentaje de remoción del colorante.

Tabla 4. Diseño experimental factorial completo 2^3 .

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 |
|------------|----------------------|-----------------|-------------------------------|
| Run | A: Tipo de agitación | B: Temperatura | C: Concentración de colorante |
| | - | °C | mg/L |
| 1 | Neumática | 20 | 3 |
| 2 | Orbital | 20 | 3 |
| 3 | Neumática | 35 | 3 |
| 4 | Neumática | 35 | 3 |
| 5 | Orbital | 20 | 3 |
| 6 | Orbital | 20 | 5 |
| 7 | Neumática | 20 | 5 |
| 8 | Orbital | 35 | 5 |
| 9 | Neumática | 20 | 5 |
| 10 | Neumática | 35 | 5 |
| 11 | Orbital | 20 | 5 |
| 12 | Orbital | 35 | 5 |
| 13 | Neumática | 20 | 3 |
| 14 | Neumática | 35 | 5 |
| 15 | Orbital | 35 | 3 |
| 16 | Orbital | 35 | 3 |

El diseño experimental 2^3 se realizó por duplicado para generar mayor confianza en los datos del modelo matemático generado. Asimismo, se aplicó el mismo diseño experimental tanto para AM como para RC.

3.3.4. Evaluación de la remoción de azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa inactiva de *Chlorella vulgaris*.

Se procedió a obtener 100 gramos de biomasa seca de la microalga *Chlorella vulgaris* para esto se realizaron varios cultivos en fotobiorreactores de 4 L, luego de 6 días de crecimiento se procedió a cosechar la biomasa por coagulación-floculación (CF) con sulfato de aluminio según (Sanyano et al., 2013). Luego se procedió a hacer varios lavados con agua destilada y se secó la biomasa a 70 °C x 24 h. Posteriormente se procedió a realizar varios experimentos para optimizar la adsorción de colorantes, las variables a estudiar serán dosis de bioadsorbente, concentración de colorante y velocidad de agitación. Para este objetivo se aplicará un diseño experimental de superficie de respuesta Box – Behnken. El cual se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño experimental de Box – Behnken para la remoción de colorantes con biomasa inactiva de *C. vulgaris*.

| <i>Factor 1</i> | <i>Factor 2</i> | <i>Factor 3</i> |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------------|
| <i>A:Dosis de bioadsorbente</i> | <i>B:Conc. colorante</i> | <i>C:Vel. agitación</i> |
| <i>g</i> | <i>mg/L</i> | <i>RPM</i> |
| 1 | 0 | 1 |
| 0 | 0 | 0 |
| 1 | 1 | 0 |
| 0 | 1 | 1 |
| -1 | -1 | 0 |
| 1 | 0 | -1 |
| -1 | 1 | 0 |
| -1 | 0 | -1 |
| 1 | -1 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | 0 | 0 |
| 0 | -1 | -1 |
| 0 | 1 | -1 |
| -1 | 0 | 1 |
| 0 | -1 | 1 |

3.3.5. Cuadro comparativo de alternativas para la metodología aplicada en la tesis

Para el presente trabajo de tesis se evaluará varias alternativas de metodología, y se escogieron las más actuales y apropiadas para este estudio. En la Tabla 6 se presenta un análisis comparativo de ventajas y desventajas para llevar a cabo el estudio propuesto, entonces debido a que el estudio se basa en la optimización de procesos se optó por usar diseños experimentales ya que tienen claras ventajas sobre el estudio de factor por factor que era otra alternativa.

Tabla 6. Cuadro de comparación de alternativas de metodología.

| Método | Ventajas | Desventajas |
|----------------------------------|---|---|
| Diseño experimental | <ul style="list-style-type: none"> • Utiliza diseños experimentales para optimizar procesos. • Permite examinar múltiples variables simultáneamente. • Identifica interacciones entre variables. • Proporciona resultados cuantitativos confiables. • Ayuda a optimizar procesos de forma eficiente. | <ul style="list-style-type: none"> • Requiere planificación y diseño cuidadosos. • Las interacciones pueden ser difíciles de interpretar |
| Enfoque factor por factor | <ul style="list-style-type: none"> • Evalúa cada factor individualmente y su impacto. • Permite entender el efecto específico de cada factor. | <ul style="list-style-type: none"> • No considera posibles interacciones entre factores. • Puede no reflejar la complejidad del sistema real. • No permite evaluar el efecto conjunto de factores. |

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de los parámetros normales de crecimiento microalgal de *Chlorella vulgaris* utilizando medio BBM.

Las condiciones de cultivo normales se dieron a 20 ± 2 °C bajo una luz con iluminación continua ($440 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de densidad de flujo de fotones), se utilizó agitación neumática y agitación orbital a 150 RPM; no hubo un fotoperiodo, para estimular la constante reproducción de la microalga (Adochite & Andronic, 2020). Las curvas de crecimiento en medio BBM se presenta a continuación en la Figura 5. El medio BBM ha sido muy utilizado para el establecimiento y acondicionamiento de la microalga *C. vulgaris* (Salgueiro et al., 2018; Terán Hilares et al., 2021).

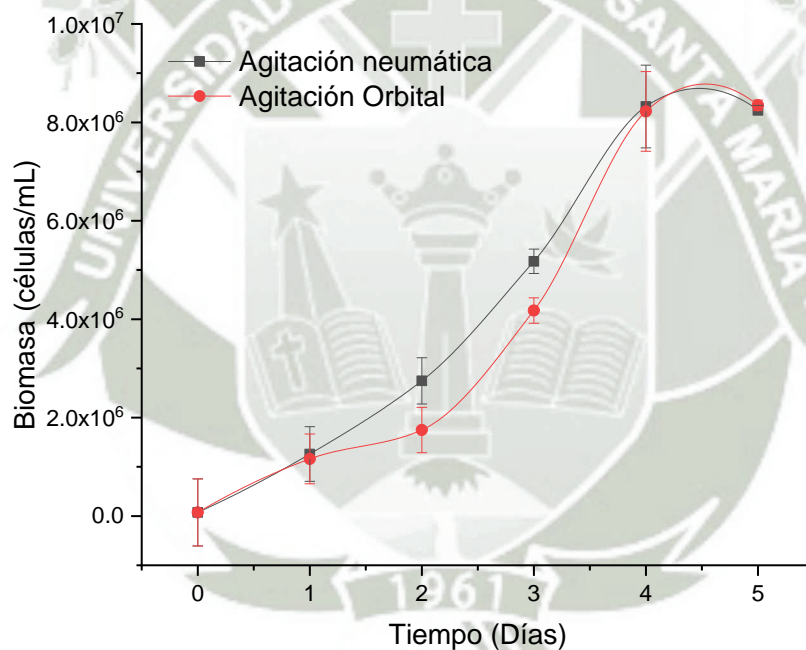


Figura 5. Curva de crecimiento de *C. vulgaris* en medio BBM.

La curva de crecimiento presenta un comportamiento normal para la microalga en estudio, presentó datos y tendencia muy similar a estudios de Sánchez-Borroto et al. (2018). También se calculó la velocidad de crecimiento específica (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) dando valores de $0,237 \pm 0.021 \text{ día}^{-1}$ y $2,95 \pm 0.281 \text{ h}$ respectivamente para agitación neumática y $0,227 \pm 0.016 \text{ día}^{-1}$ y $2,97 \pm 0.231 \text{ h}$ para agitación orbital, estos datos concuerdan con los valores de μ y t_d de $0,298 \text{ día}^{-1}$ y $2,326 \text{ h}$ respectivamente reportados por Baldiris Navarro et

al. (2022). Los datos también concuerdan con los reportados por varios autores que desarrollaron trabajos en la ciudad de Arequipa y Perú (Huarachi-Olivera et al., 2018; Terán Hilaes et al., 2021). La productividad de biomasa fue de $0,49 \pm 0.025 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ para agitación neumática y $0,47 \pm 0.011 \text{ g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ para agitación orbital, acorde a lo reportado por Samaniego Bordón et al. (2022). En lo que respecta a la comparación entre agitación orbital y neumática no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre ambos tratamientos ($p > 0,05$), el procesamiento estadístico se presenta en las Tabla 14 - 18 del Anexo 1. En la Tabla 7 se puede apreciar los parámetros cinéticos de crecimiento de *C. vulgaris* con su respectivo análisis estadístico.

Tabla 7. Resultados de los parámetros cinéticos de crecimiento de *C. vulgaris* cultivada en agitación neumática y orbital.

| Tipo de agitación | Promedio \pm Desviación estándar Agrupación Tukey. | | |
|-------------------|--|--------------------|--------------------------------------|
| | $\mu, \text{ día}^{-1}$ | Td, día | P, $\text{g.L}^{-1}.\text{día}^{-1}$ |
| Neumática | $0,237 \pm 0.021^A$ | $2,95 \pm 0.281^A$ | $0,49 \pm 0.025^A$ |
| Orbital | $0,227 \pm 0.016^A$ | $2,97 \pm 0.231^A$ | $0,47 \pm 0.011^A$ |
| p value | 0.557 | 0.584 | 0.477 |

Los valores obtenidos de p value, indican que no existen diferencias significativas, entre los dos tipos de agitación empleados en el desarrollo de la microalga. Lo cual nos indica que se pueden evaluar otras condiciones y ver efectos en la mejora de la biodegradación de algún contaminante (Chen et al., 2003).

Para calcular el número de experimentos necesarios, se utilizó la fórmula del número total de combinaciones para un diseño factorial completo:

$$N = n^k$$

Donde:

- N es el número total de combinaciones o experimentos necesarios.
- n es el número de niveles por factor (en este caso, 3 para ambos factores).

- k es el número de factores (en este caso, 2).

Entonces, aplicando la fórmula, se obtendrá matemáticamente el número de experimentos, principalmente en el uso de diseños experimentales factoriales completos (Gutiérrez Pulido & De la Vara Salazar, 2008).

4.2. Evaluación del efecto de diferentes concentraciones de azul de metileno y rojo Congo sobre la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y productividad de biomasa de *Chlorella vulgaris*.

4.2.1. Evaluación del efecto de la concentración de AM sobre parámetros de crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

Se realizó el estudio del efecto en los parámetros de crecimiento de *C. vulgaris*, con diferentes concentración de AM. En la Figura 6 se presentan las curvas de crecimiento de la microalga con diferentes concentraciones de azul de metileno. Las condiciones de temperatura e iluminación fueron iguales a las ejecutadas en el anterior punto.

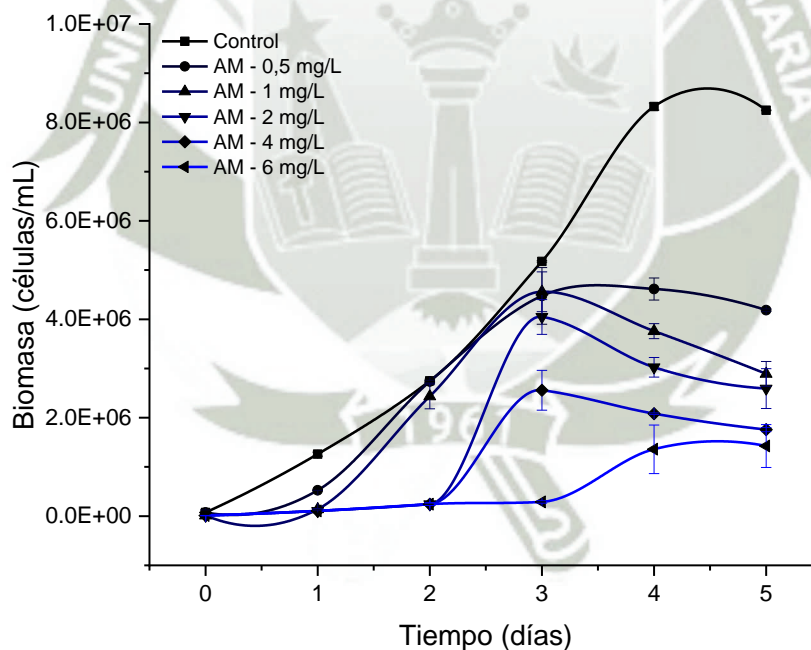


Figura 6. Curvas de crecimiento con diferentes concentración de AM.

Es muy clara la diferencia entre el control (0 mg/L de AM) y las concentraciones de azul de metileno, es evidente el efecto inhibitorio del azul de metileno en el inicio del crecimiento exponencial, esta etapa se da en el control, 0,5, 1 y 2 mg/L entre el día 1 y 2, sin embargo a

partir de concentraciones de 4 mg/L la etapa exponencial empieza en el día 3 y en 6 mg/L empieza al día 4, asimismo es observable que la concentración final de células/mL, se ve seriamente afectada a mayores concentraciones. El efecto en crecimiento se debe principalmente a la toxicidad relacionada con el colorante que daña la membrana celular y afecta al mecanismo de división celular (Pikula et al., 2019), por otro lado, los resultados obtenidos son muy similares a los hallados por Krishna Moorthy et al. (2021), donde presentan importantes porcentajes de inhibición, a partir de concentraciones de 4 mg/L de AM. Evaluación del efecto de la concentración de RC sobre parámetros de crecimiento de *Chlorella vulgaris*.

Se realizó el estudio del efecto en los parámetros de crecimiento de *C. vulgaris*, con diferentes concentración de RC. En la Figura 7 se presentan las curvas de crecimiento de la microalga con diferentes concentraciones de RC.

