



UNS
ESCUELA DE
POSTGRADO

**EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE
PLOMO EN EL CRECIMIENTO DE LA
MICROALGA MARINA *Tetraselmis suecica*.**

**Tesis para optar el grado de Maestro
en Gestión Ambiental**

Autor:

Bach. Sorayda Mendoza Espinoza

Asesor:

Dr. Juan Fernando Merino Moya

CHIMBOTE - PERÚ

2017



AVAL DE INFORME DE TESIS

El Informe de Tesis: “**Efecto de las concentraciones de plomo en el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica***” que tiene como autor a **Bach. Sorayda Mendoza Espinoza**, alumna de la Maestría en **Gestión Ambiental** ha sido elaborado de acuerdo al Reglamento de Normas y Procedimientos para obtener el Grado Académico de Maestro de la Escuela de Postgrado de la Universidad Nacional del Santa; quedando expedito para ser evaluado por el Jurado Evaluador correspondiente.

Dr. Juan Fernando Merino Moya



UNS
ESCUELA DE
POSTGRADO

HOJA DE CONFORMIDAD DEL JURADO EVALUADOR

**EFFECTO DE LAS CONCENTRACIONES DE PLOMO EN EL CRECIMIENTO DE LA
MICROALGA MARINA *Tetraselmis suecica*.**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAESTRO EN GESTIÓN AMBIENTAL

Revisado y Aprobado por el Jurado Evaluador:

.....

Dr. Walter Eduardo Avalos Reyes

PRESIDENTE

.....

Dr. Juan Fernando Merino Moya

SECRETARIO

.....

Mg. Lucio Eleuterio Encomendero Yépez

VOCAL

AGRADECIMIENTO

Al ser supremo que permite que todas mis células funcionen perfectamente para así tener vida y poder cumplir con otros de mis retos dentro de mi vida profesional.

A la Universidad que es mi alma mater y que me ha permitido seguir estudiando la maestría brindándome todas las facilidades para la culminación de mi tesis.

A mi mentor y asesor el Dr, Juan Fernando Merino Moya por todas sus enseñanzas durante la ejecución de mi tesis, gracias profesor todo lo que ha logrado construir en mi vida profesional.

Al Dr. Carlos Azañero Díaz, por ser mi compañero de trabajo y amigo, por brindarme su apoyo incondicional durante la ejecución y culminación de la tesis

Al Dr. Álvaro Tresierra Aguilar por el apoyo que me brindo para elaboración de este proyecto.

Al Dr. Luis Torres Cabrera por las facilidades brindadas en el laboratorio de Limnología e impacto ambiental.

Al MSc. Daniel Sánchez Vaca por su apoyo en las lecturas de la muestras por espectrofotometría de absorción atómica en el laboratorio Limnología e impacto ambiental.

A la MSc. Eliana Zelada Máznela y la Blga. Acuicultora Carmen Yzasiga Barrera por la facilidad brindada en el laboratorio fisiología, genética y biología reproductiva de los organismos acuáticos

A Oscar Chauca Quintana técnico del laboratorio de Microbiología y Bioquímica por su apoyo y facilidades brindadas durante la ejecución de mi tesis.

A Maribel Astete Reyna técnico del laboratorio de Biología y Ecología por su apoyo y facilidades brindadas durante la ejecución de mi tesis.

A mis compañeros de trabajo por todo el apoyo incondicional que me brindaron, Lic. Luis Bosa , Blga. Acui. Mirian Velásquez Guarniz, MSc. Wilian Capa Robles.

AUTOR

DEDICATORIA

A mis hijos Ericka, Rafael, Sore, por darme la fortaleza para seguir avanzando en mi vida profesional y así poder luchar para que la vida nos depare un futuro mejor.

A mi esposo por ser el motor de mi familia que me brindo todo su apoyo incondicional para la culminación de mi tesis.

A mi amada madre y hermana que siempre estuvieron a mi lado brindándome su apoyo y consejos para ser de mí una mejor persona en mi vida profesional.

CONTENIDO

CAPÍTULO I	1
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	1
1.2. Antecedentes de la investigación	2
1.3. Formulación del problema de investigación.....	4
1.4. Delimitación del estudio.....	4
1.5. Justificación e importancia de la investigación.....	5
1.6. Objetivos de la investigación	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
CAPÍTULO II	7
MARCO TEÓRICO.....	7
2.1. Fundamentos teóricos de la investigación	7
2.2. Marco conceptual.....	8
CAPÍTULO III	10
MARCO METODOLÓGICO.....	10
3.1. Hipótesis central de la investigación	10
3.2. Variables e indicadores de la investigación	10
3.3. Métodos de la investigación.....	10
3.4. Diseño de la investigación	11
3.5. Población y muestra	11
3.6. Actividad del proceso investigativo	12
3.7. Técnicas e instrumentos de la investigación	13
3.8. Procedimiento para la recolección de datos	15
3.9. Técnicas de procesamiento y análisis de los datos.....	15
CAPÍTULO IV	16
RESULTADOS	16
4.1. Crecimiento poblacional.....	16
4.2. Tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD).....	17
4.3. Crecimiento en biomasa de <i>T. suecica</i>	18
4.4. Concentración del Pb en el agua de cultivo.....	20
4.5. Tasa de asimilación del Pb por los cultivos de <i>T. suecica</i>	21
4.6. Capacidad e intensidad de asimilación del Pb por <i>T. suecica</i>	22

4.7. Morfología de <i>T. suecica</i> expuestas a diferentes concentraciones de Pb.....	23
4.8. Parámetros ambientales de los cultivos de <i>T. suecica</i>	24
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	33
5.1. Conclusiones	33
5.2. Recomendaciones	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
ANEXOS.....	42

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables para obtener los indicadores.....	10
Tabla 2. Diseño experimental de los tratamientos dosificados con Pb en el cultivo de T. suecica.....	11
Tabla 3. Composición química del medio Guillard f/2.	12
Tabla 4. Crecimiento poblacional (10×10^4 cel mL ⁻¹) de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm).	16
Tabla 5. Tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb en el día 6 de cultivo.	18
Tabla 6. Tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb en el día 7 de cultivo.	18
Tabla 7. Crecimiento en biomasa de los cultivos de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb.....	19
Tabla 8. Concentración del Pb (mg L ⁻¹) en los cultivos de T. suecica (media \pm).	20
Tabla 9. Asimilación (%) diaria del Pb en los cultivos de T. suecica en diferentes concentraciones de plomo.	21
Tabla 10. Capacidad (k) e intensidad (1/n) de asimilación del plomo de los cultivos de T. suecica dosificada con diferentes concentraciones de Pb.....	22
Tabla 11. Temperatura (°C) en los cultivos de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm).	25
Tabla 12. pH de los cultivos de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm).	25
Tabla 13. Salinidad en los cultivos de T. suecica dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm).	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Células <i>T. Suecica</i> en un preparado en fresco (40x).....	11
Figura 2. Distribución al azar de las unidades experimentales con los cultivos de <i>T. suecica</i> Dosificadas Con Diferentes Concentraciones De Pb.	13
Figura 3. Crecimiento poblacional de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de Pb.....	17
Figura 4. Crecimiento En biomasa promedio (mg L^{-1}) de los cultivos de <i>T. suecica</i> Dosificados con diferentes concentraciones de Pb.....	19
Figura 5. Concentración del Pb en los cultivos de <i>T. suecica</i>	21
Figura 6. Regresión lineal de la biomasa algal y la concentración del Pb por los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de Pb: A) 5 mg L^{-1} ; B) 10 mg L^{-1} Y C) 20 mg L^{-1}	23
Figura 7. Células de <i>T. suecica</i> creciendo Con diferentes dosificaciones de Pb. A) cultivo control; B) con 5 mg L^{-1} ; C) con 10 mg L^{-1} ; D) con 20 mg L^{-1} de Pb.	24

ÍNDICE DE ANEXO

Anexo 1. Curva de calibración de absorción y concentración de plomo (Pb).....	41
Anexo 2. Crecimiento poblacional promedio de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de Pb (5 mg L ⁻¹ , 10 mg L ⁻¹ , 20 mg L ⁻¹).	41
Anexo 3. Valores de Crecimiento en biomasa (mg L ⁻¹) de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de plomo.....	42
Anexo 4. Valores de la concentración del Pb (mg L ⁻¹) en los cultivos de <i>T. suecica</i>	42
Anexo 5. Valores diarios de la temperatura (°C) en los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de plomo (Pb).	43
Anexo 6. Valore diarios del pH de los cultivos de <i>T. suecica</i> dosificados con diferentes concentraciones de plomo (Pb).	43
Anexo 7. Asimilación (X/M, mg g ⁻¹) del Pb obtenidos de la concentración del metal (mg L ⁻¹) y la densidad óptica algal (g L ⁻¹).	45

RESUMEN

Se evaluó el efecto de las diferentes concentraciones del Pb en el crecimiento de la microalga marina *Tetraselmis suecica*. Los ensayos fueron realizada según la metodología de la ecuación de Guillard para determinar tasa de crecimiento, tiempo de duplicación, así como también la modelo de Freundlich para evaluar la capacidad e intensidad de asimilación. Se empleó el diseño de estímulo creciente con tres tratamientos experimentales (5, 10 y 20 mgL⁻¹ de Pb) y un grupo control, cada uno con tres repeticiones. Los cultivos de *T. suecica* se realizaron en botellas plásticas 1.5 L de capacidad, agitados por burbujeo de aire constante (1 L min⁻¹) e iluminados de manera continua con luz fluorescente de 40 W. La temperatura (22,1 a 22,5°C) y el pH (8,3 a 9,9) fueron uniformes. El medio de cultivo fue Guillard F/2 y el plomo fue empleado como acetato der Pb. La experiencia duró 7 días, y las concentraciones finales del Pb fueron determinada por espectrofotometría de absorción atómica. Los resultados demuestran que las diferentes concentraciones de Pb dosificados en los cultivos de *T. suecica* no afectaron ($p > 0,05$) la tasa de crecimiento, ni el tiempo de duplicación en todos los tratamientos y el control; sin embargo, la tasa de asimilación fue variable y estuvo en función a las concentraciones iniciales usadas. Las capacidades de asimilación del Pb fueron mayores en los cultivos con 5 mg L⁻¹ de Pb (3,56 mg g⁻¹) y la mayor intensidad asimilación (1/n) en los cultivos con 10 mg L⁻¹ (1,944 mg g⁻¹). Además, se observó la formación de gránulos intracelulares y espacios lisígenos que incrementaron con el tiempo hasta ocasionar la muerte celular en los cultivos dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb..

Palabras claves: elemento Pb, medio de cultivo, ecuación de Freundlich, *Tetraselmis suecica*.

ABSTRACT

The effect of the different concentrations of Pb on the growth of the marine microalga *Tetraselmis suecica* was evaluated. The tests were carried out according to the methodology of the Guillard equation to determine growth rate, time of duplication, as well as the Freundlich model to evaluate the capacity and intensity of assimilation. The design of increasing stimulus was used with three experimental treatments (5, 10 and 20 mgL⁻¹ of Pb) and a control group, each with three repetitions. The cultures of *T. suecica* were made in plastic bottles 1.5 L capacity, agitated by constant air bubbling (1 L min⁻¹) and continuously illuminated with fluorescent light of 40 W. The temperature (22.1 to 22, 5 ° C) and pH (8.3 to 9.9) were uniform. The culture medium was Guillard F/2 and the lead was used as acetate Pb. The experience lasted 7 days, and the final concentrations of Pb were determined by atomic absorption spectrophotometry. The results show that the different concentrations of Pb dosed in *T. suecica* cultures did not affect ($p > 0.05$) the growth rate, nor the doubling time in all the treatments and the control; however, the assimilation rate was variable and was a function of the initial concentrations used. The assimilation capacities of Pb were higher in the cultures with 5 mg L⁻¹ of Pb (3.56 mg g⁻¹) and the highest assimilation intensity (1/n) in the cultures with 10 mg L⁻¹ (1,944 mg g⁻¹). In addition, the formation of intracellular granules and lysine spaces that increased over time to cause cell death in the cultures dosed with 20 mg L⁻¹ of Pb was observed.

