

UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DECANATO



TESIS

**Remoción de metales pesados (mercurio y plomo) de soluciones acuosas
sintéticas a diferentes concentraciones utilizando la microalga
dulceacuícola *Scenedesmus acutus*.**

PARA OPTAR EL TITULO PROFESIOAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTADO POR:

Br. Lucia Victoria Chulle Ramos

Br. Pablo Higinio Villalobos Barrios

PATROCINADORA

M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo

Lambayeque – Perú

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA

TITULO: Remoción de metales pesados (mercurio y plomo) de soluciones acuosas sintéticas en diferentes concentraciones utilizando la microalga dulceacuícola *Scenedesmus acutus*.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

**Br. Lucia Victoria Chulle Ramos
Br. Pablo Higinio Villalobos Barrios**

APROBADO POR:

**Dr. Jorge Oliva Nuñez
PRESIDENTE**

**Lic. Jorge Chanamé Céspedes
SECRETARIO**

**M. Sc. Josefa Ecurra Puicon
VOCAL**

**M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo
PATRICINADOR**

Lambayeque- 2016

AGRADECIMIENTOS

Nuestro especial agradecimiento a nuestros padres por el apoyo, guiarnos por el buen camino, brindarnos las facilidades necesarias con el fin de lograr el objetivo trazado para un futuro mejor y ser el orgullo de ellos.

Nuestros sinceros agradecimientos a la M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo, patrocinadora del presente estudio por brindarnos su apoyo y las facilidades para la culminación de esta investigación.

Al M.Sc. Jorge Fupuy Chung, por ser además de un buen maestro un buen amigo, por su confianza, paciencia y sobre todo los bien dirigidos consejos a lo largo del desarrollo de la investigación.

Al personal del laboratorio de Química Analítica, Biología General, en donde se realizaron parte de los experimentos.

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a Dios y a la Virgen María quienes supieron guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en las dificultades que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin desfallecer en el intento.

A mis padres, quienes me dieron la vida, educación y que han sabido formarme con buenos hábitos y valores; a mis hermanas, mi abuelita Victoria y mis tías Aurora y Elena por el apoyo incondicional y los buenos consejos.

A mis maestros y amigos por la motivación, tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra formación profesional.

Lucia Victoria Chulle Ramos

Dedico esta investigación a mis padres
quienes me dieron educación y apoyo.

A mi esposa Marianela quien me alentó para
continuar, cuando parecía que me iba a
rendir.

A mi nuevo amor Carime Tiamat que con su
llegada alegro mi vida.

A mis maestros quienes nunca desistieron al
enseñarme.

Pablo Higinio Villalobos Barrios

CONTENIDO

I.	INTRODUCCION	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS	5
	2.1. Contaminación ambiental por metales pesados	5
	2.1.1. Metales pesados	5
	2.1.2. Metales pesados y su impacto en el ambiente	6
	2.1.3. Mercurio	8
	2.1.4. Plomo	10
	2.2. Algas	11
	2.3. Microalgas	11
	2.3.1. <i>Scenedesmus acutus</i>	12
	2.4. Remoción de metales pesados	13
	2.4.1. Métodos tradicionales	14
	2.4.2. Métodos biológicos	14
	2.5. Remoción de metales pesados con algas	16
III.	MATERIALES Y METODOS	18
	3.1. Material	18
	3.1.1. Material biológico	18
	3.1.2. Población y muestra en estudio	18
	3.2. Métodos	19
	3.2.1. Diseño metodológico	19
	3.2.2. Esterilización y desinfección	20
	3.2.3. Purificación y conservación de <i>Scenedesmus acutus</i>	20
	3.2.3.1. Cultivo y mantenimiento	20
	3.2.3.2. Análisis de pureza	21
	3.2.3.3. Cultivo en medio sólido	22
	3.2.4. Secuencia del cultivo	23
	3.2.4.1. Cultivo en tubo de ensayo	23
	3.2.4.2. Cultivo en matraz	23

3.2.4.3. Cultivo en botella	24
3.2.5. Fases de crecimiento	25
3.2.5.1. Curva de calibración	26
3.2.5.2. Conteo celular	26
3.2.6. Toxicidad	26
3.2.7. Remoción de metales pesados (mercurio y plomo)	29
3.2.7.1. Medición de mercurio y plomo	29
3.2.8. Análisis de datos	30
IV. RESULTADOS	31
4.1. Purificación y conservación de <i>Scenedesmus acutus</i>	31
4.1.1. Análisis de pureza	31
4.2. Fases de crecimiento	31
4.3. Toxicidad	36
4.4. Remoción de mercurio y plomo con <i>Scenedesmus acutus</i>	42
4.4.1. Porcentajes de remoción	44
V. DISCUSION	45
VI. CONCLUSIONES	52
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIASBIBLIOGRAFICAS	54
IX. ANEXOS	66

RESUMEN

La creciente contaminación del agua por procesos industriales, agrícolas y actividades mineras, conlleva a una mayor necesidad de búsqueda de estrategias que eliminen contaminantes como compuestos de nitrógeno, fósforo, metales pesados y compuestos clorados; es por ello que surge una alternativa económica basada esencialmente en la capacidad de los microorganismos para degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes.

El objetivo del presente estudio es establecer los niveles de remoción de mercurio y plomo de soluciones acuosas sintéticas por la microalga *Scenedesmus acutus* y evaluar el efecto de éstos metales sobre el crecimiento celular. La microalga se cultivó en medio Bold's Basal modificado. Los cultivos fueron expuestos a diferentes concentraciones de plomo y mercurio en un rango de 5, 10, 15, 20 y 30 mg/L para los ensayos de remoción y toxicidad, en ambos casos se trabajó con un grupo control y tres réplicas, ajustándose a un modelo experimental con estímulo creciente. Para toxicidad, la concentración de 10mg/L de plomo estimuló el crecimiento celular, mientras que las concentraciones de 15, 20 y 30 mg/L ocasionaron una clara reducción, y las restantes sin influencia (5 mg/L y control); para mercurio, el cultivo algal fue afectado negativamente en todas concentraciones (5, 10, 15, 20 y 30 mg/L). En cuanto a remoción se obtuvieron porcentajes de 97,68% para plomo y 93% para mercurio después de 4 días de exposición a los metales, los niveles de remoción disminuyeron cuando las concentraciones de ambos metales se incrementaron.

Palabras clave: *Scenedesmus acutus*, ensayo de toxicidad, remoción de metales pesados.

ABSTRACT

The increasing pollution of water by industrial, agricultural and mining processes, leading to a greater need to search for strategies that remove pollutants such as nitrogen compounds, phosphorus, heavy metals and chlorinated compounds; It is why it has emerged an economical alternative based essentially on the ability of microorganisms to degrade naturally certain contaminant compounds.

The aim of this study is to establish the levels of mercury and lead removal from aqueous solutions by synthetic microalgae *Scenedesmus acutus* and evaluate the effect of these metals on cell growth. *Scenedesmus acutus* were cultured in Basal Bold's modified. The cultures were exposed to different concentrations of lead and mercury in a range of 5, 10, 15, 20 and 30 mg/L for testing removal and toxicity, in both cases we worked with a control group and three replicates, in line with an experimental model with increasing stimulus. In the toxicity test, the concentration of 10 mg/L lead positive influence on cell growth of *Scenedesmus acutus*, while concentrations of 15, 20 and 30 mg/L caused a significant reduction, and the remaining without influence (5 mg/L and Control). Moreover, as for the mercury, the algal culture was adversely affected in all concentrations (5, 10, 15, 20 and 30 mg/L). In the test, removal levels are observed up to 97,68% lead and 93% for mercury after 4 days of exposure to metals; as was observed at the end of the investigation, removal levels decreased when the concentrations of both metals increased. Thus *Scenedesmus acutus* is presented as an efficient alternative for the removal of mercury and lead in aquatic environments

Key words: *Scenedesmus acutus*, toxicity test, heavy metals removal.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Densidades celular promedio (DCP). Muestreo en Espectrofotómetro UV a 685 nm y en cámara de Neubauer (N° cel/mL x 10 ⁶).	32
Tabla 2. Valores de tasa de crecimiento (Ke), divisiones por día (K), tiempo de duplicación (Td) y numero de generaciones por día (n) de <i>Scenedesmus acutus</i> .	33
Tabla 3. Análisis de varianza de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	40
Tabla 4. Prueba de comparación múltiple de Dunnet de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	40
Tabla 5. Análisis de varianza de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	41
Tabla 6. Prueba de comparación múltiple de Dunnet de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	41
Tabla 7. Análisis de varianza de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	42
Tabla 8. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	43
Tabla 9. Análisis de varianza de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	43
Tabla 10. Prueba discriminatoria de Tukey ($\alpha=0,05$) de los valores promedio de la concentración celular de <i>Scenedesmus acutus</i> , por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control.	44
Tabla 11. Remoción de plomo Ci (concentración inicial), Cf (concentración final).	45
Tabla 12. Remoción de mercurio Ci (concentración inicial), Cf (concentración final).	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Scenedesmus acutus</i> bajo la luz del microscopio (100X), se observa su longitud promedio de 12,85 μm .	19
Figura 2. <i>Scenedesmus acutus</i> inoculado con 10 mL de cultivo algal y 90 mL de cultivo BBM, con agitación manual diaria.	21
Figura 3. Coloración Gram.	22
Figura 4. Cultivo de la solución algal en medio sólido.	22
Figura 5. Cultivo de <i>Scenedesmus acutus</i> en tubos de ensayo (1mL de cultivo algal y 9 mL de medio BBM).	23
Figura 6. 700 mL de cultivo de <i>Scenedesmus acutus</i> para determinar sus fases de crecimiento.	24
Figura 7. A) Inoculación de 70 mL de cultivo en fase exponencial en 630 mL de medio BBM. B) Adición de los metales en el cultivo algal en fase exponencial. C) Cultivos algales expuestos a diferentes concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con su control negativo. D) Cultivos algales expuestos a diferentes concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con su control negativo.	28
Figura 8. Filtrado de los cultivos algales luego de cuatro días de exposición a los metales en diferentes concentraciones.	30
Figura 9. Cultivo unialgal de <i>Scenedesmus acutus</i> bajo la luz del microscopio.	31
Figura 10. Gráfico de dispersión mostrando los resultados de las absorbancias de tres réplicas (M1, M2, M3) de <i>Scenedesmus acutus</i> en medio BBM.	34
Figura 11. Curva de crecimiento de los valores promedio de las absorbancias de <i>Scenedesmus acutus</i> en medio BBM.	34
Figura 12. Gráfico de dispersión mostrando los resultados del conteo celular en cámara de Neubauer de tres réplicas (M1, M2, M3) de <i>Scenedesmus acutus</i> en medio BBM.	35
Figura 13. Curva de crecimiento de los valores promedio del conteo celular en cámara de Neubauer de <i>Scenedesmus acutus</i> en medio BBM.	35

Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de plomo (mg/L) sobre el crecimiento (685nm) de <i>Scenedesmus acutus</i> cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua (40 Watts).	
Figura 15.1. Efecto de diferentes concentraciones de mercurio (mg/L) sobre el crecimiento (685nm) de <i>Scenedesmus acutus</i> cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua (40 Watts).	38
Figura 15.2. Efecto de diferentes concentraciones de mercurio sin la muestra control (mg/L) sobre el crecimiento (685nm) de <i>Scenedesmus acutus</i> cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua (40 Watts).	39
Figura 16. Porcentajes de remoción de plomo utilizando <i>Scenedesmus acutus</i> .	45
Figura 17. Porcentajes de remoción de mercurio utilizando <i>Scenedesmus acutus</i> .	46

I. INTRODUCCION

El incremento de la industria de manufactura y metal- mecánica, así como la minería, exige la extracción exhaustiva de metales pesados como materia prima, lo que conlleva a una elevada presencia de metales trayendo como consecuencia que los ambientes acuáticos presenten concentraciones de metales que exceden los criterios de calidad de agua (Guibal *et al.*, 2001). Los metales pesados bajo su forma iónica son vertidos a ríos y mares provenientes de industrias de plásticos, minería, pigmentos, fotografía, baterías y metalurgia, sin el debido control ambiental (Volesky, 1990).

Las características tóxicas de los metales pesados se pueden analizar desde diferentes puntos de vista: toxicidad a largo plazo, transformación a formas más tóxicas bajo ciertas condiciones, biomagnificación a través de la cadena alimenticia lo que puede poner en peligro la vida humana ocasionando efectos tóxicos y cambios teratogénicos en plantas, animales y el hombre (Shanab & Essa, 2007). La toxicidad de metales pesados ocurre, incluso a bajas concentraciones desde 1 a 10 mg/L; algunos metales tóxicos como el mercurio y cadmio, son muy tóxicos, incluso en concentraciones de 0,01 a 0,1 mg/mL. (Volesky, 1990; Wang, 2002; Alkorta *et al.*, 2004).

Perú siendo un país en donde se practica la minería no es ajeno a la contaminación de sus aguas por metales pesados; estudios realizados por la Autoridad Nacional del Agua (ANA) en cuencas de Madre de Dios encontraron elevados niveles de contaminación por cadmio, plomo, arsénico, mercurio, níquel y cobre superando los límites máximos poniendo en riesgo la salud de las poblaciones cercanas a estas cuencas, así como para la flora y fauna

que habitan estos ecosistemas (Autoridad Nacional del Agua, 2008). Situaciones similares ocurren en Cajamarca, la minería y contaminación de agua por el mal uso de sus desechos producto de esta actividad han llevado a la contaminación de sus ríos y lagos lo que produce el temor de sus habitantes, pues esta actividad se asocia a posibles afectaciones a los recursos naturales en el área de las poblaciones influenciadas por el proyecto minero y a la limitada responsabilidad social de algunas empresas (Brack *et al.*, 2011).

En Pasco, según el OEFA, la Administradora Cerro S.A.C., subsidiaria de Volcán Compañía Minera, empresa que extrae plomo, cobre y zinc, vierte sus desechos tóxicos sin tratar en la laguna Yanamate (Distrito de Chaupimarca, Pasco), lo que ha ocasionado una disputa entre estos dos organismos ya que según el OEFA, tanto el programa de adecuación y manejo ambiental (PAMA) –realizado en 1999– como el estudio de impacto ambiental (EIA) del 2008, aprobados para esta unidad minera, ordenaban que la operadora dejara de arrojar sus desechos tóxicos a Yanamate, cuyo cuerpo de agua debía ser recuperado al 2015 (El Comercio, 2015).

En nuestro país entre los principales agentes contaminantes identificados tenemos: el plomo, mercurio, aluminio, arsénico, magnesio, manganeso, hierro, cobre, cianuro, agregándose a éstos metales pesados el dióxido de azufre, y el ácido sulfúrico. Adicionalmente a ello se tiene la presencia cada vez mayor de las poblaciones ubicadas dentro del área de influencia de las actividades productivas entre ellas la minería (Ministerio de Salud, 2015).

Numerosos esfuerzos han sido realizados con el fin de eliminar los metales tóxicos de aguas de desecho, entre los que destacan micro-precipitación, electro deposición, ósmosis, adsorción, filtración, ultra centrifugación, resinas de intercambio iónico, etc., obteniendo

resultados satisfactorios. Desafortunadamente, dichos métodos no son efectivos a bajas concentraciones de metales pesados en disolución, tornándose altamente costosos y de bajo rendimiento a condiciones reales, además estas tecnologías generan una elevada cantidad de lodos altamente tóxicos y difíciles de tratar (Veglio *et al.*, 2003).

Actualmente, los procesos biotecnológicos, presentan un gran interés por la variedad de métodos detoxificantes de metales pesados (Bishop, 2002; Volesky, 2001). Un claro ejemplo es la biorremediación, que es un proceso biotecnológico donde se utiliza biomasa viviente (bacterias, levaduras, hongos, algas y plantas superiores) para remover y/o recuperar sustancias contaminantes (metales pesados, aniones, radionúclidos) del suelo, gases o agua (Pellón *et al.*, 2003; Alguacil & Merino, 1998).