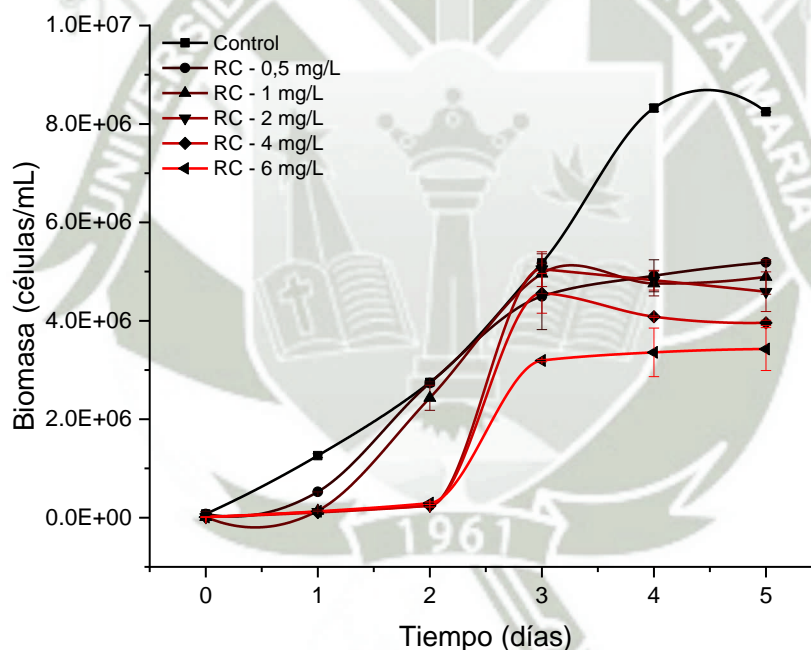


Figura 7. Curvas de crecimiento con diferentes concentración de RC.

Es muy clara la diferencia entre el control (0 mg/L de RC) y las diferentes concentraciones de RM, es claro el efecto inhibitorio del RC en el inicio del crecimiento exponencial, esta etapa se da en el control, 0,5, 1 y 2 mg/L entre el día 1 y 2, sin embargo, a partir de concentraciones de 4 mg/L en adelante, la etapa exponencial empieza en el día 2, a diferencia de los efectos en el

crecimiento por AM, concentraciones de 6 mg/L no generan un retraso mayor en el inicio de la fase exponencial. Asimismo, es observable una clara fase estacionaria a partir del día 3 en todas las concentraciones de RC a diferencia del control (0 mg/L). Se han conseguido demostrar que la exposición de las microalgas al RC redujo la tasa de crecimiento, la fotosíntesis y la respiración (Hernández-Zamora et al., 2014a), precisamente el autor antes mencionado demuestra reducción en la tasa crecimiento a 5 mg/L de RC, muy similares a las reportadas por este estudio a 4 y a 6 mg/L. También se ha demostrado la alta capacidad de remover colorante RC con *C. vulgaris* (Noor S. & Jasim M., 2019), debido de manera precisa a que tiene evidentemente un menor impacto toxico que el AM (Krishna Moorthy et al., 2021).

En la Figura 19 y Figura 20 del Anexo 2, se presentan fotografías de los sistemas que nos permiten ver la apariencia de los sistemas evaluados en el primer día (momento de la inoculación de la microalga) y el último día de evaluación, en los sistemas con AM y RC, se puede apreciar que hubo crecimiento en casi todas las concentraciones menos en la última de 6 mg/L para el caso de AM y la última y penúltima para el caso de RC en donde el color verde característico no es tan intenso como en las demás concentraciones. Este ensayo fue útil para saber cuál es la concentración de AM más alta en la que la microalga se puede desarrollar sin problemas, varios autores reportan este método como adecuado porque de esta forma no exigimos al microorganismo a un proceso de adaptación si no únicamente potenciamos los mecanismos de biorremoción del contaminante (Terán Hilares et al., 2021).

4.3. Optimización de la decoloración de azul de metileno y rojo congo a través de la microalga *Chlorella vulgaris* variando tipo de agitación y temperatura.

4.3.1. Optimización de la decoloración de AM.

Se ejecutó el diseño experimental, y los resultados se presentan en la Tabla 8, el procesamiento estadístico nos indica que hubo un correcto ajuste entre los datos experimentales y los datos del modelo matemático.

Tabla 8. Resultados del diseño experimental 2³ AM.

| Corrida | Factor 1 A: Tipo de agitación | Factor 2 B: Temperatura | Factor 3 C: Concentración de colorante | Response 1 Remoción de AM |
|---------|----------------------------------|----------------------------|---|------------------------------|
| | - | °C | mg/L | % |
| 1 | Neumática | 20 | 3 | 84.565 |
| 2 | Orbital | 20 | 3 | 66.776 |
| 3 | Neumática | 35 | 3 | 88.994 |

| | | | | |
|----|-----------|----|---|--------|
| 4 | Neumática | 35 | 3 | 90.432 |
| 5 | Orbital | 20 | 3 | 67.434 |
| 6 | Orbital | 20 | 5 | 50.467 |
| 7 | Neumática | 20 | 5 | 60.556 |
| 8 | Orbital | 35 | 5 | 42.504 |
| 9 | Neumática | 20 | 5 | 59.455 |
| 10 | Neumática | 35 | 5 | 70.454 |
| 11 | Orbital | 20 | 5 | 59.555 |
| 12 | Orbital | 35 | 5 | 40.443 |
| 13 | Neumática | 20 | 3 | 86.454 |
| 14 | Neumática | 35 | 5 | 70.435 |
| 15 | Orbital | 35 | 3 | 47.546 |
| 16 | Orbital | 35 | 3 | 48.546 |

El análisis de varianza ejecutado para el modelo indica que hay un buen nivel de ajuste, obteniendo un valor p menor a 0,05, lo cual se interpreta como significativo, asimismo todos los factores evaluados son significativos para la variable de respuesta, eso se puede ver en la Figura 17 donde se observa que los efectos estandarizados para los factores de tipo de agitación, temperatura y concentración de colorante superan el límite de Bonferroni lo cual indica que son sumamente relevantes para la variable de respuesta (Azari et al., 2019).

Tabla 9. ANOVA para el modelo factorial 2³ AM.

| Fuente | Suma de cuadrados | df | Cuadrado medio | Valor F | Valor p | |
|-------------------------------------|-------------------|----|----------------|---------|----------|---------------|
| Modelo | 4060.40 | 7 | 580.06 | 97.57 | < 0.0001 | significativo |
| A-Tipo de agitación | 2210.74 | 1 | 2210.74 | 371.86 | < 0.0001 | |
| B-Temperatura | 80.59 | 1 | 80.59 | 13.56 | 0.0062 | |
| C-Concentración de colorante | 1006.13 | 1 | 1006.13 | 169.24 | < 0.0001 | |
| AB | 557.88 | 1 | 557.88 | 93.84 | < 0.0001 | |
| AC | 170.38 | 1 | 170.38 | 28.66 | 0.0007 | |
| BC | 34.56 | 1 | 34.56 | 5.81 | 0.0424 | |

| | | | | | |
|-------------------|---------|----|--------|--------|--------|
| ABC | 0.1274 | 1 | 0.1274 | 0.0214 | 0.8872 |
| Error puro | 47.56 | 8 | 5.95 | | |
| Cor Total | 4107.96 | 15 | | | |

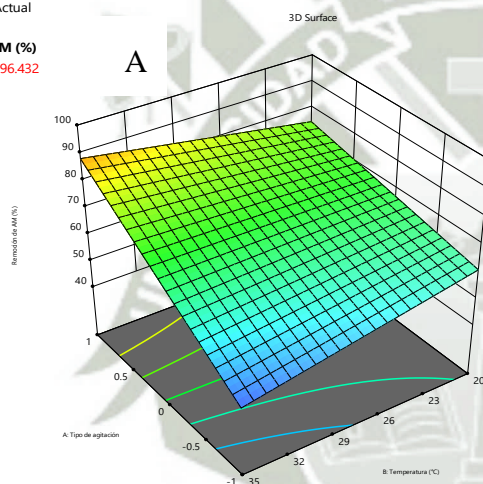
El valor F del modelo de 97,57 implica que el modelo es significativo. Solo hay un 0,01% de posibilidades de que se produzca un valor F tan grande debido al ruido. Los valores p inferiores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A, B, C, AB, AC, BC son términos modelo significativos. Los valores superiores a 0,1000 indican que los términos del modelo no son significativos. Si hay muchos términos de modelo insignificantes (sin contar los necesarios para admitir la jerarquía), la reducción del modelo puede mejorar el modelo.

Factor Coding: Actual

Remoción de AM (%)
42.504 96.432

X1 = A
X2 = B

Actual Factor
C = 4

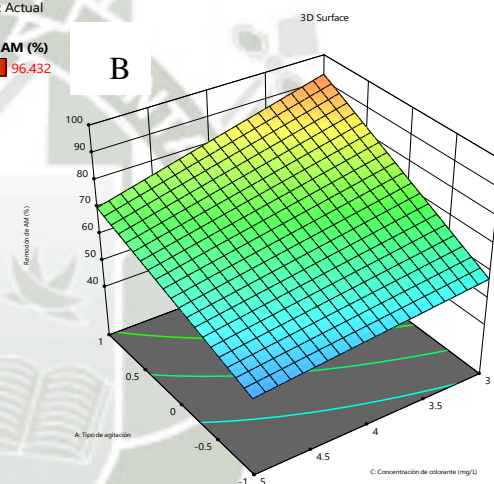


Factor Coding: Actual

Remoción de AM (%)
42.504 96.432

X1 = A
X2 = C

Actual Factor
B = 27.5



Factor Coding: Actual

Remoción de AM (%)
42.504 96.432

X1 = B
X2 = C

Actual Factor
A = 0

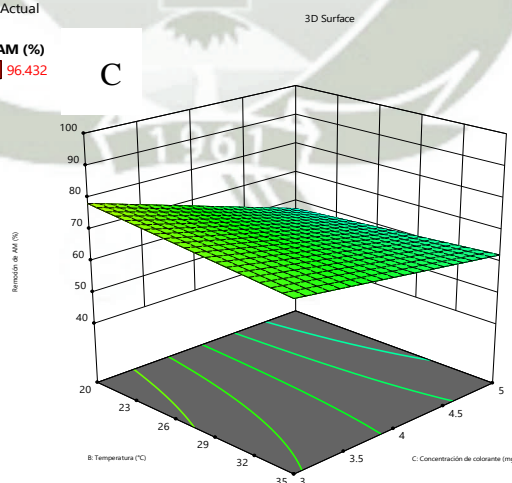


Figura 8. Gráficos de superficie de las interacción de los factores (A) Tipo de agitación y temperatura, (B) Tipo de agitación y concentración de colorante AM, (C) temperatura y concentración de colorante.

Usando los gráficos de superficie (Figura 8), se representan los efectos de los factores independientes (Tipo de agitación, neumática (+1) y orbital (-1), temperatura y concentración de colorante) y su interacción en la decoloración de AM, se puede predecir la respuesta y se pueden determinar los valores óptimos de decoloración. Los gráficos de superficie (Figura 8 A-C), muestran la decoloración de AM en función de dos factores, se puede apreciar una clara mejora en la decoloración al utilizar la agitación neumática, la cual provee una correcta homogenización e intercambio gaseoso (Krishna Moorthy et al., 2021), también se puede observar que con bajas concentraciones de colorante se puede tener una mejor remoción superando valores de 90 %, esto es muy lógico debido a la toxicidad del colorante a mayores concentraciones (de Souza Kirnev et al., 2022), finalmente se puede apreciar que existe una ligera mejora en la remoción a 35 °C de temperatura del proceso, debido a que las microalgas como *C. vulgaris* acelera su metabolismo a temperaturas mayores a 30 °C (Ras et al., 2013).

Para optimizar la decoloración del AM, se usó diseño factorial completo 2^3 con tres factores (Tipo de agitación, concentración de colorante y Temperatura), los niveles de los factores se pueden apreciar en la Tabla 7. Utilizando los datos experimentales, se ajustó el modelo polinómico de segundo orden (codificado) a los resultados de decoloración el cual se presenta a continuación:

$$\begin{aligned} \% R. AM = & 64.6635 + 11.754625A - 2.24425B - 7.929875C + 5.904875AB \\ & - 3.26325AC + 1.469625BC + 0.089250000000002ABC \end{aligned}$$

Para la optimización se tomó como criterios la minimización de la temperatura de trabajo, la maximización de la concentración de colorante y se mantuvo la agitación neumática (+1) que fue la mejor y requiere menos gasto energético.

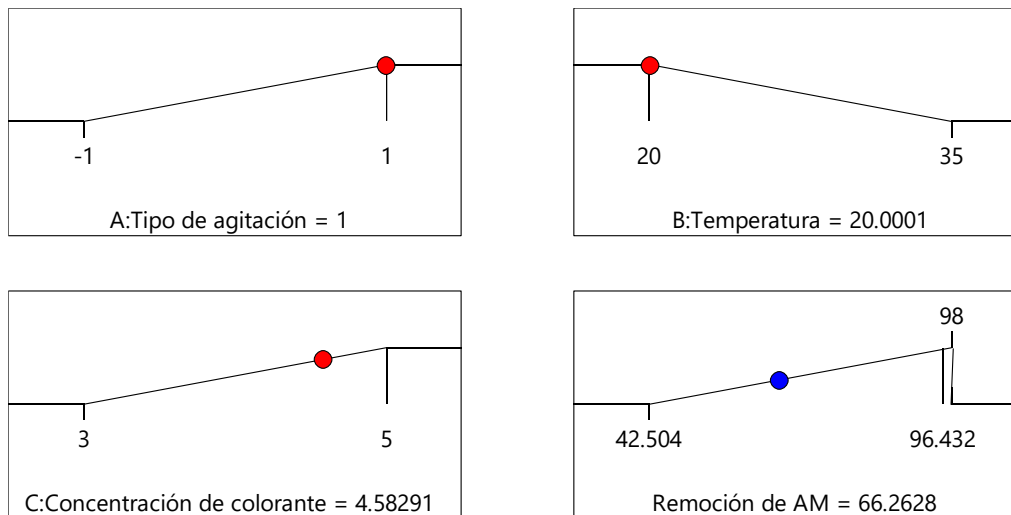


Figura 9. Rampas de optimización para la remoción de AM.