Key words: Pb element, culture medium, Freundlich equation, *Tetraselmis suecica*

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento y fundamentación del problema de investigación

La contaminación ambiental es uno de los problemas más importantes en nuestro mundo que surge a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fenómenos naturales), o bien debido a los diferentes procesos productivos del hombre (actividades antropogénicas) inherentes a las actividades de la vida diaria (Albert, 2004). A pesar que las actividades productivas impulsan el desarrollo económico de los países, estas actividades, principalmente las del tipo industrial, minero, metalúrgico y agrícola, generan cuantiosas cantidades de contaminantes con elementos metálicos, los cuales al ser dispuestos deterioran el medio ambiente (Acuña-González *et al.*, 2004).

En la actualidad, los océanos están catalogados como los ecosistemas más vulnerables, debido a las excesivas descargas de contaminantes que se realizan vía terrestre, acuático-terrestre o atmosférica (Coll *et al.*, 2004; García-Céspedes *et al.*, 2004; Spongberg, 2004; Rojas de Astudillo *et al.*, 2005). Si bien muchos de los metales, como el zinc y el cobre, son requeridos para el metabolismo celular, elevadas concentraciones de estos originan condiciones de toxicidad (Tadro *et al.*, 1990). Por ende, algunos sistemas biológicos (bacterias, plantas y hongos) han sido propuestos con el fin de estudiar los efectos de la contaminación por elementos metálicos y buscar soluciones tendientes a disminuir su presencia en el medio natural, de entre los cuales, las microalgas destacan por su eminente capacidad acumulativa de iones metálicos (Hernández-Pérez y Labbé, 2014).

Las microalgas constituyen la base de la cadena trófica y el principal componente planctónico en los ambientes acuáticos, por lo que los cambios en sus comunidades repercuten drásticamente en todos los niveles tróficos (Nalewajko y Olavenson, 1998; Franklin *et al.*, 2000). Estos microorganismos son los mayores productores primarios en el planeta, responsables de aproximadamente la mitad de la producción de oxígeno presente en la atmósfera terrestre; asimismo, representan la principal fuente de alimento

para el zooplancton, los moluscos, crustáceos y las larvas de diversos peces (Fisher y Jones, 1981).

El estrés que producen diferentes contaminantes en las microalgas altera su composición bioquímica que impacta negativamente en el contenido de ácidos grasos, minerales, aminoácidos, esteroides, azúcares y vitaminas; además, tienen la capacidad de acumular sustancias tóxicas, como los metales, que pueden ser transferidos a lo largo de la cadena trófica (Walsh, 1988). En consecuencia, el impacto de los diferentes contaminantes en las microalgas ocasiona cambios en la composición de especies propiciando la dominancia de algunas especies sobre otras generando un hábitat ecológicamente desequilibrado.

Según Tadros *et al.* (1990), muchos de los metales como el Zn y Cu a concentraciones bajas, juegan un papel esencial en el metabolismo de las microalgas; sin embargo, cuando las concentraciones son altas, originan condiciones de contaminación del medio acuático que provocan desbalances metabólicos en el fitoplancton. Algunas microalgas han sido consideradas como especies modelos para estudiar efectos de contaminación. En consecuencia, las microalgas pueden ser utilizadas en el monitoreo de las condiciones de salubridad de ambientes acuáticos, marino y dulceacuícolas, lo que abre la posibilidad de utilizar algunas especies de microalgas para limitar o minimizar la presencia de metales y/o sustancias tóxicas en ambientes acuáticos.

1.2. Antecedentes de la investigación

En los lugares en donde se desarrollan actividades mineras y metalúrgicas se detecta la presencia de diversos elementos metálicos en fuentes de agua cercanas (Puga *et al.*, 2006). El retiro de estos contaminantes urge y es de importancia para mantener el equilibrio de las comunidades de animales y vegetales que habitan en estos ecosistemas.

Los metales pesados, por su carácter no biodegradable, tienen una significativa influencia en la salud de los organismos. Se ha demostrado que estos elementos producen complejos con sustancias orgánicas que inducen a un desequilibrio metabólico en las microalgas (Mount y Stephan, 1997). Estos metales, presentan gran afinidad como ligando por los grupos sulfhídrico, radicales aminos, fosfato carboxilo e hidroxilo; como resultado de estas uniones (ligando-metal) la célula es afectada por disrupción en la

estructura de proteínas, lo que implica la inhibición de su actividad, desplazamiento de elementos esenciales del metabolismo estándar, produciendo efectos de deficiencia, y catálisis de reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) (Navarro *et al.*, 2007). En tal sentido, se ha recurrido al uso de células vivas para concentrar los metales pesados mediante procesos activos (ingreso al interior de la célula) y/o pasivos (unión a la superficie celular), conocidos como bioadsorción y bioacumulación (Malik, 2004).

En relación a la acumulación de los metales pesados en microalgas, Cordero *et al.* (2005) evaluaron el efecto tóxico de los metales cadmio (Cd), cobre (Cu), mercurio (Hg) y plomo (Pb) en *Tetraselmis chuii* y establecieron que el Hg y Pb causan mayor disminución en la biomasa microalgal, siendo el Pb a 0,40 mg L⁻¹ letal al 50% (CL50) para los cultivos, lo que corresponde a tres veces la toxicidad del Hg y trece veces menor que el Cd. *Chlorella vulgaris* es capaz de acumular hasta un 5% de Cu presente en el medio, incluso siendo cultivadas en bajas densidades (2 x 10⁷ cel. mL⁻¹) (Moreno-Garrido, 2000). La microalga *Scenedesmus obliquus*, también cuenta con esta capacidad asimilativa y remueve hasta el 95% de Cr en el medio acuático (Veranes *et al.*, 2011).

Del mismo modo, Moreno (2007) evaluó el efecto del Cd y vanadio (V) sobre el crecimiento, morfología y contenido de pigmentos de *Scenedesmus sp.* y *Dunaliella viridis*, encontrando alteraciones en los organelos involucrados en la producción de pigmentos (cloroplastos) y en los encargados de almacenamiento de metabolitos energéticos (pirenoides y vacuolas lipídicas); además, se observó inhibición en el crecimiento poblacional de las microalgas ; no obstante, ambas especies presentaron mecanismos de adaptabilidad al estrés provocado por estos metales.

En nuestra localidad se han realizado algunos ensayos preliminares con Pb sobre *Dunaliella sp.*, y *Scenedesmus acutus* y los resultados fueron disímiles en el crecimiento,, para los rangos ensayados (de 5 a 10 mg L⁻¹), por lo que es necesario realizar estudios más exhaustivos para determinar la influencia del Pb en el crecimiento y su efecto en la morfología celular de las microalgas.

1.3. Formulación del problema de investigación

¿Cuál es el efecto de las concentraciones de Plomo en el crecimiento poblacional de la microalga marina *T. suecica*, en condiciones de laboratorio?

1.4. Delimitación del estudio

Desde el año 1995, el Ministerio de Energía y Minas del Perú (MEMP) a identificando, a lo largo de la costa peruana, un total de 24 empresas con 30 plantas de beneficio con deposición de residuos "in situ", relaves y escorias. De éstas, sólo tres tienen deposición de sus vertimientos en el medio marino costero. Para el año 2017, existen 30 empresas mineras reportadas por el MEMP. Los productos finales de estas plantas son los minerales de baritina molida, bentonita molida, cemento Portland, cobre, plomo, zinc, cadmio, ácido sulfhídrico, cemento blanco, otros productos no metálicos, carbón, hierro, oro, concentrado de cobre y molibdeno, cobre-plata blist y carbonato de calcio, los que son vertidos a los mares sin ningún tratamiento previo atentando contra la biodiversidad.

En la región Ancash existen varias zonas en las que se realiza la extracción de minerales. Una de ellas es la ciudad de Huarmey, que es considerada como un potencial puerto que alberga actividades productivas que se conjugan con las operaciones portuarias de embarque de concentrados de metales pesados (Cu, Zn y Pb), existiendo las posibilidades de introducir metales pesados en el medio acuático y generar dificultades en la biota marina por la complejidad de su movilidad de estos y la capacidad de ser bioacumulados por la flora y fauna marinas.

Los organismos acuáticos tienen la capacidad de asimilar metales trazas cuyas concentraciones son magnificados a través de las cadenas tróficas (Walsh, 1988), incrementando los riesgos de mortandad y de salud, además de ocasionar severas pérdidas económicas a las industrias pesqueras o maricultura. Por lo tanto, el fitoplancton es la base de las cadenas tróficas marinas, su presencia en buenas condiciones es esencial para el normal funcionamiento de las comunidades acuáticas (Walsh *et al.*, 1987). En este sentido, es importante conocer los efectos de contaminantes y agentes químicos sobre las poblaciones algales utilizando los datos obtenidos en pruebas de toxicidad en especies sensibles (Walsh, 1988).

Las microalgas son consideradas excelentes objetos de estudio, por su alta sensibilidad a diversos materiales de prueba, además de utilizarse en el tratamiento de aguas residuales conteniendo metales pesados. La biomasa de microalgas, viva o muerta, puede utilizarse para desarrollar una técnica biológica eficiente teniendo en cuenta las ventajas que representa sus requerimientos nutricionales y la alta tasa de crecimiento que permite alcanzar altas densidades en pocos días, así también su relativa sencillez de manipulación y cultivo en laboratorio (Liu y Dutka, 1984).

1.5. Justificación e importancia de la investigación

Existen algunas cepas de microalga susceptibles de ser utilizadas en estudios de concentración de metales pesados debido a su sensibilidad ante dichos elementos y fundamentalmente, por sus altas tasas de crecimiento y la simpleza de sus medios de cultivo. La alta tasa de crecimiento permite obtener en pocos días, altas concentraciones de biomasa algal que son utilizadas para evaluar los efectos de la concentración del metal o agente tóxico. Siendo necesario desarrollar y ampliar líneas de investigación tendientes a generar y/o mejorar las metodologías específicas utilizadas en el campo de la toxicología, así como también, impulsar la búsqueda de nuevas especies potencialmente bioindicadoras que nos permitan evaluar el efecto de los metales pesados en la estructura poblacional de las microalgas, como primer eslabón de la cadena trófica.

El desarrollo de una metodología con la microalga marina *T. suecica* como modelo para monitorear condiciones de salubridad de los ambientes acuáticos marinos permitirá analizar la relación entre la cantidad del metal a la que los organismos están expuestos. Por lo tanto, la relación dosis-respuesta proporciona una herramienta necesaria para el análisis de los potenciales peligros que presenta el plomo como metal, no solo en el medio acuático sino también en los organismos que habitan en ella, siendo algunos de ellos sustento de diversas actividades económicas y/o alimentarias.

Los sistemas productivos son los ejes principales de la sustentabilidad, basados en la aplicación de tecnologías que no degraden el medioambiente ni agoten los recursos naturales, por lo tanto, la utilización de microalgas es una excelente alternativa para recuperar ambientes acuáticos contaminados por metales pesados y/o sustancias tóxicas.