El microorganismo más estudiado y utilizado en las últimas décadas para la remoción de metales tóxicos en ecosistemas acuáticos son las microalgas debido a su capacidad de acumular en cierta medida cantidades de metales pesados a partir de soluciones acuosas diluidas. Estos microorganismos tienen el potencial como bioproceso para hacer frente a los problemas mundiales de contaminación por metales pesados debido a su amplia presencia en la naturaleza y asimilación metabólica con crecimiento continuo, siendo candidatas ideales para realizar estudios de bioacumulación de metales llegándose a obtener resultados más eficientes, rápidos y económicos en comparación con los métodos físico químicos (Arunakumara *et al.*, 2007).

Por lo antes expuesto, las microalgas constituyen una poderosa herramienta para la eliminación de metales, así mismo se presenta como una alternativa eficiente y económica viable, pues se trata de un proceso rápido que permite tratar volúmenes de agua con bajas concentraciones de metal ya que han sido útiles para ofrecer información sobre la calidad

del agua, y son consideradas como el más promisorio de todos los indicadores de alerta temprana de cambios en las características ecológicas de sistemas acuáticos, éstas constituyen el primer eslabón de la cadena trófica, y se destacan por su sensibilidad a los efluentes industriales, de aquí que constituyan una herramienta válida en el monitoreo y control de la contaminación, de la que se pueden considerar indicadores primarios. Es por ello que la utilización de *Scenedesmus acutus* sería una opción viable debido a su capacidad de tolerar y remover metales pesados de soluciones acuosas.

El poco desarrollo de esta línea de investigación en la región, nos impulsa más a desarrollar este trabajo de investigación, en la que se propone la siguiente inquietud: **¿Cuál es el nivel de remoción de metales pesados (mercurio y plomo) por la microalga dulceacuícola *Scenedesmus acutus* en soluciones acuosas sintéticas y el efecto de éstos metales sobre su crecimiento celular?** Con el fin de dar respuesta a estas interrogantes se plantearon como objetivos; establecer los niveles de remoción de mercurio y plomo por la microalga *Scenedesmus acutus*, y determinar el efecto de éstos metales sobre el crecimiento celular de *Scenedesmus acutus*.; planteándose para tales fines la siguiente hipótesis: los metales pesados son removidos en niveles mayores al 65% de las soluciones acuosas sintéticas después de ser tratadas con la microalga *Scenedesmus acutus*; se espera que el crecimiento de *Scenedesmus acutus* sea favorable en las diferentes concentraciones de los metales tratados. De esta manera se presenta a *Scenedesmus acutus* como agente removedor de metales pudiéndose obtener los máximos beneficios de este microorganismo que sin duda será de gran importancia para investigaciones posteriores, así como de gran contribución para la comunidad.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

2.1. Contaminación ambiental por metales pesados

2.1.1. Metales pesados

Los metales son componentes naturales de la corteza terrestre. Existen, sin embargo, otros de origen antropogénico, como las actividades industriales, agrícolas, mineras y ganaderas (Chapman *et al.*, 2003; Ouyang *et al.*, 2006). Algunos de ellos tienen un papel importante en los organismos al ser parte fundamental de sus funciones bioquímicas y fisiológicas, presentándose como oligoelementos imprescindibles para el mantenimiento de los sistemas bioquímicos de los seres vivos, como, por ejemplo, el cobre, el manganeso o el zinc, que son esenciales en el metabolismo (Bengtsson *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2004). Entre tanto, los metales como el cadmio, plomo y mercurio son no esenciales (no cumplen una función biológica conocida) y son conocidos por causar diversos daños en organismos a muy bajas concentraciones (Mejía, 2006). Pueden actuar también como potentes tóxicos, tanto para los seres humanos como para los ecosistemas, según cuáles sean sus vías de exposición, la dosis absorbida y la naturaleza química del metal (Llobet *et al.*, 2004; Rodríguez & Formoso, 2005).

Existe controversia al especificar que es un metal pesado, pues no se dispone de una definición oficialmente aceptada ni de un listado de estos elementos, ni de sus propiedades o caracteres específicos que provengan de alguna sociedad científica u organismo referente como la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) o la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los EUA) (Hawkes, 1997). Sin embargo se están empleando criterios para definir los metales pesados, utilizando para ello la densidad, peso atómico y número atómico (Duffus, 2002). Los metales pesados son clasificados en tres grupos de

acuerdo con Wang et al., (2009) en metales tóxicos: Cr, Hg, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn; metales preciosos: Pt, Pd, Ag, Au, Ru; y radionucleótidos: U, Th, Ra, Am.

Una posible definición de metal se basa en la gravedad específica: “metal pesado es aquel metal con gravedad específica $> 5 \text{ g/cm}^3$ ”, sin embargo, ésta definición no es útil respecto al estudio de los efectos toxicológicos que algunos metales tienen sobre el ambiente y los seres vivos, así que otra definición de metal pesado que se ha adoptado es “grupo de metales o metaloides asociados con contaminación y toxicidad potencial” (Cornelis & Nordberg, 2007).

2.1.2. Metales pesados y su impacto en el ambiente

Los metales pesados están generalmente relacionados con la degradación ambiental, ya que producen alteraciones en la calidad de agua y suelo. Estas alteraciones tienen un impacto directo en el equilibrio de los ecosistemas, afectando directa o indirectamente a la salud de los seres humanos, siendo que algunos de esos metales son capaces de provocar efectos tóxicos agudos y cáncer (Batista & Freire, 2010).

La contaminación ambiental proveniente de efluentes industriales ha agravado la situación de degradación del ambiente y el equilibrio de los ecosistemas naturales. Uno de los compuestos más preocupantes encontrados en los efluentes son metales tóxicos, los cuales se presentan nocivos al ambiente y a la salud humana debido a su capacidad de bioacumulación y de su alto tiempo de permanencia en el medio. De acuerdo a la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), los metales tóxicos son: arsénico, cromo, cobalto, níquel, cobre, zinc, cadmio, mercurio, titanio, selenio y plomo. La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) considera entre sus sustancias más peligrosas al plomo, mercurio,

arsénico y cadmio. Los efectos carcinogénicos de los metales pesados y metaloides también han sido estudiados ampliamente (Cañizares, 2000; Garza *et al.*, 2010, Pellón *et al.*, 2003; Villanueva & Tapia, 2005). La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica las sustancias de acuerdo a su condición carcinogénica. En el grupo 1 (Carcinógeno Humano) se encuentran los compuestos del cromo (VI), arsénico orgánico e inorgánico, cadmio, fierro (durante exposición ocupacional) y níquel; en el grupo 2 (Probable Carcinógeno Humano) se enlista el plomo inorgánico y sus compuestos (IARC, 2012). Los efectos que estos elementos tienen sobre la salud del ser humano dependen de la naturaleza del compuesto, la ruta de exposición, la dosis de exposición y el tiempo de exposición. Actualmente una de las más importantes rutas de exposición es la ingesta de agua debido a la contaminación de acuíferos (Mejia, 2006; Richmond, 2004).

Según el Ministerio del Ambiente, señala que el deterioro de la calidad de agua peruana se debe a que en ella se vierten efluentes domésticos e industriales (minería, agroquímica), conteniendo residuos químicos de actividades ilícitas, lixiviados provenientes de relaves de la minería. Esto se está volviendo un problema cada vez más grave ya que afecta la calidad de muchos ríos, entre ellos Madre de Dios, Rímac, Mantaro, Cajamarca, Espinar (Cusco), Llaucano, Santa, Chira, Chili. (Brack *et al.*, 2014).

Los límites máximos permisibles aprobados por el Estado Peruano mediante Decreto Supremo N° 010-2010-MINAM, para la descarga de efluentes líquidos de Actividades Minero- Metalúrgicas que se desarrollen en el territorio nacional, fueron para el plomo total de 0,2 mg/L y para mercurio total 0.002 mg/L (El Peruano, 2010).

2.1.3. Mercurio

El Mercurio cumple una serie de requisitos que lo vuelven sujeto de la atención por parte de Salud Pública ya que presenta un peligro significativo (OMS, 2003). Deriva de la palabra griega hydrargyros, (“agua plateada”). Los romanos lo denominaron Argentum Vivum, (“Plata viva”). Ocupa la zona de los metales en la Tabla Periódica de los elementos, con número atómico 80, y símbolo químico “Hg”; es el único metal que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente (Yang *et al*, 2000).

Las mayores fuentes naturales de mercurio son las emisiones de los volcanes, la erosión de las rocas y la evaporación desde los cuerpos de agua. Las principales fuentes antrópicas provienen de actividades relacionadas con extracción de recursos naturales: recuperación de metales preciosos, yacimientos petrolíferos y carboníferos. El Mercurio llega a las fuentes superficiales de agua desde las redes de lixiviados, deforestación de territorio, volcado de aguas residuales de industrias en cuencas afluentes, contaminación ‘gota a gota’ desde fuentes domésticas, residuos, y principalmente de actividades mineras (Yang *et al.*,2000).

Las vías de ingreso del mercurio al organismo son la dérmica, inhalatoria, parenteral y digestiva, según la Organización mundial de la Salud los valores máximos permisibles para mercurio en agua es 1ug/L de mercurio total. En adultos expuestos continuamente puede provocar una disminución en la capacidad visual y auditiva, así como deficiencias en el sentido del olfato, gusto y tacto (Li, 2008). La exposición al mercurio ha sido asociada con infartos de miocardio, autismo, fibromialgias, síndrome de fatiga crónica, lupus eritematoso sistémico, demencia, mal de Parkinson, Alzheimer, esclerosis múltiple, cuadros metabólicos, hormonales, renales, dermatológicos. Si bien la discusión científica no está cerrada para varios de estos efectos y el tipo y grado de asociación todavía no está

establecida, la diversidad y la gravedad de los cuadros explican la preocupación de profesionales y población general respecto de la exposición a compuestos de Mercurio (OMS, 2003; Casarett & Doull, 2005). Se conoce que una madre contaminada por mercurio le transmite al feto gran cantidad del mercurio presente en su cuerpo ya que los tejidos fetales nuevos tienen mayor afinidad para unirse al metilmercurio que los tejidos viejos de la madre. Por lo tanto, al entrar en contacto el feto con este compuesto, se ve afectada la formación de su sistema nervioso central lo que trae graves consecuencias cerebrales (Shigeo, 2007; Harada, 1968).

Existen diversas opiniones que establecen los niveles de mercurio permitidos, la Organización Mundial de la Salud, concluyó a través de varios estudios que valores menores a 50 μg de mercurio/g de cabello no presenta un riesgo significativo a la salud de la población adulta (hombre o mujeres no embarazadas) (United States Environmental Protection Agency, 1997).

Un claro ejemplo de intoxicación por mercurio ocurrió en los primeros días de Junio del año 2000 un camión vinculado a Newmont (empresa que explota el yacimiento minero, en las cercanías de Cajamarca) derramó en Choropampa, en las inmediaciones de la mina, 150 kilogramos de mercurio a lo largo de varios kilómetros. Los pobladores, pensando que el mercurio contenía oro, lo recogieron; algunos de ellos incluso lo llevaron a sus casas. 72 horas después, aparecen los primeros casos de intoxicación en pobladores. Para fines de julio se habían identificado aproximadamente 67 hogares con datos de contaminación por mercurio, las lecturas aproximadas de mercurio que se encontraron en aire fueron por debajo de 0,001 mg/m^3 , pero por encima de 0,0003 mg/m^3 (Fuente: “Investigación del derrame de mercurio del 2 de junio del 2000 en las cercanías de San Juan).

2.1.4. Plomo

Se considera como metal pesado y se ha convertido en el contaminante ambiental más importante, como resultado de las actividades industriales y mineras que se realizan con este metal (Yang et al., 2005).

A través de los siglos, el plomo se hizo esencial en la manufactura de municiones, baterías, compuestos químicos, explosivos, cristalería, productos de metal, gasolina, y pintura. Sin embargo, el problema es que es un metal tóxico (Yang *et al*, 2000).

El plomo (Pb) tiene múltiples aplicaciones en la industria y se utiliza tanto en forma sólida como líquida, generando polvo, humos o vapores, según se realicen unas operaciones u otras. Las actividades de alto riesgo a exposición de plomo son metalurgia, industrias de construcción (tubos fontanería), fabricación de acumuladores eléctricos (baterías), soldadura, tratamientos térmicos, fabricación de explosivos, fabricación y utilización de pinturas, esmaltes, barnices; industrias de plástico (Zuzendaritza, 1986).

Se ha probado que el plomo es un agente potencialmente mutagénico, teratogénico y cancerígeno. Las rutas de exposición a este meta pueden ser mediante inhalación o ingesta, concentrándose en órganos del cuerpo donde forman complejos con muchas biomoléculas causando a nivel del aparato digestivo: cólico saturnino con dolor, vómitos y estreñimiento; a nivel del sistema nervioso: encefalopatía saturnina con convulsiones y coma que conduce a la muerte en dos o tres días. También puede presentarse en forma de delirio o psicosis tóxica; a nivel renal: albuminuria, cilindruria, oliguria, a veces hay afectación hepática pudiendo aparecer desde una necrosis hepática hasta una ligera citólisis (Sanz *et al.*, 1987). Los niños expuestos corren el riesgo de un desarrollo deteriorado, disminución del coeficiente intelectual, hiperactividad. Es probable que el plomo sea un agente selectivo que

continúa actuando e influenciando a la estructura genética y en la futura evolución de la flora y fauna expuesta a este metal (Henry, 2000; Johnson, 1998).

2.2. Algas

Las algas son organismos acuáticos, fotoautótrofos oxigénicos y poco complejos morfológicamente, son organismos muy antiguos y diversos y que no tienen todos un origen común, sus aparentes semejanzas morfológicas y anatómicas se deben a su adaptación primaria al medio acuático. Son organismos que no se diferencian en raíces, tallos y hojas (Lee, 2008; Bellinger & Sigeo, 2010).

Estos organismos acuáticos van desde seres microscópicos unicelulares hasta organismos multicelulares que forman colonias grandes y vistosas. Las algas realizan una de las mayores aportaciones de oxígeno al planeta; se estima que participan con cerca del 50% de la fotosíntesis global. Actualmente el término alga se refiere a organismos que tienen células con núcleo (Eucariontes) y se excluyen las algas-verde azules pertenecientes al reino de las bacterias (Phylum Cyanobacteria) (Woese et al. 1990).

La gran diversidad de algas se reúne en un grupo con parentescos diversos (polifilético). Los grupos más importantes y conocidos pertenecen a dos reinos distintos: las algas verdes (División Chlorophyta) al reino Plantae y las rojas (Phylum Rhodophyta) y pardas o cafés (Phylum Heterokontophyta) pertenecen al reino de Protista (Barsanti & Gualtieri, 2006).

2.3. Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares eucariotas fotosintéticos capaces de transformar la energía luminosa en energía química con una eficiencia cuatro veces superior a la de las plantas. Su importancia radica en su papel como productores primarios de la

cadena trófica, que las constituyen en las primeras formadoras de materia orgánica. Por su tamaño reducido y variado (5–50 μm en promedio) son de fácil captura y digestión por multitud de organismos que se alimentan en forma directa del fitoplancton (Abalde, 2004).

Muchas especies se encuentran como células individuales, forma de bastón o fusiforme, otros forman colonias multicelulares. Algunas colonias son simples agregados de células idénticas, unidas después de la división; muchas otras se componen de diferentes tipos de células especializadas para determinadas funciones. (Peng *et al.*, 2002).

Las condiciones óptimas de temperatura, intensidad luminosa, salinidad, nutrientes y pH para el cultivo de microalgas, varían ampliamente de una especie a otra, estos parámetros fisicoquímicos, han sido determinados en laboratorio y nos ayudan a comprender las condiciones óptimas para el desarrollo de las diferentes especies en cultivo. Actualmente a nivel comercial, los cultivos masivos de microalgas al exterior y los fotobiorreactores cobran mayor importancia para la producción de compuestos químicos de alta pureza, como: biocombustibles, biofertilizantes, intercambiadores iónicos y carotenos; así mismo, para el tratamiento de aguas residuales, obtención de compuestos terapéuticos y como alimento de consumo humano y animal (Contreras-Flores *et al.*, 2003). Son consideradas importantes para la vida en la tierra debido a que producen aproximadamente la mitad del oxígeno atmosférico y usan simultáneamente el CO_2 ambiental para crecer foto autotróficamente (Peng *et al.*, 2012).

