



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

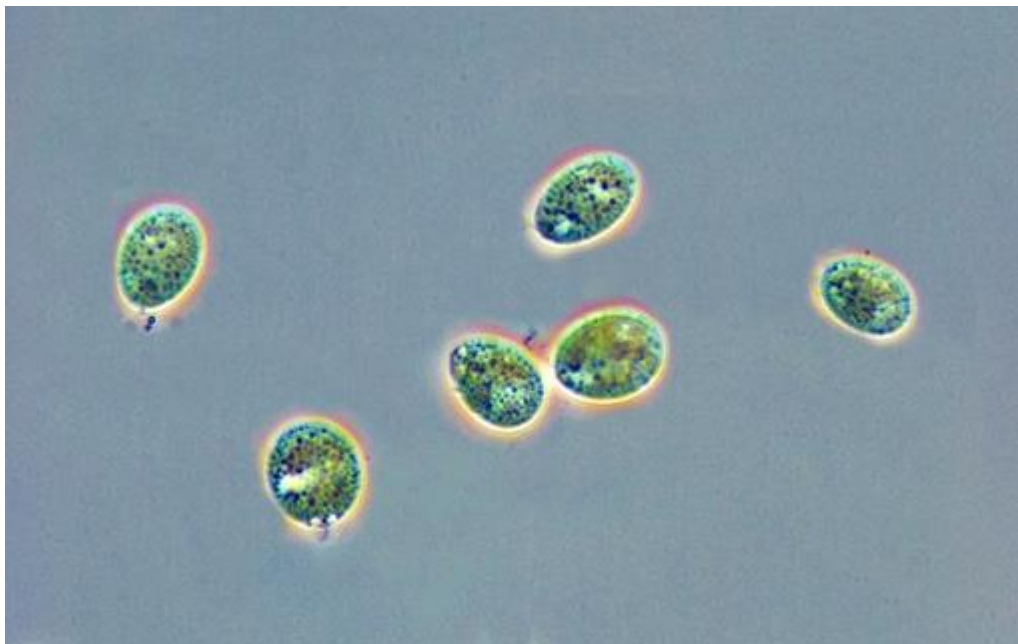
Departamento de Bioloxía Celular e Molecular

Área de Microbioloxía

Descontaminación de azul de metileno en augas por biomasa de microalgas.

Descontaminación de azul de metileno en augas por biomasa de microalgas.

Methylene blue decontamination from waters by microalgae biomass.



Raquel Seoane Cuquejo

Traballo de Fin de Grao

A Coruña, febreiro de 2017

Dirixido polo Dr. José Enrique Torres Vaamonde



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

O Dr. José Enrique Torres Vaamonde, profesor do Departamento Bioloxía Celular e Molecular da Universidade da Coruña, autoriza a presentación do Traballo de Fin de Grao “Descontaminación de azul de metileno en augas por biomasa de microalgas” realizado por Raquel Seoane Cuquejo para a súa defensa ante o Tribunal Calificador.

O titor:

A alumna:

Fdo: José Enrique Torres Vaamonde

Fdo: Raquel Seoane Cuquejo

A Coruña, 16 de febreiro de 2017.

ÍNDICE

1. Resumo / Resumen / Abstract	7
2. Introducción	8
3. Obxectivo	9
4. Material e métodos	10
4.1. Descrición da especie	10
4.2. Cultivo da microalga.....	10
4.3. Contaminante: Azul de Metileno.....	11
4.4. Deseño experimental	12
4.5. Método analítico.....	13
4.6. Estudo das cinéticas de adsorción	13
4.7. Estudo das isothermas de adsorción	13
4.8. Estudo do factor de bioconcentración (FBC)	14
5. Resultados e discusión	14
5.1. Efecto da concentración inicial de colorante e do tempo de contacto	15
5.2. Estudo das isothermas	19
5.3. Factor de Bioconcentración (FCB).....	22
6. Conclusións / Conclusiones /Conclusions	22
7. Bibliografía	24

1. Resumo / Resumen / Abstract

Os colorantes orgánicos sintéticos son tóxicos, moitos incluso canceríxenos e mutáxenos, e alteran a vida dos ecosistemas acuáticos nos que acaban como resultado da actividade industrial. Entre eles podemos encontrar o azul de metileno. Debido á súa escasa eliminación natural, búscanse métodos eficaces para retiralos das augas. Entre estes métodos está a biosorción que é efectiva, barata e sinxela e onde o uso de microalgas é novidoso e resulta interesante pola súa versatilidade. No presente estudo investigouse o potencial de *Chlamydomonas moewusii* Gerlof para a biorremediación do colorante azul de metileno dunha solución acuosa. Isto realizouse a través da eficiencia de retirada e da cantidade de colorante adsorbido ao longo do tempo e variando a concentración inicial do contaminante. Ao proceso aplicáronse as isotermas de adsorción (Langmuir e Freundlich), o factor de separación (R_L) e o factor de bioconcentración (FBC). Observouse unha clara redución do azul de metileno na solución como resultado da acción da biomasa da microalga e unha cantidade máxima de adsorción (q_m) de 200,88 mg/g segundo o modelo de isoterma de Langmuir, que foi quen mellor describiu os datos no equilibrio. O factor R_L mostrou un proceso de sorción favorable ao estar comprendido entre 0 e 1 e o factor de bioconcentración un valor en torno a 1000. Todos estes resultados evidencian a eficacia da biomasa de *C. moewusii* e demostran o seu potencial uso na retirada de azul de metileno dunha solución acuosa.

Palabras clave: *Chlamydomonas moewusii*, azul de metileno, biosorción, isotermas, microalga, colorante téxtil.

Los colorantes orgánicos sintéticos son tóxicos, muchos incluso cancerígenos y mutagénicos, y alteran la vida de los ecosistemas acuáticos en los que acaban como resultado de la actividad industrial. Entre ellos podemos encontrar el azul de metileno. Debido a su escasa eliminación natural, se buscan métodos eficaces para retirarlos de las aguas. Entre estos métodos está la biosorción que es efectiva, barata y sencilla y donde el uso de microalgas es novedoso y resulta interesante por su versatilidad. En el presente estudio se ha investigado el potencial de *Chlamydomonas moewusii* Gerlof para la biorremediación del colorante azul de metileno de una solución acuosa. Esto se realizó a través de la eficiencia de retirada y de la cantidad de colorante adsorbido a lo largo del tiempo y variando la concentración inicial del contaminante. Al proceso se le aplicaron las isotermas de adsorción (Langmuir y Freundlich), el factor de separación (R_L) y el factor de bioconcentración (FBC). Se observó una clara reducción del azul de metileno en la solución como resultado de la acción de la biomasa de la microalga y una cantidad máxima de adsorción (q_m) de 200,88 mg/g según el modelo de isoterma de Langmuir, que fue quien mejor describió los datos en el equilibrio. El factor R_L mostró un proceso de sorción favorable al estar comprendido entre 0 e 1 y el factor de bioconcentración un valor en torno a 1000. Todos estos resultados evidencian la eficacia de la biomasa de *C. moewusii* y demuestran su potencial uso en la retirada de azul de metileno de una solución acuosa.

Palabras clave: *Chlamydomonas moewusii*, azul de metileno, biosorción, isotermas, microalga, colorante textil.

Synthetic organic dyes are toxic, some of them even carcinogenic and mutagenic, and alter aquatic life, where they end up as a result of industrial activity. Into this category we can find methylene blue. Due to their low natural elimination, effective methods to remove them from waters are being tested. One of which is biosorption, an effective, cheap and simple method where the use of microalgae is a novel and interesting way because of its versatility. In the present work, bioremediation of methylene blue in aqueous solution by *Chlamydomonas moewusii* Gerlof has been investigated using the sorption efficiency and the amount of dye adsorbed over time and varying the initial concentration of the contaminant. Isotherms (Langmuir and Freundlich), separation factor (R_L) and bioconcentration factor (BCF) were applied on the adsorption process. Methylene blue reduction was observed in the solution as a result of microalgae's action and the maximum uptake (q_m) was 200,88 mg/g according to Langmuir isotherm model, which best described equilibrium data. The R_L value showed feasible sorption process as the obtained value was between 0 and 1 and bioconcentration factor value was around 1000. Results from this study evidenced the efficacy of *C. moewusii* biomass and demonstrate its potential use in methylene blue dye removal from aqueous solution.