La investigación realizada con la microalga marina *T. suecica* permitirá disponer de una metodología más apropiada y de nuevos datos para trabajar en un futuro inmediato en la selección de bioindicadores para evaluar la calidad de estos ecosistemas marinos en relación a los metales pesados, y valorar su potencial capacidad biorremediadora

1.6. Objetivos de la investigación

Objetivo general

Determinar el efecto de diferentes concentraciones del Plomo en el crecimiento poblacional de la microalga marina *T. suecica* en condiciones de laboratorio.

Objetivos específicos

- Determinar el crecimiento poblacional (cel mL⁻¹) e incremento de biomasa (g L⁻¹) de la microalga marina *T. suecica* cultivada en diferentes concentraciones de plomo.
- Determinar la mayor tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) de la microalga marina *T. suecica* cultivada a diferentes concentraciones del Plomo.
- Evaluar la capacidad e intensidad de asimilación del plomo por la microalga marina *T. suecica* cultivada en diferentes concentraciones de plomo.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Fundamentos teóricos de la investigación

En los noventa surge el enfoque conocido como desarrollo sustentable, durable o sostenible, basado en los altos niveles de degradación del medio ambiente (contaminación atmosférica, agua y suelos) con pérdida de la biodiversidad. El desequilibrio ecológico altera notoriamente las condiciones naturales del hábitat de animales, vegetales y humanos, poniendo en serio riesgo el futuro de nuestra propia existencia (Gutiérrez, 2007).

La generación de residuos no debe exceder la capacidad de asimilación de los ecosistemas; sin embargo, la generación de residuos orgánicos e inorgánicos producto de la actividad humana excede la capacidad de carga de los ambientes acuáticos, siendo los residuos más comúnmente encontrados en el medio ambiente marino restos de drenados, aguas residuales, vertidos industriales y municipales (Rodríguez y Sandoval, 2001). Estos residuos contienen un amplio rango de contaminantes, entre los que se encuentran petróleo y sus derivados, hidrocarburos halogenados y metales pesados, considerados como sustancias críticas para la salud medioambiental (Vargas, 2005).

Debido a su movilidad en los ambientes acuáticos y toxicidad, los metales se han considerado como los contaminantes que más afectan al medio ambiente, pues aun cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, su persistencia en cuerpos de agua, implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a ser elevada (Cañizares, 2000). La presencia de estos compuestos puede provocar una serie de alteraciones en los organismos acuáticos: alta mortalidad en los estados de vida más sensibles como huevos, larvas y alevines de peces, así como cambios en el desarrollo, la fisiología y el metabolismo de estos organismos (Kennish, 1997).

Las microalgas tienen la capacidad de acumular metales pesados (Barclay *et al* 1994). Becker (1995), afirma que las microalgas son capaces de acumular hasta 5000 veces los metales pesados disueltos en el medio líquido, mediante mecanismos de

adsorción-absorción (pasivo o activo). El proceso en el cual las moléculas se concentran en la interfase de la pared celular se conoce como adsorción, mientras que, cuando las moléculas penetran al interior de la fase sólida en la célula (citoplasma), el proceso es conocido como absorción. El término sorción generalmente es utilizado cuando los procesos de adsorción y absorción ocurren simultáneamente y no se pueden distinguir uno de otro (Agouborde, 2008).

En la ecología del fitoplancton intervienen significativamente los micronutrientes y metales traza presentes en el medio, donde la mayoría son metales traza ligados a la nutrición del fitoplancton tales como: Cobalto (Co), Cobre (Cu), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Níquel (Ni), Molibdeno (Mo), Selenio (Se), Estaño (Sn) y Zinc (Zn). Estos micronutrientes juegan un rol esencial en su metabolismo y crecimiento (Tadros *et al.*, 1990). Sin embargo, desbalances severos de sus concentraciones pueden causar daños de diversa consideración en las células, cuando las especies sensibles del fitoplancton son expuestas a distintas concentraciones de metales traza, los iones metálicos libres actuarán en distinto grado provocando inhibición del crecimiento, cambios morfológicos, respuestas fisiológicas que dependen de cada especie Walsh *et al.* (1987).

La efectividad de las algas para absorber selectivamente cationes metálicos pesados se debe a la presencia de grupos funcionales con elevada densidad electrónica: alginatos y fucoidanos. Siendo los alginatos mayoritariamente los encargados de la biosorción (Davía *et al.*, 2003). El segundo grupo funcional importante son los fucoidanos, los cuales son polisacáridos con grupos sulfatos esterificados, con capacidad de adsorción relativamente baja, siendo más eficaz a bajo pH mediante la desprotonación de sus grupos ácidos. En este sentido las algas marinas aún mantienen cierta capacidad adsorbente de metales pesados bajo estas condiciones incluso a valores cercanos a 2 de pH (Navarro *et al.*, 2004).

2.2. Marco conceptual

Medio de cultivo: nutrientes orgánicos e inorgánicos que permite el crecimiento de las microalgas.

Crecimiento microalgas: aumento del número de células y/o de biomasa en función al tiempo.

Microalgas: microorganismos pigmentados capaces de realizar la fotosíntesis y se caracterizan por que viven en ambientes acuáticos o muy húmedos.

Metales pesados: elementos químicos de alto peso atómico que presentan características físicas y químicas propias y que pueden ser tóxicas o no.

Plomo: Elemento químico de número atómico 82, masa atómica 207,19 y símbolo Pb. Es un metal sólido de color gris azulado, blando, maleable, dúctil, de elevada densidad y mal conductor de la electricidad. Es uno de los metales tóxicos que más se recicla y es muy utilizado en aleaciones, baterías, compuestos y pigmentos, revestimientos para cables, proyectiles y municiones. El plomo en el ambiente se puede encontrar como: sulfato de plomo, cloruro de plomo, acetato de plomo, óxido de plomo, nitrato de plomo y carbonatos de plomo.

Bioacumulación: acumulación de diversas sustancias químicas por organismos animales y vegetales.

Biodegradación: proceso de descomposición natural de una amplia gama de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas por la acción de agentes biológicos.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Hipótesis central de la investigación

Si en condiciones de laboratorio utilizamos diferentes concentraciones de Plomo (5, 10 y 20 mg L⁻¹), con la concentración de 10 mg L⁻¹ se obtiene un mayor crecimiento poblacional de la microalga marina *T. suecica*.

3.2. Variables e indicadores de la investigación

Variable independiente (Vi): Concentraciones de plomo

Variable dependiente (Vd): Crecimiento poblacional de *T. suecica*

Indicadores de la investigación

Tabla 1. Operacionalización de variables para obtener los indicadores.

Variables	Definición conceptual	Dimensiones	Indicadores
Plomo	Es un metal sólido tóxico que más se recicla. El plomo en el ambiente se puede encontrar como compuesto de: sulfato de plomo, cloruro de plomo, acetato de plomo, óxido de plomo, nitrato de plomo y carbonatos de plomo.	Concentración en mg L ⁻¹	T1= (control) T2 =5 mg L ⁻¹ de plomo T3 =10 mg L ⁻¹ de plomo T4 =20 mg L ⁻¹ de plomo
Crecimiento	Aumento de células y/o de biomasa en función al tiempo	Nº de células Biomasa Tasa de crecimiento Tiempo de duplicación Asimilación	Cel mL ⁻¹ peso (g) (μ) TD (%)

3.3. Métodos de la investigación

Método experimental

3.4. Diseño de la investigación

Se empleó el diseño de estímulo creciente (Tabla 2), con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control, ambos trabajados por triplicado.

Tabla 2. Diseño experimental de los tratamientos dosificados con Pb en el cultivo de *T. suecica*.

Tratamientos	Concentración de Pb (mg L ⁻¹)
T ₁	0 (control)
T ₂	5
T ₃	10
T ₄	20

3.5. Población y muestra

Población: La microalga *T. suecica* (Fig.1) fue proporcionado por el Laboratorio de Cultivos de Especies Auxiliares, de la Escuela de Biología en Acuicultura, de la Universidad Nacional del Santa. Todos los cultivos se iniciaron con un inculo de la microalga en fase de crecimiento exponencial, mantenida en agua de mar previamente tratada y enriquecida con medio Guillard F/2, bajo condiciones controladas de luz (2000 lux) y temperatura entre rangos de 21 a 25 °C.



Figura 1. Células *T. suecica* en un preparado en fresco (40x).

Muestra: Los ensayos fueron iniciados con una densidad de $5,1 \times 10^4$ cel mL⁻¹, extraídas de la fase logarítmica de la curva de crecimiento del inculo.

3.6. Actividad del proceso investigativo

Agua de Mar: El agua de mar empleada se obtuvo de la playa “El Dorado” (bahía de Samanco). Para eliminar las impurezas se filtró con malla de 2 μ de diámetro, se agregó 1 mL L⁻¹ de hipoclorito de sodio y se dejó reposar por 24 h. Posteriormente, se neutralizó con tiosulfato de sodio (1 mL L⁻¹). El fundamento de este tratamiento es eliminar los microorganismos presentes en el agua de dilución, por ser el cloro una sustancia bactericida, y así evitar la presencia de otros microorganismos que interfieran en el crecimiento algal.

Inóculos algales: El inóculo de la microalga marina *T. suecica* se preparó a partir de un litro de microalgas con una población de 67,2 x10⁴ cel mL⁻¹, se extrajo de la fase logarítmica un volumen de 84 mL, se aforó a 1000 mL de agua y se obtuvo un tamaño de muestra final de 5,1 x10⁴ cel mL⁻¹ para cada tratamiento.

Medio de cultivo Guillard f/2: El medio de cultivo Guillard f/2 (Tabla 3), se preparó según los estándares establecidos (Guillard, 1975), en agua de mar tratada y filtrada, para ser utilizado en el mantenimiento de la población algal, así como en el control y experimental del cultivo de *T. suecica*.

Tabla 3. Composición química del medio Guillard f/2.

Nutrientes	Concentración (mg L ⁻¹)
Solución de macronutrientes	
NaNO ₃	75,00
PO ₄ H ₂ Na.H ₂ O	5,00
Solución de metales traza	
Na ₂ EDTA	4,36
Cl ₃ Fe.6H ₂ O	3,15
SO ₄ Cu.5H ₂ O	0,01
SO ₄ Zn.7H ₂ O	0,022
Cl ₂ Co.6H ₂ O	0,01
Cl ₂ Mn.4H ₂ O	0,18
MoO ₄ Na ₂ .2H ₂ O	0,006
Solución de vitaminas	
Cianocobalamina (B12)	0,50
Tiamina. HCl (B1)	0,10
Biotina (Vit. H)	0,50

Fuente: Guillard (1975).

Solución stock de Pb: La solución stock de plomo se preparó diluyendo 1,5699 g de acetato de plomo [(CH₃COO)₂ Pb] en 1 L de agua destilada, de tal manera que la concentración final de Pb fue de 1000 mg L⁻¹.

Acondicionamiento de unidades experimentales: Se utilizaron 12 botellas plásticas de 1.5 L de capacidad con un volumen efectivo de 1,0 L de suspensión algal para cada tratamiento. La experiencia se realizó con una densidad celular inicial de 5,1 X 10⁴ cel mL⁻¹, determinadas mediante contajes celulares en cámaras de Neubauer. Todas las unidades experimentales fueron iluminadas con fluorescente de 40 watts, ubicados a 20 cm de los fotobiorreactores. La aireación fue suministrada constantemente por un Blower de ½ HP a razón de 1 L min⁻¹, determinado con un flujómetro Cole Parmer ± 0,1 mL min⁻¹ de sensibilidad, con la finalidad de evitar la sedimentación algal e incrementar el contacto nutriente-microalga y luz.