2.3.1. *Scenedesmus acutus*

Scenedesmus está clasificada botánicamente en el reino Plantae, división Chlorophyta, clase Chlorophyceae, orden Chlorococcales, familia Scenedesmaceae, género Scenedesmus. Esta familia se caracteriza por tener individuos cenobiales de 2, 4, 8 o 16 células. Las células

pueden tener forma elipsoidal, oblonga o fusiforme que se agrupan en un plano en el eje longitudinal. Algunas veces, las células forman dos hileras alternas donde las células terminales de la fila difieren en forma y ornamentación. (Komarek, 1985; Cronquist, 1982, 1977).

Scenedesmus es un alga cenobial que frecuentemente se presenta casi como un cultivo puro en el plancton. Las células en la colonia se organizan en múltiplos de dos, las especies más comunes presentan cuatro u ocho células, y estas pueden ser elipsoides, ovoides o en forma de media luna, la pared celular es lisa y no presenta espinas. Presentan un cloroplasto parietal y usualmente tiene un pirenoide. Este es probablemente el género de Chlorococcales más comúnmente reportado y frecuentemente abundante en aguas ricas en nutrientes, especialmente con un alto contenido de nitrógeno. La reproducción, que en muchas especies es totalmente asexual, se realiza mediante la formación de autocolonias en el interior de cada célula adulta. Dichas autocolonias quedan en libertad por ruptura de la pared de la célula madre y después alcanzan gradualmente el tamaño y la ornamentación característica de la especie. Dentro de este género, *Scenedesmus acutus* es una especie ampliamente estudiada y cultivada principalmente como fuente de alimento en la industria de la piscicultura (González, 2010).

2.4. Remoción de metales pesados

El término biorremediación, acuñado a principios de la década de los '80, proviene del concepto de remediación que hace referencia a la aplicación de estrategias físico-químicas para evitar el daño y la contaminación del suelo. En el caso particular de la biorremediación se centra en la remediación “biológica”, basada esencialmente en la capacidad de los microorganismos para degradar en forma natural ciertos compuestos contaminantes; los

sistemas biológicos frecuentemente utilizados son microorganismos o vegetales. La biorremediación permite entonces reducir o remover los residuos potencialmente riesgosos presentes en el ambiente (European Federation of Biotechnology, 1999), ofreciéndose una opción que permite destruir o volver inofensivos diversos contaminantes utilizando actividad biológica natural (Vidali, 2002). Sin embargo, la estrategia de la biorremediación para metales pesados, aún no ha sido totalmente desarrollada, ni aplicada a gran escala (Volesky 1999).

2.4.1. Métodos tradicionales

Para la eliminación de contaminantes metálicos de soluciones acuosas, se han aplicado tanto métodos físicos como químicos. Sin embargo, todos ellos presentan ciertas desventajas, entre ellas su elevada relación costo-efectividad, la generación de productos peligrosos o su ineficiencia cuando la concentración de metales está por debajo de 100 mg/L (Cañizares, 2000; Cuizano & Navarro, 2008; Sheng et al., 2004).

2.4.2. Métodos biológicos

Marivela *et al.* (2002) señalan que el proceso de biorremediación puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico en los siguientes tipos:

- Fitorremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos. Un ejemplo de la fitorremediación la constituye el uso de la especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio. Lombi et al. (2001) encontraron que el uso de esta especie lograba eliminar más de 8 mg/Kg de cadmio y 200 mg/Kg de zinc,

representado estos valores el 43 y 7 por ciento de estos metales en un suelo agrícola, respectivamente.

- Biorremediación animal. Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener los metales pesados.
- Biorremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

La biorremediación no es más que el empleo de sistemas biológicos (bacteria, algas, hongos, levaduras y plantas superiores) para eliminar los contaminantes del suelo, agua o gases (Sanchez *et al.*, 1999). Esta herramienta de la ciencia incluye la fitorremediación y la biosorción. En el primer caso, se utilizan las plantas para la eliminación y/o recuperación de contaminantes y, en el segundo caso, se utilizan microorganismos. A diferencia de otros, esta tecnología es uno de los métodos más baratos entre los muchos que se usan para el tratamiento de desechos peligrosos; puede llevarse a cabo en el sitio de contaminación y causa la mínima alteración física alrededor del área tratada (Lovey & Coates, 1997; Alguacil & Merino, 1998; Volesky, 1999).

Entre las ventajas que presenta este importante potencial biotecnológico con respecto a las tecnologías tradicionales utilizadas para la descontaminación ambiental, están: (1) los

compuestos químicos tóxicos son destruidos o eliminados del ambiente y no simplemente separados, (2) Requiere menos energía en comparación con otras tecnologías, (3) es un proceso natural, (4) puede llevarse a cabo *in situ* sin causar interrupción de las actividades normales (Alguacil & Merino, 1998).

Las microalgas, un microorganismo utilizado en la biorremediación, poseen una alta tolerancia a concentraciones elevadas de metales pesados. Asimismo, por ser muy susceptibles a la toxicidad de los metales son utilizadas como sensores biológicos para detectar sus efectos tóxicos potenciales (Richmond, 2004).

La bioacumulación de metales por las microalgas, puede representar un método factible para el tratamiento de aguas residuales que contengan iones metálicos en solución. De esta manera la biorremediación se está convirtiendo en una técnica cada vez más aplicada para la limpieza de contaminantes, así mismo las investigaciones en este campo se están incrementando de manera satisfactoria (Juwarkar *et al.*, 2010).

2.5. Remoción de metales pesados con algas

Numerosos estudios han documentado la utilización de algas para remover metales pesados como un método alentador y efectivo de biorremediación. Estos estudios toman en consideración varios factores, como el alga empleada, pH, concentración del metal, los componentes o las formas químicas del metal, la temperatura, presencia de oxígeno y la luz.

Se ha demostrado que las microalgas son capaces de absorber metales pesados de las soluciones acuosas, especialmente a una concentración de metales por debajo de 50 mg/l; las microalgas que remueven metales pesados pueden estar metabólicamente activas o inactivas, libres o inmovilizadas (Davis *et al.*, 2003). Se encuentran en todas las partes del

mundo, distribuidas principalmente en medios acuáticos, aunque también sobre la superficie de todos los tipos de suelos (Richmond, 2004).

Las algas ofrecen diversas ventajas para la remoción de metales, debido a que contienen muchos sitios poli funcionales de unión para complejos metálicos en su superficie, ya sean especies aniónicas o catiónicas (Karnika *et al.*, 2007).

Khoshmanesh *et al* (1997), señalan que las microalgas son más eficientes en la remoción de metales pesados en comparación con las bacterias y hongos. Probablemente porque los procesos llevados a cabo por microalgas vivas están asociados con actividades metabólicas y fotosintéticas. Además, menciona que las microalgas poseen una alta tolerancia a concentraciones elevadas de metales pesados.

Se ha demostrado también el uso de algas marinas para la remoción de metales pesados, tal es el caso de *Sargassum sp* en el cual se demostró que la cinética de bioabsorción de cromo por la biomasa del alga marina *Sargassum sp.* es relativamente rápida, con cerca de 70% de capacidad de bioabsorción siendo alcanzada en 10 minutos de contacto (Sala, 2000).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. Material

3.1.1. Material biológico

El material biológico estuvo conformado por un cultivo microalgal dulceacuícola donado por el laboratorio de Planctología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, dicha muestra se utilizó como una muestra piloto; para la experimentación, la muestra estuvo conformado por un cultivo donado por el docente Merino Moya, catedrático de la Universidad Nacional de Santa, Chimbote.

3.1.2. Población y muestra en estudio

La población estuvo constituida por la microalga *Scenedesmus acutus* y la muestra estuvo conformada por 550 ml de cultivo, la cual fue previamente identificada por el Dr. Manuel Fernández Honores, catedrático de la Universidad Nacional de Trujillo, basándose en la morfología, disposición celular, tamaño, núcleo, forma, tipo de reproducción. (Figura 1).

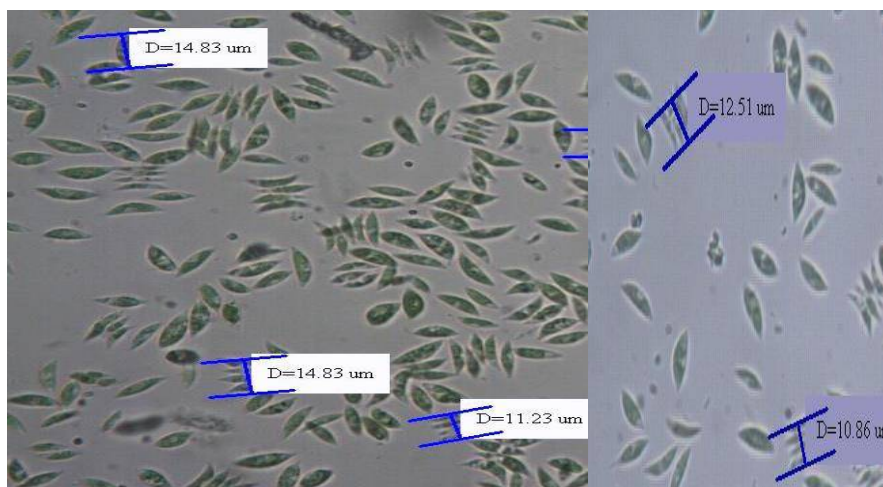
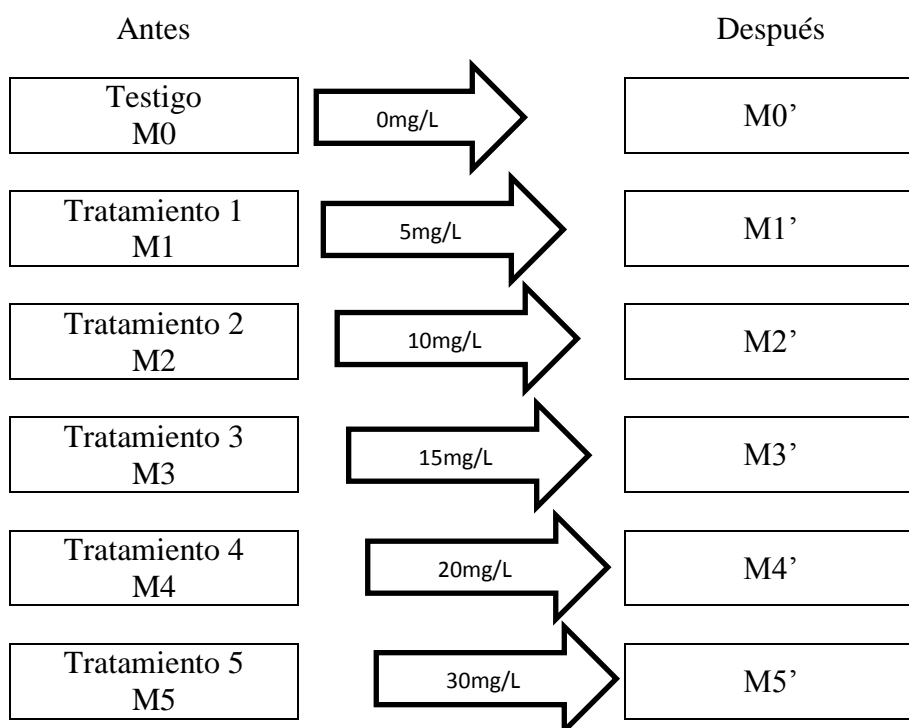


FIGURA 1. *Scenedesmus acutus*, bajo la luz del microscopio (100 X), se observa su longitud promedio de 12.85 μm .

3.2. Métodos

3.2.1. Diseño metodológico

Para determinar el efecto *in vitro* de la microalga dulceacuícola *Scenedesmus acutus* sobre la remoción y toxicidad de mercurio y plomo presentes en soluciones acuosas sintéticas se realizó un estudio de tipo experimental con ensayos independientes y tres repeticiones para todos los tratamientos, siguiendo los lineamientos de un Diseño experimental de estímulo creciente (Laporte, 1993; Zavaleta, 1990), como se aprecia en el siguiente gráfico.



3.2.2. Esterilización y desinfección

La desinfección del área de trabajo se hizo con etanol al 70%. Para la limpieza de los materiales de vidrio se utilizó detergente e hipoclorito de sodio y varios lavados con abundante agua, esto se hizo con la finalidad de eliminar residuos que puedan afectar los resultados.

Para los medios de cultivo y soluciones se utilizó la autoclave a 15 libras/pulgada² por 20 minutos. La presencia de un mechero fue requerido para la siembra, transferencia y manipulación de la cepa. (Romo, 2002).

3.2.3. Purificación y conservación de *Scenedesmus acutus*

3.2.3.1. Cultivo y mantenimiento

El cultivo microalgal de *Scenedesmus acutus* fue obtenido del Laboratorio de Ficología de la Universidad Nacional del Santa, para la parte de experimentación se usaron instalaciones de la Universidad de San Martín de Porres, así como un microscopio LEICA MD 1000 con cámara incorporada y el programa LAEZ para captura de imágenes in vivo desde el microscopio.

Para el cultivo de *Scenedesmus acutus*, 10 ml de cultivo algal fue inoculado en un matraz (estéril y taponado con algodón) conteniendo 90 ml de medio de cultivo líquido Bold's Basal Medium (BBM) (Ramírez & Mendoza, 2008) modificado (Anexo 1). Los matraces se inocularon a temperatura ambiente, bajo iluminación continua (24 horas) con lámparas fluorescentes de luz blanca (40 watts), sin aireación y con una agitación manual diaria. (Figura 2).



FIGURA 2. *Scenedesmus acutus* inoculado con 10 mL del cultivo algal y 90 mL de medio BBM, con agitación manual diaria.

3.2.3.2. Análisis de pureza

Después de 5 días, los cultivos algales contenidos en los matraces fueron analizados para descartar su contaminación por rotíferos, bacterias y otros géneros de microalga. Para determinar la presencia de rotíferos se retiró aproximadamente 2 ml del cultivo con ayuda de una pipeta Pasteur colocando una gota en medio de un porta objetos, se cubrió con un cubreobjetos y se observó directamente al microscopio. Para las bacterias se realizó una coloración Gram (Anexo 2) y fue observada en el microscopio a 100X (Figura 3).



FIGURA 3. Coloración Gram para verificar contaminación por bacterias

3.2.3.3. Cultivo en medio sólido

Esta técnica se realizó en una placa Petri previamente esterilizada conteniendo medio BBM enriquecido con agar 2%, se colocó una gota de cultivo algal purificado. Se incubó durante 6 a 8 días, a temperatura ambiente, iluminación continua, hasta notar la presencia de colonias; posteriormente se llevó a refrigeración. Esto se realizó con la finalidad de conservar la sepa de *Scenedesmus acutus*. (Figura 4).



FIGURA 4. Cultivo de la solución algal en medio sólido.

3.2.4. Secuencia del cultivo

3.2.4.1. Cultivo en tubo de ensayo

Con la ayuda de una pipeta Pasteur se tomó 1mL de cultivo microalgal, se vertió en un tubo de ensayo conteniendo 9 mL de medio BBM, este proceso se repitió 3 veces. Los tubos inoculados se agitaron dos veces al día, se colocaron a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes (40 Watts) de luz blanca y sin aireación (Figura 5). El recambio se realizó cada 15 días conteniendo medio de cultivo nuevo.