Keywords: *Chlamydomonas moewusii*, methylene blue, biosorption, isotherms, microalga, textile dye.

2. Introducción

Dentro da gran variedade de contaminantes presentes nas augas, os colorantes constitúen un dos grupos máis amplos e importantes. Son compostos de uso común na industria, destacando a téxtil como principal emisor, aínda que tamén se empregan na industria papeleira, alimentaria, médica... (Yagub et al., 2014; Ali, 2010; Forgacs et al., 2004). Como consecuencia desta actividade acaban, xunto co resto de contaminantes das augas residuais, nos ecosistemas acuáticos. Aí absorben e reflicten a luz solar interferindo na súa correcta penetración na columna de auga e alteran a solubilidade dos gases perturbando a vida acuática e a cadea alimentaria (Vandevivere et al., 1998; Asgher, 2012). Estímase que se perde nas augas residuais do 12 ao 15% das $7 \cdot 10^5$ toneladas de colorantes xeradas anualmente (Vijayaraghavan & Yun, 2008; Aksu, 2005). Nas últimas décadas aumentou o coñecemento sobre a toxicidade de colorantes orgánicos de uso máis común e que non se contemplaban como perigosos; algúns son agora considerados canceríxenos e mutáxenos, co cal a súa eliminación dos efluentes pasou a ser un tema prioritario para a seguridade ambiental (Asgher, 2012; Yagub et al., 2014).

O azul de metileno é un colorante catiónico empregado na tinguidura de papel, lá e algodón entre outros, en microbioloxía, en cirurxía e en diagnósticos. Aínda que a súa toxicidade non é demasiado elevada pode provocar vómitos, aumento da frecuencia cardíaca, confusión ou necrose dos tecidos en exposicións prolongadas e/ou inxestión (Vijayaraghavan & Yun, 2008).

Ao igual có resto de colorantes orgánicos de natureza sintética, o azul de metileno considérase un elemento recalcitrante, resistente á degradación aerobia e estable ante axentes oxidantes, derivando todo isto nunha eliminación natural moi reducida (Fomina & Gadd, 2014). Isto, sumado á súa toxicidade, fai que se busquen métodos cada vez máis eficaces e baratos para a súa retirada dos medios acuáticos.

Os métodos físico-químicos tradicionais de retirada, entre os que destaca a adsorción a carbón activado (Hamiid et al., 2007), son efectivos pero saen caros e poden provocar residuos tóxicos. Deste xeito, comezaron a testarse adsorbentes alternativos que resultasen máis baratos pero igual de eficaces (materiais naturais, biosorbentes, residuos industriais e agrícolas...). Neste ámbito, a biosorción supón unha boa alternativa na decoloración de efluentes contaminados con estes compostos ao ser unha técnica sinxela, barata, eficiente, selectiva e que produce residuos inocuos (Nozaki et al., 2008).

Así, a biosorción refírese á retirada de substancias, orgánicas ou inorgánicas, dunha solución acuosa empregando biomasa, viva ou morta e incluso algún derivado, de microorganismos, fungos, algas ou plantas. Inclúe, por tanto, unha fase sólida, o biosorbente, e unha líquida composta por un solvente (normalmente auga) que contén disolta ou en suspensión a especie a ser adsorbida, o sorbato (Fomina & Gadd, 2014). A retirada ten lugar cando o sorbato interactúa coa matriz biolóxica, resultando na redución da súa concentración na solución a descontaminar. Esta interacción prodúcese a través de grupos funcionais das superficies e paredes celulares dos biosorbentes, como poden ser os grupos carboxilo, hidroxilo ou carbonilo, e o colorante pode chegar a penetrar ate o interior celular resultando na súa bioacumulación.

Hai numerosos estudos que empregan a biomasa de fungos e bacterias na retirada de azul de metileno. Por exemplo Aksu et al. (2010) e Ayla et al. (2013) obtiveron resultados moi satisfactorios na súa retirada empregando biomasa do fungo *Rhizopus arrhizus* e da bacteria *Bacillus subtilis*, respectivamente. Tamén se otiveron usando biomasa da macroalga *Ulva lactuca*, onde o azul de metileno dunha solución foi retirado eficaz e rapidamente (Sikaily et al., 2006).

Nos últimos anos os estudos adicados á investigación do uso de microalgas para a remediación da cor nas augas residuais aumentaron debido a que, a maiores da retirada que é moi eficiente, aportan outros beneficios coma a fixación de CO₂ ou a utilización da biomasa xerada na fabricación de biocombustible (Chisti, 2007). Al-Fawwaz & Abdullah (2016) obtiveron ata un 98,4% de retirada de azul de metileno empregando a microalga *Desmodesmus sp.* e Daneshvar et al. (2007) un 87,1% de retirada de verde malaquita empregando *Cosmarium sp.* baixo condicións óptimas. Ao seren consideradas prometedoras no campo da biorremediación, é preciso caracterizar diferentes biomosas de microalgas para poder estudar a súa posible aplicación neste campo.

3. Obxectivo

O obxectivo do presente traballo é estudar a capacidade da biomasa da microalga *Chlamydomonas moewusii* Gerloff de actuar como un sorbente de baixo custo e fácil de cultivar na retirada de azul de metileno dunha solución acuosa.

Para elo avalíase o efecto de diferentes concentracións de azul de metileno ao longo do tempo sobre a eficiencia de adsorción e a cantidade de contaminante retirado. Co fin de comprender o mecanismo de sorción empregáronse isotermas que permiten obter os parámetros que caracterizan este proceso.

4. Material e métodos

4.1. Descrición da especie

O xénero *Chlamydomonas* está englobado, dentro da división Chlorophyta, na clase Chlorophyceae, orde Chlamydomonales e familia Chlamydomonaceae (Guiry & Guiry, 2017). Está constituído por numerosas especies cosmopolitas que aparecen en solos, augas doces e salgadas (Pérez Valcárcel, 2010). As especies das que se compón teñen unha estrutura similar, presentando pequenas variacións, as cales permiten a súa distinción. Son de forma ovoide, elipsoidal ou esférica, cun tamaño de 5-30 μm de lonxitude e posúen 2 flaxelos apicais de tamaño igual ou superior ao da célula, e na base dos cales é común encontrar vacúolos pulsátiles. A parede celular, que é fina e lisa, está constituída unicamente por glicoproteínas fibrosas (sen polisacáridos) e vese interrompida na zona flaxelar. O seu cloroplasto ten forma de copa e asociado a el pode haber pirenoides. Tamén teñen unha mancha ocular no medio ou na parte anterior da célula (Pérez Valcárcel, 2010).

Para o presente estudo empregouse a cepa CCAP 11/5B de *Chlamydomonas moewusii* Gerloff (Figura 1.), obtida da Colección de Cultivos de Algas e Protozoos (CCAP; Culture Collection of Algae and Protozoa) do Laboratorio Mariño de Dunstaffnage (Escocia, Reino Unido). Esta é unha microalga verde de auga doce que pode reproducirse sexual ou asexualmente polo que para evitar o primeiro tipo cultivouse o *mating type* (+) (mt+).

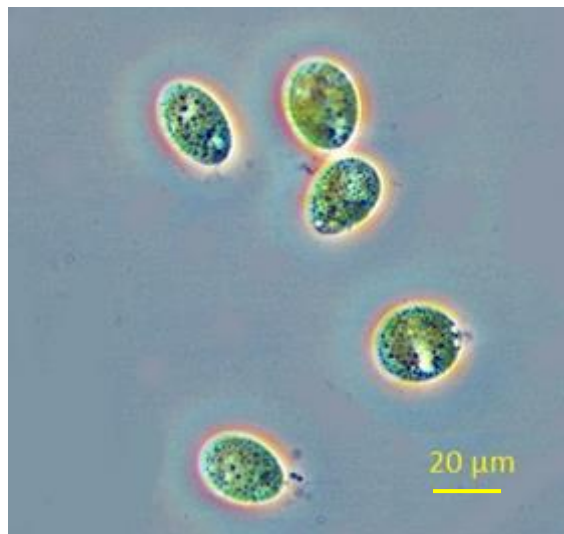


Fig. 1. Células de *Chlamydomonas moewusii*. Fotografía obtida cun microscopio de contraste de fases (400X).