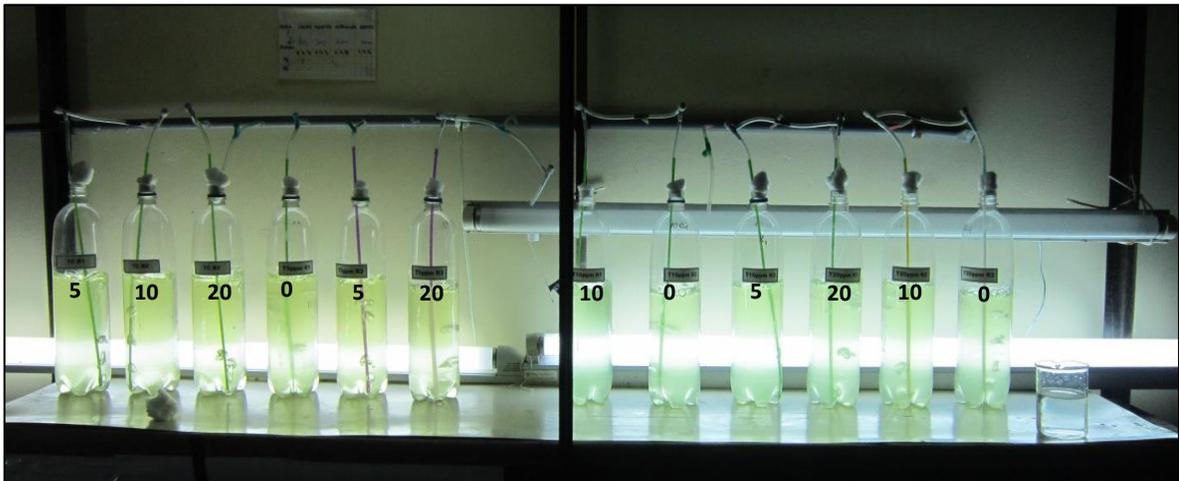


Figura 2. Distribución al azar de las unidades experimentales con los cultivos de *T. suecica* dosificadas con diferentes concentraciones de Pb.

3.7. Técnicas e instrumentos de la investigación

Crecimiento de *T. suecica*: Los incrementos de las poblaciones algales (cel mL⁻¹) de los cultivos se determinaron, diariamente durante 7 días, mediante conteos microscópicos con cámara de Neubauer y microscopio binocular, tomando alícuotas de 0,01 mL. Las tasas crecimiento (μ) y los tiempos de duplicación fueron calculados utilizando las ecuaciones de Guillard (1973):

$$U = \ln (N_1/N_0) / t_1 - t_0$$

$$TD = \ln 2 / u$$

Donde μ = Constante de crecimiento (día^{-1}); TD= tiempo de duplicación; N = número de cel mL^{-1} al tiempo t; t_0 = Tiempo inicial; t_1 = Tiempo final.

Biomasa de *T. suecica*: Para determinar la biomasa, se utilizó el espectrofotómetro de luz UV Parmer, a 560 nm de transmitancia (T), según Álvarez y Gallardo (1989). Las lecturas se realizaron diariamente utilizando 2 mL de cada cultivo, aplicando la siguiente fórmula para determinar la biomasa algal (Griffiths *et al.*, 2011):

$$DO = \text{Log } 100 / T$$

Donde DO (g L^{-1}) = densidad óptica expresada en g por L de masa seca; T = transmitancia

Plomo en agua de cultivo de *T. suecica*: La concentración de plomo en el agua de la suspensión algal se realizó mediante centrifugación a fin de separar la biomasa, donde se obtuvo 50 mL de agua a la que se añadió 0,1 uL de ácido nítrico para estabilizar el plomo en la solución acuosa y proceder a realizar lecturas en el espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer "Analyst 300". Las concentraciones del plomo fueron obtenidas de la curva de calibración (Anexo 1).

Tasa de asimilación del Plomo por *T. suecica*: Las tasas de asimilación del plomo por las células de *T. suecica* en los de los diferentes grupos experimentales se determinaron según la siguiente ecuación:

$$T.A. = (C_f - C_i) / C_i \times 100$$

Donde C_f y C_i corresponden a las concentraciones final e inicial del Pb (mg L^{-1}) de los cultivos.

Capacidad e intensidad de asimilación del plomo por *T. suecica*: Para determinar la capacidad e intensidad de asimilación del Pb por las células de *T. suecica* se aplicó la ecuación de Freundlich (Tien, 2002):

$$X/M = k C^{1/n}$$

Donde X/M = cantidad de plomo asimilado por las algas (mg g^{-1}); k = capacidad de asimilación; $1/n$ = intensidad de asimilación.

Parámetros ambientales: Las salinidades de las unidades experimentales se determinaron diariamente con un salinómetro ATAGO S-28E ($\pm 0,01$). Del mismo modo, las temperaturas se registraron diariamente con un termómetro digital Hanna ($\pm 0,1$ °C) y los valores de pH se determinaron con un pH-metro digital marca Oakton ($\pm 0,01$).

3.8. Procedimiento para la recolección de datos

Se realizaron muestreos diarios de los cultivos de *T. suecica* de los diferentes tratamientos y el control, a través de la observación in situ, utilizando instrumentos de medición y técnicas que permitieron obtener los datos de crecimiento, contenido del plomo en el agua, tasa de asimilación de plomo, capacidad e intensidad de asimilación del plomo, así como también registrar los valores de temperatura, salinidad y pH.

3.9 Técnicas de procesamiento y análisis de los datos

El análisis estadístico aplicado fue un análisis de varianza simple y se utilizó la prueba a posteriori de Tukey con un nivel de significancia de 0,05. El proceso estadístico fue desarrollado con el software SPSS 20,0 para Microsoft Windows 8.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1. Crecimiento poblacional

Los cultivos controles mostraron crecimiento continuo durante los siete días que duraron los ensayos, sin embargo, los cultivos experimentales, en algunos días, presentaron crecimientos significativamente similares ($p < 0,05$) al control. El crecimiento de los cultivos experimentales disminuyó en relación a la concentración del plomo, así tenemos que aquellos dosificado con 20 mg L^{-1} de Pb presentaron los menores valores al final de la experiencia ($35,3 \pm 2,7 \times 10^4 \text{ cél mL}^{-1}$); sin embargo, los tratamientos expuestos a 5 y 10 mg L^{-1} de Pb son significativamente similares ($p > 0,05$) al cultivo control (Tabla 4).

Tabla 4. Crecimiento poblacional ($10 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$) de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm desviación estándar).

Día	Concentración de Pb (mg L^{-1})			
	0	5	10	20
0	$5,1 \pm 0,0^a$	$5,1 \pm 0,0^a$	$5,1 \pm 0,0^a$	$5,1 \pm 0,0^a$
1	$5,5 \pm 1,4^a$	$7,3 \pm 1,8^a$	$8,7 \pm 1,0^a$	$6,6 \pm 1,2^a$
2	$10,1 \pm 1,1^a$	$8,1 \pm 1,3^{ab}$	$6,3 \pm 0,6^{bc}$	$5,2 \pm 1,3^c$
3	$19,5 \pm 2,8^a$	$15,9 \pm 4,4^a$	$15,9 \pm 2,6^a$	$13,3 \pm 0,9^a$
4	$28,3 \pm 3,7^a$	$25,4 \pm 3,9^a$	$26,1 \pm 1,5^a$	$22,8 \pm 2,1^a$
5	$41,9 \pm 1,7^a$	$36,5 \pm 2,6^{ab}$	$29,3 \pm 2,0^b$	$34,4 \pm 4,5^{ab}$
6	$48,8 \pm 6,3^a$	$44,3 \pm 3,3^a$	$38,3 \pm 5,1^a$	$36,1 \pm 4,4^a$
7	$48,9 \pm 4,1^a$	$48,1 \pm 2,9^a$	$45,2 \pm 1,8^a$	$35,3 \pm 2,7^b$

Los valores con diferentes letras indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

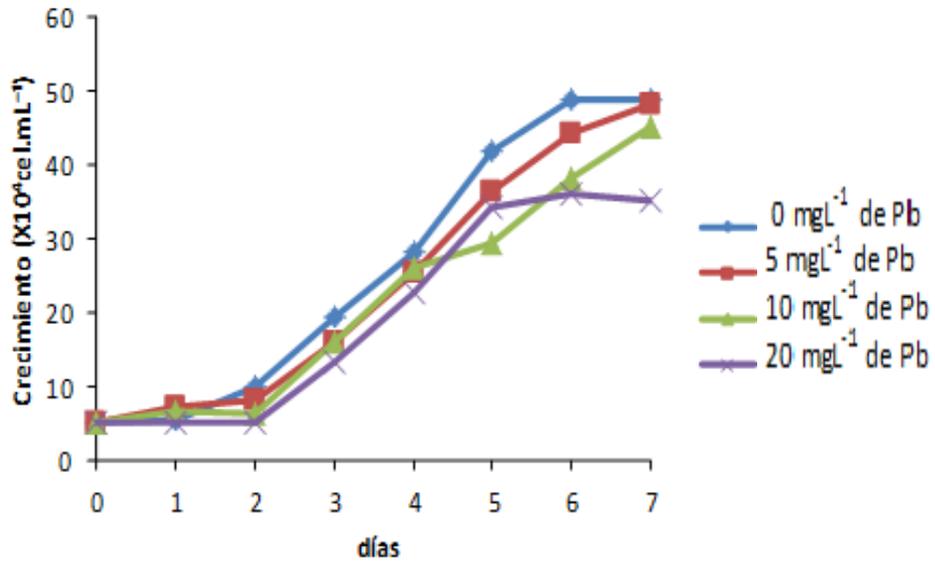


Figura 3. Crecimiento poblacional de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb.

4.2. Tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD)

A efectos de evaluar comparativamente los valores de μ y TD se han considerado los días 6 y 7, cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica y estacionaria del crecimiento, observándose que en el día 6 (Tabla 5) la tasa de crecimiento (μ), en el tratamiento experimental y los controles son significativamente iguales ($p > 0,05$); asimismo, en el día 7, los tratamientos dosificados con 5 y 10 ml L⁻¹ de Pb son estadísticamente similares ($p > 0,05$), y el menor valor de μ se determinaron en los cultivos dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb (Tabla 6).

Respecto al TD, en el día 6, los valores de todos los cultivos fueron estadísticamente similares ($p > 0,05$) (Tabla 5), mientras que en el día 7, los cultivos controles y los dosificados con 5 mg L⁻¹ y 10 mg L⁻¹ de Pb presentaron valores significativamente similares ($p > 0,05$) y diferentes a los de 20 mg L⁻¹ (Tabla 6).

Tabla 5. Tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb en el día 6 de cultivo (media \pm desviación estándar).

Parámetro	Concentraciones de plomo (mg L ⁻¹)			
	0	5	10	20
N _o	5,1	5,1	5,1	5,1
N _f	48,8	44,3	38,3	36,1
Δt	6	6	6	6
μ	0,3764 \pm 0,022 ^a	0,3603 \pm 0,013 ^a	0,3360 \pm 0,021 ^a	0,3262 \pm 0,021 ^a
TD	1,8415 \pm 0,1134 ^a	1,9238 \pm 0,0686 ^a	2,0629 \pm 0,1278 ^a	2,1249 \pm 0,1362 ^a

Los valores de las desviaciones estándar con diferentes letras indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

Tabla 6. Tasa de crecimiento poblacional (μ) y tiempo de duplicación (TD) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb en el día 7 de cultivo (media \pm desviación estándar).