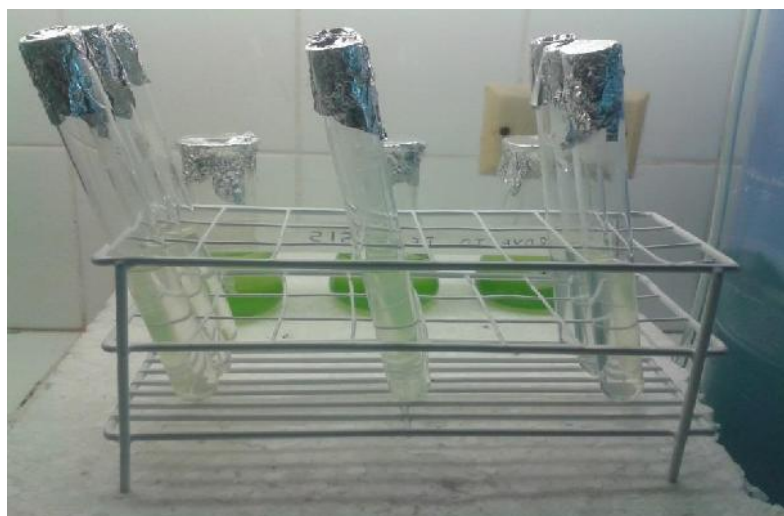


FIGURA 5. Cultivo de *Scenedesmus acutus* en tubos de ensayo (1mL de cultivo algal y 9mL de medio BBM).

3.2.4.2. Cultivo en matraz

Después de 15 días, el contenido del tubo de ensayo fue vertido en un matraz de 250 mL de capacidad que contenía 90 mL de medio de cultivo. Los matraces inoculados se agitaron dos veces al día con la finalidad de evitar que las células se sedimenten y mueran; fueron colocados a temperatura ambiente, iluminación continua (lámparas fluorescentes de 40 Watts) de luz blanca y sin aireación. Este procedimiento se realizó por triplicado. La nueva

inoculación se realizó 7 días después de la siembra de botellas de vidrio de 1L de capacidad conteniendo medio de cultivo nuevo (Romo, 2002).

3.2.4.3. Cultivo en botella

En esta etapa, el contenido del matraz fue vertido en una botella de 1 L de capacidad que contenía 630 mL de medio BBM. Las botellas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes (40 watts) de luz blanca, constante agitación mediante bombas de aireación, esto se realizó con la finalidad de evitar la sedimentación celular permitiendo su homogenización; el aire fue depurado para evitar contaminación con microorganismos ambientales. El sistema estuvo precedido por dos botellas, la primera contenía 200 mL de agua destilada estéril y 1mL de ácido nítrico 0.5 %, la segunda botella contenía solo 200 mL de agua destilada estéril (Guillard, 1973) (Figura 6).



FIGURA 6. 700mL de cultivo de *Scenedesmus acutus* para la determinación de sus fases de crecimiento.

3.2.5. Fases de crecimiento

Se realizó con la finalidad de identificar las diferentes fases de crecimiento del cultivo microalgal. Las botellas de vidrio (1 L de capacidad) que contenían 630 mL de medio BBM fueron inoculadas con 70 mL de cultivo de *Scenedesmusacutus* (de 4 días de edad), se inocularon a temperatura ambiente, con aireación, iluminación continua con lámparas fluorescentes de 40 Watts de luz blanca.

El crecimiento fue registrado cada 24 horas durante 15 días. Se tomaron muestras de los cultivos para hacer conteos celulares en cámara de Neubauer y lecturas de absorbancia con el espectrofotómetro (todos los cultivos iniciaron con una absorbancia de 0,1). Con los valores obtenidos de la densidad celular se determinó la tasa de crecimiento (K_e), el número de generaciones por día (n), divisiones por día (K), tiempo de duplicación (T_d) por día y por horas; para esto se aplicaron las siguientes fórmulas (Guillard, 1973).

$$K_e = \frac{\ln(N_1 / N_0)}{t_1 - t_0}$$

$$K = \frac{K_e}{\ln 2}$$

$$T_d = \frac{1}{K}$$

$$n = \frac{t}{T_d}$$

Donde, N_1 : concentración final del cultivo (cel/mL)

N_0 : concentración inicial del cultivo (cel/mL)

t_1 : tiempo final (días)

t_0 : tiempo inicial (días)

$$\ln 2 = 0.6931$$

3.2.5.1. Curva de calibración

De las muestras se realizaron lecturas de absorbancia en un espectrofotómetro de luz UV (GENESYS) a 685 nm (máxima absorbancia), para realizar estas lecturas las muestras fueron homogenizadas previamente. Las lecturas se realizaron por triplicado y el medio de cultivo BBM actuó como blanco.

3.2.5.2. Conteo celular

Con ayuda de una pipeta pasteur se extrajo una gota del cultivo previamente homogenizado y se colocó en una cámara de Neubauer (0,1 mm de profundidad), se dejó en reposo por unos minutos y se procedió al conteo bajo un microscopio de luz. Se aplicó la siguiente ecuación (Guillard, 1973).

$$\text{Densidad celular (cel.mL}^{-1}\text{)} = \text{Número de células} \times 10^4$$

3.2.6. Toxicidad

Se inoculó 70 mL de *Scenedesmus acutus* en fase exponencial en botellas de vidrio de 1 L de capacidad que contenían 630 mL de medio BBM, los cultivos se iniciaron con una absorbancia de 0,1 nm (Figura 7-A). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes (40 Watts) y con aireación.

Cuando los cultivos iniciaron la fase logarítmica (2° día), se adicionó soluciones de mercurio y plomo en forma de nitratos (Merck) en las concentraciones de: 0 (control negativo), 5, 10, 15, 20, 30 mg.L para cada metal (Figura 7-B). Las muestras se mantuvieron

a temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes (40 Watts) y con aireación (Figura 7- C y D). Esto se realizó por triplicado.

La finalidad fue evaluar el efecto de los metales (mercurio y plomo) sobre el crecimiento celular y el número de divisiones por día de *Scenedesmus acutus*. Para ello fue necesario tomar muestras a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. De cada una de las muestras se realizó lecturas de absorbancia a 685nm, las lecturas se realizaron por triplicado y el medio de cultivo BBM actuó como blanco. Así mismo los valores obtenidos de las absorbancias (a 685nm) se promediaron y fueron reemplazados en la ecuación de la recta para conocer la concentración en cel/mL.



FIGURA 7. A) Inoculación de 70 ml de cultivo en fase exponencial en 630mL de medio BBM. B) Adición de los metales en el cultivo algal en fase exponencial. C) Cultivos algaes expuestos a las diferentes concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con su control negativo. D) Cultivos algaes expuestos a las diferentes concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con su control negativo.

3.2.7. Remoción de metales pesados (mercurio y plomo)

Se realizó en botellas de 1L de capacidad, las muestras en fase exponencial estuvieron en base al 10% del volumen total (630 mL). Al segundo día se les adicionó los metales en las siguientes concentraciones: 0 (control negativo), 5, 10, 15, 20, 30 mg.L para cada metal (plomo y mercurio), esto se realizó por triplicado para cada metal y se mantuvieron en las mismas condiciones: temperatura ambiente, iluminación continua con lámparas fluorescentes (40 Watts) de luz blanca y con aireación. Se tomaron muestras para realizar lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro UV a 685nm antes y después de la exposición a los metales. Las lecturas se realizaron por triplicado.

3.2.7.1. Medición de mercurio y plomo

Después de la adición de los metales, en condiciones asépticas, los cultivos se filtraron (papel filtro N°2) (Figura 8) y se depositaron en botellas estériles. La medición de la concentración de plomo se realizó por espectrofotometría de absorción atómica con flama (Anexo 3) y para mercurio se realizó por espectrofotometría de absorción atómica a vapor frío (Anexo 4). Las mediciones se realizaron antes y después. La eficiencia de la remoción se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{Remoción} = \frac{(C_i - C_f)}{C_i} \times 100$$

Dónde: c_i = concentración inicial del metal

c_f = concentración final del metal



FIGURA 8. Filtrado de los cultivos algales luego de cuatro días de exposición a los metales en diferentes concentraciones.

3.2.8. Análisis de datos

Para determinar el crecimiento celular frente a los metales (mercurio y plomo), el número de divisiones de *Scenedesmus acutus*, así como su capacidad de remoción de mercurio y plomo, se utilizó un análisis de varianza con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre las concentraciones con respecto al control. Si el resultado del ANOVA es significativo se realizará la prueba de comparación de Dunnnet (para toxicidad) y el de Tukey (para remoción). Esta se realizó utilizando el software estadístico Statistica ver 12.0

IV. RESULTADOS

4.1. Purificación y conservación de *Scenedesmus acutus*

4.1.1. Análisis de pureza

En las muestras que se analizaron no se encontraron otros géneros de microalgas ni contaminación por rotíferos, ni bacterias; por lo cual fueron transferidos a un medio estéril para iniciar con la investigación (Figura 9).

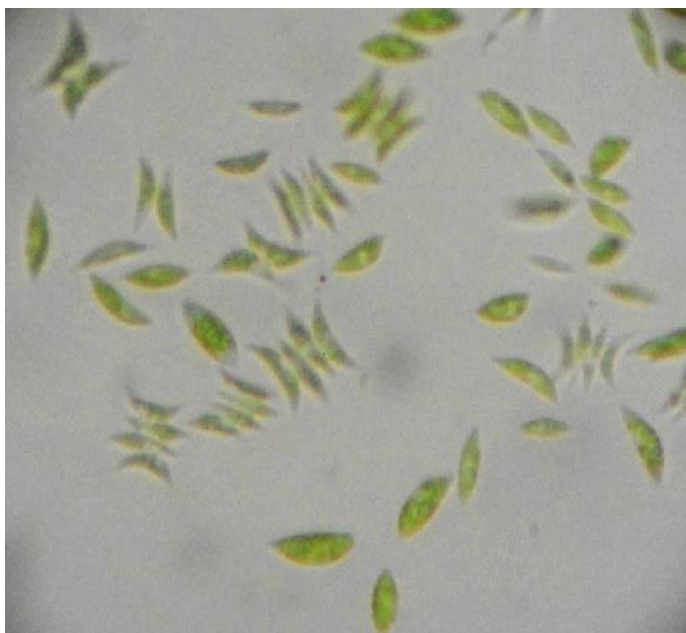


FIGURA 9. Cultivo unialgal de *Scenedesmus acutus* bajo la luz del microscopio.

4.2. Fases de crecimiento

Se logró identificar las diferentes fases de crecimiento de *Scenedesmus acutus* cuya fase de adaptación es de menos de 24 horas, la fase exponencial comenzó aproximadamente después de las 24 horas de incubación y continuó hasta el día 10, donde se observó su

máxima densidad con una absorbancia de 2,173 nm y un conteo celular de $8,90 \times 10^6$ cel.mL. La fase estacionaria se inició el día 11 y culminó el día 12, la fase de muerte empezó el día 13.

Se registró el crecimiento de *Scenedesmus acutus* midiendo su densidad celular mediante conteo con cámara de Neubauer y absorbancia en espectrofotómetro UV cada 24 horas durante 15 días (Tabla 1). Se evaluó también la tasa de crecimiento (K_e), divisiones por día (K), tiempo de duplicación (T_d), generaciones por día(n) (Tabla 2).

Tabla 1.

Densidades celulares promedio (DCP). Muestreo en espectrofotómetro UV a 685 nm y en cámara de Neubauer (N° cel / mL $\times 10^6$).

MUESTREO	ABSORBANCIA	CONTEO
(días)	DCP	CELULAR
		DCP*
0	0,102	2,73
1	0,139	3,17
2	0,342	3,50
3	0,561	4,37
4	0,754	4,55
5	1,115	5,25
6	1,433	5,90
7	1,712	6,27
8	1,956	7,63
9	2,141	8,45
10	2,173	8,90
11	2,074	8,32
12	1,971	7,93
13	1,905	7,35
14	1,803	6,55
15	1,772	6,05

* 1×10^6 cel / mL

Tabla 2.

Valores de tasa de crecimiento, divisiones por día, tiempo de duplicación y número de generaciones por día de Scenedesmus acutus.

Interv.															
Días	0-1	1-2	2- 3	3- 4	4- 5	5- 6	6-7	7- 8	8- 9	9- 10	10- 11	11- 12	12- 13	13- 14	14- 15
N₁/N₂	1,16	1,11	1,25	1,04	1,15	1,12	1,06	1,22	1,11	1,05	0,93	0,95	0,93	0,89	0,92
ln N₁/N₂	0,15	0,1	0,22	0,04	0,14	0,11	0,06	0,2	0,1	0,05	-0,07	-0,05	-0,07	-0,12	-0,08
t₂- t₁	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ke	0,15	0,1	0,22	0,04	0,14	0,11	0,06	0,2	0,1	0,05	-0,07	-0,05	-0,07	-0,12	-0,08
K	0,22	0,14	0,32	0,06	0,2	0,16	0,09	0,29	0,14	0,07	-0,1	-0,07	-0,1	-0,17	-0,12
T_d (días)	4,55	7,14	3,13	16,67	5	6,25	11,11	3,45	7,14	14,29	-10	-14,29	-10	-5,88	-8,33
n	0,22	0,14	0,32	0,06	0,2	0,16	0,09	0,29	0,14	0,07	-0,1	-0,07	-0,1	-0,17	-0,12

Se observó una buena relación entre el análisis de la concentración celular (N° cel/mL x 10^6) y las absorbancias a 685nm de los cultivos de *Scenedesmus acutus*.

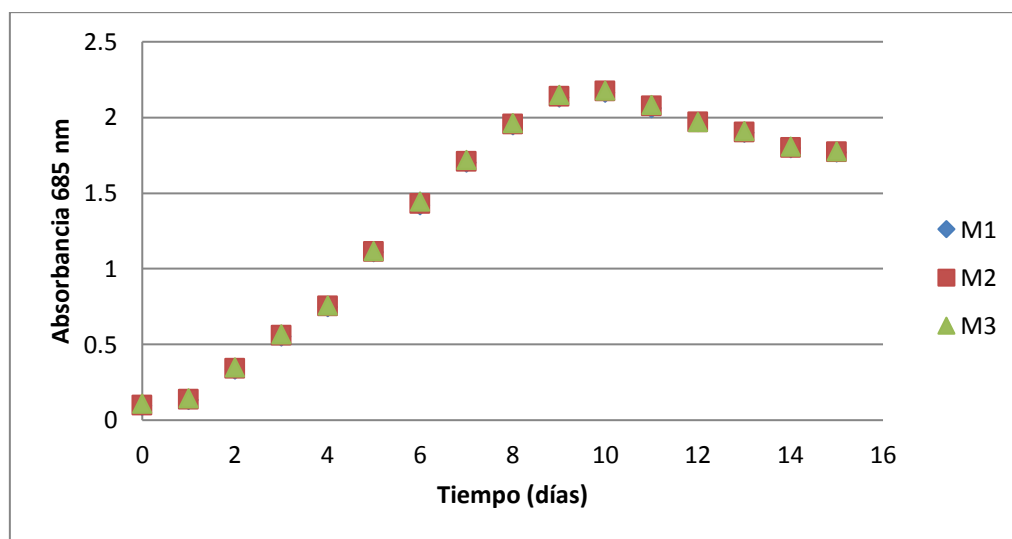


FIGURA 10. Gráfico de dispersión mostrando los resultados de las absorbancias de las tres réplicas (M1, M2, M3) de *Scenedesmus acutus* en medio BBM.

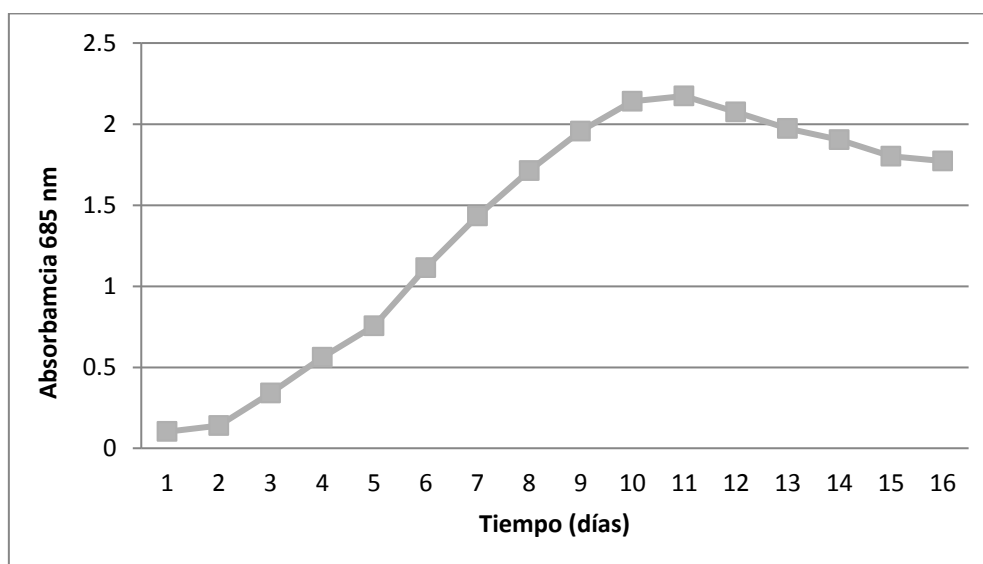


FIGURA 11. Curva de crecimiento de los valores promedio de las absorbancias de *Scenedesmus acutus* en medio BBM.