4.2. Cultivo da microalga

O medio empregado para o cultivo de *C.moewusii* é o medio de cultivo Bristol (Brown et al., 1967) a base de macro e micronutrientes e auga destilada, que se esteriliza en autoclave a 120°C durante 20 minutos. A composición deste medio foi a seguinte (Táboa I).

Táboa I. Composición do medio Bristol.

Reactivos	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,175
NaNO ₃	0,25
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,075
K ₂ HPO ₄	0,075
NaCl	0,025
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,025
KOH	0,031
EDTA	0,05
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4,0 · 10 ⁻³
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,8 · 10 ⁻³
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1,1 · 10 ⁻⁴
MoO ₃	3,9 · 10 ⁻⁴
H ₃ BO ₃	2 · 10 ⁻⁴
CuSO ₄	4,3 · 10 ⁻⁵

Estes cultivos realízanse en botellas *Pyrex* de 1 ou 0,5 L e incúbase nunha cámara de cultivo que lles proporciona aireación constante e unhas condicións de luz e temperatura determinadas. En canto á aireación, un turbosoplador insúflalle aire atmosférico filtrado con filtros *Milipore FG de* 0,22 µm de poro cun fluxo constante de 10 L · min⁻¹. A iluminación é de 68 µE/(m² s) e proporcionana tubos fluorescentes de 36 W nun ciclo de 12 horas de luz alternadas con 12 de escuridade. Por último, a temperatura mantense constante a 18±1°C.

Todo o material empregado para a realización das experiencias é igualmente esterilizado a 120°C durante 20 minutos.

4.3. Contaminante: Azul de Metileno

O azul de metileno, ou cloruro de tetrametiltionina (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazationio; C.I.: 52030), é un composto aromático heterocíclico con fórmula química C₁₆H₁₈N₃SCl·3H₂O e estrutura amosada na figura 2.

É un colorante catiónico, polo que se une ás partes das células cargadas negativamente por atracción eléctrica e incluso pode chegar a penetrar nelas e almacenarse no citoplasma.

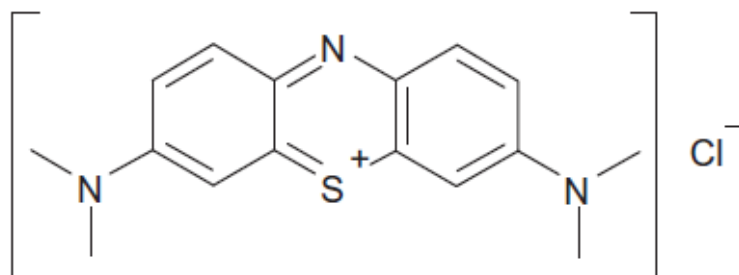


Fig. 2. Estrutura química do azul de metileno.

Preparáronse catro solucións *stock* de azul de metileno de xeito que permitisen engadir un volume apropiado aos ensaios e obter as diferentes concentracións empregadas. Estas foron de 100 mg/L, 1000 mg/L, 5000 mg/L e 15000 mg/L, e para preparalas empregouse azul de metileno en po cristalino (Methylene Blue Hydrate), obtido de Sigma-Aldrich e que foi diluído en auga destilada.

4.4. Deseño experimental

Co obxectivo de avaliar a capacidade de biorremediación de azul de metileno pola microalga *C.moewusii*, realizáronse experiencias dunha duración total de 7 horas nas que as células foron expostas a diferentes concentracións do contaminante.

As concentracións ensaiadas foron: 0,75; 2,25; 4,5; 9; 12; 24; 48; 96; 200 e 400 mg/L. Para cada unha delas fíxose un control sen microalgas. Todas as experiencias foron realizadas por triplicado de xeito que os datos obtidos son a media das tres réplicas.

Os ensaios leváronse a cabo en tubos Kimax de 50 mL nos que se engadiron:

- 40 mg de biomasa viva, tomada do cultivo inicial en fase exponencial de crecemento.
- Un volume axeitado da solución *stock* de azul de metileno segundo a concentración que se vaia ensaiar.
- Auga destilada estéril ata acadar os 50 mL de volume final.

A figura 3 amosa unha fotografía dos tubos nos que se realizaron as experiencias. Durante a o transcurso das mesma, os tubos mantivéronse nas condicións de cultivo indicadas anteriormente, pero sen aireación e en axitación a 200 rpm cun axitador orbital.



Fig. 3. Deseño das experiencias onde se ven tanto o control (tubos 1 a 3) coma o ensaio coa microalga engadida (tubos 4 a 6) por triplicado.

As mostras para a medición da cantidade de azul de metileno na suspensión tomáronse aos 0, 5, 15, 30, 60 e 90, 120, 180, 240, 300, 360 e 420 minutos.

Dos tubos Kimax tomáronse alícuotas de 1,5 mL, aos tempos establecidos, e pasáronse a tubos Eppendorf que se centrifugaron a 13000 rpm e 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante, que

contén o azul de metileno non adsorbido polas microalgas, foi trasladado a outro Eppendorf que se almacenou a -20°C ate o día da medición (Figura 4). O *pellet* rexeitouse.

4.5. Método analítico

A concentración de azul de metileno do sobrenadante determinouse medindo a súa absorbancia a 665 nm, que foi a lonxitude de onda á que se observou máxima absorción do azul de metileno, contrastando cun branco de auga destilada. Para elo empregouse un espectrofotómetro UV-Visible modelo UV-1700 (Shimadzu, Xapón).

Previamente realizouse unha curva de calibrado con dilucións coñecidas de azul de metileno para obter a ecuación da recta a través da cal se pode extrapolar a concentración de azul de metileno en función da absorbancia medida.

4.6. Estudo das cinéticas de adsorción

A eficiencia de retirada por parte da microalga mediuse coa porcentaxe de colorante retirado que se calcula empregando a seguinte ecuación [1]:

$$\% \text{ Retirada} = (C_i - C_t) \cdot 100 / C_i \quad [1]$$

Onde C_i é a concentración inicial de colorante (mg/L) e C_t a concentración de colorante no tempo t (mg/L).

A cantidade de colorante adsorbido pola biomasa de *C.moewusii* no equilibrio, capacidade de biosorción, calculouse coa seguinte ecuación [2]:

$$q_e = (C_i - C_t) \cdot v / m \quad [2]$$

Onde C_i e C_t son as concentracións de azul de metileno na solución ao iniciar a experiencia e no tempo t (mg/L), respectivamente; m refírese á cantidade de biosorbente (g) e v é o volume da suspensión (L).

4.7. Estudo das isothermas de adsorción

O mecanismo do proceso de adsorción estudouse empregando as isothermas de adsorción de Langmuir (Langmuir, 1918) e Freundlich (Freundlich, 1906).

A forma matemática de expresar a isoterma de Langmuir é [3]:

$$q_e = (q_m \cdot b \cdot C_e) / (1 + b \cdot C_e) \quad [3]$$

Onde q_e é a cantidade de colorante adsorbido (mg/g de biomasa), q_m (mg/g) a capacidade máxima de adsorción, b a constante de Langmuir (L/mg) e C_e a concentración de colorante no equilibrio (mg/L).

Para determinar o comportamento característico da adsorción segundo o modelo de Langmuir emprégase o parámetro de equilibrio ou factor de separación (R_L) (Hall et al., 1966) calculado mediante a seguinte ecuación [4]:

$$R_L = 1 / (1 + (b \cdot C_i)) \quad [4]$$

Onde b é a constante de Langmuir (L/mg) e C_i a concentración de azul de metileno empregadas na investigación (mg/L). Un valor de R_L igual a 0 indica adsorción irreversible, un comprendido entre 0 e 1 unha adsorción favorable e un maior a 1 indica unha adsorción desfavorable.

O modelo de Freundlich exprésase como [5]:

$$q_e = K_f \cdot C_e^{1/n} \quad [5]$$

Onde K_f (mg/g) e n son constantes de Freundlich.