Parámetro	Concentraciones de plomo (mg L ⁻¹)			
	0	5	10	20
No	5,1	5,1	5,1	5,1
N _f	48,9	50,8	42,1	35,3
Δt	7	7	7	7
U	0,3229 \pm 0,1763 ^a	0,3284 \pm 0,1771 ^a	0,3015 \pm 0,1778 ^a	0,2764 \pm 0,1500 ^b
TD	2,1466 \pm 0,0827 ^a	2,1107 \pm 0,0573 ^a	2,2990 \pm 0,0406 ^a	2,5078 \pm 0,0972 ^b

Los valores de las desviaciones estándar con diferentes letras indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.3. Crecimiento en biomasa de *T. suecica*

Todos los cultivos de *T. suecica* mostraron crecimientos en biomasa (g L⁻¹) estadísticamente similares ($p > 0,05$), excepto los días 2 y 7 en los que los cultivos dosificados con 5 y 10 mg L⁻¹ de Pb son estadísticamente similares ($p > 0,05$). Al final de la experiencia, todos los cultivos experimentales mostraron mayores incrementos de biomasa que el control (Tabla 7).

Tabla 7. Crecimiento en biomasa de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Plomo (media \pm desviación estándar).

DÍA	CONCENTRACIÓN (mg L ⁻¹) DE Pb			
	0	5	10	20
0	72,2 \pm 1,2 ^a	75,4 \pm 10,0 ^a	71,8 \pm 2,5 ^a	72,3 \pm 0,6 ^a
1	99,6 \pm 12,1 ^a	88,1 \pm 16,2 ^a	95,1 \pm 6,4 ^a	109,5 \pm 14,8 ^a
2	184,2 \pm 20,4 ^a	142,2 \pm 23,2 ^{ab}	115,9 \pm 12,8 ^b	110,0 \pm 17,2 ^b
3	266,2 \pm 11,0 ^a	228,1 \pm 37,9 ^a	218,6 \pm 10,2 ^a	221,3 \pm 12,4 ^a
4	317,7 \pm 43,4 ^a	318,4 \pm 12,2 ^a	281,2 \pm 49,6 ^a	286,9 \pm 56,5 ^a
5	380,8 \pm 42,9 ^a	396,3 \pm 28,1 ^a	415,2 \pm 46,6 ^a	423,4 \pm 30,8 ^a
6	460,5 \pm 90,8 ^a	446,0 \pm 50,8 ^a	437,7 \pm 83,5 ^a	469,8 \pm 17,4 ^a
7	411,5 \pm 45,0 ^a	484,0 \pm 61,0 ^b	466,9 \pm 84,3 ^b	506,2 \pm 26,4 ^c

Los valores de las desviaciones estándar con diferentes letras indican diferencias significativas ($p > 0.05$).

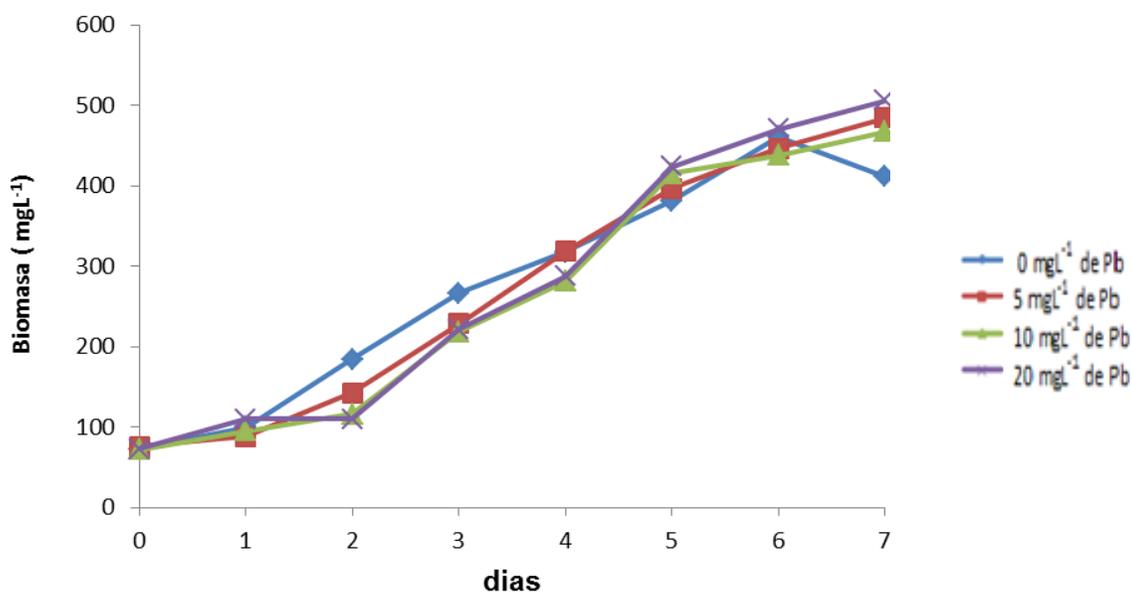


Figura 4. Crecimiento en biomasa promedio (mg L⁻¹) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Plomo.

4.4. Concentración del Pb en el agua de cultivo

Las concentraciones del Pb en el agua de los cultivos algales tienden a disminuir durante los días que duraron los ensayos (Fig. 5), observándose relación directa entre la dosificación inicial del Pb, con valores de 1,90 en los dosificados con 5 mg L⁻¹; 2,47 en los de 10 mg L⁻¹ y 2,71 en los de 20 mg L⁻¹; asimismo, todos los cultivos presentaron diferencias significativas ($p>0.05$), excepto los días 5 y 6 en que los tratamientos dosificados con 10 mg L⁻¹ y 20 mg L⁻¹ son significativamente similares ($p>0,05$). Al final de las experiencias, todos los cultivos mostraron diferencias significativas ($p>0,05$) (Tablas 8).

Tabla 8. Concentración del Pb (mg L⁻¹) en los cultivos de *T. suecica* (media \pm desviación estándar).

Día	Concentración de plomo (mg L ⁻¹)			
	0	5	10	20
0	0,05 \pm 0,00 ^a	5,04 \pm 0,02 ^b	10,17 \pm 0,15 ^c	2001 \pm 0,01 ^d
1	0,00 \pm 0,00 ^a	1,90 \pm 0,01 ^b	2,47 \pm 0,03 ^c	2,71 \pm 0,03 ^d
2	0,00 \pm 0,00 ^a	1,70 \pm 0,02 ^b	2,39 \pm 0,04 ^c	2,61 \pm 0,03 ^d
3	0,00 \pm 0,00 ^a	1,45 \pm 0,02 ^b	2,09 \pm 0,05 ^c	2,58 \pm 0,06 ^d
4	0,00 \pm 0,00 ^a	1,25 \pm 0,02 ^b	2,09 \pm 0,05 ^c	2,42 \pm 0,04 ^d
5	0,00 \pm 0,00 ^a	1,13 \pm 0,07 ^b	2,08 \pm 0,05 ^c	2,11 \pm 0,05 ^c
6	0,00 \pm 0,00 ^a	0,77 \pm 0,02 ^b	1,85 \pm 0,03 ^c	1,78 \pm 0,05 ^c
7	0,00 \pm 0,00 ^a	0,43 \pm 0,02 ^b	1,24 \pm 0,05 ^c	1,60 \pm 0,02 ^d

Los valores de las desviaciones estándar con diferentes letras indican diferencias significativas ($P>0,05$).

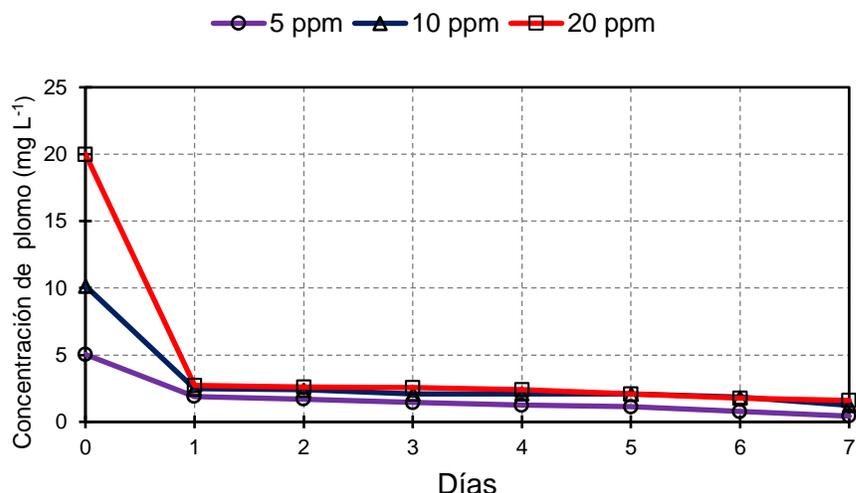


Figura 5. Concentración del Pb en los cultivos de *T. suecica*.

4.5. Tasa de asimilación del Pb por los cultivos de *T. suecica*

Las tasas de asimilación del Pb varían según la concentración inicial y los días de cultivo, presentando diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos y el control. La mayor asimilación inicial del plomo incrementa con su dosificación con valores significativamente diferentes de 62,30 %, 75,78 % y 86,50 % en los cultivos dosificados con 5, 10 y 20 mg L⁻¹ de Pb, respectivamente; posteriormente todos los cultivos muestran diferencias significativas ($p > 0,05$); sin embargo, pese a la similitud presentada en el día 4 (con 5 y 20 mg L⁻¹ de Pb), día 5 (con 5 y 10 mg L⁻¹ de Pb) y día 6 (con 5, 10 y 20 mg L⁻¹ de Pb), todos los cultivos al final de la experiencia son estadísticamente diferentes (Tabla 9).

Tabla 9. Asimilación (%) diaria del Pb en los cultivos de *T. suecica* en diferentes concentraciones de plomo.

Días	Concentración de Pb (mg L ⁻¹)							
	0		5		10		20	
	Asim.	%	Asim.	%	Asim.	%	Asim.	%
1	0,00 ± 0,00 ^a	100,00	3,14 ± 0,02 ^b	62,30	7,69 ± 0,15 ^c	75,78	17,30 ± 0,01 ^d	86,50
2	0,00 ± 0,00 ^a	0,00	0,20 ± 0,01 ^b	3,97	0,08 ± 0,03 ^c	0,78	0,10 ± 0,03 ^d	0,45
3	0,00 ± 0,00 ^a	0,00	0,25 ± 0,02 ^b	4,96	0,30 ± 0,04 ^c	2,94	0,03 ± 0,03 ^a	0,15
4	0,00 ± 0,00 ^a	0,00	0,19 ± 0,02 ^b	3,97	0,00 ± 0,05 ^a	0,00	0,17 ± 0,06 ^b	0,80
5	0,00 ± 0,00 ^a	0,00	0,13 ± 0,02 ^a	2,38	0,02 ± 0,05 ^a	0,10	0,31 ± 0,04 ^b	2,05
6	0,00 ± 0,00 ^a	0,00	0,35 ± 0,07 ^b	7,14	0,23 ± 0,05 ^b	2,25	0,32 ± 0,05 ^b	1,15
7	0,00 ± 0,00 ^a	0,00	0,34 ± 0,02 ^b	6,75	0,61 ± 0,03 ^c	2,45	0,18 ± 0,05 ^d	2,70

Los valores de las desviaciones estándar con diferentes letras indican diferencias significativas ($p > 0,05$).

4.6. Capacidad e intensidad de asimilación del Pb por *T. suecica*

La capacidad de asimilación (k) en los cultivos dosificados con 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} y 20 mg L^{-1} de Pb no muestran diferencia significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos, sin embargo la intensidad de asimilación ($1/n$) es mayor en aquellos dosificados con 10 mg L^{-1} de plomo ($1,944 \text{ mg g}^{-1}$). Los valores de a y b fueron determinados por regresión lineal empleando la fórmula de Freundlich con altos valores de los coeficientes de regresión lineal (R^2), (Tabla 11, Fig. 6).