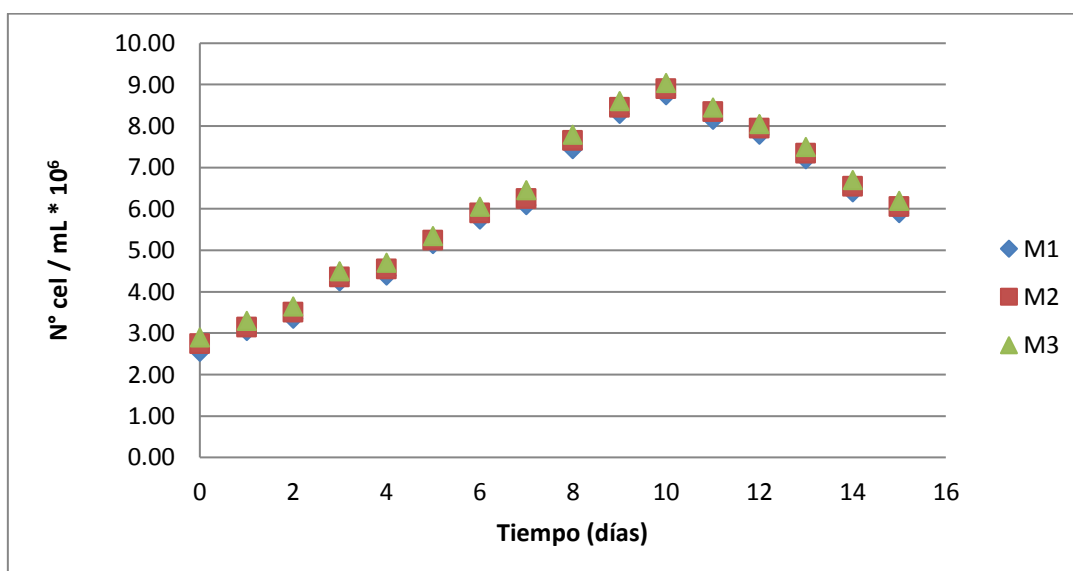


FIGURA 12. Gráfico de dispersión mostrando los resultados del conteo celular en cámara de Neubauer de tres réplicas (M1, M2, M3) de *Scenedesmus acutus* en medio BBM.

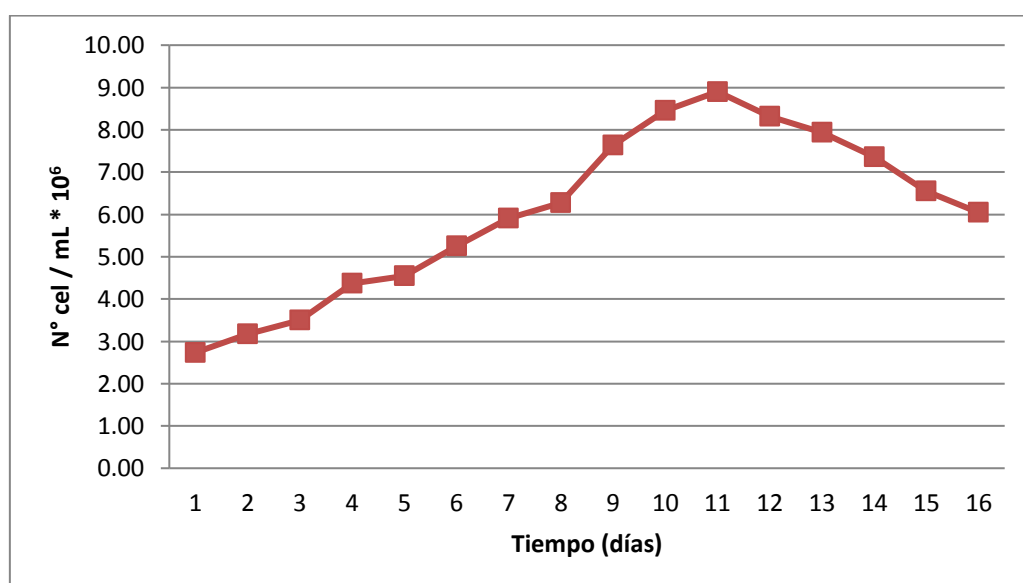


FIGURA 13. Curva de crecimiento de los valores promedio del conteo celular en cámara de Neubauer de *Scenedesmus acutus* en medio BBM.

4.3.Toxicidad

La densidad celular de *Scenedesmus acutus* se determinó midiendo su absorbancia y conteo celular a las 0, 24, 48, 72, 96 horas del cultivo control y de las muestras expuestas a las diferentes concentraciones de mercurio y plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L). Se mostraron diferencias claras en el crecimiento celular de la microalga (Anexo 5).

La concentración más baja de plomo (5 mg/L) no influyó en el crecimiento celular, mostrándose un crecimiento similar al cultivo control, la concentración de 10 mg/L influyó positivamente en el crecimiento celular de *Scenedesmus acutus* resultando leves estímulos en su crecimiento a las 48 horas de la exposición al metal (7,04 % después de 48 horas de exposición), mientras que las demás concentraciones (15, 20 y 30 mg/L) ocasionaron una clara reducción en su crecimiento (Figura 14). En cuanto al análisis de varianza se determinó la diferencia significativa mediante la “prueba F” por lo cual se puede afirmar que las diferentes concentraciones del metal así como el tiempo al que fue expuesta *Scenedesmus acutus* tienen importancia en su crecimiento celular (Tabla 3 y 4).

Por otra parte, cuando el cultivo algal fue expuesto a las diferentes concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20 y 30 mg/L) ocasionó una clara disminución en su crecimiento (Figura 15), se observaron inhibiciones del crecimiento celular de 35,41% cuando se trató con 5 mg/L Hg, 35,73% cuando se trató con 10 mg/L Hg, 37,16% para 15 mg/L Hg, 37,96% para 20 mg/L Hg y 38,19% para 30 mg/L Hg. El análisis de varianza mostró diferencias significativas en cuanto a las concentraciones del metal y el tiempo de exposición de *Scenedesmus* (Tabla 5 y 6).

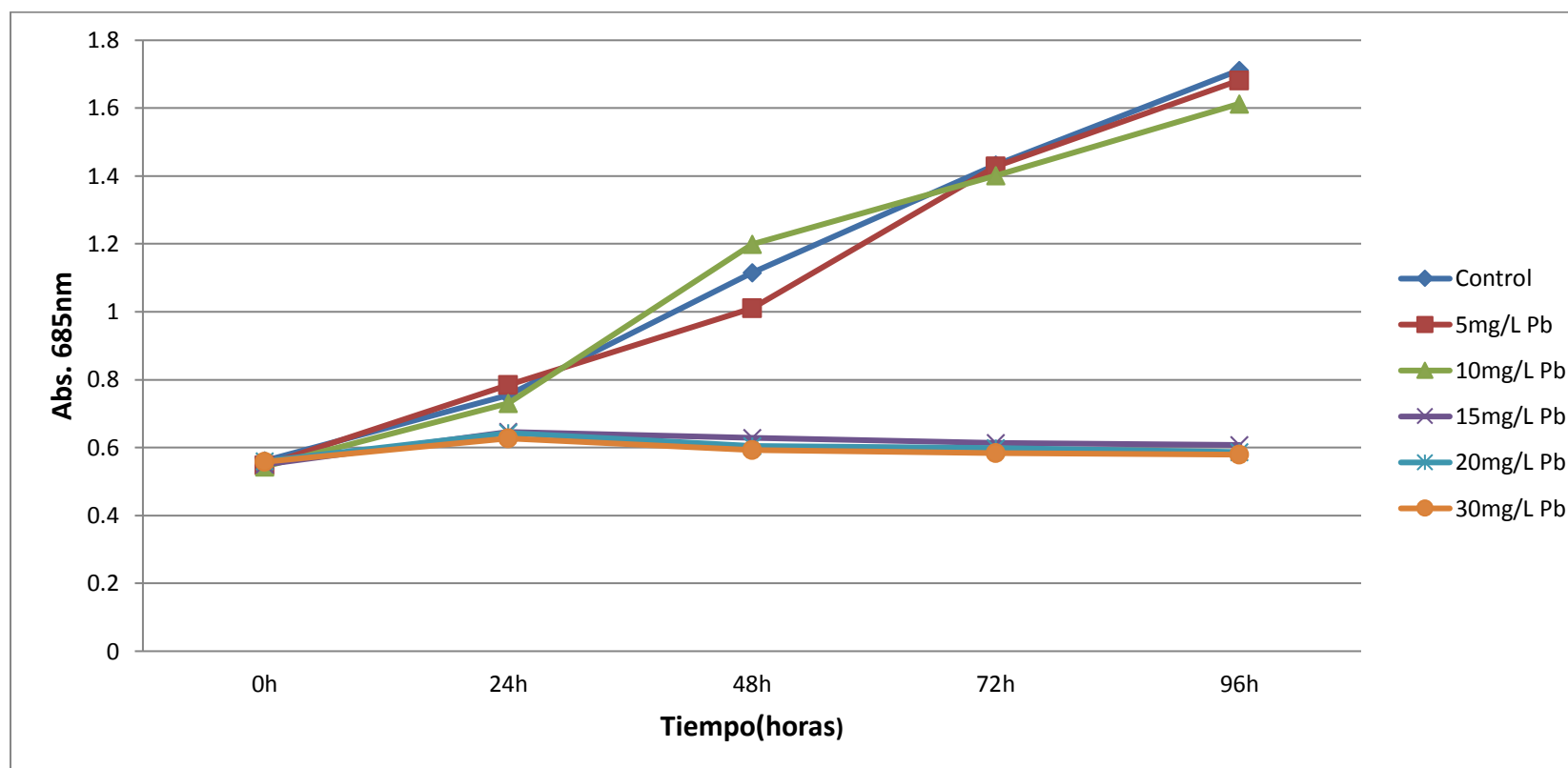


FIGURA14. Efecto de diferentes concentraciones de plomo (mg/L) sobre el crecimiento (685 nm) de *Scenedesmus acutus* cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua (40 Watts)

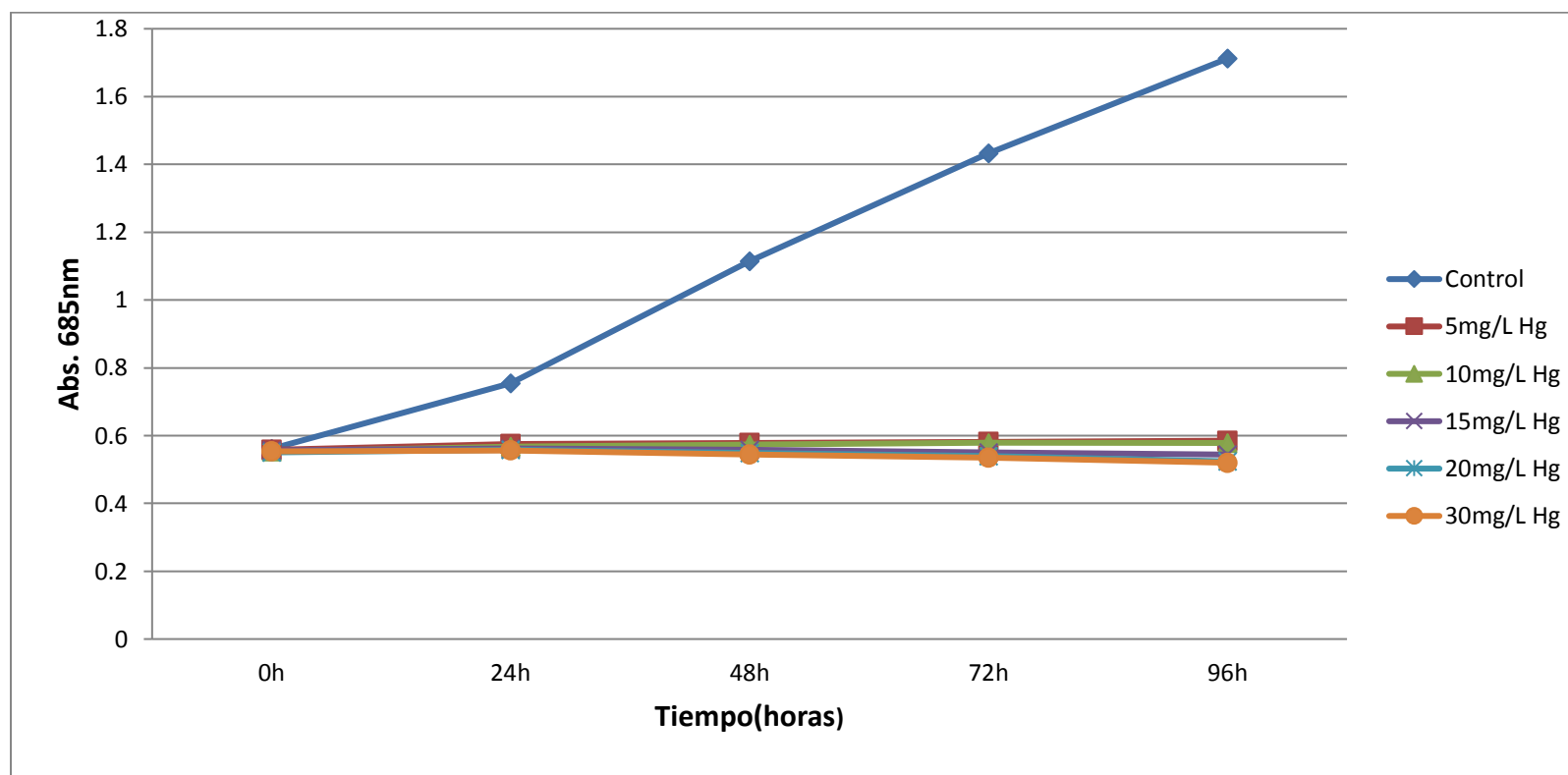


FIGURA 15.1 Efecto de diferentes concentraciones de mercurio (mg/L) sobre el crecimiento (685 nm) de *Scenedesmus acutus* cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua (40 Watts).