Os datos axustáronse a estes modelos de adsorción mediante unha regresión non lineal.

Todos os datos foron calculados empregando o programa SigmaPlot 13.0.

4.8. Estudo do factor de bioconcentración (FBC)

O factor de bioconcentración calcúlase como [6]:

$$FCB = q / C_i \quad [6]$$

Onde q é a cantidade de colorante contido na biomasa da microalga (mg/Kg) e C_i a concentración inicial de azul de metileno na solución (mg/L).

5. Resultados e discusión

Os resultados obtidos indicaron que a cantidade de azul de metileno se reduciu nos diferentes tubos nos que se levaron a cabo as experiencias. A figura 4 mostra de forma visual esta redución do contaminante ao longo do tempo mediante a perda de cor, sendo cada Eppendorf unha mostra obtida destes tubos, despois de retirar as células, nos tempos establecidos.

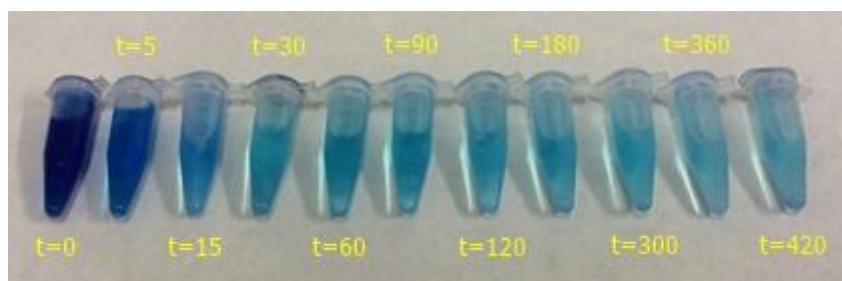


Fig.4. Sobrenadante en tubos Eppendorf preparados para a medición. Na fotografía pode observarse a clara retirada de colorante co paso do tempo. Corresponde co ensaio de 48 mg/L.

5.1. Efecto da concentración inicial de colorante e do tempo de contacto

O aumento do tempo de contacto mellorou tanto a porcentaxe coma a cantidade de colorante retirado, mentres que o incremento da concentración inicial de azul de metileno provocou un aumento na cantidade de sorción e un descenso da porcentaxe, o cal se debeu á ocupación dos sitios de unión na superficie do biosorbente que se saturaron co colorante. Nos tubos de control non se observou ningún tipo de redución e/ou variación da concentración de azul de metileno, quedando descartada calquera tipo de retirada externa á biomasa da microalga como podería ser a fotodegradación, por exemplo.

Na figura 5 represéntase a concentración de azul de metileno (mg/L), que queda no sobrenadante, fronte ao tempo (min) nas diferentes concentracións de colorante ensaiadas. Como se ve, ao avanzar a experiencia, a concentración do contaminante diminúe en todos os casos. Este descenso prodúcese primeiro de forma moi rápida para logo decrecer lentamente ata acadar un equilibrio. Do mesmo xeito, o uso de biomasa de *Chlorella pyrenoidosa* para retirar azul de metileno de augas residuais (Pathak et al., 2015) ou o uso de *Cystoseira barbatula* (Caparkaya & Cavas, 2008) tamén obtiveron este rápido descenso da concentración do contaminante da solución ata acadar un equilibrio.

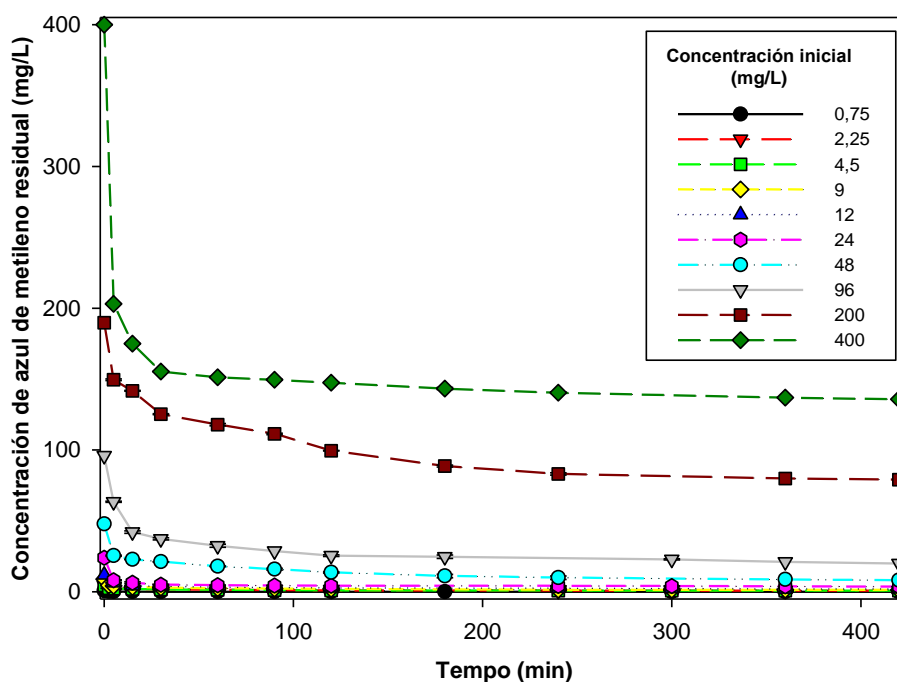


Fig. 5. Concentración de azul de metileno residual (mg/L) ao longo do tempo (min) das diferentes concentracións iniciais ensaiadas. Os valores representados son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

Na figura 6 pode observarse a porcentaxe de adsorción de azul de metileno, a diferentes concentracións iniciais e con respecto ao tempo. Esta porcentaxe crece ao aumentar o tempo de contacto. Nos primeiros 15-30 minutos a taxa de adsorción é moi rápida, retirándose a maior parte do colorante, e logo descende gradualmente ata acadar un equilibrio no que cesa a biosorción. Este ten lugar nos 90-120 minutos, a partir dos cales o aumento na porcentaxe con respecto ao tempo de contacto é moi reducido. Así, no caso de aplicación da biomasa desta

microalga na retirada de azul de metileno baixo estas condicións, este sería o tempo óptimo de contacto. Comparando este resultado co descrito por Pathak et al. (2015) podemos observar a mesma tendencia pero con diferente resultado. Estes investigadores ensaiaron con 150 mg de biomasa seca e fresca doutra microalga, *C. pyrenoidosa*, e variaron a concentración de azul de metileno entre 10 e 60 mg/L, obtendo a maior parte da retirada nos primeiros 15 minutos e o equilibrio aos 45. O tempo requirido para acadar o equilibrio é moito menor no caso de *C. pyrenoidosa* porque a cantidade de biomasa empregada polos investigadores, 150 mg, é moito maior cá do presente estudo, 40 mg.

Ao estudar a retirada deste mesmo colorante con outros organismos, coma as macroalgas, os investigadores observan resultados semellantes. Caparkaya & Cavas (2008) estudaron a capacidade de retirada de *Cystoseira barbatula* e viron que o tempo necesario para acadar o equilibrio era de 210 minutos, moi superior ao obtido con *C. moewusii*.

Sikaily et al. (2006) realizaron un estudo similar con outra macroalga, *Ulva lactuca* e, en contraposición ao anterior e ao obtido no presente traballo, describiron a existencia de 3 fases, en lugar de 2, na retirada do colorante. Esta tendencia repetíase tanto ao variar as concentracións ensaiadas como ao variar a cantidade de biomasa aplicada. Segundo estes autores, existe unha primeira fase onde a taxa de adsorción é pequena, unha segunda fase na que a taxa aumenta progresivamente, resultando nunha fase de retirada rápida co aumento do tempo de contacto, e unha última fase na que hai unha saturación ao acadar o equilibrio ao cabo dun tempo de contacto determinado, no seu caso de 45 minutos.