Tabla 10. Capacidad (k) e intensidad ($1/n$) de asimilación del plomo de los cultivos de *T. suecica* dosificada con diferentes concentraciones de Pb.

Variables	Concentraciones de Pb (mg L^{-1})		
	5	10	20
a^*	0,437	0,338	0,344
b^*	1,645	1,944	1,695
K	2,735 ^a	2,178 ^a	2,21 ^a
$1/n$	1,645 ^a	1,943 ^b	1,695 ^a
R^2	0,886	0,847	0,897

*Los valores a y b se obtienen de la ecuación lineal.

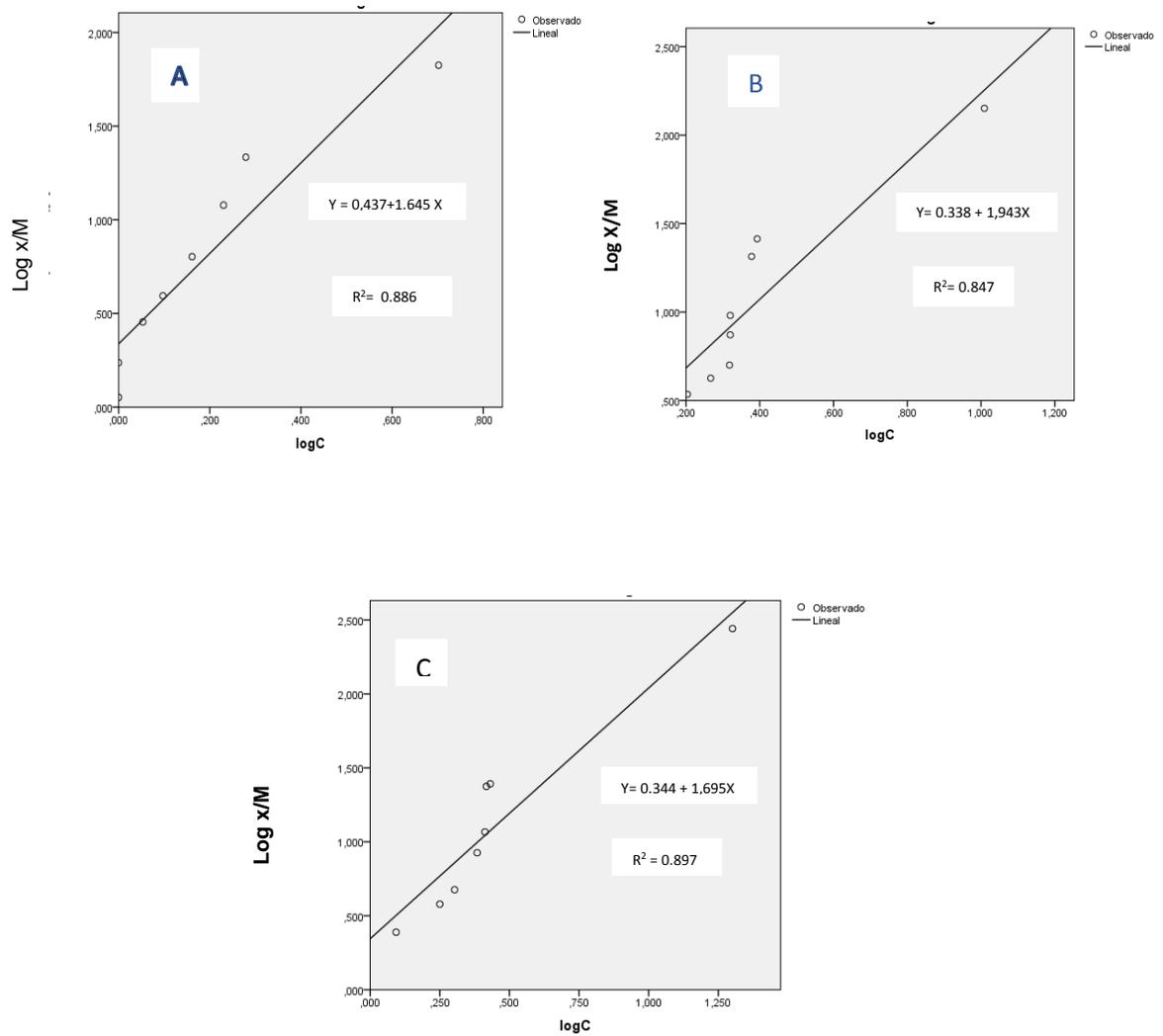


Figura 6. Regresión lineal de la biomasa algal y la concentración del Pb por los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb: A) 5 mg L⁻¹; B) 10 mg L⁻¹ y C) 20 mg L⁻¹.

4.7. Morfología de *T. suecica* expuestas a diferentes concentraciones de Pb

El efecto del Pb sobre las células de *T. suecica* observadas microscópicamente, muestra acumulación de gránulos oscuros alrededor de las vacuolas que aumentan progresivamente de tamaño (Fig. 7).

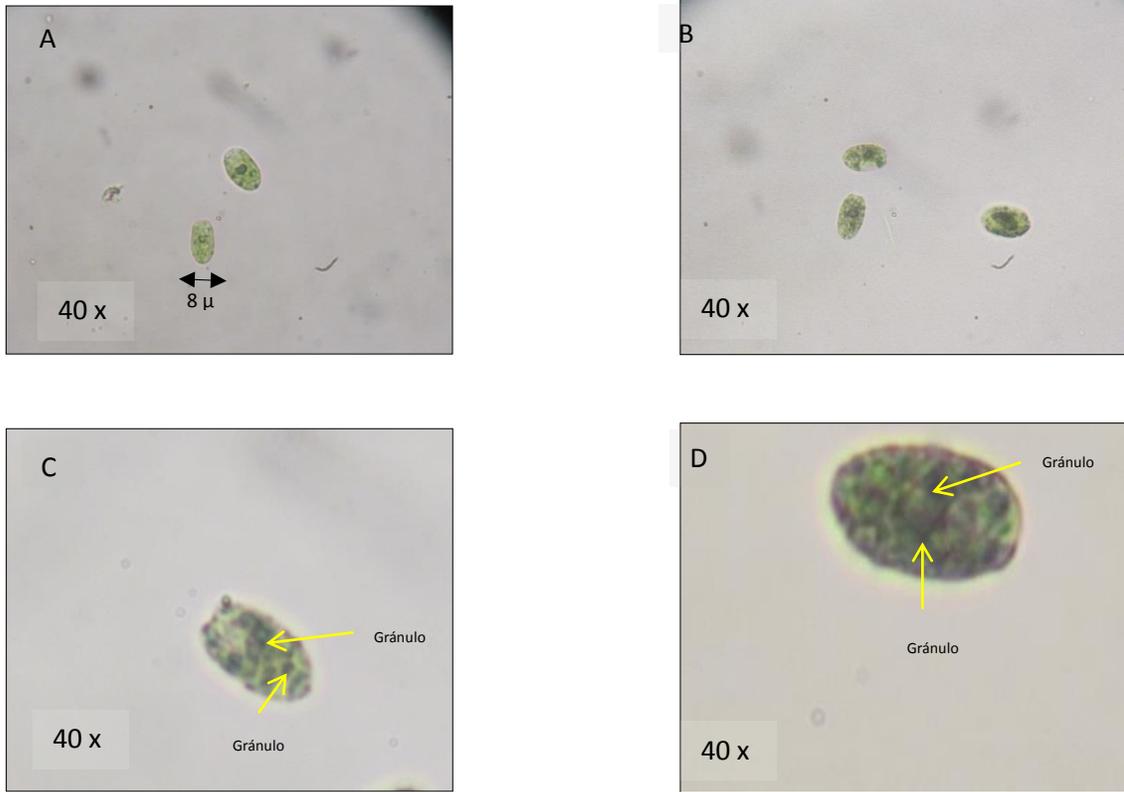


Figura 7. Células de *T. suecica* creciendo con diferentes dosificaciones de Pb. A) cultivo control; B) con 5 mg L⁻¹; C) con 10 mg L⁻¹; D) con 20 mg L⁻¹ de Pb.

4.8. Parámetros ambientales de los cultivos de *T. suecica*

La temperatura, pH y la salinidad de los cultivos de *T. suecica* presentan ligeras variaciones, dentro de los rangos adecuados en las diferentes dosificaciones ensayadas (Tablas 11, 12 y 13).

Tabla 11. Temperatura (°C) en los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm desviación estándar).

Día	Concentración Pb (mg L ⁻¹)			
	0	5	10	20
0	21,6 \pm 0,0	21,6 \pm 0,0	21,6 \pm 0,0	21,5 \pm 0,1
1	21,8 \pm 0,3	22,0 \pm 0,1	21,9 \pm 0,4	22,0 \pm 0,1
2	22,1 \pm 0,1	22,2 \pm 0,1	22,4 \pm 0,2	22,5 \pm 0,2
3	22,2 \pm 0,1	22,3 \pm 0,1	22,5 \pm 0,2	22,5 \pm 0,3
4	21,9 \pm 0,1	21,9 \pm 0,1	22,2 \pm 0,2	22,2 \pm 0,2
5	21,6 \pm 0,1	21,8 \pm 0,1	21,9 \pm 0,2	21,8 \pm 0,2
6	21,2 \pm 0,2	21,2 \pm 0,1	21,4 \pm 0,3	21,3 \pm 0,1
7	21,3 \pm 0,1	21,2 \pm 0,1	21,5 \pm 0,3	21,4 \pm 0,1

Tabla 12. pH de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm desviación estándar).

DÍA	Concentración Pb (mg L ⁻¹)			
	0	5	10	20
0	8,6 \pm 0,1	8,6 \pm 0,0	8,5 \pm 0,1	8,5 \pm 0,1
1	9,0 \pm 0,1	8,8 \pm 0,2	8,6 \pm 0,1	8,6 \pm 0,0
2	9,4 \pm 0,4	9,1 \pm 0,0	9,1 \pm 0,0	8,8 \pm 0,6
3	9,9 \pm 0,8	9,2 \pm 0,2	9,1 \pm 0,2	9,5 \pm 0,2
4	9,2 \pm 0,6	8,7 \pm 0,2	8,7 \pm 0,2	9,0 \pm 0,0
5	9,3 \pm 0,5	8,7 \pm 0,1	8,5 \pm 0,4	8,9 \pm 0,3
6	9,2 \pm 0,6	8,5 \pm 0,2	8,3 \pm 0,2	8,3 \pm 0,2
7	9,5 \pm 0,5	8,7 \pm 0,2	8,4 \pm 0,2	8,4 \pm 0,1

Tabla 13. Salinidad en los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb (media \pm desviación estándar).

Día	Concentración Pb (mg L ⁻¹)			
	0	5	10	20
0	31 \pm 0,0	31 \pm 0,0	31 \pm 0,0	31 \pm 0,0
1	32 \pm 2,0	32 \pm 0,0	31,3 \pm 0,2	32 \pm 0,0
2	31,3 \pm 1,2	32 \pm 0,0	32 \pm 0,0	31,3 \pm 1,2
3	32,3 \pm 1,5	31,3 \pm 0,6	31,3 \pm 2,3	31,3 \pm 1,2
4	32,6 \pm 1,2	32,3 \pm 0,6	34 \pm 0,0	32,6 \pm 1,2
5	34 \pm 0,0	34 \pm 0,0	34,3 \pm 0,6	34 \pm 0,0
6	35 \pm 0,0	34,6 \pm 0,6	35 \pm 0,0	34,6 \pm 0,6

CAPÍTULO IV

DISCUSION

Los valores del crecimiento de *T. suecica* que se observaron entre los diversos tratamientos revela la capacidad de adaptación al estrés causado por las concentraciones de plomo y su acumulación. Según Becker (1995), las microalgas son capaces de acumular hasta 5000 veces los iones disueltos en el medio líquido. Los resultados mostraron que con 5 mg L⁻¹ es similares ($p > 0,05$) al control, al parecer, por la activación de algún proceso de adecuación o aclimatación, mientras que Cordero *et al.* (2005), demostraron que las células de *T. chuii* no expuestas a los metales pesados (Cd, Pb, Hg, Cu) tienen mejores crecimientos que los expuestos a tales metales; sin embargo, los menores valores observados en la fase estacionaria del crecimiento en los dosificados con 20 mg L⁻¹ son consecuencia de los efectos tóxicos ocasionados por la alta concentración del Pb que propician la presencia de abundantes granulaciones intracelulares.