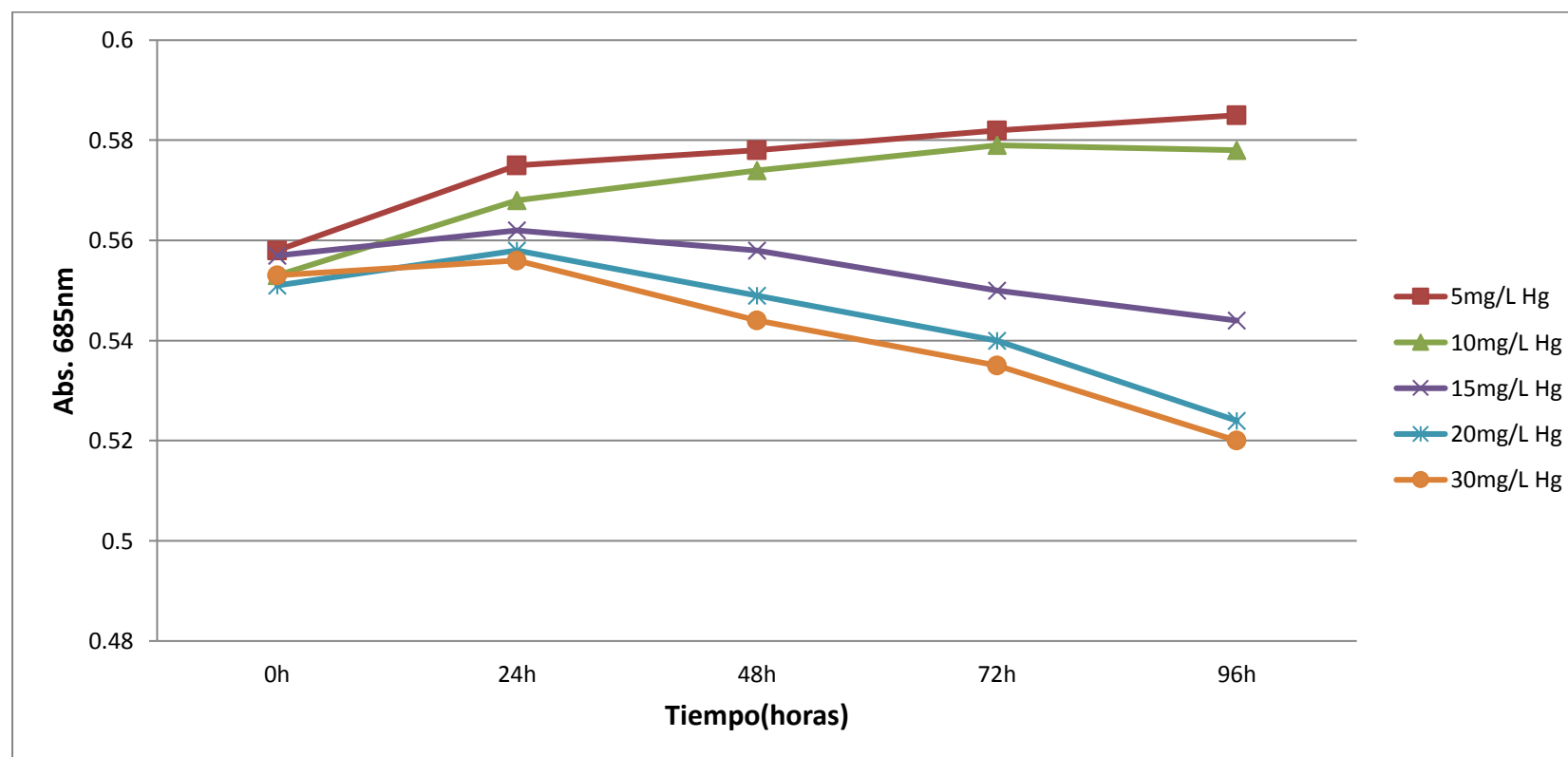


FIGURA15.2 Efecto de diferentes concentraciones de mercurio sin la muestra control (mg/L) sobre el crecimiento (685 nm) de *Scenedesmus acutus* cultivada en medio BBM a temperatura ambiente, aireación y luz continua (40 Watts)

Tabla 3.

Análisis de varianza de los valores promedio de la concentración celular de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Nivel-Plomo	5,689	5	1,138	9980,218	0,000
Tiempo	3,874	4	0,969	8496,121	0,000
Nivel-Plomo * Tiempo	3,848	20	0,192	1687,795	0,000
Error	0,007	60	0,000		
Total	78,417	90			
Total corregida	13,418	89			

Tabla 4.

Prueba de comparación múltiple de Dunnet de los valores promedio de la concentración celular de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

					Intervalo de confianza 95%	
Nivel de Plomo		Diferencia de medias	Error típ.	Sig.	Límite inferior	Límite superior
Testigo	5 mg/L	0,02460*	0,003899	0,000	0,01680	0,03240
	10 mg/L	0,01720*	0,003899	0,000	0,00940	0,02500
	15 mg/L	0,50600*	0,003899	0,000	0,49820	0,51380
	20 mg/L	0,51620*	0,003899	0,000	0,50840	0,52400
	30 mg/L	0,52700*	0,003899	0,000	0,51920	0,53480

*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05

Tabla 5.

Análisis de varianza de los valores promedio de la concentración celular de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Nivel_Mercurio	3,877	5	0,775	28268,035	0,000
Tiempo	0,429	4	0,107	3910,403	0,000
Nivel_Mercurio *	2,262	20	0,113	4123,193	0,000
Tiempo	0,002	60	2,743E-05		
Error	44,779	90			
Total	6,570	89			
Total corregida					

Tabla 6.

*Prueba de comparación múltiple de Dunnet de los valores promedio de la concentración celular de *Scenedesmus acutus*, por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.*

Nivel de Mercurio		Diferencia de medias	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Testigo	5 mg/l	0,53940*	0,001913	0,000	0,53557	0,54323
	10 mg/L	0,54460*	0,001913	0,000	0,54077	0,54843
	15 mg/L	0,56160*	0,001913	0,000	0,55777	0,56543
	20 mg/L	0,56160*	0,001913	0,000	0,55777	0,56543
	30 mg/L	0,57340*	0,001913	0,000	0,56957	0,57723

*. La diferencia de medias es significativa al nivel ,05.

4.1.Remoción de mercurio y plomo con *Scenedesmus acutus*

Se midió la absorbancia de *Scenedesmus acutus* antes y después de la exposición a las diferentes concentraciones de mercurio y plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) con la finalidad de determinar la densidad celular del alga (Anexo 6).

La prueba del análisis de varianza de los valores promedios para ambos metales resultó ser significativos, lo que demuestra que existió efecto de los tratamientos en la variable estudiada (Tablas 7 y 9). Según la prueba discriminatoria de Tukey para mercurio el mayor valor de concentración celular se obtuvo con el cultivo control (sin adición de metal)

diferenciándose estadísticamente de los demás tratamientos (Tabla 8). Para el tratamiento con plomo el mayor valor de concentración celular se obtuvo con el cultivo control (sin adición de metal), sin embargo, para el tratamiento con 10 mg/L de plomo se puede observar un ligero crecimiento celular (Tabla 10).

Tabla 7.

Análisis de varianza de los valores promedios de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tiempo	0,42910	4	0,10728	3910	0,00
Concentración (CC)	3,87743	5	0,77549	28268	0,00
Tiempo*CC	2,26226	20	0,11311	4123	0,00
Error	0,00165	60	0,00003		

Tabla 8.

Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) de los valores promedios de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de mercurio (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

Concentración	Media estimada	Grupos	
30 mg/L	0,541600	a	
15 mg/L	0,553400	b	
20 mg/L	0,553400	b	
10 mg/L	0,570400	c	
5 mg/L	0,575600	c	
Control	1,115000	d	

Tabla 9.

Análisis de varianza de los valores promedios de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

Origen	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	p
Tiempo	3,87423	4	0,96856	8496,1	0,00
Concentración (CC)	5,68872	5	1,13774	9980,2	0,00
Tiempo*CC	3,84817	20	0,19241	1687,8	0,00
Error	0,00684	60	0,00011		

Tabla 10.

Prueba discriminadora de Tukey ($\alpha=0,05$) de los valores promedios de Scenedesmus acutus, por efecto de cinco concentraciones de plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y su control respectivamente.

Concentración	Media estimada	Grupos	
30 mg/L	0,588000	a	
20 mg/L	0,598800	a	b
15 mg/L	0,609000		b
5 mg/L	1,090400		c
10 mg/L	1,097800		c
Control	1,115000		d

4.1.1. Porcentajes de remoción

Los cultivos de *Scenedesmus acutus* se filtraron después de cuatro días de exposición a las diferentes concentraciones de mercurio y plomo (5, 10, 15, 20, 30 mg/L) y se determinaron las concentraciones finales; con los valores obtenidos se obtuvo el porcentaje de remoción para cada metal.

Tabla11.

Remoción de plomo con *Scenedesmus acutus*. C_i (concentración inicial), C_f (concentración final).

C_i (mg/L)	C_f (mg/L)	% Remoción
5	0,116	97,68
10	0,273	97,27
15	1,492	90,05
20	2,045	89,77
30	3,143	89,52

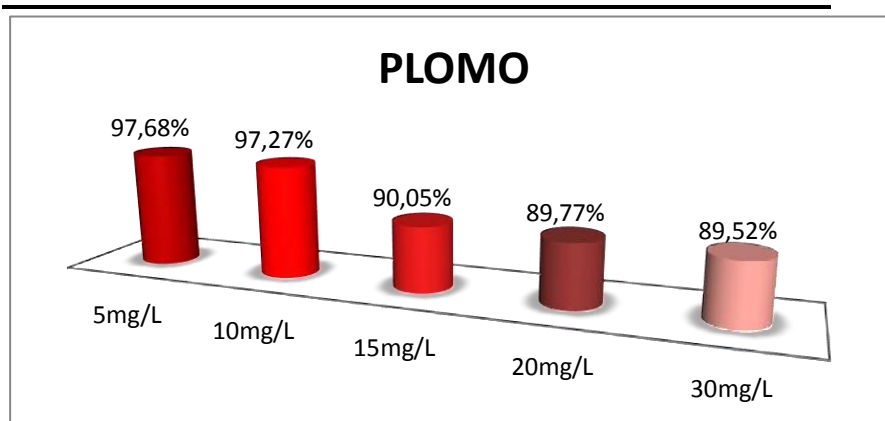


FIGURA 16. Porcentajes de remoción de plomo utilizando *Scenedesmus acutus*.

Tabla 12.

Remoción de mercurio con *Scenedesmus acutus*. C_i (concentración inicial), C_f (concentración final).

C_i (mg/L)	C_f (mg/L)	% Remoción
5	0,343	93,00
10	0,950	90,50
15	1,633	89,10
20	2,325	88,37
30	3,715	87,60

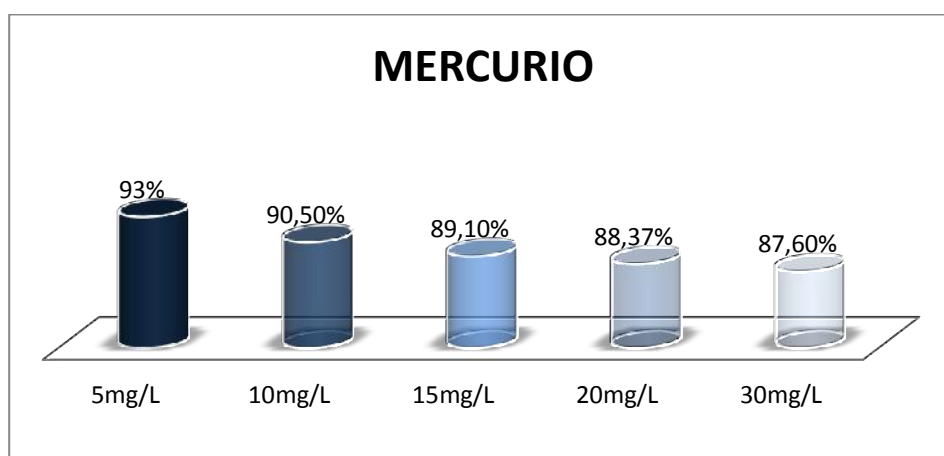


FIGURA 17. Porcentajes de remoción de mercurio utilizando *Scenedesmus acutus*.

I. DISCUSION

El medio utilizado para cultivar *Scenedesmus acutus* fue el Bold's Basal Medium modificado; para este estudio, se sustituyó el nitrato de sodio por la úrea, debido a que este nutriente es más económico con lo cual se logró obtener una densidad máxima de 2,173 nm y un conteo celular de $8,90 \times 10^6$ cel.mL en el día 10. El medio solido (Bold's Basal Medium y agar al 2%) fue útil para conservar la cepa de *Scenedesmus acutus*.

La capacidad de la úrea para incrementar el crecimiento celular así como el contenido de clorofila total, lípidos y carotenos, ha sido reportada para otras especies de microalgas y cianobacterias (Battah *et al*, 2013; Berman & Chava, 1999; Rukminasari & Redden, 2011). La úrea no sólo actúa como fuente de nitrógeno sino también como una fuente complementaria de carbono (Shafik, 1993).

En los últimos años, los ensayos de toxicidad han sido ampliamente usados para evaluar los efectos estimulatorios e inhibitorios de aguas residuales, naturales y químicos específicos sobre el crecimiento de las algas (Stauber, 1987). En este trabajo de investigación, la tasa de crecimiento de *Scenedesmus acutus* se usó como parámetro para evaluar la respuesta de la microalga a la toxicidad de los metales usados (plomo, mercurio) las cuales mostraron diferencias significativas con el cultivo control.

Para el ensayo de toxicidad con plomo se observó que la concentración más baja (5mg/L), no tuvo un efecto estimulatorio en el crecimiento celular, mostrándose la tolerancia de *Scenedesmus acutus* frente a la exposición de plomo a esta concentración; para la concentración de 10 mg/L se observó un efecto estimulante sobre los parámetros evaluados. Según El- Sheekl *et al*. (2003) a bajas concentraciones, la sustitución de plomo por el zinc en algunas metalo enzimas puede ocasionar el incremento del crecimiento. Por otra parte, el efecto del plomo a altas concentraciones (15, 20, 30 mg/L) registrados en la presente

investigación, resultó ser tóxico para el alga, ya que se observó disminución en su crecimiento celular; esta toxicidad puede ser debido al efecto inhibitorio del plomo sobre la fotosíntesis, respiración, síntesis enzimática, proteínas y ácidos nucleicos. Leborans & Naviola (1996), mencionan que altas concentraciones de plomo afectan la división celular del alga en fase estacionaria inhibiendo la tasa de crecimiento. Arunakumara & Xuecheng (2007), obtuvieron resultados similares a nuestro ensayo al exponer a *Scenedesmus platensis* a diferentes concentraciones de plomo; registraron una estimulación del crecimiento al ser expuesta a concentraciones bajas (1, 2, 3 ug/L de Plomo), mientras que concentraciones más altas (4, 5 ug/L) ejercieron un efecto adverso.

En estudios realizados por Faryasova (1999) y Ahmed (2008), en donde se estudió el efecto de los metales pesados sobre algas, se encontró que la tasa de crecimiento disminuyó con altas concentraciones de metales debido a que el plomo a altas concentraciones puede destruir la membrana de los cloroplastos y tilacoides del alga. Según los reportes mencionados la inhibición del crecimiento depende de la dosis a la que es expuesta el alga tal y como se demostró en esta investigación.

Diversos investigadores han estudiado algas con mecanismos de remoción de mercurio extracelulares. Así, Manuel & Neyra Tanabe (2012) observaron que diferentes especies pertenecientes a los géneros *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Oscillatoria* fueron capaces de adsorber mercurio entre un 10-40% de 100 mg/L.

En esta investigación, *Scenedesmus acutus*, mostró altos índices de remoción para ambos metales (97% de remoción para plomo y 93% de remoción para mercurio). Monteiro & Castro (2012), señalan que la capacidad para absorber metales depende de la composición de la superficie de su pared celular y es promovido por la presencia de grupos funcionales

cargados negativamente. La remoción de metales por células microalgales involucra una adsorción pasiva, rápida y reversible sobre la superficie celular, seguida por un proceso activo lento e irreversible, el cual involucra el transporte de los cationes a través de la membrana celular al interior del citoplasma (Muñoz *et al.*, 2008; Pawlik, 2003; Worms, 2006).

El uso de biomasa algal inerte como material adsorbente, ha demostrado altas eficiencias de remoción de metales, por ejemplo, *Scenedesmus abundans* removió el 97 % de una solución conteniendo 10 mg l⁻¹ de Cd, lo que ha impulsado el desarrollo de productos comerciales como Algasorbr®. Por otro lado, cultivos de microalgas viables creciendo en sistemas de lote, han permitido estudiar los efectos tóxicos de los metales pesados sobre las células algales, y elegir cepas que presentan selectividad en la remoción de metales (Sheng *et al.*, 2004).