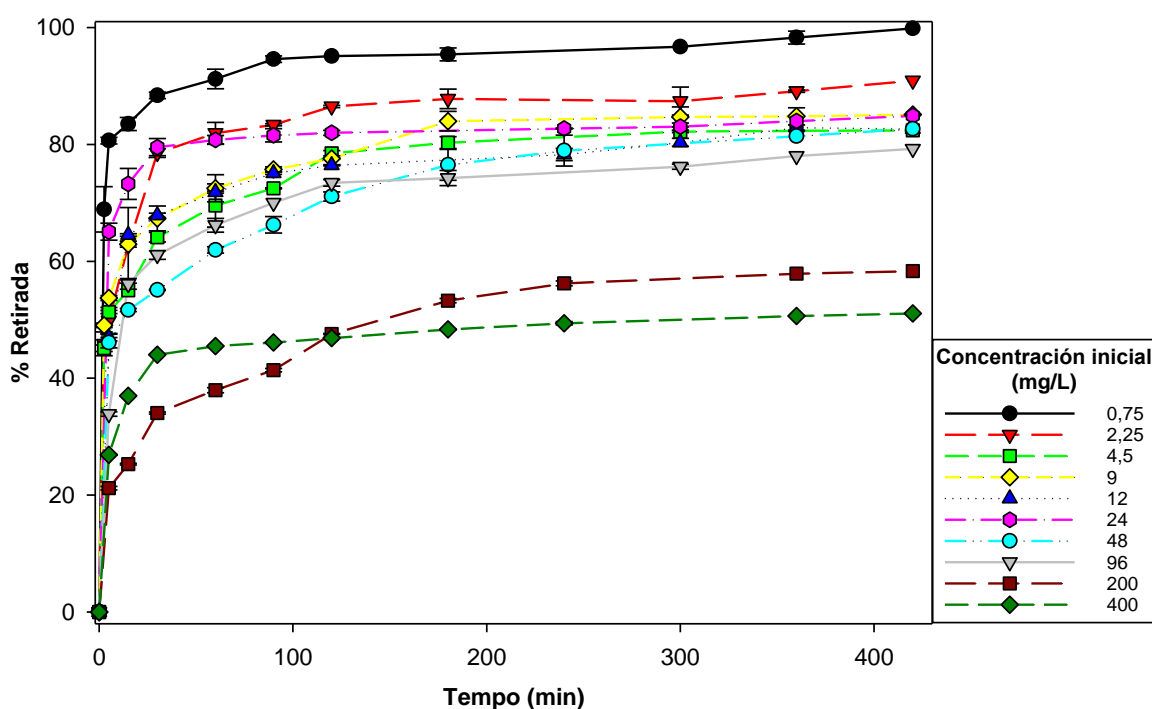


Fig. 6. Evolución da porcentaxe de retirada de colorante (%) pola biomasa de *C. moewusii* ao longo do tempo (min) das diferentes concentracións iniciais ensaiadas. Os valores representados son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

Na táboa II aparecen as porcentaxes de retirada no equilibrio nas diferentes concentracións iniciais ensaiadas (de 0,75 a 400 mg/L). Nas máis baixas, dende 0,75 a 48 mg/L, a porcentaxe é moi elevada, manténdose entre o 80 e case o 100%. A partir desa última concentración, dita porcentaxe comeza a caer ate o $50,67\% \pm 0,28$ na concentración máis alta ensaiada (400 mg/L). Este punto de inflexión ten lugar cando os sitios de posible unión na superficie da microalga para o azul de metileno xa están saturados, ocupados por outras moléculas do colorante. Así, a partir da concentración ensaiada de 48 mg/L, hai unha relación inversa entre o aumento do valor inicial de contaminante e a capacidade de adsorción do biosorbente. O uso de carbón activado (Kannan & Sundaram, 2001) tamén reporta un descenso na porcentaxe de retirada con respecto ao aumento da concentración inicial de azul de metileno pola ocupación dos sitios activos de unión, que son insuficientes para concentracións moi elevadas do colorante.

Pathak et al. (2015), aínda ensaiando con moita máis biomasa ca neste estudo (150 mg fronte a 40 mg) obtiveron unha porcentaxe de retirada no equilibrio moito menor. No seu caso, a porcentaxe descende dende o 80% para a concentración máis baixa (10 mg/L) ata algo menos do 40% na máis elevada (60 mg/L). Comparando dúas concentracións próximas de ambos estudos, vese como para a de 20 mg/L Pathak et al. (2015) obteñen un 75% de retirada mentres que neste estudo, para 24 mg/L, obtense o $84\% \pm 0,09$. Polo tanto, *C. moewusii* mostra mellores resultados xa que non acada valores tan baixos nin sequera no ensaio con 400 mg/L de azul de metileno.

Táboa II. Valores das porcentaxes de retirada de colorante no equilibrio (% Retirada) das diferentes concentracións iniciais ensaiadas. Os datos son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

Concentración (mg/L)	0,75	2,25	4,5	9	12	24	48	96	200	400
% Retirada	98,28 $\pm 0,03$	89,11 $\pm 2,4$	82,35 $\pm 0,18$	84,81 $\pm 1,7$	82,9 $\pm 1,04$	84,01 $\pm 0,09$	81,43 $\pm 2,6$	78,02 $\pm 0,43$	57,91 $\pm 0,42$	50,67 $\pm 0,28$

A cinética de adsorción de azul de metileno obtida con *C. moewusii* tamén se mantén ao variar o colorante a retirar. Khataee et al. (2009) ensaiaron a retirada de verde malaquita con biomasa de *Chlamydomonas sp.* Usaron $6 \cdot 10^6$ células/mL de biomasa e variaron a concentración inicial do contaminante entre 2,5 e 15 mg/L e viron que o tempo requirido para acadar o equilibrio supera os 400 minutos. Neste caso, a porcentaxe de retirada aumentou co incremento da concentración inicial dende algo menos do 60% ata chegar a unha adsorción de case o 70% nas concentracións máis elevadas. A diferenza con respecto a este traballo débese a que, ao estar o cultivo de *C. moewusii* a incubar en axitación, hai un maior número de colisións entre os ións de colorante e as microalgas, mellorando así o proceso de adsorción e acadando porcentaxes máis elevadas. Tal e como recollen Maurya et al. (2014) no seu estudo, a axitación afecta á distribución do colorante na solución e polo tanto tamén á súa adsorción de xeito que mellora a eficiencia de retirada.

A figura 7 representa a evolución da cantidade de azul de metileno adsorbido por gramo de biomasa ao longo do tempo para as diferentes concentracións iniciais de contaminante ensaiadas. Novamente, a capacidade de biosorción aumenta co tempo de contacto, primeiro rápida e logo lentamente, ata acadar un valor no que non se retira máis cantidade. Este último é onde se acada o equilibrio e reflicte a cantidade máxima de colorante que ese biosorbente é

capaz de retirar nestas condicións. Ademais, a cantidade inicial de retirada é maior canto máis elevada é a concentración, é dicir, un incremento na concentración inicial de colorante aumenta a capacidade de biosorción deste sorbente. Isto débese a que existe unha maior forza motriz que permite superar a resistencia á transferencia de colorante da fase líquida á sólida.