Las concentraciones del Pb utilizados no interfirieron en el crecimiento poblacional de la microalga *T. suecica* que alcanzaron la fase final del crecimiento exponencial en el día 6 (Fig. 3), ello probablemente debido a su capacidad de asimilación y neutralización de sus efectos tóxicos. El efecto de los metales pesados en el crecimiento algal se relaciona con la naturaleza del metal, en tal sentido Cordero *et al.* (2005), demostraron que con 0,40 mg L⁻¹ de Pb en forma de cloruros, se afectó negativamente el crecimiento que *T. chuii*, debido a no es esencial para su crecimiento. En consecuencia, es probable que el acetato de Pb utilizado en la experiencia enmascare o minimice sus efectos nocivos debido al uso del anión acetato como fuente de carbono orgánico como lo demostraron Villavicencio y Sagástegui (2013) en el cultivo de *D. salina*.

La poca interferencia del Pb en los procesos de duplicación y crecimiento de *T. suecica* en la tasa de crecimiento poblacional (μ) observada en los días 6 y 7, demuestra la poca o nula interferencia en los procesos de reproducción y crecimiento algales debido a su adecuación a las diferentes concentraciones del Pb utilizado. Asimismo, la activa asimilación del Pb en forma de gránulos intracelulares (Fig. 7) ocasiona disminución del área fotosintética que según Hendry & Price, (1993) consideran que la pérdida del área fotosintética está asociada a estrés ambiental, por lo que el contenido de pigmentos es

utilizado frecuentemente como biomarcador de la exposición a diversos tóxicos como los metales pesados (Couderchet & Vernet, 2003). Otros estudios revelan que *T. suecica* expuesta a concentraciones de 15 y 30 mg L⁻¹ de Pb durante 96 h disminuye significativamente el contenido de los pigmentos fotosintéticos (Gonzales, 2006), y es probable que en la presente experiencia, la dosificación con 20 mg L⁻¹, disminuya el área fotosintética de la célula *T. suecica*.

Las curvas del crecimiento expresados en biomasa (g L⁻¹) son más representativos que los de densidad poblacional (cel mL⁻¹), por la mayor exactitud de las mediciones fotométricas y porque según Tien (2002), el peso seco es el principal parámetro para cuantificar la absorción del metal en relación al incremento de la biomasa durante el crecimiento de los cultivos. Las similares tendencias determinadas en los todos los tratamientos (5, 10 y 20 mg L⁻¹) revelan la capacidad para asimilar activamente los iones de Pb sin afectar el crecimiento; sin embargo, al final del experimento, todos los cultivos dosificados con Pb mostraron mayores valores que el control y los dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb alcanzaron mayores valores significativamente diferentes (Tabla 7).

Los cultivos dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb en el día 7 presentaron menores valores de la densidad poblacional (35,3 x 10⁴ cel mL⁻¹) y mayores valores de biomasa (506,2 mg L⁻¹), debido a la reducción del área fotosintética que limita la división celular y al aumento del peso por la acumulación intracelular del Pb en forma de gránulos o vacuolas, lo que coincide con lo mencionado por Klerks y Bartholomew (1991). Además, la reducción del área fotosintética por la asimilación del Pb ocasionó disminución del color verde característico de los cultivos de *T. suecica* que son más notorios en los cultivos con mayores dosificaciones de Pb 20 mg L⁻¹, probablemente fue debido a la mayor afinidad del Pb por los sitios activos de asimilación en concentraciones mayores del metal ocasionando pérdida de pigmentos clorofilianos (Tien, 2002).

Las disminuciones diarias de las concentraciones del Pb en las suspensiones algales (Tabla 8, Fig. 5), se debe a su elevada precipitación inicial sobre las células de *T. suecica* por la presencia de fucoïdanos (Navarro *et al*; 2007), y el ingreso activo por la presencia de alginatos (Davis *et al* 2003), procesos responsables de la bioacumulación del Pb presente en el medio acuático.

Los valores de asimilación diaria no presentan un patrón definido debido a las diferentes concentraciones del Pb utilizado y a las interferencias derivadas de la precipitación extracelular y formación de complejos químicos con otros nutrientes. Por otro lado, la mayor sedimentación algal observada en los cultivos dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb sería consecuencia de la mayor acumulación del Pb que ocasiona finalmente la muerte de las células de *T. suecica* (Fig. 7). La capacidad de asimilación de las microalgas permite su uso en la remediación de efluentes y residuos de diversa procedencia, coincidiendo con Van der Meer *et al.* (2004), quienes lo consideran como un “primer filtro” de la toxicidad de ambientes contaminados, y capaces de asimilar metales pesados hasta concentraciones de 5 mg L⁻¹ (Becker, 1995). Los resultados muestran que la asimilación del Pb, al final de las experiencias, no es total por lo tanto, los remanentes del Pb pueden ser totalmente asimilados mediante cultivos secuenciales.

Los altos valores porcentuales iniciales de la asimilación del Pb (Tabla 9) estarían relacionados a los procesos de precipitación extracelular debido a la mayor atracción de los cationes metálicos y su posterior adsorción en la superficie celular, que disminuye la solubilidad y biodisponibilidad de tales iones en el medio acuático (Perpetuo *et al.*, 2011). La nula o baja asimilación del Pb observados después de alcanzar máximos valores estaría relacionada a la dinámica de asimilación del Pb, proceso independiente de su concentración en el medio acuático, sin descartarse la existencia de adsorción física pasiva por polímeros o estructuras presentes en la superficie celular (Garnham *et al.*, 1992a; 1992b) que producen cambios en la permeabilidad de la membrana celular (Mason & Jenkins, 1995) o a la lenta adecuación de las algas al estrés que representan elevadas concentraciones de Pb. La mayor asimilación del Pb por *T. suecica* varía con las concentraciones del metal, así tenemos que los dosificado con 20, 10 y 5 mg L⁻¹ se observa en los días 3, 4 y 5, respectivamente (Tabla 9), como consecuencia del desprendimiento del Pb adherido a las membranas maternas durante la división asexual y/o al deterioro progresivo de la viabilidad celular, que en los cultivos con las más altas dosificaciones conducen a la muerte celular (Fig. 7).

La capacidad de *T. suecica* de crecer en soluciones con altas concentraciones de Pb es una clara demostración de soportar el estrés ocasionado por la presencia de este metal, que según Perales-Vela *et al.* (2006), se debe a la existencia de mecanismos biológicos y fisiológicos que les permiten discriminar iones metálicos no esenciales de los

esenciales, para su crecimiento obedeciendo en la mayoría de los casos a una cinética de saturación o la existencia de mecanismos de transporte mediado por transportadores poco específicos o por difusión pasiva con transportador o sin él (Mason & Jenkins, 1995). En este sentido, la existencia de mecanismos moleculares para el secuestro de los metales intervienen proteínas como las metalotioneínas sintetizadas a partir del ARNm de bajo peso molecular (6-7 k Da), ricos en cisteína y puede formar complejos metal-proteína en los organismos acuáticos, que ha sido reconocidas como potenciales biomarcadores de toxicidad y acumulación de metales pesados (Won *et al.*, 2008); asimismo, la presencia de fitoquelatinas, sintetizadas intracelularmente, es una respuesta a las altas concentraciones de metal y que pueden ser inducidas por una gran variedad de metales (Ag, Au, Bi, Cd, Cu, Hg, Pb y Zn) (Schat *et al.*, 2002).

Con respecto a la capacidad (k) e intensidad de asimilación (1/n) del Pb (mg g⁻¹), las células de *T. suecica* evidencian la existencia de mecanismos celulares eficaces de neutralización del efecto tóxico del Pb y su asimilación a diferentes intensidades. Los valores de k, no presentaron diferencias significativas (p < 0,05), entre los diferentes tratamientos, debido a la existencia de mecanismo que permiten una mayor asimilación por los sitios de saturación y relacionada con la naturaleza del metal pesado como lo demostró Tien (2002) en *Chlorella vulgaris* (4.06). Asimismo, los valores obtenidos de k no mantienen una relación directa con el incremento de las densidades poblacionales, al parecer, por ser un proceso activo y por la constante reproducción de las microalgas.

Por otro lado, el mayor valor de 1/n determinado en los dosificados con 10 mg L⁻¹ de Pb (1.944) es significativamente diferente (p < 0,05) a los otros cultivos demostrando que la intensidad está relacionada con la concentración del metal y la disponibilidad de sitios de asimilación; asimismo, Tien (2002) considera que la capacidad de asimilación del Pb está directamente relacionada con su concentración y la densidad poblacional. La asimilación del Pb es un proceso gradual de adecuación a dicho metal en la que la biomasa es una variable importante en el equilibrio del contenido de iones metálicos siendo mayor a mayores densidades celulares (Mehta & Gaur, 2001).

Los datos experimentales ajustado a la ecuación logarítmica de regresión lineal (Log X/M = log k + 1/n log C) reiteran la evidencia de la capacidad de asimilación activa del Pb y el poco efecto en la dinámica del crecimiento en todos los cultivos experimentales,

reflejados en los altos los coeficientes de regresión (>0.837) de los cultivos dosificados con 5, 10 y 20 mg L⁻¹ de Pb. Los valores determinados se deberían a la existencia de mecanismos celulares como la formación de vacuolas o corpúsculos intracelulares para controlar la concentración citoplasmática de iones metálicos y neutralizar el efecto tóxico de los metales pesados (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

La formación de gránulos densos alrededor de las vacuolas incrementó de tamaño con los días del cultivo debido a la progresiva asimilación del Pb que disminuyeron los espacios ocupados por el material citoplasmático y cloroplastos. La formación de grandes vacuolas al final de los cultivos dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb indujo el cese de su asimilación y la muerte celular, asimismo, la reducción de los cloroplastos ocasiona disminución del color verde característico de los cultivos creciendo en condiciones normales. El ingreso activo del Pb dentro de las células de *T. suecica* originaría la formación de cuerpos intracelulares reportados por Shanab *et al.* (2012) como acumulación de cuerpos o gránulos densos oscuros en las vacuolas de las células como un mecanismo de "regulación de la concentración de iones metálicos libres" y de desintoxicación; también los almacena como complejos de metales quelados o sales insolubles en el citoplasma, considerándose que la absorción de metales pesados por microalgas es superior a los procesos fisicoquímicos por ser biológicamente degradada y bioacumulada (Perrein-Ettajani *et al.*, 1999).

Los resultados de crecimiento y capacidad de asimilación del Pb por *T. suecica* implican importantes posibilidades para ser utilizadas ventajosamente en procesos de biorremediación por su rápido crecimiento, facilidad de su cultivo a bajo costo, no generar residuos tóxicos y, adicionalmente según Monteiro *et al.* (2012), su alta selectividad es aplicable a aguas y/o efluentes contaminadas con metales pesados, especialmente Pb.