Como se observa en la Figura 8, la optimización numérica realizada en el software Design Expert 13 ® indica que se puede lograr un 66,26 % de remoción, llevando a cabo el experimento a 20 °C y con una concentración inicial de 4,58 mg/L de AM, manteniendo una agitación neumática con una deseabilidad de 0,763, un valor aceptable (Jaafari & Yaghmaeian, 2019). La importancia del valor de 66, 26% con las condiciones ante mencionadas es que se ha logrado la optimización del proceso utilizando una significativa menor cantidad de energía (Gottipati & Mishra, 2010).

4.3.1. Optimización de la decoloración de RC.

Se ejecutó el diseño experimental, y los resultados se presentan en la Tabla 10, el procesamiento estadístico nos indica que hubo un correcto ajuste entre los datos experimentales y los datos del modelo matemático.

Tabla 10. Resultados del diseño experimental 2³ RC.

| Corrida | Factor 1 A:Tipo de agitación | Factor 2 B:Temperatura | Factor 3 C:Concentración de colorante | Respuesta Remoción de RC |
|---------|---------------------------------|---------------------------|--|-----------------------------|
| | - | °C | mg/L | % |
| 1 | Neumática | 35 | 4 | 78.322 |
| 2 | Neumática | 20 | 4 | 67.323 |
| 3 | Neumática | 20 | 2 | 68.545 |
| 4 | Orbital | 20 | 2 | 65.651 |
| 5 | Orbital | 35 | 2 | 64.782 |
| 6 | Orbital | 20 | 4 | 53.564 |

| | | | | |
|----|-----------|----|---|--------|
| 7 | Orbital | 35 | 4 | 63.432 |
| 8 | Orbital | 20 | 2 | 59.763 |
| 9 | Neumática | 35 | 2 | 86.654 |
| 10 | Orbital | 20 | 4 | 52.456 |
| 11 | Neumática | 20 | 2 | 75.781 |
| 12 | Neumática | 20 | 4 | 79.766 |
| 13 | Orbital | 35 | 4 | 62.612 |
| 14 | Orbital | 35 | 2 | 65.763 |
| 15 | Neumática | 35 | 2 | 85.454 |
| 16 | Neumática | 35 | 4 | 74.576 |

El análisis de varianza ejecutado para el modelo indica que hay un buen nivel de ajuste, obteniendo un valor p menor a 0,05, lo cual se interpreta como significativo, asimismo todos los factores evaluados son significativos, ya que poseen un valor p, menor a 0.05, sin embargo solo el factor tipo de agitación es significativo para la variable de respuesta ya que supera el límite de Bonferroni, eso se puede ver en la Figura 18 donde se observa que los efectos estandarizados para el factor de tipo de agitación supera el límite de Bonferroni lo cual indica que es sumamente relevantes para la variable de respuesta, temperatura y concentración de colorante superan el límite de valor p, lo que indica que son significativos (Azari et al., 2019).

Tabla 11. ANOVA para el modelo factorial 2³ RC.

| Fuente | Suma de cuadrados | df | Cuadrado medio | Valor F | Valor p | |
|-------------------------------------|-------------------|----|----------------|---------|----------|---------------|
| Modelo | 1443.91 | 7 | 206.27 | 12.69 | 0.0009 | Significativo |
| A-Tipo de agitación | 1030.54 | 1 | 1030.54 | 63.39 | < 0.0001 | |
| B-Temperatura | 215.62 | 1 | 215.62 | 13.26 | 0.0066 | |
| C-Concentración de colorante | 101.80 | 1 | 101.80 | 6.26 | 0.0368 | |
| AB | 4.44 | 1 | 4.44 | 0.2733 | 0.6153 | |
| AC | 3.48 | 1 | 3.48 | 0.2138 | 0.6561 | |
| BC | 3.13 | 1 | 3.13 | 0.1924 | 0.6725 | |
| ABC | 84.91 | 1 | 84.91 | 5.22 | 0.0516 | |

| | | | | | |
|-------------------|---------|----|--------|---|---|
| Error puro | 130.06 | 8 | 16.26 | - | - |
| Cor Total | 1573.97 | 15 | 206.27 | - | - |

El valor F del modelo de 12,69 implica que el modelo es significativo. Solo hay un 0,01% de posibilidades de que se produzca un valor F tan grande debido al ruido. Los valores p inferiores a 0,05 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A, B, C, son términos modelo significativos. Los valores superiores a 0,1000 indican que los términos del modelo no son significativos, las interacción dobles y triples no son significativas.

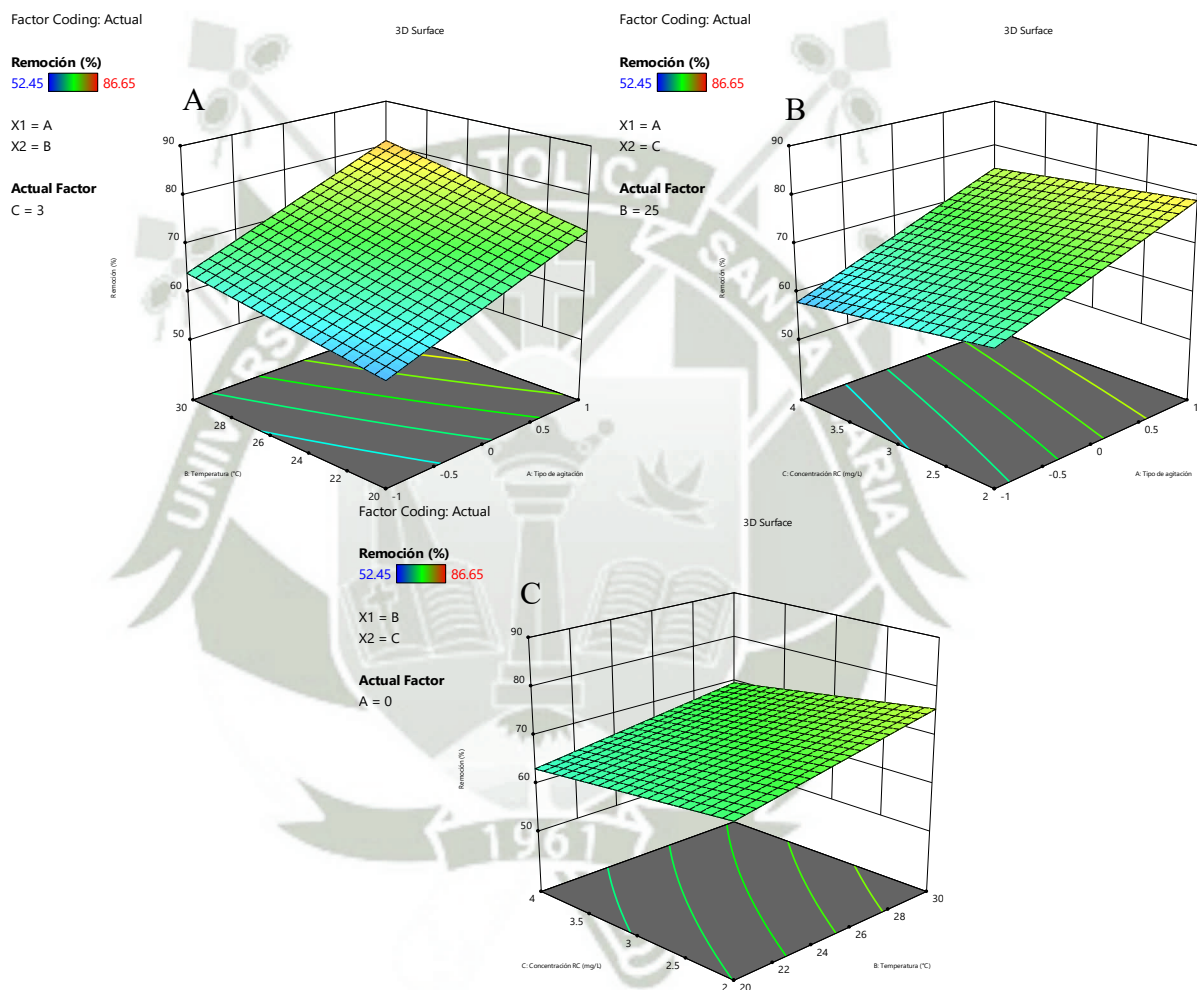


Figura 10. Gráficos de superficie de las interacciones de los factores (A) Tipo de agitación y temperatura, (B) Tipo de agitación y concentración de colorante RC, (C) temperatura y concentración de colorante.

Usando los gráficos de superficie (Figura 10), se representan los efectos de los factores independientes (Tipo de agitación, temperatura y concentración de colorante) y su interacción en la decoloración de RC, se puede predecir la respuesta y se pueden determinar los valores

óptimos de decoloración. Los gráficos de superficie (Figura 10 A-C), muestran la decoloración de RC en función de dos factores, se puede apreciar una clara mejora en la decoloración al utilizar la agitación neumática, la cual provee una correcta homogenización e intercambio gaseoso (Krishna Moorthy et al., 2021), también se puede observar que con bajas concentraciones de colorante se puede tener una mejor remoción superando valores de 86 %, esto es muy lógico debido a la toxicidad del colorante a mayores concentraciones (de Souza Kirnev et al., 2022), finalmente se puede apreciar que existe una ligera mejora en la remoción a 35 °C de temperatura del proceso, debido a que las microalgas como *C. vulgaris* acelera su metabolismo a temperaturas mayores a 30 °C (Hernández-Zamora et al., 2014b; Ras et al., 2013).

Para optimizar la decoloración del RC, se usó diseño factorial completo 2^3 con tres factores (Tipo de agitación, concentración de colorante y Temperatura), los niveles de los factores se pueden apreciar en la Tabla 10. Utilizando los datos experimentales, se ajustó el modelo polinómico de segundo orden (codificado) a los resultados de decoloración el cual se presenta a continuación:

$$\%R.RC = 69.0245 + 8.0255A + 3.671B - 2.522375C + 0.527AB + 0.466125AC - 0.442125BC - 2.303625ABC$$

Para la optimización se tomó como criterios la minimización de la temperatura de trabajo, la maximización de la concentración de colorante y se mantuvo la agitación neumática (+1) que fue la mejor y requiere menos gasto energético.

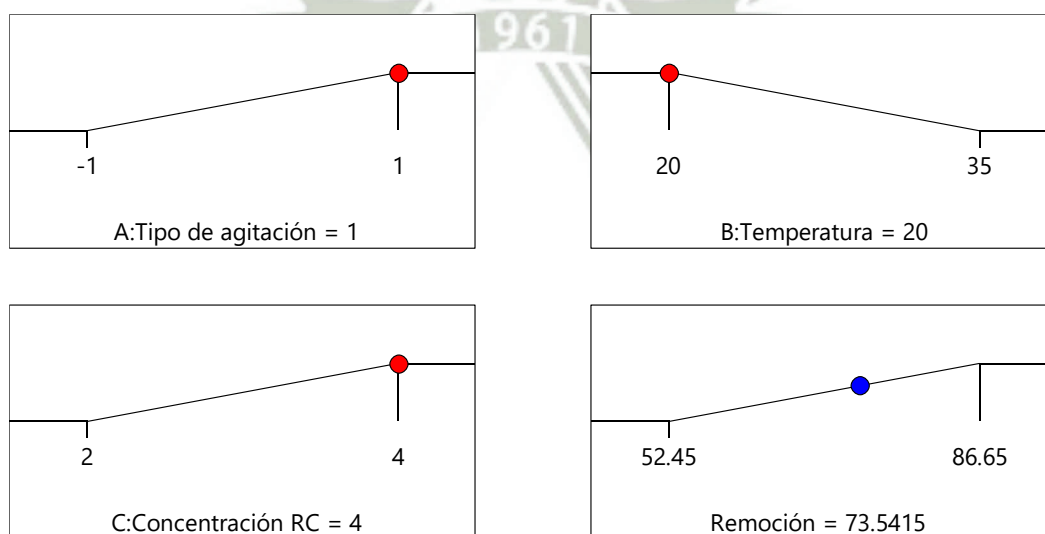


Figura 11. Rampas de optimización para la remoción de RC.

Como se observa en la Figura 11, la optimización numérica realizada en el software Design Expert 13 ® indica que se puede lograr un 73,54 % de remoción, llevando a cabo el experimento a 20 °C y con una concentración inicial de 4 mg/L de RC, manteniendo una agitación neumática con una deseabilidad de 0,1 un valor muy aceptable (Jaafari & Yaghmaeian, 2019). La importancia del valor de 73,54 % con las condiciones ante mencionadas es que se ha logrado la optimización del proceso utilizando una significativa menor cantidad de energía (Gottipati & Mishra, 2010).

4.4. Evaluación de la remoción de azul de metileno y rojo Congo utilizando biomasa inactiva de *Chlorella vulgaris*.

4.4.1. Capacidad de adsorción de AM y RC con biomasa inactiva de *C. vulgaris*.

Se ejecutó un experimento para determinar la capacidad de adsorción de AM por la biomasa de *C. vulgaris* los resultados indican que existe una concentración inicial de AM ideal para obtener la mayor capacidad de adsorción, los experimentos se ejecutaron en un volumen de 100 mL, a 150 RPM, por 45 minutos, con 1 gramo de biosorbente como indica la norma ASTM (ASTM, 2010).