En el Laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN (México), desde hace algunos años se ha venido estudiando el empleo de microalgas y cianobacterias para la remoción de metales (Cd, Zn, Cr, Cu y Ni). En los experimentos, se ha ensayado el efecto de metales cuando se adicionan por separado y en mezcla, y los resultados de estos estudios han sido muy satisfactorios. Cuando se empleó un sistema de cultivo continuo y la microalga *Scenedesmus incrassatulus* (chlorophyceae) creciendo en un fotobiorreactor “airlift”, se obtuvieron porcentajes de remoción de los metales Cr (VI) y Ni (II) superiores a los obtenidos en cultivos por lote con otras especies del mismo género *Scenedesmus* como son *S. acutus* y *S. quadricauda* y con especies de los géneros *Selenastrum* y *Chlorella*. Los resultados mencionados demuestran la potencialidad de aplicación del sistema de cultivo continuo, como una alternativa

tecnológica interesante en procesos de tratamiento terciario de efluentes contaminados con bajas concentraciones de iones metálicos (Cañizares & Jácome- Pilco, 2007).

En estudios realizados por Pellón *et al.*, (2003), la eficiencia máxima de eliminación del ion cromo presente en las aguas residuales galvánicas utilizando la microalga *Scenedesmus obliquus* en estado libre, para las condiciones de experimentación alcanzó un valor próximo al 30 %; y en condiciones de inmovilización se logran mejores resultados, 95% de eliminación de Cr (III) en 30 h y 99,8 % en 64 h. En estudios posteriores por Pellón (2011) para remoción de cromo mediante el uso de un bioreactor utilizando *Scenedesmus obliquus* inmovilizado se obtuvo que la microalga en estado inmovilizado resultaba ser efectiva en la remoción de cromo, con una eficiencia del 92,4 %. La inmovilización de *S. obliquus* permitió que no fuese afectada morfológicamente por el cromo, así como por el pH que presentaba el agua residual sometida a tratamiento. Así mismo, el tratamiento del agua residual con concentraciones de cromo de 86mg/L mediante *S. obliquus* en estado inmovilizado, permitió recuperar el 83% del cromo que se encontraba en disolución al inicio del experimento.

Por otro lado, Gokhale *et al.*, (2008), realizaron ensayos de bioabsorción de cromo (VI) utilizando biomasa seca de *Spirulina platensis* como material adsorbente, en condiciones experimentales optimizadas, con pH 1,5, agitación de 180 rpm y temperatura de 30 °C, lográndose la remoción de hasta 99% del metal para una solución conteniendo 100 mg L⁻¹ de cromo (VI). Aneja *et al.*, (2010), evaluaron la bioabsorción de Pb⁺² y Zn⁺² de una solución acuosa conteniendo diferentes concentraciones de esos metales, a través de la biomasa inactiva de *Spirulina sp.*, alcanzando índices de remoción de 82 % para Pb⁺² y de 90 % para Zn⁺² para un tiempo de contacto de 15 min.

Se encontró también que *Chlorella vulgaris* puede acumular altos niveles de arsénico y otros elementos tóxicos, puesto que poseen mecanismo intrínsecos de detoxificación logrando transformar el metal acumulado (Maeda & Sakaguchi, 1990). Así también quedo demostrado que puede acumular cobre debido a que presentan tolerancia a este ión metálico, al igual que *Chlamydomonas angulosa* y *Scenedesmus bijuga* (Nakajima *et al.*, 1981).

No sólo pueden utilizarse las células microalgales libres, sino también encapsuladas utilizando distintos soportes. Moreno *et al.* (2002) realizaron un estudio sobre la acumulación de cobre y zinc empleando células de *Nannochloropsis gaditana*, libres e inmovilizadas en alginato durante 24 horas, las células libres acumularon prácticamente el 100% de Cu y Zn presente en el medio en condiciones experimentales.

Como ha quedado demostrado, el uso de microalgas para el tratamiento de aguas con iones metálicos se presenta como una solución factible, pues ofrecen la ventaja de ser cultivadas con pocos requerimientos de nutrientes para su mantenimiento y desarrollo. Así mismo su manipulación es sencilla en el laboratorio y pueden ser usados diferentes técnicas y métodos con el fin de lograr la descontaminación de superficies, sistemas de agua dulce y marinos, suelos, agua subterránea y ecosistemas terrestres contaminados pudiendo ser usada en el sitio de contaminación. Al comparar nuestra investigación con estudios similares nos muestra que la microalga dulceacuícola *Scenedesmus acutus* podría ser utilizada como un removedor de plomo y mercurio de soluciones acuosas sintéticas.

II. CONCLUSIONES

- *Scenedesmus acutus*, logró porcentajes de remoción los cuales estuvieron comprendidos entre 93,00% y 87,60% máxima y mínima remoción respectivamente para mercurio y 97,68% y 89,52% máxima y mínima remoción respectivamente para plomo, para los tratamientos cuyas concentraciones fueron 5, 10, 15, 20, 30 mg/L.
- La concentración más baja de plomo (5 mg/L) no influyó en el crecimiento celular de *Scenedesmus acutus*, entre tanto la concentración de 10 mg/L influyó positivamente en su crecimiento celular resultando leves estímulos a las 48 horas de la exposición al metal. Sin embargo, las otras concentraciones de ambos metales (plomo y mercurio) ocasionaron una clara disminución.
- *Scenedesmus acutus* mostró ser un buen biorremediador de mercurio y plomo ya que se obtuvieron resultados de remoción de hasta 93,00% para mercurio y 97,68% para plomo.

III. RECOMENDACIONES

- Disponer de un área apropiada que cuente con las condiciones físicas necesarias para evitar cualquier tipo de alteración y contaminación.
- Caracterizar *Scenedesmus acutus* mediante la técnica molecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), considerando que la identificación taxonómica fue realizada en esta investigación por docente de la Universidad Nacional de Trujillo.
- Formular medios de cultivo económicos, así mismo evaluar que el crecimiento celular de *Scenedesmus acutus* sea óptimo en este medio.
- Evaluar en qué fase de crecimiento del alga los metales ejercen mayor efecto y como consecuencia su muerte.
- Determinar el efecto in vitro de *Scenedesmus acutus* sobre la remoción de otros metales presentes en soluciones acuosas.
- Evaluar en qué sitios polifuncionales del alga se unen éstos complejos metálicos logrando de esta manera la remoción de metales pesados.

IV. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abalde, J., Herrero, c. (2004). Microalgas en acuicultura: calidad nutricional. Algas (pp. 16-18; 32, 40).
- Ahmed, S. (2008). The effect of some heavy metal son growth and nutrient uptake of *Chroococcus sp.* Al- Mustansiriya. *Journal of Environmental Science*, (pp. 1, 3- 19).
- Alguacil, F. & Merino, Y. (1998). Biotratamiento de contaminantes de origen inorgánico. *Revista de Metalurgia*, 34(5), 428-436.
- Alkorta, I., Hernandez- Allica, J. M., Amezaga, I., Albizu, I., Garbizu, C. (2004). Chemical, technological, biotechnological, (3), 71-90.
- Aneja, R. K.; Chaudhary, G.; Ahluwalia, S. S.; Goyal, D. (2010). Biosorption of Pb and Zn by Non-Living Biomass of *Spirulina sp.* *Indian J. Microbiol.* 50(4), 438.
- Autoridad Nacional del Agua, ANA. (2008). Diagnóstico de los problemas y conflictos de la gesti{on del agua en la cuenca Chancay- Lambayeque: Proyecto de modernización de la gestión de los recursos hídricos (PMGRH). Ministerio de Agricultura. Lima, Perú.
- Arunakumara, K., Xuecheng, Z. & Song, X. (2007). Estudio comparativo de la bioacumulación del plomo y cadmio en cianobacterias. *Synechocystis sp.* PCC 6803 bajo condiciones de laboratorio. *Revista de Ciencias Marinas*, 33(3), 271- 280.
- Barsanti, L. & Gualtieri, P. (2006). Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology. Florida, United States of America.
- Batista, F., Freire, J. A. (2010). Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia. 7, 166.

- Battah, M., El- Sayed, A. & El- Sayed, E. (2013). Growth of the Green alga *Chlorella vulgaris* as effected by different carbón sources. *Life Science Journal*, 10(1), 2075-2081.
- Bellinger, E. G. & Sigeo, D. C. (2010). Freshwater Algae: Identification and use as bioindicators. United Kingdom: Jhon Wiley & Sons.
- Berman, T. & Chava, S. (1999). Algal growth on organic compounds as nitrogen sources. *Jounal of Plankton Research*, 21(8), 1423- 1437.
- Bengtsson, H., Alvenas, G., Nilsson, S. I., Hultman, B., Oborn, I. (2006). Agric ecosyst environ. 113, 120-138.
- Bishop, R. (2002). Pollution prevention: fundamentals and practice. Beijing Tsinghua University Press.
- Brack, A., Ipenza, C., Álvarez, J. & Sotero, V. (2011). Minería aurífera en Madre de Dios y contaminación cn mercurio: Una bomba de tiempo. Lima, Perú: MINAM.
- Cañizaris, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiologia*, 42(131), 131-143.
- Cañizares, R., Jácome- Pilco, C. (2007). Cultivo continuo de microalgas como alternativa para la remoción de metales pesados en solución. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Laboratorio de Biotecnología de Microalgas. México.
- Casarett & Doull. (2005). Fundamentos de Toxicología. Mc Graw-Hill Interamericana. 560pp.

- Chapman, P. M., Wang, F., Janssen, C. R., Goulet, R., Kamunde, C. (2003). Human and ecological risk assessment. *International Journal* (9), 641-697.
- Contreras-Flores, C., Peña-Castro, J., Flores-Cotera, L & R Cañizares-Villanueva. (2003). Avances en el diseño conceptual de fotobiorreactores para el cultivo de microalgas. *Interciencia* 28(8): 450-456.
- Cornelis, R., Nordberg, M. (2007). General Chemistry, Sampling, Analytical Methods, and Speciation. Handbook on the toxicology of metals. (pp. 29-35).
- Cronquist, A. 1982. Magnoliophyta.. Synopsis and Classification of Living Organisms, vol. 1. McGraw-Hill, New York. (pp. 357-487).
- Cuizano & Navarro, A. (2008). Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a bajas concentraciones. *Anales de Química*, 104 (2), 120-125.
- Davis, T. a., Volesky, B. & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37, 4311-4330.
- Duffus, J.H. (2002). "Heavy metals"- a meaningless term. *International Research Journal Pure and Applied Chemistry*. 74(5), 792-807.
- El Comercio (2015). Pasco: Avalan que minera arroje aguas sin tratar a Yanamate. El comercio 20 de Octubre.
- El Peruano. (2010). Aprueban límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero- metalúrgicas. D.S. N° 010-2010-MINAM. El Peruano 21 de agosto- Normas Legales. Pág.: 424114-424117.

- El- Sheekl, M., El- Naggar, A., Osman, M. & El- Mazaly, E. (2003). Effect of cobalto in growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphdium minutum* and *Nitzchia perminuta*. *Braziliam. Journal of Plant Physiology*. 15(3), 159- 166.
- European Federation of Biotechnology. (1999). “Environmental Biotechnology” Briefing Paper 4, Second Edition, January 1999.
- Faryasova, A. (1999). The green algae a subject for the study of inhibitory effect Cd, Cu, Zn, Pb and Fe. *Journal of Science*, 54, 383- 388.
- Garza, M. T., Almaguer, V., Rivera, J. & Loredó, J. A. (2010). Bioingeniería ambiental aplicada a una columna empacada con *Chlorella sp.* Inmovilizada para la remoción de metales pesados. *Revista de Investigación*, 13(2), 174- 177.
- Gokhale, S. V.; Jyoti, K. K.; Lele, S. S. (2008). Kinetic and equilibrium modeling of chromium (VI) biosorption on fresh and spent *Spirulina platensis/Chlorella vulgaris* biomass. *Bioresour Technol.* Jun; 99(9):3600-8.
- Guibal, E., Von Offenberg, N., Zikan, M., Vicent, T., Tobin, J.M. (2001). Competitive sorption of platinum and palladium on chitosan derivatives. *Int. J. Biol. Micromo.* 28(5), 401-408.
- Guillard, R. (1973). Division rates. *Handbook of Phycological Methods: Culture methods and growth measurements* (pp. 289- 312). Cambridge: Cambridge University Press. J. Stein (Ed),
- Harada, Y. (1968). Congenital (or fetal) Minamata Disease. In: Study Group of Minamata Disease editor. *Minamata Disease*. Kumamoto: Kumamoto university.

- Hawkes, S. J. (1997). What is a “heavy metal”? *Journal of Chemical Education*, 74(11), 1374.
- Henry, J. R. (2000). An Overview of the Phytoremediation of Lead and Mercury. National Network of Environmental Management Studies (NNEMS) Fellow. Washington, D.C. *Environmental Pollution*, 123, 500- 524.
- International Agency for Research on Cancer. 2012. Agents Classified by the IARC Monographs. Volumes 1–106.
- Investigación del derrame de mercurio del 2 de junio del 2000 en las cercanías de San Juan, Choropampa, y Magdalena, Perú. (2000). “Informe de la Comisión Independiente a la Oficina del Ombudsman y Asesor en Materia de Observancia de la Corporación Financiera Internacional y el Organismo Multilateral de Garantía de Inversiones”.
- Johnson, F. M. (1998). The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research*, 410, 123- 140.
- Juwarkar, A.A., Singh, S.K. & Mudhoo, A. (2010). A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Environmental Science and Bio/Technology* [online]. 9(3), pp. 215- 288.
- Khoshmanesh, A., Lawson, F. & Prince, I.G. (1997). Cell surface area as a major parameter in the uptake of cadmium by unicellular Green microalgae. *The Chemical Engineering Journal*, 65, 13-19.
- Komárek, J. & Fott, B. (1985). Chlorophyceae (Grünalgen), Ordnung Chlorococcales. Volume 5, Issue 1, (pp. 111).

- Laporte, J. (1993). Principios Básicos de Investigación clínica. Madrid.
- Leborans, G. & Naviolla, A. (1996). Toxicity and bioaccumulation of cadmium in algae (Raphidophyceae). *Water Research*, 30, 57- 62.
- Lee, R. (2008). Phycology. New York, United States of America: Cambridge University Press.
- Li, P. (2008). Mercury exposures and symptoms in smelting workers of artisanal mercury mines in Wuchuan, Guixhou, China. *Environmental Research*, 107, 108- 114.
- Llobet, J. M., Schuhmacher, M., Domingo, J. L. (2000). Toxicological and environmental chemistry. 77, 119-129.
- Lombi, E., Zhao, F.J., Dunham, S.J., McGrath, S.P. (2001). Phytoremediation of Heavy Metal Contaminated Soils: Natural Hyperaccumulation versus Chemically Enhanced Phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* v. 30, p. 1919.
- Lovey, D. R & Coates, J.D. (1997). Bioremediation of metal contamination. *Curr Opin Biotechnol.* 8(3):285-289.
- Maeda, S. & Sakaguchi, T. (1990). Accumulation and detoxification of toxic metal elements by algae. *Journal of Phycology*, 1, 137- 149.
- Manuel, C.D., Neyra-Tanabe, M.E. (2012). Mercury uptake of microalgae in Kematu River, T'boli, South Cotabato, Philippines. Trabajo presentado en la 2da Conferencia internacional y 12 conferencia científica anual, Filipinas.

- Marivela, C., Guerrero, C., López, L., Sánchez, V., Toledo, A. (2002). Metales pesados y medio ambiente. Grupo de seminario 1-26, Barcelona, España.
- Mejía, G. (2006). Aproximación teórica de biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1(1), 77-99.
- Miller, J. R., Hudson-Edwards, K. A., Lechler, P. J., Preston, D., Macklin, M. G. (2004). Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Río Pilcomayo basin, Bolivia. *Science of the total Environment*. 320, 189-209.
- Ministerio de Salud, MINSA (2015). Contaminación con metales pesados. Lima, Perú.
- Monteiro, C. & Castro, P. (2012). Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology Progress*, 28 (2), 299- 311.
- Moreno, I., Codd, G.A., Gadd, G. M. & Lubián, L. M. (2002). Acumulación de Cu y Zn por células microalgas marinas *Nannochloropsis gaditana* (Eustigmatophyceae) inmovilizadas en alginato de calcio. *Ciencias Marinas*, 28(1), 107- 119.
- Muñoz, R., Alvarez, M., Muñoz, A., Terrazas, E., Guieysse, B. & Mattiason, B. (2008). Sequential removal of heavy metal ions and organic pollutants using an algal- bacterial consortium. *Chemosphere*, 63, 903- 911.
- Nakajima, A., Horikoshi, T. & Sakaguchi, T. (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *European Journal of Applied Microbiology- biotechnology*, 16, 88- 91.