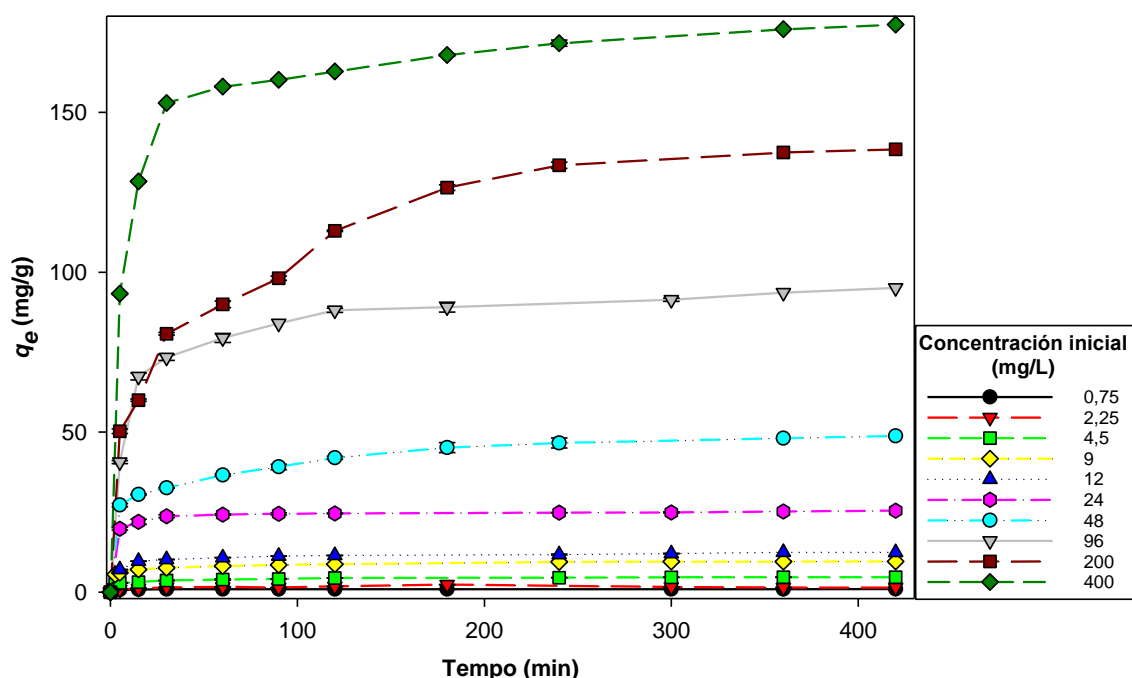


Fig. 7. Cantidade de azul de metileno (mg/g) adsorbido ao longo do tempo (min) das diferentes concentracións iniciais ensaiadas. Os valores representados son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

Na táboa III amósanse os valores obtidos para a capacidade de retirada de azul de metileno no equilibrio para as diferentes concentracións ensaiadas. Como se ve, a capacidade de adsorción no equilibrio desta microalga aumentou de $0,92 \pm 0,16$ a $175,95 \pm 0,99$ mg/g ao incrementar a concentración inicial de azul de metileno de 0,75 a 400 mg/L.

Táboa III. Valores das cantidades de colorante retirado no equilibrio (q_e) nas diferentes concentracións iniciais ensaiadas. Os datos son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

Concentración (mg/L)	0,75	2,25	4,5	9	12	24	48	96	200	400
q_e (mg/g)	0,92 $\pm 0,16$	1,43 $\pm 0,07$	4,63 $\pm 0,01$	9,54 $\pm 0,19$	12,44 $\pm 0,16$	25,20 $\pm 0,03$	48,06 $\pm 1,56$	93,62 $\pm 0,52$	137,42 $\pm 0,98$	175,95 $\pm 0,99$

Diferentes autores que estudaron a retirada de colorantes con macroalgas observaron este mesmo incremento na adsorción máxima ao aumentar a concentración inicial de contaminante. É o caso de Marungrueng & Pavasant (2006) que ensaiaron a retirada de azul astrazon FGRL con biomasa de *Caulerpa lentillifera*, ou Aravindham et al. (2007) que o fixeron coa de *Caulerpa*

scalpelliformis e que tamén obtiveron este incremento da cantidade adsorbida de 4,7 a 27 mg/g ao aumentar a concentración inicial de amarelo básico de 25 a 150 mg/L.

Esta tendencia non só se percibe en macro e microorganismos senón que tamén se pode ver noutros sorbentes menos habituais coma o empregado por Guechi & Hamdaoui (2016), quen usaron pel de pataca para retirar azul de metileno. Neste caso, a capacidade de biosorción no equilibrio aumentou de 3,62 a 14,83 mg/g variando a concentración de 10 a 40 mg/L. Do mesmo xeito, o uso de diferentes superficies de carbón activado (Kannan & Sundaram, 2001) tamén describiron un aumento exponencial da cantidade de azul de metileno retirada ao aumentar a súa concentración inicial.

5.2. Estudo das isothermas

O equilibrio de adsorción establécese cando a cantidade de colorante adsorbido permanece constante. Ao representar graficamente a concentración do colorante da solución no equilibrio fronte á cantidade adsorbida pola biomasa, obtense a representación dunha isoterma de adsorción. Neste estudo, os datos analízanse empregando as isothermas de Langmuir e Freundlich (Figura 8).

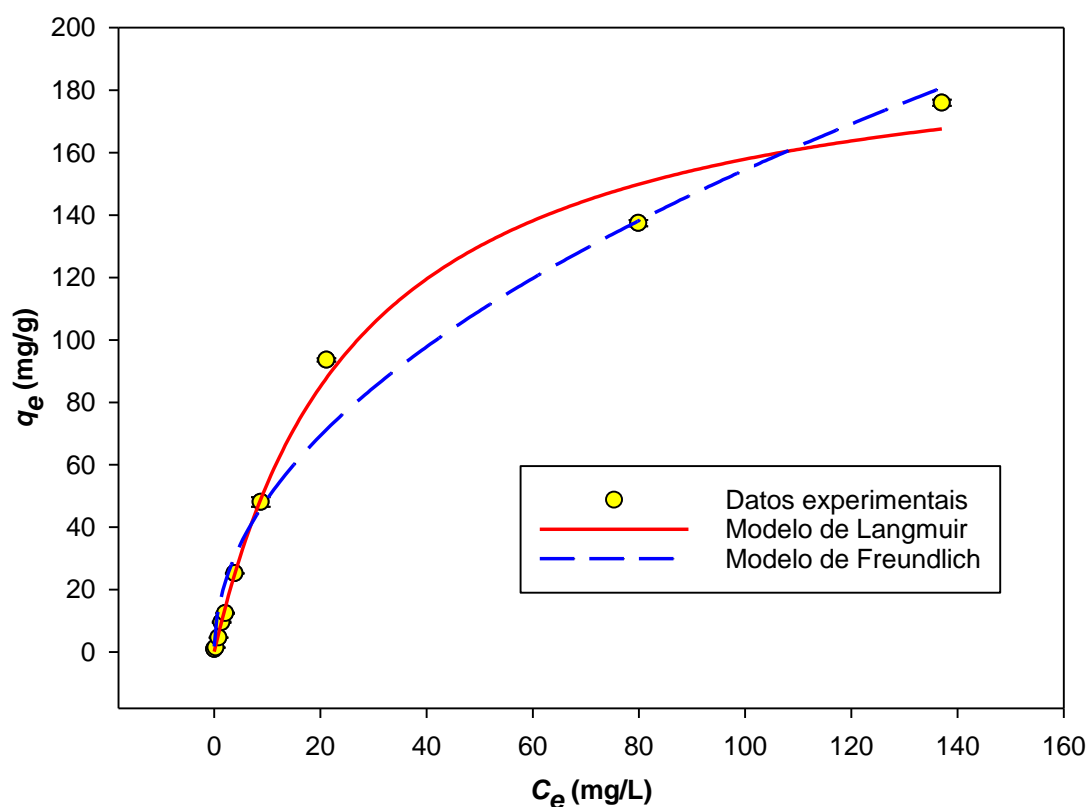


Fig. 8. Modelos de Langmuir e Freundlich axustados aos datos experimentais. Os valores representados son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

O modelo de Langmuir (Langmuir, 1918) asume unha adsorción de natureza química onde o colorante é adsorbido nunha cuberta en monocapa cuxos sitios de unión son homoxéneos, é dicir, idénticos entre si e coa mesma afinidade polo sorbato. As constantes obtidas neste estudo, axustando os datos experimentais ao modelo anteriormente descrito (figura 8), foron para a cantidade máxima de retirada (q_m) de $200,88 \pm 8,78$ mg/g e para a afinidade polo substrato (b) de $0,04 \pm 0,005$ L/mg (Táboa IV). Un maior valor de q_m e de b son favorables, pois o primeiro indica maior calidade do biosorbente, ao ser capaz de reter máis cantidade do contaminante, e o segundo unha maior afinidade entre sorbente e sorbato.

O factor de separación (figura 9) amosou valores entre 0 e 1 para todas as concentracións iniciais de contaminante ensaiadas, evidenciando un proceso de sorción moi favorable.