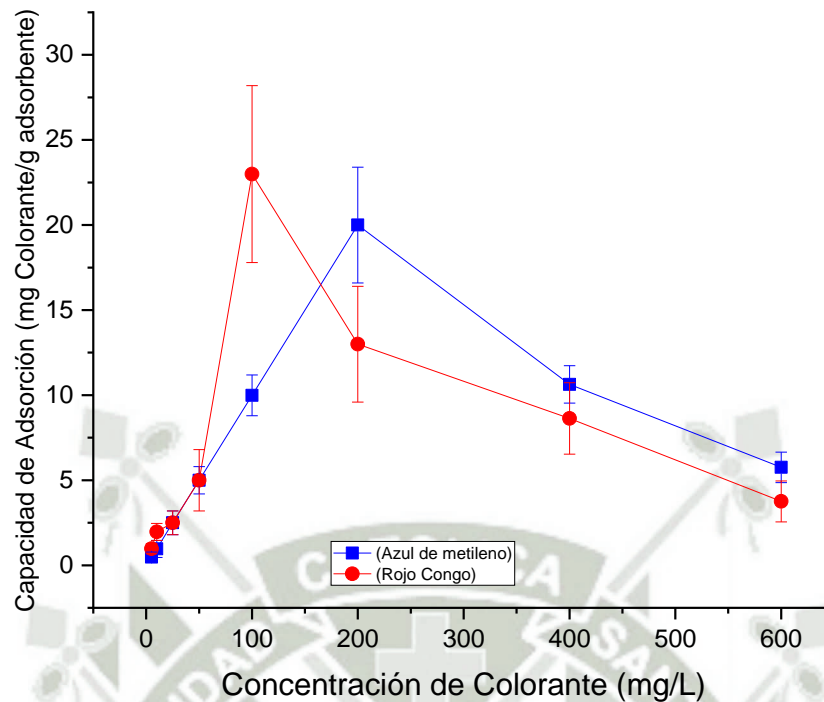


Figura 12. Capacidad de adsorción de AM y RC por *C. vulgaris* en función de la concentración inicial de colorante.

La capacidad de absorción de AM y RC se muestra en la Figura 12. Se encontró que la capacidad de adsorción de AM aumentó de $0,480 \pm 0,33$ mg/g a $19,996 \pm 3,45$ mg/g cuando la concentración inicial de AM se incrementaba de 5 a 200 mg/L. Luego, la capacidad de remoción de AM se redujo a $8,629 \pm 1,13$ mg/g cuando la concentración inicial de tinte aumentó aún más a 300 mg/L.

La frecuencia de colisión entre la molécula de tinte y la biomasa de células de microalga a una concentración inicial de tinte de 300 mg/L es mayor que a una concentración de tinte de 50 mg/L (Chin et al., 2020). Por lo tanto, se absorben con éxito más moléculas de tinte en la superficie celular; cuando la concentración inicial de tinte aumenta aún más a 600 mg/L, esta reducción en la capacidad de remoción de AM indicó que las células de microalgas han alcanzado un nivel óptimo para la adsorción. El aumento en la concentración inicial de colorante conduce a la plenitud que ocupan los grupos funcionales de la superficie de las microalgas. Además, las células que estaban completamente cubiertas por una capa de tinte tienden a rechazar las moléculas libres de azul de metileno (Saeidi et al., 2017). Por lo tanto, la

capacidad de adsorción de tinte disminuye cuando la concentración inicial de tinte es superior a 200 mg/L.

Se pudo observar que la capacidad de adsorción de RC aumentó de $0,980 \pm 0,321$ mg/g a $22,99 \pm 5,22$ mg/g cuando la concentración inicial de RC se incrementaba de 5 a 100mg/L. Luego, la capacidad de remoción de RC se redujo a $12,99 \pm 3,43$ mg/g cuando la concentración inicial de tinte aumentó aún más a 200 mg/L.

La concentración inicial de colorantes se puede correlacionar con la capacidad de adsorción de un adsorbente. En general, el porcentaje de eliminación disminuye con el aumento de la concentración inicial si el sitio activo en la superficie del adsorbente está saturado, mientras que el porcentaje de eliminación aumenta con el aumento de la concentración inicial de colorante si el sitio activo está insaturado, donde la alta concentración de tinte proporcionará una gran fuerza impulsora de transferencia de masa hacia la adsorción (Yu et al., 2021). La adsorción de tintes catiónicos y aniónicos se ha demostrado utilizando biocarbón de microalgas torrefactado en húmedo con un enfoque del sorbente derivado de residuos y de bajo costo. Yu et al. Elaboraron un biocarbón de microalgas torrefactado en húmedo, logrando un alto rendimiento en la adsorción de AM y RC con capacidades máximas de adsorción de 113,00 mg/g y 164,35 mg/g respectivamente, es notoria las cantidades de capacidad de adsorción, sin embargo es rescatable que las capacidades de adsorción obtenidas en el presente estudio (19,99 y 22,98 mg/g de AM y RC respectivamente) fueron con un biosorbente a partir de biomasa microalgal, sin uso de temperaturas altas de pirolisis u otros tipos de activación que requieren altos costos, entonces considerando el bajo costo del bioadsorbente su eficiencia es alta.

4.4.2. Optimización de la remoción de RC utilizando un diseño experimental de Box Behnken.

Debido a que, en el anterior ensayo, el adsorbente a base de biomasa seca de *C. vulgaris* mostró mayor afinidad por el RC, se procedió a realizar una optimización de este proceso. Para lo cual se utilizó un diseño experimental de Box Behnken el cual se presenta en la Tabla 12.

Tabla 12. Matriz experimental de Box Behnken para la optimización de remoción de AM con biomasa de *C. vulgaris*.

| Corrida | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Respuesta |
|---------|---------------------------------|--------------------------------------|---------------------------|---------------|
| | A:Velocidad de agitación RPM | B:Concentración de Colorante mg/L | C:Masa de adsorbente g | Remoción % |
| 1 | 200 | 15 | 0.75 | 66.67 |
| 2 | 150 | 5 | 0.75 | 69.76 |
| 3 | 150 | 25 | 1.25 | 87.66 |
| 4 | 200 | 5 | 1 | 59.77 |
| 5 | 150 | 15 | 1 | 87.32 |
| 6 | 150 | 5 | 1.25 | 81.54 |
| 7 | 100 | 5 | 1 | 56.77 |
| 8 | 150 | 25 | 0.75 | 79.43 |
| 9 | 100 | 15 | 0.75 | 53.44 |
| 10 | 100 | 25 | 1 | 54.55 |
| 11 | 150 | 15 | 1 | 87.65 |
| 12 | 150 | 15 | 1 | 88.41 |
| 13 | 200 | 25 | 1 | 79.65 |
| 14 | 200 | 15 | 1.25 | 74.44 |
| 15 | 150 | 15 | 1 | 84.77 |
| 16 | 100 | 15 | 1.25 | 58.42 |

Luego de realizar el análisis en el software Design Expert 12 ® se obtuvo que el modelo es significativo y la falta de ajuste es no significativa, los resultados se muestran en la Tabla 13. El valor F del modelo de 117,27 implica que el modelo es significativo. Solo hay un 0,01% de posibilidades de que se produzca un valor F tan grande debido al ruido. Los valores p inferiores a 0,0500 indican que los términos del modelo son significativos. En este caso, A, B, C, AB, A², B², C² son términos modelo significativos. Los valores superiores a 0,1000 indican que los términos del modelo no son significativos. El valor F de la falta de ajuste de 0,96 implica que la falta de ajuste no es significativa en relación con el error puro. Hay un 51,26% de posibilidades de que se produzca una falta de ajuste de un valor F tan grande debido al ruido. La falta de ajuste no significativa es buena, queremos que el modelo encaje.

Tabla 13. ANOVA del diseño experimental Box Behnken para la optimización de la remoción de RC con biomasa seca de microalga.

| Fuente | Suma de cuadrados | Df | Cuadrado medio | Valor F | Valor p | |
|-------------------------------------|-------------------|----|----------------|---------|----------|---------------------|
| Modelo | 2580.77 | 9 | 286.75 | 117.27 | < 0,0001 | significativo |
| A-Velocidad de agitación | 411.13 | 1 | 411.13 | 168.14 | < 0,0001 | |
| B-Concentración de Colorante | 139.86 | 1 | 139.86 | 57.20 | 0.0003 | |
| C-Masa de adsorbente | 134.15 | 1 | 134.15 | 54.86 | 0.0003 | |
| AB | 122.10 | 1 | 122.10 | 49.94 | 0.0004 | |
| Corriente alterna | 1.95 | 1 | 1.95 | 0.7959 | 0.4067 | |
| A.C | 3.15 | 1 | 3.15 | 1.29 | 0.2996 | |
| A² | 1657.10 | 1 | 1657.10 | 677.70 | < 0,0001 | |
| B² | 63.96 | 1 | 63.96 | 26.16 | 0.0022 | |
| C² | 47.37 | 1 | 47.37 | 19.37 | 0.0046 | |
| Residual | 14.67 | 6 | 2.45 | | | |
| Falta de ajuste | 7.19 | 3 | 2.40 | 0.9613 | 0.5126 | No es significativo |
| Error puro | 7.48 | 3 | 2.49 | | | |
| Cor Total | 2595.44 | 15 | | | | |

Se obtuvo un modelo cuadrático, el cual representa la adsorción de RC con la biomasa seca de *C. vulgaris*, el modelo tuvo un correcto ajuste mostrando un R^2 de 0.9943, la ecuación final en términos de factores codificados se presenta a continuación:

$$\%R.RC = 87.0375 + 7.16875A + 4.18125B + 4.095C + 5.525AB + 0.6975AC - 0.8875BC - 20.35375A^2 - 3.99875B^2 - 3.44125C^2$$

La ecuación en términos de factores codificados se puede utilizar para hacer predicciones sobre la respuesta para niveles dados de cada factor. De forma predeterminada, los niveles altos de los factores se codifican como +1 y los niveles bajos se codifican como -1. La ecuación codificada es útil para identificar el impacto relativo de los factores mediante la comparación de los coeficientes de los factores.

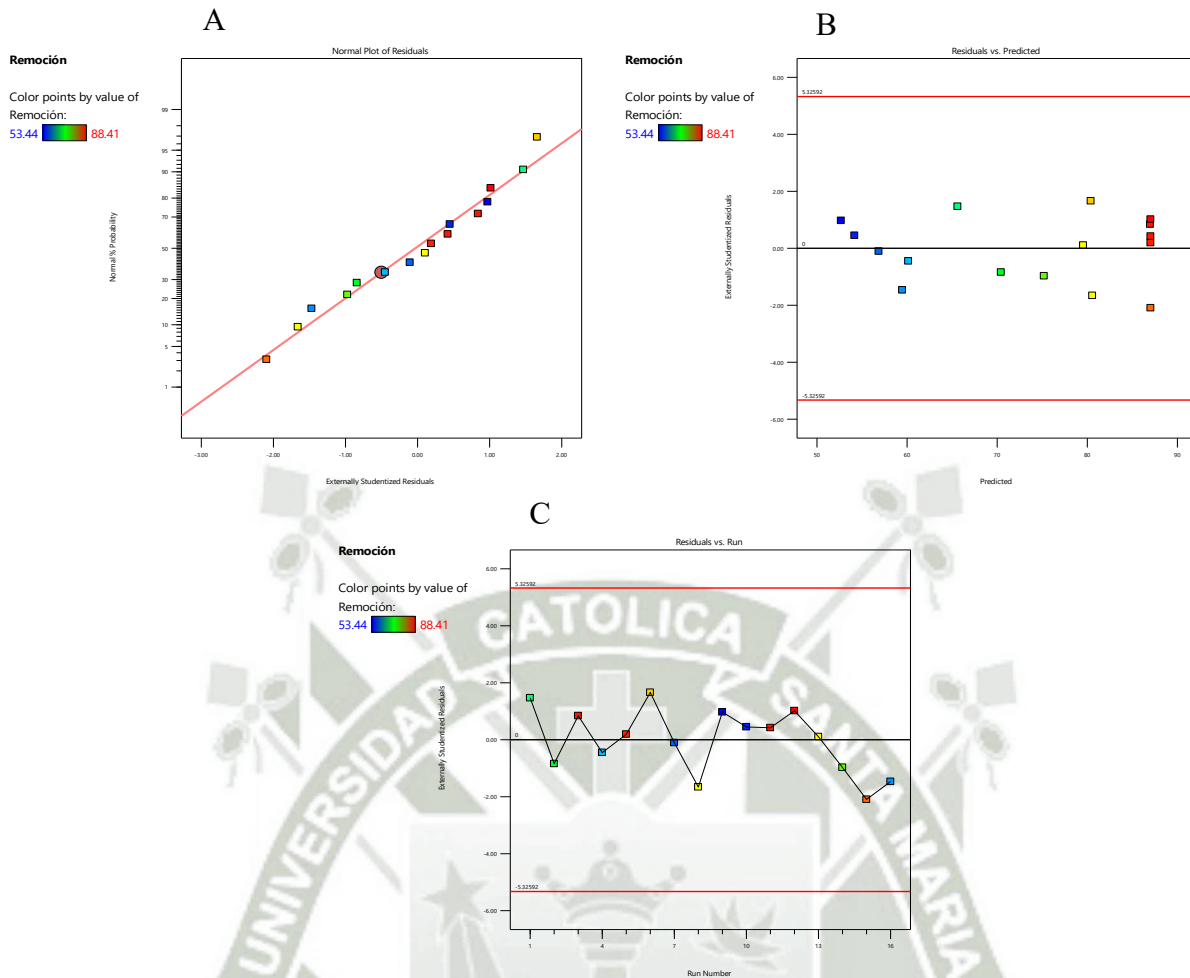


Figura 13. Validación de supuestos estadísticos del modelo ajustado. (A) normalidad, (B) homocedasticidad y (C) independencia.