- Organización Mundial de la Salud. (2003). Elemental mercury and inorganic mercury compounds: Human health aspects. Dr Risher, J.F. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Atlanta, Georgia, USA.
- Ouyang, T. P., Zhu, Z. Y., Kuang, Y. Q., Huang, N. S., Tan, J. J., Guo, G. Z., Gu, L. S., Sun, B. (2006). Dissolved Trace Elements in River Water: Spatial Distribution and the Influencing Factor, a Study for the Pearl River Delta Economic Zone, China. *Environmental geology*. 49(5), 733-742.
- Pawlik- Skowronska, B. (2003). Resistance, accumulation and alolocation of zinc in two ecotypes of the Green alga *Stiegeoclonium tenue* Kütz, coming from hábitats of different heavy metal concentration. *Aquatic Botany*, 75, 189- 198.
- Pellón, A., Benitez, F., Frades, J., García, L., Cerpa, A. & Alguacil, F. (2003). Empleo de la microalga *Scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Revista de Metalurgia*, 39, 9-16.
- Pellón, A. (2011). Remoción de cromo mediante el uso de un bioreactor utilizando *Scenedesmus obliquus* inmovilizado. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, Vol. 32, N°. 1, Ene-Abr 2011, 13-20.
- Peng, Ch., Qi-Jie, Ch., Li-Ye, Ch. & Hong-Bo, S. (2012). Some progress in sexual reproduction and sex determination of economic algae. *African Journal of Biotechnology*. 11(21), 4706-4715.
- Richmond, A. (Ed.). (2004). Handbook of microalgal culture: *Biotechnology and Applied Phycology*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Science.

- Rodrigues, M., Formoso, M. (2005). Exposure to selected heavy metals through water ingestion in an area under the influence of tanneries. *Environmental geochemistry and health*. 27, 397-408.
- Romo, A. K. (2002). Manual para el cultivo de microalgas.(Tesis de Grado) Universidad Autónoma de Baja California Sur, La Paz, B. C. S. Recuperada de: <http://biblio.uabcs.mx/tesis/te1366.pdf>.
- Rukminasari, N. & Redden A. (2011). Growth response of natural phytoplankton to enrichment of urea and the other form of dissolved nitrogen. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5(12), 1100- 1116.
- Sala, E. (2000). Bioabsorción de cromo (III) por la biomasa del alga marina sargassum sp. Tesis de doctorado presentado por la facultad de Ingeniería química. Universidad Estatal de Campinas. Brasil.
- Sánchez, A., Ballester, A., Blázquez, M.L., González, E., Muñoz, J., Hammami, A. (1999). Biosorption of copper and zinc by *Cymodocea nodosa*. *Microbiology Reviews*. 23, 527-536.
- Sanz, P., Nogue, S., Corbella, J. (1997). Alteración hepatológica en una intoxicación crónica por plomo. *Medical Int* 1987; 4: 475-476.
- Shafik, M. (1993). ^{14}C - urea metabolism by some marine algae from Alexandria in combination with sewage treatment. *Egyptian Journal of Applied Science*, 8(10), 275-303.

- Shanab, S. & Essa, A. (2007). Heavy metal tolerance, biosorption and bioaccumulation by some microalgae (Egyptian isolates). *New Egyptian Journal of Microbiology*, 17, 76-88.
- Sheng, P., Ting, Y., Chen, J. & Hong, L. (2004). Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 131-141.
- Shigeo Ekino, M.S. (2007). Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences*, 262, 131- 144.
- Stauber, J. & Florence, T. (1987). Mechanism of toxicity of ionic copper complexes to algae. *Journal of Chemistry*, 94, 511- 519.
- Veglio, F., Beolchini, F., Prisciandaro, M. (2003). Sorption of copper by olive mill residues. *Water Res*, 37(20), 4895- 4903.
- Vidali, M. (2002). Biorremediación: An overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172.
- United States Environmental Protection Agency. (1997). Mercury Study Report to Congress volume I: Executive Summary. EPA- 452/ R- 97- 003.
- Villanueva, C. & Tapia, N. (2005). Bioadsorción de Cu (II) por biomásas que contienen pectinas. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 8(1), 11-15.
- Volesky, B. (1990). Biosorption of Heavy metals: Biosorption and biosorbents. En Volesky. B y CRC press. (pp. 3-5) Montreal, Canadá. McGill University.

- Volesky, B. (1999). Biosorption for the next century. *El Escorial*, Spain, June. 20-23.
- Volesky, B. (2001). Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Journal Hydrometallurgy*. 59, 203- 216.
- Wana, R. A. & Okieimen, F. E. (2011). Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risk and best available strategies for remediation. *International Scholarly Research Network*, 1- 20.
- Wang, J.L. (2002). Immobilization techniques for biocatalysts and water pollution control. *Beijing Science press*.
- Wang J., Chen C. (2009). “Biosorbents for heavy metals removal and their future”. *Biotechnology Advances*, 27, p. 195-226.
- Woese, C., O. Kandler, and M. Wheelis. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (12): 4576–9.
- Worms, I., Simon, D., Hassler, C. & Wilkinson, K. (2006). Bioavailability of trace metals to aquatic microorganisms: importance of chemical, biological and physical processes on biouptake. *Journal of chemistry*, 88, 1721- 1731.
- Yang XW, Shen QF, Guo YY (2000). Press of Metallurgical Industry, Beijing. *Journal of Biohydrometallurgy*, 26, 267- 271.
- Zavaleta, A. (1990). Metodología de la Investigación Científica. Lima- Perú.

Zuzendaritza, L. (1986). Dirección de Trabajo del Gobierno Vasco. Higiene eta Segurantzak lanean/Seguridad e Higiene en el trabajo. Servicio Central de publicaciones. Monografía Plomo 1986; 2.

V. ANEXOS

ANEXO N° 1

Composición del medio de cultivo BOLD'S BASAL (BBM) modificado

REACTIVO	CONCENTRACION (mg/L) *
Úrea	500
CaCl ₂ . H ₂ O	25
MgSO ₄ . 7H ₂ O	75
K ₂ HPO ₄	75
KH ₂ PO ₄	175
NaCl	25
FeSO ₄ . 7H ₂ O	4.98
H ₂ SO ₄	0,001 (mL/L)
H ₃ BO ₃	11,42
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,82
CuSO ₄ . 5H ₂ O	1,57

*Las

cantidades indicadas se diluyen en agua destilada y el pH del medio se ajusta a 6.5 con NaOH (0.1N) y H₂SO₄ (0.1N).

ANEXO 2

Análisis de pureza: coloración Gram

1. Con ayuda de un asa bacteriológica se tomó una muestra de cultivo de *Scenedesmus acutus* y se colocó en un portaobjetos.
2. El frotis fue cubierto con violeta de genciana y se dejó durante tres minutos.
3. Se lavó a chorro de agua para ser cubierto con lugol y se dejó durante un minuto.
4. Se volvió a lavar a chorro de agua y se decoloró con alcohol cetona, procurando no eliminar todo el colorante.
5. Se cubrió con safranina por treinta segundos.
6. Se lavó a chorro de agua y se dejó secar al calor suave del mechero.
7. Se observó al microscopio a 100X utilizando aceite de inmersión.

ANEXO 3

ANALISIS DE PLOMO

Método de espectrofotometría de absorción atómica con flama

1. La muestra en forma líquida es aspirada a través de un tubo capilar y conducida a un nebulizador donde ésta se desintegra y forma un rocío o pequeñas gotas de líquido.
2. Las gotas formadas son conducidas a una flama, donde se produce una serie de eventos que originan la formación de átomos. Estos átomos absorben cualitativamente la radiación emitida por la lámpara y la cantidad de radiación absorbida está en función de su concentración.
3. La señal de la lámpara una vez que pasa por la flama llega a un monocromador, que tiene como finalidad el discriminar todas las señales que acompañan la línea de interés. Esta señal de radiación electromagnética llega a un detector o transductor y pasa a un amplificador y por último a un sistema de lectura.
4. Una vez que han sido formados los átomos, la flama tiene la misma función que una celda en espectroscopia visible o Ultravioleta. Los átomos de la flama absorben radiación de acuerdo a la Ley de Beer si esta corresponde a la diferencia en energía entre los niveles energéticos de algunos de los átomos presentes, de lo contrario, la radiación pasa por la flama sin disminuir la potencia de haz como efecto de los átomos contenidos en ella.
5. El análisis cuantitativo es semejante al realizado en espectroscopia UV. Para esto se prepara una serie de estándares y se hace una curva de calibración con base a esta gráfica se determina la concentración de las soluciones problema.

ANEXO 4

ANALISIS DE MERCURIO

Método de espectrofotometría de absorción atómica a vapor frío

Un caso particular en la técnica de absorción atómica, lo constituye el mercurio, ya que gracias a su volatilidad, no requiere el uso de llama para atomizarse y puede determinarse en forma de vapor frío. Mediante esta técnica se alcanzan límites de detección del orden de 1 ppb.

La determinación se realiza adicionando un agente reductor (cloruro estañoso o borohidruro de sodio), al digerido. La reacción del mercurio en solución con el agente reductor produce mercurio atómico muy volátil. El vapor de mercurio es conducido hacia una celda colocada en el paso del haz de luz, donde ocurre la interacción entre los átomos de mercurio y la radiación, produciéndose la absorción. Para la determinación de mercurio en agua se utiliza el espectrofotómetro de absorción atómica SHIMADZU AA-7000 y un generador de vapor frío SHIMADZU.

PROCEDIMIENTO:

1. A la muestra recolectada se le debe adicionar ácido nítrico concentrado hasta obtener un pH de 1, monitorear el pH en este valor y guardar la muestra refrigerada para ayudar con su conservación, pero se debe tener en cuenta que las muestras deben ser analizadas antes de dos meses, para mejores resultados.
2. Preparación de soluciones curva de calibración
 - 2.1. Solución madre de mercurio (10 mg/L): tomar 1mL de solución estándar PANREAC de 1000 ppm, aforar a 100 mL.

2.2. Solución estándar de mercurio (0,02 mg/L): Tomar 1mL de solución madre de mercurio (10 mg/L), aforar hasta 500mL.

2.3. Patrones curva de calibración de mercurio: Tomar el volumen en bureta necesario de la solución estándar de Mercurio (0,02 mg / L) para preparar cada uno de los patrones de acuerdo a la siguiente tabla:

PATRON	CONCENTRACION (ug/L)	VOLUMEN DE SOLUCION ESTANDAR A TOMAR (mL)
Blanco	0,00	0,00
1	0,50	0,50
2	0,75	0,75
3	1,00	10,00
4	2,00	20,00
5	3,00	30,00

Tomar el volumen correspondiente y aforar cada uno de los patrones a 200 mL con agua Desionizada, pasar los patrones antes preparados a 6 winklers previamente lavados con ácido nítrico al 10%, agregar 4 mL de Ácido Nítrico Concentrado y 4 mL de Ácido Sulfúrico concentrado.

3. Preparación de las muestras

3.1. Preparación de solución de Permanganato de Potasio (0,05 g/mL): Pesar 10 g de KMnO_4 puro. Diluir en 20 mL de agua desionizada, aforar hasta 200 mL.

3.2. Preparación de solución de Cloruro de Hidroxilamina: Pesar 24 g de cloruro de Hidroxilamina puro. Diluir en 20 mL de agua desionizada, aforar hasta 100 mL.

3.3. Digestión de las muestras de agua tratada: Adicionar 200 mL de agua en un winkler. Agregar 4 ml de Ácido Nítrico Concentrado y 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, dejar reposar por una hora.

3.4. Preparación de solución de cloruro estañoso (0,1 g/mL): Pesar 20 g de cloruro estañoso puro. Diluir en 20 mL de Ácido Clorhídrico Concentrado, aforar hasta 200 mL.

3.5. . Preparación de la muestra para la medición: Agregar 200 mL de la solución patrón acidificada o del agua tratada acidificada o del agua cruda digerirá en un vial del generador de vapor frio. Agregar 10 mL de solución de cloruro estañoso preparada. Proceder a medir en el equipo de absorción atómica.

4. Medición

Se realiza en el espectrofotómetro de absorción atómica SHIMADZU AA-7000, la cual debe ser programada a través del software WizAArd, instalado en la PC.

El software WizAArd permite realizar automáticamente controles para garantizar la calidad de los datos, tales como coeficientes de correlación, verificación inicial de calibración, verificación continua de calibración en el transcurso de las lecturas de concentración de las de las muestras, valores del blanco menores al límite de detección, entre otras.

5. Cálculos y resultados

En caso de que se haga dilución de la muestra, calcular la concentración de mercurio a partir de la ecuación de la curva guardada en el equipo o graficada durante la realización de la curva de calibración. Si hubo dilución de la muestra aplicar la siguiente relación:

$$\mu\text{g Metal} / L = \frac{(\mu\text{g Metal} / L) \times \text{Volumen final (mL)}}{\text{Alicuota (mL)}}$$

ANEXO 5

ENSAYO DE TOXICIDAD

Densidad celular de *Scenedesmus acutus* expuesta a diferentes concentraciones de plomo y mercurio.

Horas	ABSORBANCIA (685nm)					N° cel.mL x 10 ⁶				
	0h	24h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	72h	96h
Control	0,561	0,754	1,115	1,433	1,712	4,37	4,55	5,25	5,90	6,27
5mg/L Pb	0,548	0,784	1,010	1,428	1,682	3,95	4,56	5,13	6,20	6,85
10mg/L Pb	0,544	0,731	1,199	1,402	1,613	3,94	4,42	5,62	6,13	6,67
15mg/L Pb	0,550	0,646	0,628	0,614	0,607	3,96	4,20	4,16	4,12	4,10
20mg/L Pb	0,560	0,643	0,605	0,599	0,587	3,98	4,20	4,10	4,08	4,05
30mg/L Pb	0,558	0,627	0,592	0,584	0,579	3,98	4,15	4,07	4,04	4,03

Horas	ABSORBANCIA (685nm)					N° cel.mL x 10 ⁶				
	0h	24h	48h	72h	96h	0h	24h	48h	72h	96h
Control	0,561	0,754	1,120	1,433	1,712	4,37	4,55	5,25	5,90	6,27
5mg/L Hg	0,558	0,575	0,578	0,582	0,585	3,98	4,02	4,03	4,04	4,05
10mg/L Hg	0,553	0,568	0,574	0,579	0,578	3,97	4,00	4,02	4,03	4,03
15mg/L Hg	0,557	0,562	0,558	0,550	0,544	3,98	3,99	3,98	3,96	3,94
20mg/L Hg	0,551	0,558	0,549	0,540	0,524	3,96	3,98	3,95	3,93	3,89
30mg/L Hg	0,553	0,556	0,544	0,535	0,520	3,97	3,97	3,94	3,92	3,88

ANEXO 6

REMOCION DE PLOMO Y MERCURIO

Densidad celular de *Scenedesmus acutus* expuesta a diferentes concentraciones de plomo y mercurio.

Horas	Absorbancia (685 nm)		N° cel. mL x 10 ⁶	
	0 h	96 h	0 h	96 h
Control	0,561	1,712	4,37	6,27
5 mg/L Pb	0,548	1,682	3,95	6,85
10 mg/L Pb	0,544	1,613	3,94	6,67
15 mg/L Pb	0,550	0,607	3,96	4,10
20 mg/L Pb	0,560	0,587	3,98	4,05
30 mg/L Pb	0,558	0,579	3,98	4,03

Horas	Absorbancia (685 nm)		N° cel. mL x 10 ⁶	
	0 h	96 h	0 h	96 h
Control	0,561	1,712	4,37	6,27
5 mg/L Hg	0,558	0,585	3,98	4,05
10 mg/LHg	0,553	0,578	3,97	4,03
15 mg/LHg	0,557	0,544	3,98	3,94
20 mg/LHg	0,551	0,524	3,96	3,89
30 mg/LHg	0,553	0,520	3,97	3,88