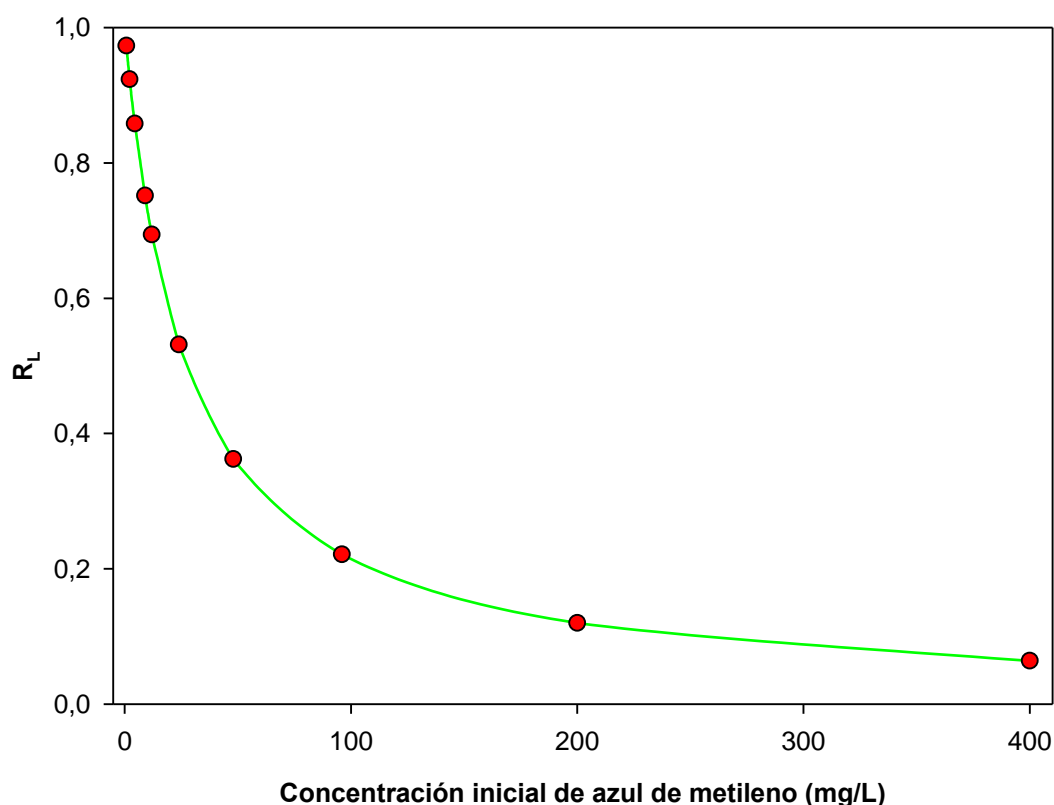


Fig. 9. Relación entre a concentración inicial de azul de metileno e o factor de separación (R_L).

O modelo de Freundlich (Freundlich, 1906) asume unha adsorción do colorante a unha superficie heteroxénea onde os sitios de unión teñen diferentes afinidades polas moléculas do sorbato. A constante K_f está relacionada coa capacidade de biosorción representando a cantidade de azul de metileno adsorbido, mentres que a constante n está relacionada co nivel de heteroxeneidade da superficie. En xeral, valores de n inferiores a 1 indican biosorción química, iguais a 1 unha biosorción lineal e superiores a 1 indican unha biosorción física. Canto maior sexa n , maior é a intensidade de adsorción existindo unha unión favorable entre adsorbato e sorbente. Os valores do coeficiente (K_f) e da intensidade (n) de adsorción obtidos para *C. moewusii* foron $15,57 \pm 3,05$ mg/g e $2,01 \pm 0,18$, respectivamente (Táboa IV).

Os altos coeficientes de regresión obtidos, R^2 (Táboa III), tanto para o modelo de Langmuir coma o de Freundlich foron $0,996 \pm 5,75$ e $0,988 \pm 10,35$ respectivamente. Estes coeficientes indican que ámbolos dous modelos se axustan moi ben aos datos experimentais. Non obstante, debido a que o valor do coeficiente para modelo de Langmuir é lixeiramente maior (Táboa IV), represéntaos máis fielmente e implica unha superficie de sorción da microalga que tende á monocapa.

Táboa IV. Valores das constantes de Langmuir e Freundlich. Os datos son o resultado da media das 3 réplicas coa súa desviación correspondente.

Constantes de Langmuir			Constantes de Freundlich		
q_m (mg/g),	b (L/mg)	R^2	K_f (mg/g)	n	R^2
$200,88 \pm 8,78$	$0,04 \pm 0,005$	0,996	$15,57 \pm 3,05$	$2,01 \pm 0,18$	0,988

Comparando a cantidade máxima de azul de metileno que diferentes biosorbentes poden retirar (Táboa V), vemos como o empregado neste estudo é un dos de maior eficacia ao retirar moita máis cantidade de colorante ca outras micro e macroalgas e tamén de sorbentes alternativos. Cabe destacar a gran diferenza existente entre *Chlamydomonas moewusii* e *Chlorella pyrenoidosa* xa que, a pesar de seren as dúas microalgas verdes de augas doces, a cantidade máxima de retirada da primeira supera en 100 mg/L a da segunda. Supera tamén, coa mesma marxe cá anterior, á macroalga parda *C. barbatula* e, en menor medida, ás algas vermellas *K.alvarezii* e *Gelidium sp.* Menos abrupta é a diferenza cos biosorbentes alternativos como a pel de pataca ou follas, onde a cantidade retirada é aproximadamente a metade cá da microalga testada no presente traballo. De entre os exemplos, só o fungo *Rhizopus arrhizus* e o carbón activado comercial superan a capacidade de biosorción de *C. moewusii*.

Táboa V. Cantidade máxima de retirada de azul de metileno por diferentes biosorbentes.

Biomasa	q_m (mg/g)	Referencia
Carbón activado comercial	980,3	Kannan & Sunsaram (2001)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	370,3	Aksu et al. (2010)
<i>C. moewusii</i>	$200,88 \pm 8,78$	Actual estudo
<i>Gelidium sp.</i>	171	Vilar et al. (2007)
<i>Bacillus subtilis</i>	169,4	Ayla et al. (2013)
Pel de pataca	105,26	Guechi & Hamdaoui (2016)
Follas caídas	96,15	Kong et al. (2015)
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	74,4	Vijayaraghavan et al. (2015)
<i>Cystoseira barbatula</i>	21,93	Caparkaya & Cavas (2008)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	20,8	Pathak et al. (2015)

5.3. Factor de Bioconcentración (FCB)

O factor de bioconcentración pode entenderse coma o número de veces que o contaminante se concentra dentro da microalga. Os valores obtidos para este factor amósanse na seguinte táboa (Táboa VI):

Táboa VI. Valores do factor de bioconcentración (BCF) nas diferentes concentracións iniciais de colorante ensaiadas.

Concentración (mg/L)	0,75	2,25	4,5	9	12	24	48	96	200	400
FCB (L/Kg)	1226,7	635,6	1028,9	1060	1036,7	1050	1001,3	975,2	687,1	439,9

En comparación cos valores calculados para o estudo de Caparkaya & Cavas (2008) con *Cystoseira barbatula*, todos próximos a 300 nas concentracións entre 5 e 100 mg/L de azul de metileno, a microalga do presente ensaio amosa claramente un maior factor de bioconcentración, o cal é un aspecto desexable nun estudo de biorremediación.

Moita maior é a diferenza entre os factores de bioconcentración se o colorante a retirar é colorante básico azul astrazon FGRL con *Caulerpa lentillifera*, que revela valores en torno a 50-60 ao variar as concentracións do contaminante entre 20 e 1280 mg/L (Marungrueng & Pavasant, 2006).

No caso do fungo *Rhizopus arrhizus* (Aksu et al., 2010) que era o único organismo da Táboa V que superaba a capacidade de biosorción de *C. moewusii*, posúe tamén un factor de bioconcentración inferior ao da microalga do presente estudo, concretamente, o máximo valor para este factor no seu caso é de 758,77 mentres que neste estudo é de 1226,7.