La validación del modelo experimental requiere la verificación de supuestos estadísticos (normalidad, igual varianza e independencia) (Haddaji et al., 2022). En la Figura 13 A se muestra el gráfico residual utilizado para comprobar los supuestos del modelo ajustado en cuanto a remoción de RC. La suposición de normalidad de los modelos es correcta si la gráfica de residuos se asemeja mucho a una línea recta (Antony, 2023). De acuerdo con la Figura 13 A los puntos de datos de la respuesta Y1 estaban razonablemente cerca de la línea recta. Sin embargo, aparece un ligero sesgo en los valores extremos. El gráfico Residual Vs Predicho se puede utilizar para ver si la varianza se distribuye habitualmente (Park et al., 2018) . Como se muestra en las Figura 13 B, los residuos del modelo corresponden a nubes de puntos completamente dispersas sin estructura ni forma particular a lo largo del eje de ordenadas, lo cual confirma el cumplimiento del supuesto de homocedasticidad. E grafico de residuos frente a orden se ilustran en la Figura 13 C; el propósito de estos gráficos es verificar la suposición

de que los residuos son independientes entre sí. Si los puntos están cerca uno del otro, los residuos pueden estar correlacionados y, por lo tanto, no es independiente. Idealmente, los residuos en la parcela deberían caer al azar alrededor de la línea central (Park et al., 2018). En la Figura 13 C se observa que los residuos se distribuyen irregularmente, independientemente del orden experimental; por lo tanto, no se viola el supuesto de independencia (Haddaji et al., 2022).

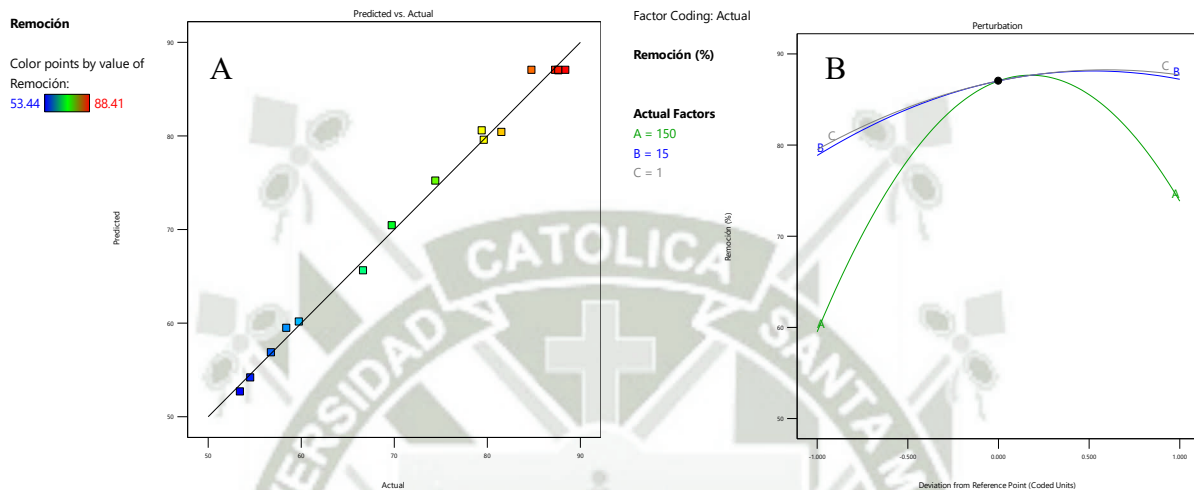


Figura 14. (A) Gráfico de respuestas predichas frente a respuestas reales del modelo. (B) perturbación del % de remoción de RC frente a la desviación del punto de referencia.

En la Figura 14 A se ilustra el gráfico de la respuesta experimental real (% de remoción de RC) frente a la respuesta predicha por el modelo. Los puntos de datos en el gráfico se adhieren estrechamente a la línea lineal, lo que indica que el rango experimental estudiado fue explicado adecuadamente por el modelo de superficie de respuesta con el diseño experimental de Box - Behnken. La Figura 14 C ilustra la sensibilidad y la interacción simultánea de todas las variables independientes sobre el % de remoción de RC. El factor A, velocidad de agitación fue el más pronunciado, lo que indica la alta sensibilidad del % de remoción de RC a este parámetro. Las líneas relativamente planas de concentración de colorante (B) y masa de adsorbente (C) representaban la menor sensibilidad de la respuesta a estos parámetros. Este gráfico concuerda bien con los hallazgos de ANOVA en los que se determinó que A es un factores cruciales en la remoción de RC por el biosorbente (Tee et al., 2022).

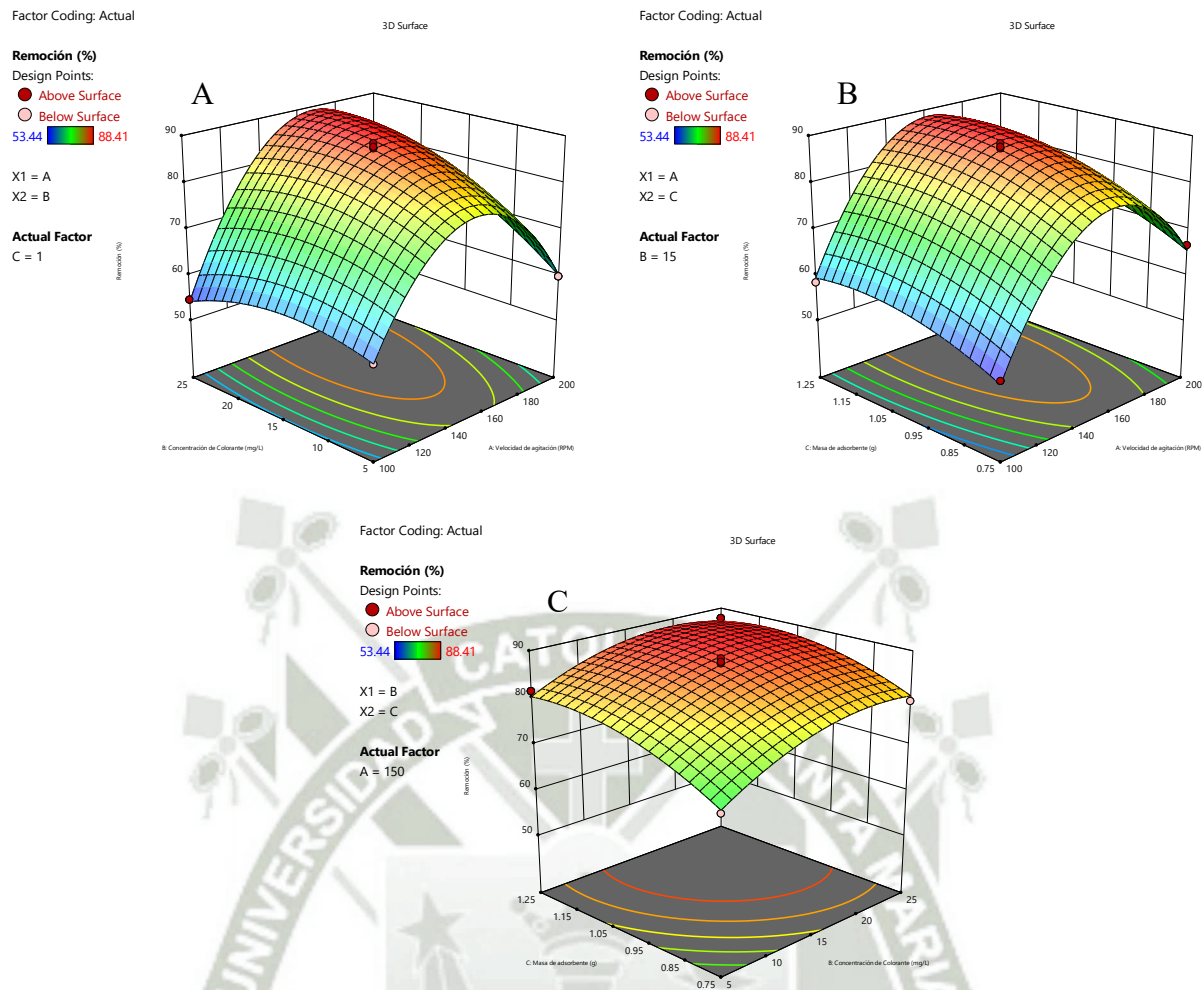


Figura 15. Gráficos de respuesta superficial 3D de (A) AB, (B) AC y (C) BC.

La (A) representa la interacciones entre los factores velocidad de agitación y concentración de colorante, donde se observa una tendencia de mayor eficiencia de remoción en condiciones muy cercanas al punto central (150 RPM), este comportamiento se debe a que una velocidad de agitación adecuada promueve la adsorción, ya que al ser muy violenta se puede evitar que el adsorbato se una al adsorbente (Tee et al., 2022). En la (B) se observa la interacción entre la masa del adsorbente y la velocidad de agitación, donde nuevamente vemos que este parámetro es crucial para la remoción del RC manteniendo valores altos de remoción en la zona cercana al punto central, la dosis de adsorbente al parecer no tiene mucha relevancia en el proceso, esto no significa que se puede llevar a cabo la adsorción con cantidades mínimas, lo que nos da a entender la gráfica es que no serviría de mucho aumentar la dosis de adsorbente ya que con la cantidad usada es suficiente, esto se asemeja mucho a lo reportado por Oulakhir et al. (2023), quien utilizó 1 gramo de biomasa de pericarpio de quinua para remover colorantes catiónicos.

Para la optimización se consideró que se debía mantener la masa de adsorbente en 1 g y la velocidad de agitación en 150 RPM, la concentración de colorante a remover se maximizó y la variable de respuesta también se maximizó.

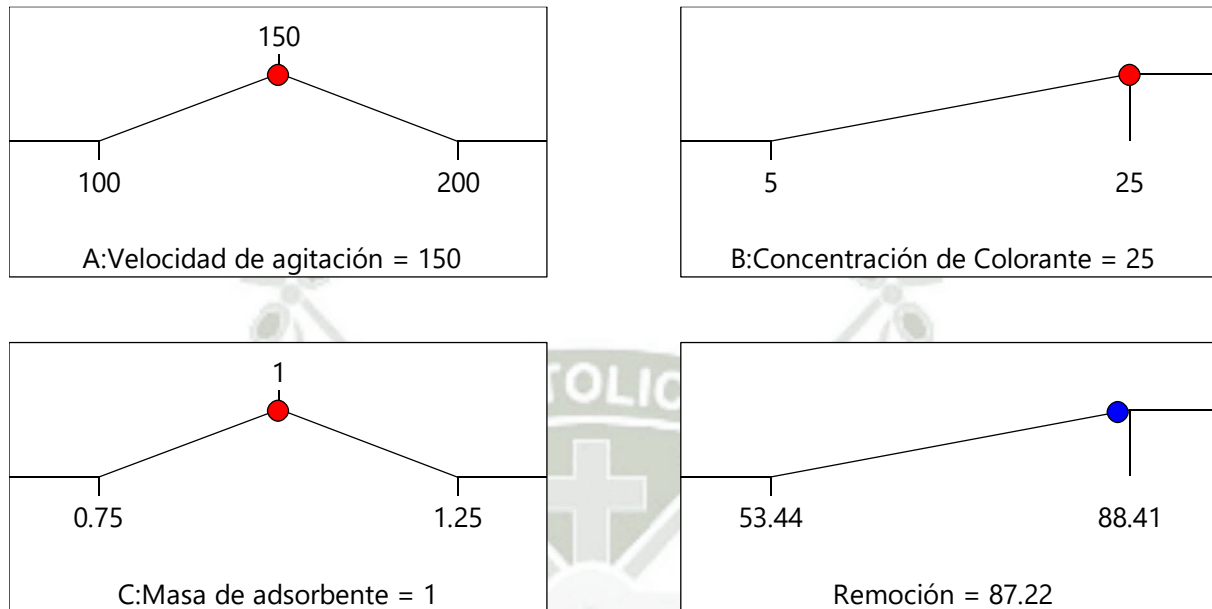


Figura 16. Rampas de optimización para la remoción de RC con biomasa seca de *C. vulgaris*.

Los resultados de optimización dieron un valor teórico de 87.22 % de remoción de colorante RC en un concentración de 25 mg/L, tal como se observa en la Figura 16, esta remoción no fue observada en la matriz experimental inicial con esta combinación de niveles de los factores. La función de deseabilidad de RSM se utilizó en la optimización de la remoción de RC del presente estudio, identifica mejor combinación de ajustes de factores que optimizan la respuesta deseable a partir del objetivo deseado y el rango establecido para cada factor y respuesta. Se predijo una deseabilidad y % de remoción de 87.22 % relativamente alto en los parámetros optimizados de dosis de adsorbente de 1 g, concentración inicial de 25 mg/L y velocidad de agitación de 150 RPM. Para la validación de los resultados de optimización, se llevaron a cabo experimentos de laboratorio por triplicado en las condiciones indicadas. Se determinó que el % de remoción experimental de 86.97 % alcanzado en estas condiciones concordaba bien con la respuesta óptima prevista (87.22 %), con una mera diferencia del 0,28%. Este hallazgo confirma la alta precisión del modelo matemático desarrollado (Tee et al., 2022).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

PRIMERA: Se logró determinar los parámetros de crecimiento de *C. vulgaris*, utilizando el medio de cultivo BBM, y dos tipos de agitación, neumática y orbital; se determinó que la velocidad de crecimiento específica no tuvo diferencias significativas entre los dos tipos de agitación empleados.

SEGUNDA: Tanto el azul de metileno como el rojo congo, presentaron inhibición en el crecimiento normal de *C. vulgaris*, sin embargo, el que tuvo mayor efecto inhibitorio fue el azul de metileno, a pesar de los efectos inhibitorios la tasa de crecimiento no se bio afectada y la generación de biomasa fue menor, pero aceptable para continuar con experimentos de optimización.

TERCERA: Se optimizó la remoción de azul de metileno y rojo congo, teniendo los mejores resultados en rojo congo, alcanzando un porcentaje de 91 % de remoción utilizando temperatura ambiente, agitación neumática y la más alta concentración de rojo congo, para azul de metileno no se logró alcanzar una alta remoción, sin embargo, se podrían estudiar otras variables.

CUARTA: La remoción de colorantes con biomasa inactiva, fue muy exitosa alcanzando porcentajes de remoción alrededor del 87 % para rojo congo, en la optimización se mantuvo la dosis de adsorbente en 1 g, la velocidad de agitación en 150 RPM, la concentración de RC se maximizó a 25 mg/L y se maximizó el % de remoción. La remoción experimental llegó al 86.97 % alcanzada en estas condiciones y concuerda bien con la respuesta óptima prevista (87.22 %), con una mera diferencia del 0,28%.

RECOMENDACIONES

- Se recomendaría utilizar otros medios de cultivo en lugar de BBM para que sean la base de estudios de biodecoloración de colorantes, así mismo se podría plantear otros tipos de agitación, como la mecánica.
- Además del efecto inhibitorio en los parámetros de crecimiento de *C. vulgaris*, sería de gran importancia evaluar los efectos citotóxicos, fotosintéticos y efectos en la producción de exopolisacáridos y lípidos, que influyen mucho en la capacidad de biodecoloración y bioadsorción de *C. vulgaris*.
- Se podría optimizar mucho más la remoción de azul de metileno, utilizando otras condiciones de cultivo o quizás algún consorcio microalgal que pueda trabajar en presencia de altas concentraciones de colorantes. Además, es recomendable evaluar el comportamiento de *C. vulgaris* en la biodecoloración a diferentes longitudes de onda de luz emitida.
- Se deben realizar estudios económicos para el escalamiento tecnológico de los bioadsorbentes ya que estos pueden tener un gran desempeño a nivel de laboratorio, pero en procesos industriales se ven afectados por falta de viabilidad económica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelghaffara, R. A., El-Mekawib, S. A., Abdelghaffara, F., & El-Eninb, S. A. A. (2021). Integrated utilization of *Chlorella vulgaris* as biofuel and dye biosorbent. *DESALINATION AND WATER TREATMENT*, *235*, 241–250.
- Abo-State, M. A. M., Saleh, Y. E., & Hazaa, H. A. (2017). Decolorization of Congo Red dye by bacterial isolates. *J. Ecol. Health Environ.*, *5*, 41–48.
- Adinew, B. (2012). Textile effluent treatment and decolorization techniques—a review. *Bulgarian Journal of Science Education*, *21*(3), 434–456.
- Adochite, C., & Andronic, L. (2020). Aquatic toxicity of photocatalyst nanoparticles to green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Water*, *13*(1), 77.
- Ahmad, R., & Ansari, K. (2021). Comparative study for adsorption of congo red and methylene blue dye on chitosan modified hybrid nanocomposite. *Process Biochemistry*, *108*, 90–102.
- Ali, H. (2010). Biodegradation of synthetic dyes - A review. In *Water, Air, and Soil Pollution* (Vol. 213, Issues 1–4, pp. 251–273). <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0382-4>
- Ali, H. M., Shehata, S. F., & Ramadan, K. M. A. (2016). Microbial decolorization and degradation of crystal violet dye by *Aspergillus niger*. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *13*, 2917–2926.
- Antony, J. (2023). Fundamentals of design of experiments. In *Design of Experiments for Engineers and Scientists* (pp. 7–18). <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-15173-6.00010-x>
- Arteaga, L. C., Zavaleta, M. P., Eustaquio, W. M., & Bobadilla, J. M. (2018). Removal of aniline blue dye using live microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Energy & Environmental Sciences*, *2*(1), 6–12.
- Asiandu, A. P., & Wahyudi, A. (2021). Phycoremediation: heavy metals green-removal by microalgae and its application in biofuel production. *Journal of Environmental Treatment Techniques*, *9*(3), 647–656.

- ASTM. (2010). American Society for Testing Materials - ASTM D2862: Standard Test Method for Particle Size Distribution of Granular Activated Carbon. *ASTM Standards*, *i*, 6. <https://doi.org/10.1520/D2862-10.2>
- Azanaw, A., Birlie, B., Teshome, B., & Jemberie, M. (2022). Textile effluent treatment methods and eco-friendly resolution of textile wastewater. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 100230.
- Azari, A., Noorisepehr, M., Dehghanifard, E., Karimyan, K., Hashemi, S. Y., Kalhori, E. M., Norouzi, R., Agarwal, S., & Gupta, V. K. (2019). Experimental design, modeling and mechanism of cationic dyes biosorption on to magnetic chitosan-lutaraldehyde composite. *International Journal of Biological Macromolecules*, *131*, 633–645. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.058>
- Baldiris Navarro, I., Pérez Suárez, J. M., Cafiel Correa, A., Fajardo Cuadro, J., Correa Turizo, R., & Castro Angulo, I. (2022). Total Lipid Production of Microalgae *Chlorella* sp. and *Chlorella Vulgaris* under Mixotrophic Culture Conditions. *Teknos Revista Científica*, 22–30. <https://doi.org/10.25044/25392190.1024>
- Baysal, M., Bilge, K., Yılmaz, B., Papila, M., & Yürüm, Y. (2018). Preparation of high surface area activated carbon from waste-biomass of sunflower piths: Kinetics and equilibrium studies on the dye removal. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *6*(2), 1702–1713.
- Bekhit, F., Farag, S., & Attia, A. M. (2022). Characterization of Immobilized Magnetic Fe₃O₄ Nanoparticles on *Raoultella Ornithinolytica* sp. and Its Application for Azo Dye Removal. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *194*(12), 6068–6090.
- Bisschops, I., & Spanjers, H. (2003). Literature review on textile wastewater characterisation. *Environmental Technology*, *24*(11), 1399–1411.
- Çelekli, A., & Bozkurt, H. (2011). Bio-sorption of cadmium and nickel ions using *Spirulina platensis*: Kinetic and equilibrium studies. *Desalination*, *275*(1–3), 141–147.
- Chen, K.-C., Wu, J.-Y., Liou, D.-J., & Hwang, S.-C. J. (2003). Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology*, *101*(1), 57–68.

- Chequer, F. M. D., Oliveira, G. A. R. de, Ferraz, E. R. A., Cardoso, J. C., Zanoni, M. V. B., & Oliveira, D. P. de. (2013). Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. In M. Günay (Ed.), *Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing* (p. Ch. 6). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/53659>
- Chin, J. Y., Chng, L. M., Leong, S. S., Yeap, S. P., Yasin, N. H. M., & Toh, P. Y. (2020). Removal of synthetic Dye by *Chlorella vulgaris* microalgae as natural adsorbent. *Arabian Journal for Science and Engineering*, *45*, 7385–7395.
- Choudhury, A. K. R. (2017). Sustainable chemical technologies for textile production. *Sustainable Fibres and Textiles*, 267–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102041-8.00010-X>
- Coman, M. M., Oancea, A. M., Verdenelli, M. C., Cecchini, C., Bahrim, G. E., Orpianesi, C., Cresci, A., & Silvi, S. (2018). Polyphenol content and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial and prebiotic properties of red fruit extracts. *European Food Research and Technology*, *244*(4), 735–745. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2997-9>
- Cruz, E. D., Missau, J., Collinson, S. R., Tanabe, E. H., & Bertuol, D. A. (2023). Efficient removal of congo red dye using activated lychee peel biochar supported Ca-Cr layered double hydroxide. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, *20*, 100835. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.enmm.2023.100835>
- da Rosa, A. L. D., Carissimi, E., Dotto, G. L., Sander, H., & Feris, L. A. (2018a). Biosorption of rhodamine B dye from dyeing stones effluents using the green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Cleaner Production*, *198*, 1302–1310.
- da Rosa, A. L. D., Carissimi, E., Dotto, G. L., Sander, H., & Feris, L. A. (2018b). Biosorption of rhodamine B dye from dyeing stones effluents using the green microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Cleaner Production*, *198*, 1302–1310.
- de Souza Kirnev, P. C., de Souza Vandenberghe, L. P., Soccol, C. R., & de Carvalho, J. C. (2022). Mixing and agitation in photobioreactors. In *Innovations in Fermentation and Phytopharmaceutical Technologies* (pp. 13–35). Elsevier.
- Demey, H., Melkior, T., Chatroux, A., Attar, K., Thiery, S., Miller, H., Grateau, M., Sastre, A. M., & Marchand, M. (2019). Evaluation of torrefied poplar-biomass as a low-cost sorbent

- for lead and terbium removal from aqueous solutions and energy co-generation. *Chemical Engineering Journal*, 361, 839–852.
- Deng, L., Zeng, H., Shi, Z., Zhang, W., & Luo, J. (2018). Sodium dodecyl sulfate intercalated and acrylamide anchored layered double hydroxides: A multifunctional adsorbent for highly efficient removal of Congo red. *Journal of Colloid and Interface Science*, 521, 172–182.
- Dotto, G. L., Lima, E. C., & Pinto, L. A. A. (2012). Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: equilibrium isotherm and thermodynamic analysis. *Bioresource Technology*, 103(1), 123–130.
- Eisenberg, D., & Kauzmann, W. (2005). *The structure and properties of water*. OUP Oxford.
- Elgarahy, A. M., Elwakeel, K. Z., Mohammad, S. H., & Elshoubaky, G. A. (2021). A critical review of biosorption of dyes, heavy metals and metalloids from wastewater as an efficient and green process. In *Cleaner Engineering and Technology* (Vol. 4). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2021.100209>
- El-Sheekh, M., El Sabagh, S., Abou El-Souod, G., & Elbeltagy, A. (2019). Biosorption of cadmium from aqueous solution by free and immobilized dry biomass of *Chlorella vulgaris*. *International Journal of Environmental Research*, 13, 511–521.
- Fazal, T., Rehman, M. S. U., Javed, F., Akhtar, M., Mushtaq, A., Hafeez, A., Din, A. A., Iqbal, J., Rashid, N., & Rehman, F. (2021). Integrating bioremediation of textile wastewater with biodiesel production using microalgae (*Chlorella vulgaris*). *Chemosphere*, 281, 130758.
- Ferreira, W. H., Silva, L. G. A., Pereira, B. C. S., Gouvêa, R. F., & Andrade, C. T. (2020). Adsorption and visible-light photocatalytic performance of a graphene derivative for methylene blue degradation. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100373>
- Flores Alarcón, M. A. D., Revilla Pacheco, C., Garcia Bustos, K., Tejada Meza, K., Terán-Hilares, F., Pacheco Tanaka, D., Colina Andrade, G. J., & Terán-Hilares, R. (2022). Efficient Dye Removal from Real Textile Wastewater Using Orange Seed Powder as Suitable Bio-Adsorbent and Membrane Technology. *Water*, 14(24), 4104.

- Gottipati, R., & Mishra, S. (2010). Process optimization of adsorption of Cr(VI) on activated carbons prepared from plant precursors by a two-level full factorial design. *Chemical Engineering Journal*, 160(1), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.03.015>
- Guillén Zevallos, M. O., Pérez Murillo, V., Quispe Carrizales, T., Talavera Núñez, M. E., & Huamán Paredes, F. E. (2020). Tratamiento fisicoquímico de los efluentes del proceso de lavado de lana en una industria textil de Arequipa. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 86(4), 428–438.
- Haddaji, C., Ennaciri, K., Driouich, A., Digua, K., & Souabi, S. (2022). Optimization of the coagulation-flocculation process for vegetable oil refinery wastewater using a full factorial design. *Process Safety and Environmental Protection*, 160, 803–816. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.02.068>
- Hamous, H., Khenifi, A., Orts, F., Bonastre, J., & Cases, F. (2021). Carbon textiles electrodes modified with RGO and Pt nanoparticles used for electrochemical treatment of azo dye. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 887, 115154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.115154>
- Harja, M., Buema, G., & Bucur, D. (2022). Recent advances in removal of Congo Red dye by adsorption using an industrial waste. *Scientific Reports*, 12(1), 6087.
- Hasanbeigi, A., & Price, L. (2015). A technical review of emerging technologies for energy and water efficiency and pollution reduction in the textile industry. *Journal of Cleaner Production*, 95, 30–44. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2015.02.079>
- Hernández-Sancho, F., Lamizana-Diallo, B., Mateo-Sagasta, J., & Qadir, M. (2015). *Economic valuation of wastewater: the cost of action and the cost of no action*. United Nations Environment Programme (UNEP).
- Hernández-Zamora, M., Cristiani-Urbina, E., Martínez-Jerónimo, F., Perales-Vela, H. V., Ponce-Noyola, T., Montes-Horcasitas, M. del C., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2015). Bioremoval of the azo dye Congo Red by the microalga *Chlorella vulgaris*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 10811–10823.
- Hernández-Zamora, M., Perales-Vela, H. V., Flores-Ortíz, C. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2014a). Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to Congo red.