6. Conclusións / Conclusiones / Conclusions

Tras avaliar a capacidade de biosorción de azul de metileno pola microalga verde *Chlamydomonas moewusii* chegouse ás seguintes conclusións:

- *C. moewusii* é un biosorbente axeitado para a eliminación de azul de metileno de solucións acuosas.
- O tempo de contacto necesario para acadar o equilibrio da porcentaxe e da cantidade de retirada é de 90-120 minutos.
- O valor da cantidade máxima de retirada pola biomasa de *C. moewusii*, segundo o modelo de Langmuir (quen mellor describiu os datos experimentais), é de 200,88 mg/g.
- A biomasa de *C. moewusii* revelou un elevado valor para o factor de bioconcentración, o que denota a súa elevada capacidade para concentrar este colorante.

Tras evaluar la capacidad de biosorción de azul de metileno por la microalga verde *Chlamydomonas moewusii* se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- *C. moewusii* es un biosorbente adecuado para la eliminación de azul de metileno de soluciones acuosas.
- El tiempo de contacto necesario para alcanzar el equilibrio del porcentaje y de la cantidad de retirada es de 90-120 minutos.
- El valor de la cantidad máxima de retirada por la biomasa de *C. moewusii*, según el modelo de Langmuir (quien mejor describió los datos experimentales), es de 200,88 mg/g.
- La biomasa de *C. moewusii* ha revelado un elevado valor para el factor de bioconcentración, lo que denota su elevada capacidad para concentrar este colorante.

After evaluating biosorption capacity of methylene blue by green microalgae *Chlamydomonas moewusii* the following conclusions have been reached:

- *C. moewusii* is a suitable biosorbent for methylene blue removal from aqueous solutions.
- Contact time required to reach the equilibrium values of percentage and amount of dye sorbed is 90-120 minutes.
- Maximum removal amount value for *C. moewusii* biomass, according to Langmuir isotherm (which best described equilibrium data) is 200,88 mg/g.
- The biomass of *C. moewusii* has revealed a high value of bioconcentration factor, which means its high capacity to concentrate this dye.

• 7. Bibliografía

- Aksu, Z. (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochemistry*, 40 (3-4), 997–1026.
- Aksu, Z., Ertugrul, S., Dönmez, G. (2010). Methylene Blue biosorption by *Rhizopus arrhizus*: Effect of SDS (sodium dodecylsulfate) surfactant on biosorption properties. *Chemical Engineering Journal*, 158 (3), 474–481.
- Al-Fawwaz, A. T., & Abdullah, M. (2016). Decolorization of Methylene Blue and Malachite Green by Immobilized *Desmodesmus* sp. Isolated from North Jordan. *International Journal of Environmental Science and Development*, 7 (2), 95–99.
- Ali, H. (2010). Biodegradation of Synthetic Dyes—A Review. *Water Air Soil Pollut* 213, 251–273.
- Aravindhan, R., Rao, J. R. & Nair, B. U. (2007). Removal of basic yellow dye from aqueous solution by sorption on green alga *Caulerpa scalpelliformis*. *Journal of Hazardous Materials*, 142 (1-2), 68–76.
- Asgher, M. (2012). Biosorption of reactive dyes: A review. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223 (5), 2417–2435.
- Ayla, A., Çavuş, A., Bulut, Y., Baysal, Z., Aytekin, Ç. (2016). Removal of methylene blue from aqueous solutions onto *Bacillus subtilis* : determination of kinetic and equilibrium parameters. *Desalination and Water Treatment*, 51, 7596-7603.
- Brown, T. E., Richardson, F. L., Vaughn, M. L. (1967). Development of Red Pigmentation in *Chlorococcum wimmeri* (Chlorophyta: Chlorococcales). *Phycologia*, 6 (4), 167-184.
- Caparkaya, D. & Cavas, L. (2008). Biosorption of methylene blue by a brown alga *Cystoseira barbatula* Kützinger. *Acta Chimica Slovenica*, 55 (3), 547–553.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 25, 294–306.
- Daneshvar, N., Ayazloo, M., Khataee, A. R., & Pourhassan, M. (2007). Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource Technology*, 98 (6), 1176–1182.
- Fomina, M., & Gadd, G.M. (2014). Bioresource Technology Biosorption : current perspectives on concept , definition and application. *Bioresource Technology*, 160, 3–14.
- Forgacs, E., Cserhádi, T., Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: A review. *Environment International*, 30 (7), 953–971.
- Freundlich, H. (1906) Adsorption in solution. *Journal of Physical Chemistry*, 57, 384-410.
- Guechi, E.-K., & Hamdaoui, O. (2016). Biosorption of methylene blue from aqueous solution by potato (*Solanum tuberosum*) peel: equilibrium modelling, kinetic, and thermodynamic studies. *Desalination and Water Treatment*, 57 (22), 10270–10285.
- Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2017). *AlgaeBase*. Consultada o 23 de xaneiro de 2017 en <http://www.algaebase.org>

- Hall, K.R., Eagleton, L.C., Acrivos, A., Vermeulen, T. (1966). Pore and solid diffusion kinetics in fixed-bed absorption under constant-pattern conditions. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals*, 5 (2), 212-223.
- Hameed, B. H., Ahmad, A. L., Latiff, K. N. A. (2007). Adsorption of basic dye (methylene blue) onto activated carbon prepared from rattan sawdust, 75, 143–149.
- Kannan, N., & Sundaram, M. M. (2001). Kinetics and mechanism of removal of methylene blue by adsorption on various carbons—a comparative study. *Dyes and Pigments*, 51 (1), 25–40.
- Khataee, A. R., Zarei, M. & Pourhassan, M. (2009). Application of microalga *Chlamydomonas sp.* for biosorptive removal of a textile dye from contaminated water: modelling by a neural network. *Environmental Technology*, 30 (14), 1615–23.
- Kong, L., Gong, L., & Wang, J. (2013). Removal of methylene blue from wastewater using fallen leaves as an adsorbent. *Desalination and Water Treatment*, 53 (9), 2489-2500.
- Langmuir, I. (1918). The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical Society*, 40 (9), 1361–1403.
- Marungrueng, K. & Pavasant, P. (2006). Removal of basic dye (Astrazon Blue FGRL) using macroalga *Caulerpa lentillifera*. *Journal of Environmental Management*, 78 (3), 268–274.
- Maurya, R., Ghosh, T., Paliwal, C., Shrivastav, A., Chokshi, K., Pancha, I., Ghosh, A., Mishra, S. (2014). Biosorption of methylene blue by de-oiled algal biomass: Equilibrium, kinetics and artificial neural network modelling. *PLoS ONE*, 9 (10), 1–13.
- Nozaki, K., Beh, C. H., Mizuno, M., Isobe, T., Shiroishi, M., Kanda, T., et al. (2008). Screening and investigation of dye decolorization activities of basidiomycetes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105, 69–72.
- Pathak, V. V., Kothari, R., Chopra, A. K., Singh, D. P. (2015). Experimental and kinetic studies for phycoremediation and dye removal by *Chlorella pyrenoidosa* from textile wastewater. *Journal of Environmental Management*, 163, 270–277.
- Pérez, C. (2010). *Guía dos Microorganismos das Augas Continentais*. A Coruña (España): Bahía Edicións.
- Sikaily, A. El, Khaled, A., Nemr, A. El, Abdelwahab, O., (2016). Removal of Methylene Blue from aqueous solution by marine green alga *Ulva lactuca*. *Chemistry and Ecology*, 22 (2), 149-157.
- Vandevivere, P.C., Bianchi, R., Verstraete, W., (1998). Treatment and reuse of wastewater from the textile wet-processing industry: review of emerging technologies. *J. Chemical Technology and Biotechnology*, 72, 289–302.
- Vijayaraghavan, J., Bhagavathi Pushpa, T., Sardhar Basha, S. J., Vijayaraghavan, K., Jegan, J. (2015). Evaluation of Red Marine Alga *Kappaphycus alvarezii* as Biosorbent for Methylene Blue: Isotherm, Kinetic, and Mechanism Studies. *Separation Science and Technology*, 50 (8), 1120–1126.

- Vijayaraghavan, K., & Yun, Y. S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26 (3), 266–291.
- Vilar, V. J. P., Botelho, C. M. S. & Boaventura, R. A. R. (2007). Methylene blue adsorption by algal biomass based materials: Biosorbents characterization and process behaviour. *Journal of Hazardous Materials*, 147 (1-2), 120–132.
- Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S., Ang, H. M. (2014). Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 209, 172–184.