Ecotoxicology and Environmental Safety, 108, 72–77.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.030>

Hernández-Zamora, M., Perales-Vela, H. V., Flores-Ortíz, C. M., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2014b). Physiological and biochemical responses of *Chlorella vulgaris* to Congo red. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 72–77.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.05.030>

Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V, Mahamuni, N. M., & Pandit, A. B. (2016). A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches. *Journal of Environmental Management*, 182, 351–366.

Huarachi-Olivera, R., Dueñas-Gonza, A., Yapo-Pari, U., Vega, P., Romero-Ugarte, M., Tapia, J., Molina, L., Lazarte-Rivera, A., Pacheco-Salazar, D. G., & Esparza, M. (2018). Bioelectrogenesis with microbial fuel cells (MFCs) using the microalga *Chlorella vulgaris* and bacterial communities. *Electronic Journal of Biotechnology*, 31, 34–43.

Hurtado, J. (2005). *Cómo formular objetivos de investigación*. Madrid, España.

Husien, S., El-taweel, R. M., Salim, A. I., Fahim, I. S., Said, L. A., & Radwan, A. G. (2022). Review of activated carbon adsorbent material for textile dyes removal: Preparation, and modelling. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 100325.

Iaich, S., Miyah, Y., Elazhar, F., Lagdali, S., & El-Habacha, M. (2021). Low-cost ceramic microfiltration membranes made from Moroccan clay for domestic wastewater and Congo Red dye treatment. *DESALINATION AND WATER TREATMENT*, 235, 251–271.

Jaafari, J., & Yaghmaeian, K. (2019). Optimization of heavy metal biosorption onto freshwater algae (*Chlorella coloniales*) using response surface methodology (RSM). *Chemosphere*, 217, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.205>

Jasni, J., Arisht, S. N., Mohd Yasin, N. H., Abdul, P. M., Lin, S. K., Liu, C. M., Wu, S. Y., Jahim, J. M., & Takriff, M. S. (2020). Comparative toxicity effect of organic and inorganic substances in palm oil mill effluent (POME) using native microalgae species. *Journal of Water Process Engineering*, 34, 101165. <https://doi.org/10.1016/J.JWPE.2020.101165>

Kaushik, P., & Malik, A. (2009). *Microbial decolourization of textile dyes through isolates obtained from contaminated sites*.

- Khan, A. A., Gul, J., Naqvi, S. R., Ali, I., Farooq, W., Liaqat, R., AlMohamadi, H., Štěpanec, L., & Juchelková, D. (2022). Recent progress in microalgae-derived biochar for the treatment of textile industry wastewater. *Chemosphere*, 135565.
- Kofidis, T., Strüber, M., Wilhelmi, M., Anssar, M., Simon, A., Harringer, W., & Haverich, A. (2001). Reversal of severe vasoplegia with single-dose methylene blue after heart transplantation. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 122(4), 823–824. <https://doi.org/10.1067/mtc.2001.115153>
- Krishna Moorthy, A., Govindarajan Rathi, B., Shukla, S. P., Kumar, K., & Shree Bharti, V. (2021). Acute toxicity of textile dye Methylene blue on growth and metabolism of selected freshwater microalgae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 82. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103552>
- Kumar, L., & Bharadvaja, N. (2020). 12 - *Microorganisms: A remedial source for dye pollution* (M. P. B. T.-R. of T. P. T. M. and T. T. Shah, Ed.; pp. 309–333). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821014-7.00012-5>
- Kumar, S., Ahluwalia, A. S., & Charaya, M. U. (2019). Adsorption of Orange-G dye by the dried powdered biomass of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *Current Science*, 116(4), 604–611.
- Lebron, Y. A. R., Moreira, V. R., & Santos, L. V. S. (2019). Studies on dye biosorption enhancement by chemically modified *Fucus vesiculosus*, *Spirulina maxima* and *Chlorella pyrenoidosa* algae. *Journal of Cleaner Production*, 240, 118197.
- Lekhak, U. M. (2023). 2 - *Ecotoxicity of synthetic dyes* (S. P. Govindwar, M. B. Kurade, B.-H. Jeon, & A. B. T.-C. D. in B. and B. Pandey, Eds.; pp. 45–67). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91235-8.00021-8>
- Liu, W., & Ruan, R. (2022). Microalgae-based biomaterials for environmental remediation and functional use. In *Algae-Based Biomaterials for Sustainable Development: Biomedical, Environmental Remediation and Sustainability Assessment* (pp. 277–290). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96142-4.00015-4>
- Long, Z., Huang, Y., Zhang, W., Shi, Z., Yu, D., Chen, Y., Liu, C., & Wang, R. (2021). Effect of different industrial activities on soil heavy metal pollution, ecological risk, and health risk. *Environmental Monitoring and Assessment*, 193, 1–12.

- Majhi, P. K., Kothari, R., Pandey, A., & Tyagi, V. V. (2021). Adsorptive behavior of free and immobilized *Chlorella pyrenoidosa* for decolorization. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 11(6), 3023–3036. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-00770-6>
- Manzoor, K., Batool, M., Naz, F., Nazar, M. F., Hameed, B. H., & Zafar, M. N. (2022). A comprehensive review on application of plant-based bioadsorbents for Congo red removal. In *Biomass Conversion and Biorefinery*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02741-5>
- Moheimani, N. R., Borowitzka, M. A., Isdepsky, A., & Sing, S. F. (2012). Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In *Algae for biofuels and energy* (pp. 265–284). Springer.
- Mojtaba, S., Robati, S., Nosrati, M., Ghanati, F., Hajnowrouzi, A., Grizeau, D., & Dupré, C. (2022). Increase in lipid productivity and photosynthetic activities during distillery wastewater decolorization by *Chlorella vulgaris* cultures. *Environmental Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11233-x>/Published
- Moreno, Z. R., & Herrera, J. S. (2022). Biodegradation of Erionyl Turquoise azoic textile dye from *Chlorella vulgaris* microalgae in simulated wastewater. *J Textile Eng Fashion Technol*, 8(4), 121–124.
- Neethu, N., & Choudhury, T. (2018). Treatment of methylene blue and methyl orange dyes in wastewater by grafted titania pillared clay membranes. *Recent Patents on Nanotechnology*, 12(3), 200–207.
- Ngatia, L., Grace III, J. M., Moriasi, D., & Taylor, R. (2019). Nitrogen and phosphorus eutrophication in marine ecosystems. *Monitoring of Marine Pollution*, 1, 1–17.
- Nieto, S., Alfaro, E. G. B., Gamarra, C., Zambrano, A., Flores, J. W. V., Olivera, C. C., & Ruiz-Vergaray, M. (2021). Hydrodynamic Cavitation as a Clean Technology in Textile Industrial Wastewater Treatment. *Chemical Engineering Transactions*, 86, 277–282.
- Noor S., N., & Jasim M., S. (2019). EFFECT OF TEMPERATURE VARIATION ON THE EFFICACY OF CHLORELLA VULGARIS IN DECOLORIZATION OF CONGO RED FROM AQUEOUS SOLUTIONS. *Biochemical and Cellular Archives*, 19(2), 1–6. <https://doi.org/10.35124/bca.2019.19.2.4169>

- Novotný, Č., Svobodová, K., Kasinath, A., & Erbanová, P. (2004). Biodegradation of synthetic dyes by *Irpex lacteus* under various growth conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(2–3), 215–223.
- Oke, N., & Mohan, S. (2022). Development of nanoporous textile sludge based adsorbent for the dye removal from industrial textile effluent. *Journal of Hazardous Materials*, 422(May 2021), 126864. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126864>
- Oladoye, P. O., Ajiboye, T. O., Omotola, E. O., & Oyewola, O. J. (2022). Methylene blue dye: Toxicity and potential elimination technology from wastewater. In *Results in Engineering* (Vol. 16). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2022.100678>
- Ong, S.-A., Toorisaka, E., Hirata, M., & Hano, T. (2005). Biodegradation of redox dye Methylene Blue by up-flow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 124(1), 88–94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.03.054>
- ONU. (2022). *Objetivos y metas de desarrollo sostenible*. Organización de Las Naciones Unidas. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- Oulkhir, A., Lyamlouli, K., Danouche, M., & Benhida, R. (2023). Biosorption of a cationic dye using raw and functionalized *Chenopodium quinoa* pericarp biomass after saponin glycosides extraction. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 11(5), 110419. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2023.110419>
- Pacheco, H. G. J., Elguera, N. Y. M., Sarka, H. D. Q., Ancco, M., Eguiluz, K. I. B., & Salazar-Banda, G. R. (2022). Box-Behnken Response Surface Design for Modeling and Optimization of Electrocoagulation for Treating Real Textile wastewater. *International Journal of Environmental Research*, 16(4), 43.
- Park, K.-B., Choi, C., Yu, H.-W., Chae, S.-R., & Kim, I. S. (2018). Optimization of chemical cleaning for reverse osmosis membranes with organic fouling using statistical design tools. *Environmental Engineering Research*, 23(4), 474–484.
- Pattnaik, P., & Dangayach, G. S. (2019). Sustainability of wastewater management in textile sectors: a conceptual framework. *Environmental Engineering & Management Journal (EEMJ)*, 18(9).

- Pikula, K. S., Zakharenko, A. M., Chaika, V. V., Stratidakis, A. K., Kokkinakis, M., Waissi, G., Rakitskii, V. N., Sarigiannis, D. A., Hayes, A. W., Coleman, M. D., Tsatsakis, A., & Golokhvast, K. S. (2019). Toxicity bioassay of waste cooking oil-based biodiesel on marine microalgae. *Toxicology Reports*, 6, 111–117. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2018.12.007>
- Prashant, R., & Jyothi, S. (2010). Methylene blue: revisited. *J. Anaesth. Clin. Pharmacol*, 26, 517–520.
- Premaratne, M., Nishshanka, G., Liyanaarachchi, V. C., Nimarshana, P. H. V., & Ariyadasa, T. U. (2021). Bioremediation of textile dye wastewater using microalgae: current trends and future perspectives. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 96(12), 3249–3258.
- Priya, B., Uma, L., Ahamed, A. K., Subramanian, G., & Prabakaran, D. (2011). Ability to use the diazo dye, CI Acid Black 1 as a nitrogen source by the marine cyanobacterium *Oscillatoria curviceps* BDU92191. *Bioresource Technology*, 102(14), 7218–7223.
- Qadri, R., & Faiq, M. A. (2020). Freshwater pollution: effects on aquatic life and human health. *Fresh Water Pollution Dynamics and Remediation*, 15–26.
- Ramos, M. D. N., Claudio, C. C., Rezende, P. H. V., Cabral, L. P., Santos, L. A., Costa, G. G., Mesquita, P. L., & Aguiar, A. (2020). Critical analysis of the characteristics of industrial effluents from the textile sector in Brazil. *Revista Virtual de Química*, 12(4), 913–929. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200073>
- Ramos, P. B., Bavio, M. A., Barreto, G. P., & Eyler, G. N. (2018). Real textile effluent degradation assisted by Fe/PVA and magnetic waste. *Revista Materia*, 23(2). <https://doi.org/10.1590/S1517-707620180002.0430>
- Ras, M., Steyer, J.-P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 153–164.
- Raymond, E. S., & Kadiri, M. O. (2017). Decolourization of textile dye using microalgae (*Chlorella vulgaris* and *Sphaerocystis Schroeteri*). *Int. J. Innov. Res. Adv. Stud*, 4, 2394–4404.

- Saeidi, M., Biglari, H., Soleimani, M., Baneshi, M. M., Ahamadabadi, M., Mobini, M., Ebrahimzadeh, G., Mehrizi, E. A., Yari, A. R., & Narooie, M. R. (2017). Removal of methylene blue dye from aqueous solutions using pine shell ash. *Pollution Research*, 36(3), 445–450.
- Salgueiro, J. L., Perez, L., Maceiras, R., Sanchez, A., & Cancela, A. (2016). Bioremediation of wastewater using *Chlorella vulgaris* microalgae: Phosphorus and organic matter. *International Journal of Environmental Research*, 10(3), 465–470.
- Salgueiro, J. L., Pérez, L., Maceiras, R., Sánchez, Á., & Cancela, Á. (2018). Semicontinuous culture of *Chlorella vulgaris* microalgae for wastewater treatment. *International Journal of Environmental Research*, 12(6), 765–772.
- Salierno, G., Napoleone, S., Maisterrena, M. A., Cassanello, M., Pellasio, M., Doumic, L., & Ayude, M. A. (2021). Continuous Heterogeneous Fenton-Type Process for Dye Pollution Abatement Intensified by Hydrodynamic Cavitation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 60(46), 16653–16664.
- Samaniego Bordón, A. M., Ayala Alviso, N. B., & Casanueva Ojeda, M. E. (2022). Biomass generation from *Chlorella Vulgaris* on an industrial scale. *Revista Científica de La UCSA*, 9(1), 3–14. <https://doi.org/10.18004/ucsa/2409-8752/2022.009.01.003>
- Sánchez-Borroto, Y., Tobío-Pérez, I., De, T., Romero-López, J., Díaz-Domínguez, Y., Melo-Espinosa, E. A., & Piloto-Rodríguez, R. (2018). *Evaluación de las condiciones experimentales básicas para la producción de biomasa a partir de la microalga Chlorella vulgaris* Assessment of basic experimental conditions for biomass production from *Chlorella vulgaris* microalgae *Avaluació de les condicions experimentals bàsiques per a la producció de biomassa a partir de la microalga Chlorella vulgaris*.
- Sanyano, N., Chetpattananondh, P., & Chongkhong, S. (2013). Coagulation–flocculation of marine *Chlorella* sp. for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 147, 471–476.
- Saremi, R., Rai, S., & Sharma, S. (2022). Chapter 21 - Dyeing of fibers and impact on the environment. In T. Altalhi & Inamuddin (Eds.), *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science* (pp. 517–543). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99643-3.00021-8>

- Sarkar, S., Banerjee, A., Halder, U., Biswas, R., & Bandopadhyay, R. (2017). Degradation of synthetic azo dyes of textile industry: a sustainable approach using microbial enzymes. *Water Conservation Science and Engineering*, 2, 121–131.
- Serrano-Martínez, A., Mercader-Ros, M. T., Martínez-Alcalá, I., Lucas-Abellán, C., Gabaldón, J. A., & Gómez-López, V. M. (2020). Degradation and toxicity evaluation of azo dye Direct red 83:1 by an advanced oxidation process driven by pulsed light. *Journal of Water Process Engineering*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101530>
- Tee, W. T., Loh, N. Y. L., Hiew, B. Y. Z., Hanson, S., Thangalazhy-Gopakumar, S., Gan, S., & Lee, L. Y. (2022). Effective remediation of lead(II) wastewater by *Parkia speciosa* pod biosorption: Box-Behnken design optimisation and adsorption performance evaluation. *Biochemical Engineering Journal*, 187. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108629>
- Terán Hilaes, R., Garcia Bustos, K. A., Sanchez Vera, F. P., Colina Andrade, G. J., & Pacheco Tanaka, D. A. (2021). Acid precipitation followed by microalgae (*Chlorella vulgaris*) cultivation as a new approach for poultry slaughterhouse wastewater treatment. *Bioresource Technology*, 335, 125284. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125284>
- Tigini, V., Giansanti, P., Mangiavillano, A., Pannocchia, A., & Varese, G. C. (2011). Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74(4), 866–873. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.12.001>
- Tomar, T., Kahandawala, N., Kaur, J., Thounaojam, L., Choudhary, I., & Bera, S. (2023). Bioremediation of synthetic dyes from wastewater by using microbial nanocomposites: An emerging field for water pollution management. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102767. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102767>
- Wang, X., Jiang, J., & Gao, W. (2022). Reviewing textile wastewater produced by industries: characteristics, environmental impacts, and treatment strategies. In *Water Science and Technology* (Vol. 85, Issue 7, pp. 2076–2096). IWA Publishing. <https://doi.org/10.2166/wst.2022.088>
- Xiong, J. Q., Kabra, A. N., & Salama, E. S. (2023). Microalgae-based biotechnologies for treatment of textile wastewater. In *Current Developments in Bioengineering and*

Biotechnology: Advances in Eco-friendly and Sustainable Technologies for the Treatment of Textile Wastewater (pp. 457–471). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91235-8.00003-6>

Xiong, J.-Q., Kabra, A. N., & Salama, E.-S. (2023). Microalgae-based biotechnologies for treatment of textile wastewater. In *Current Developments in Bioengineering and Biotechnology* (pp. 457–471). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91235-8.00003-6>

Yaseen, D. A., & Scholz, M. (2019). Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. In *International Journal of Environmental Science and Technology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 1193–1226). Center for Environmental and Energy Research and Studies. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2130-z>

Yu, K. L., Lee, X. J., Ong, H. C., Chen, W. H., Chang, J. S., Lin, C. S., Show, P. L., & Ling, T. C. (2021). Adsorptive removal of cationic methylene blue and anionic Congo red dyes using wet-torrefied microalgal biochar: Equilibrium, kinetic and mechanism modeling. *Environmental Pollution*, 272. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115986>

Zahra, S. A., Ahmad, I., Abdullah, N., Iwamoto, K., & Yuzir, A. (2023). Microalgae-based bioremediation of pharmaceuticals wastewater. In *The Treatment of Pharmaceutical Wastewater* (pp. 277–309). Elsevier.

Zheng, Y., Cheng, B., Fan, J., Yu, J., & Ho, W. (2021). Review on nickel-based adsorption materials for Congo red. *Journal of Hazardous Materials*, 403, 123559.

ANEXOS

Anexo 1. Procesamientos estadísticos.

Tabla 14. ANOVA de velocidad de crecimiento específico Vs tipo de agitación.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tipo de agitación | 1 | 0.000150 | 0.000150 | 0.41 | 0.557 |
| Error | 4 | 0.001461 | 0.000365 | | |
| Total | 5 | 0.001611 | | | |

Tabla 15. Agrupaciones de velocidad de crecimiento específico Vs tipo de agitación. estadísticas con la prueba Tukey.

| Tipo de agitación | N | Media Agrupación |
|--------------------------|----------|-------------------------|
| Neumática | 3 | 0.2367 A |
| Orbital | 3 | 0.22667 A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 16. ANOVA de tiempo de duplicación Vs tipo de agitación.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------|-----------|------------------|------------------|----------------|----------------|
| Tipo de agitación | 1 | 0.02282 | 0.02282 | 0.35 | 0.584 |
| Error | 4 | 0.25813 | 0.06453 | | |
| Total | 5 | 0.28095 | | | |

Tabla 17. Agrupaciones de tiempo de duplicación Vs tipo de agitación.

| Tipo de agitación | N | Media Agrupación |
|--------------------------|----------|-------------------------|
| Orbital | 3 | 3.067 A |
| Neumática | 3 | 2.943 A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Tabla 18. ANOVA de productividad Vs tipo de agitación.

| Fuente | GL | SC Ajust. | MC Ajust. | Valor F | Valor p |
|-------------------|----|-----------|-----------|---------|---------|
| Tipo de agitación | 1 | 0.000267 | 0.000267 | 0.62 | 0.477 |
| Error | 4 | 0.001733 | 0.000433 | | |
| Total | 5 | 0.002000 | | | |

Tabla 19. Agrupaciones de productividad Vs tipo de agitación.

| Tipo de agitación | N | Media Agrupación |
|-------------------|---|------------------|
| Neumática | 3 | 0.4867 A |
| Orbital | 3 | 0.47333 A |

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

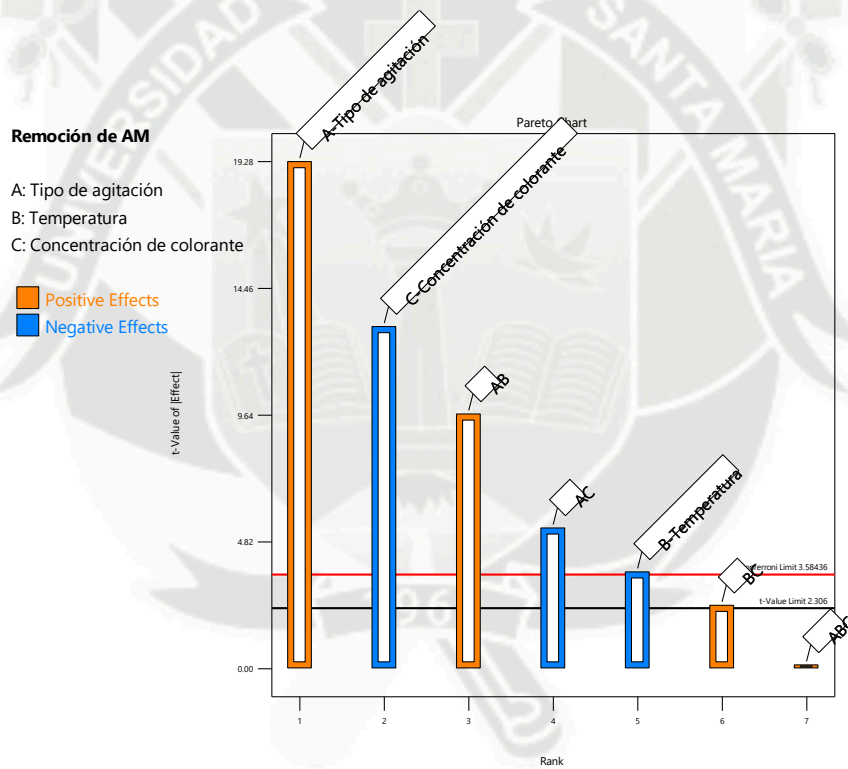


Figura 17. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados de la optimización de la decoloración de AM.

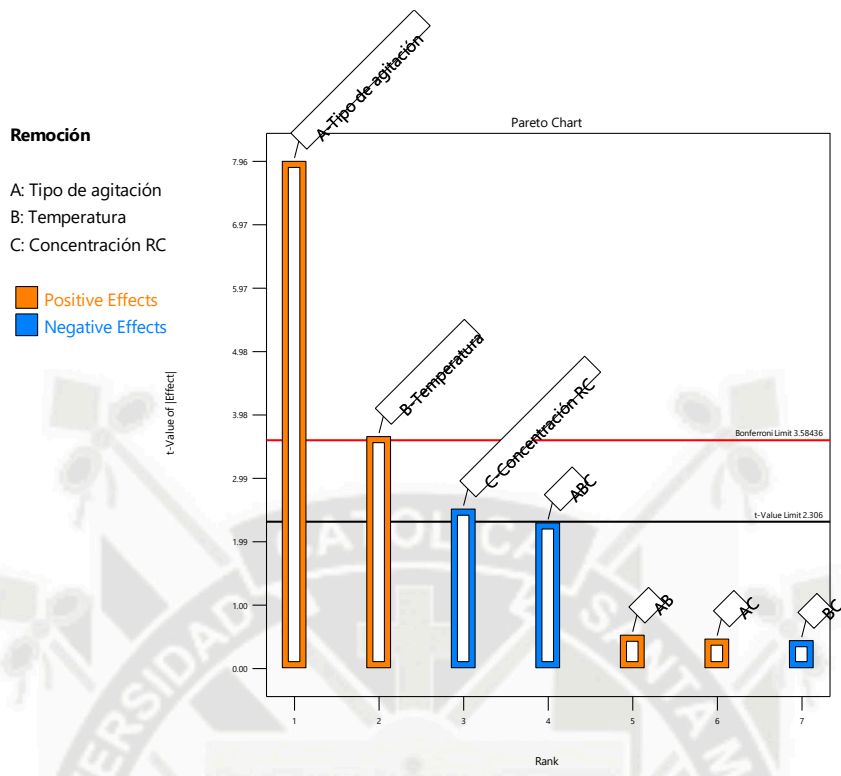


Figura 18. Diagrama de Pareto para efectos estandarizados de la optimización de la decoloración de RC.

Anexo 2. Galería fotográfica

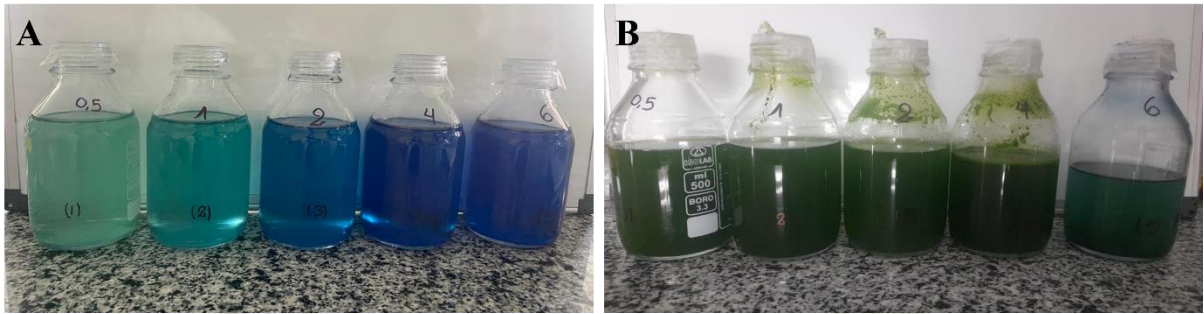


Figura 19. Cultivo de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de AM, apariencia al primer día (A) y al día cinco (B).

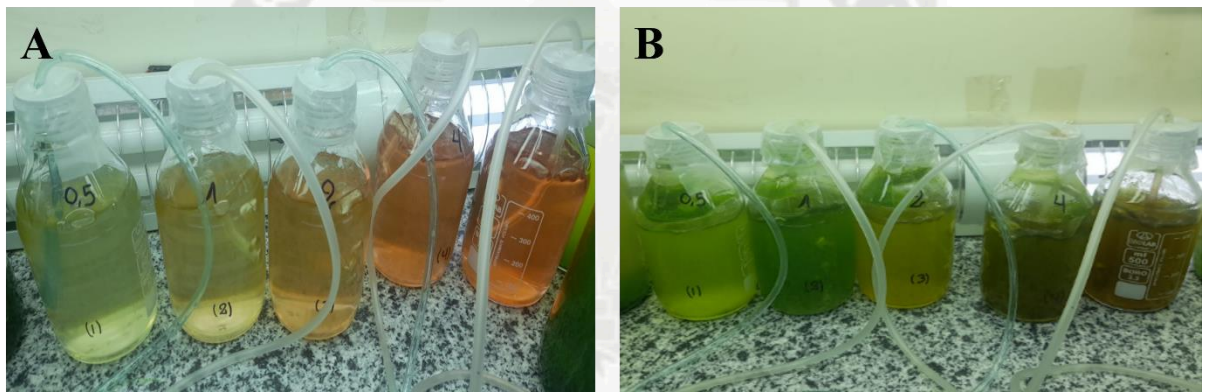


Figura 20. Cultivo de *C. vulgaris* con diferentes concentraciones de RC, apariencia al primer día (A) y al día cinco (B).