Las variaciones de la temperatura y el pH de todos los cultivos de *T. suecica* fueron similares, por lo tanto el rol de estos factores ambientales no han influenciado en el crecimiento ni en las tasas de asimilación, capacidad e intensidad de asimilación del Pb por haberse mantenido dentro de los rangos óptimos de temperatura ($22,1 \pm 0,1^{\circ}\text{C} - 22,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) y pH (8,3 – 9,9) los cultivo de *T. suecica*. Según Perpetuo *et al.*, (2011), la temperatura y el pH permiten la unión del ión metálico con polielectrolitos presentes en las paredes celulares mediados por interacciones electrostáticas, en la que la adsorción física

los iones metálicos son atraídos por el potencial negativo de la pared celular (proceso reversible).

La salinidad, afecta la absorción de diferentes metales por *D. salina* (Wilde y Benemann, 1993). En la experiencia, la salinidad se mantuvo dentro del rango óptimo (31-35 %) lo que sugiere que no afectó las condiciones fisiológicas y metabólicas de *T. suecica* ni interferir en el crecimiento y asimilación del metal, en consecuencia, los valores experimentales determinados representan la capacidad de la microalga de asimilar el Pb presente en las suspensiones algales.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Las diferentes concentraciones del Pb dosificados a los cultivos de *T. suecica* no afectaron el crecimiento poblacional hasta el día 6, sin embargo, al final del cultivo (día 7) los dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb mostraron menor crecimiento ($p < 0,05$) a los demás tratamientos.

Los cultivos de *T. suecica* dosificados con 5 y 10 mg L⁻¹ de Pb mostraron las mejores tasas de crecimiento (0,3603 y 0,3360, respectivamente) y TD (1,9238 y 2,0629, respectivamente), con valores similares ($p > 0,05$) a las del control al final del cultivo.

Los valores de la capacidad de asimilación (k) del Pb por los cultivos de *T. suecica* fueron similares en todos los tratamientos; asimismo, el mayor valor de la intensidad asimilación (1/n) fue determinado en los cultivos dosificados con 10 mg L⁻¹ (1,944 mg g⁻¹) mientras los dosificados con 5 mg L⁻¹ (1,645 mg g⁻¹) y de 20 mg L⁻¹ (1,695 mg g⁻¹) fueron similares.

La formación de gránulos intracelulares debido a la asimilación del Pb genera espacios lisígenos y vacuolas que incrementan con el tiempo hasta ocasionar la muerte celular siendo más notorio en los cultivos dosificados con 20 mg L⁻¹ de Pb.

5.2. Recomendaciones

Considerando que de los resultados obtenidos no se retira todo el Pb dosificado a los cultivos de *T. suecica* es necesario realizar cultivos secuenciales que consiste en reusar el sobrenadante del cultivo anterior a fin de retirar todo el Pb presente.

Realizar ensayos al aire libre con la finalidad de escalar estos resultados y tratar mayores volúmenes de efluentes conteniendo Pb.

Realizar ensayos para caracterizar bromatológicamente la biomasa algal obtenido y evaluar las posibilidades de su uso con fines económicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña-González, J., J.A. Vargas-Zamora, E. Gómez-Ramírez & Jairo García-Céspedes. 2004. Hidrocarburos de petróleo, disueltos y dispersos, en cuatro ambientes costeros de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Suppl. 2): 43-50.
- Agouborde L. 2008. Remoción de metales pesados por medio de adsorbentes no convencionales. Universidad De La Frontera. Temuco – Chile.
- Albert L. 2004. Contaminación ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. *Revista de la facultad de salud pública y nutrición.* Capítulo 14: 228-231.
- Alvarez, C. M. y T. Gallardo. 1989. Una revisión sobre la biotecnología de las algas. *Bot. Comp.* (15) pp: 9-60.
- Barclay, W.R., Meager, K.M, and abri, J.R., 1994, Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganismos. *J. Appl. phycol.*, 6, 123 – 129.
- Becker E. W. 1995. *Microalgae. Biotechnology and Microbiology.* Cambridge Univesity Press.
- Cañizares, R.O. 2000. "Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiano". *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 42: 131-143.
- Cobbett, C. & P. Goldsbrough. 2002. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53: 159–182.
- Coll, M., J. Cortés & D. Sauma. 2004. Características físico-químicas y determinación de plaguicidas en el agua de la laguna de Gandoca, Limón, Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Suppl. 2): 33-42.
- Cordero, J., M. Guevara, E. Morales & C. Lodeiros. 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae). Instituto Oceanográfico de Venezuela, Universidad de Oriente, Cumaná 6101, Venezuela Departamento de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. *Rev. biol. trop* 53 (3-4): 325 - 330

- Couderchet M. & Vernet G. 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 55: 271-277.
- 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.
- Ferrera R., N. Rojas, H. Poggi, A. Alarcón & R. Cañizares. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 48, No. 2 Abril - Junio. 2006. 179 – 187.
- Fisher, S.N. & G.J. Jones. 1981 Heavy metals and marine phytoplankton: correlation of toxicity and sulfhydryl binding. *J. Phycol.* 17: 108-111. Butcher.
- Franklin, N., J. Stauber, S. Markich & R. Lim. 2000. pH dependent toxicity of copper and uranium to a tropical fresh water alga (*Chlorella* sp.). *Aquat. Toxicol.* 48: 275-289.
- García-Céspedes, J., J. Acuña-González & J.A. Vargas-Zamora. 2004. Metales traza en sedimentos costeros de Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Supl. 2): 51-60.
- Garnham, G.W., G.A. CODD & G.M. GADD. 1992a. Kinetics of uptake and intracellular location of cobalt, manganese and zinc in the estuarine green alga *Chlorella salina*. - *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:270-276.
- Garnham, G.W., G.A. CODD & G.M. GADD. 1992b. Effect of nutritional regimen on accumulation of cobalt, manganese and zinc by green microalgae. – *FEMS Microbiol. Lett.* 98: 45-50.
- Gonzales, M. 2006. Aplicación e importancia de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales. *Contactos*. 59: 64-70.
- Griffiths, M.J., Garcin, C., Van Hille, R.P. & Harrison, S. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *Journal of Microbiological Methods* 85: 119-123.

- Guillard R.R.L., 1973. Divisions rates, In: J.R. Stein (Ed.). Handbook of phycolgical methods. Culture methods and growth measuremens. Cambridge, Universa Press, 289–311.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. pp 26-60.
- Gutiérrez Garza, E. 2007. De las teorías del desarrollo al desarrollo sustentable. Historia de la construcción de un enfoque multidisciplinario. Revista: Trayectorias 2007 IX (25)
- Halder S. 2014. Bioremediation of Heavy Metals through Fresh Water Microalgae: A Review Soma Halder (Paul). Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB). 2014; 2(11): 825-830.
- Hendry, G. A. F. & A.H. Price. 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry GAF, Grime JP (eds), Methods in comparative plant ecology. Chapman & Hall, London, UK. 148-152.
- Hernández-Pérez A. & J. Labbé. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. Revista de Biología Marina y Oceanografía. 49(2): 157-173.
- Kennish, M.J. 1997. *Practical Handbook of Estuarine and Marine Pollution*. Boca Raton: CRC Press.
- Klerks, .PL. & P.R. Bartholomew. 1991. Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquat Toxicol* 19. 225- 237.
- Liu, D. & B. Dutka. 1984. Toxicity Screening Procedures Using Bacterial Systems. In: Toxicity Evaluation of Heavy Metals in Phytoplankton. 433-443 pp.
- Malik, A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environ. Int.* 30:261-278.
- Jacinto E. & S. Aguilar. 2007. Concentraciones traza de metales en especies marinas de la bahía de Huarmey, Ancash – Perú. *Rev. Perú, boil.* 14(2).

- Mason AZ, Jenkins KD (1995) Metal detoxification in aquatic organisms. In: Tessier A, Turner DR (eds) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. John Wiley & Sons, New York, p 479–608.
- Mehta, S.K. & J.P. Gaur. 2001. Concurrent sorption of Ni²⁺ and Cu²⁺ by *Chlorella vulgaris* from a binary metal solution. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55: 379-382.
- Monteiro, C. M., P. Castro & F.X. Malcata. 2012. Metal uptake by microalgae: Underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnology progress*. 28(2): 299-311.
- Moreno-Garrido, I., L.M. Lubián, & A.M.V.M. Soares. 2000. Influence of cellular density on determination of EC50 in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47: 112-116.
- Moreno P. 2007. Efecto de los metales pesados cadmio y vanadio sobre el crecimiento y morfología de las microalgas *Scenedesmus sp.* y *Dunaliella viridis*. Universidad del Zulia. Serbiluz. Venezuela.
- Mount D. & C. Stephan. 1997. Method for establishing acceptable toxicant limits for fish. malthion and the butoxyethanol ester of 2,4-D Trans. *Amfish. Soc.* 96:185-193.
- Navarro J., I. Aguilar & J. López. 2007. Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas*, 16(2): 1-17.
- Nalewajko, C. & M. Olavenson. 1998. Ecofisiological considerations in microalgal toxicity test, pp. 289-309. *In* P. Wells, K. Lee & Ch. Blaise (eds). *Microscale*.
- Olivia R. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42: 131-143.
- Perales-Vela, H.V., J.M. Pena-Castro & R.O. Canizares-Villanueva. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryotic microalgae. *Chemosphere*. 64 (1): 1-10.

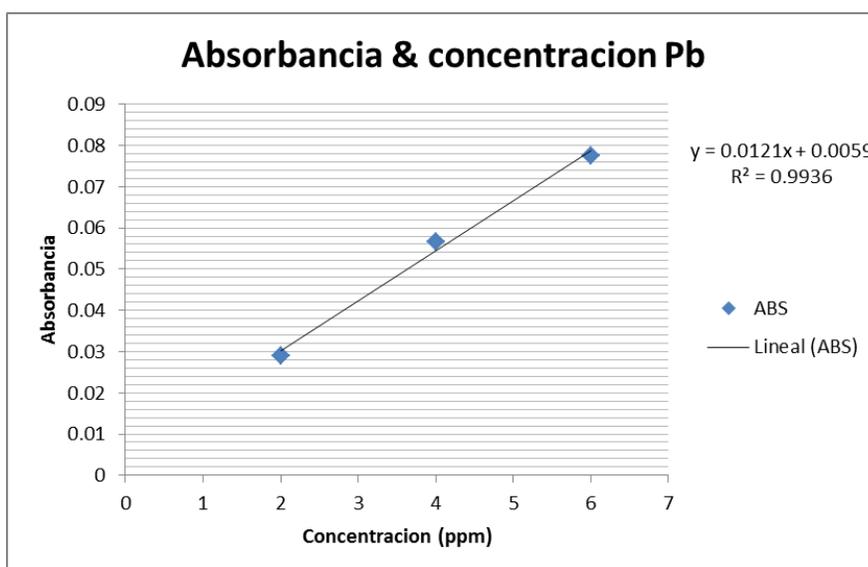
- Perpetuo, E.A., C.B. Souza & C.A.O. Nascimento. 2011. Engineering bacteria for bioremediation. In: Carpi, A. (Ed.), *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering from Analysis and Modeling to Technology Applications*. In Tech Publishers, Rijeka, Croatia. 605–632.
- Perrein-Ettajani, H., J.-C. Amiard, J. Haure & C. Renaud. 1999. Effets des métaux (Ag, Cd, Cu) sur la composition biochimique et compartimentation de ces métaux chez deux microalgues *Skeletonema costatum* et *Tetraselmis suecica*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56, 1757-1765.
- Puga S., M. Sosa, T. Lebgue, C. Quintana Y A. Campos. 2006. Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada*, 5(1,2): 149-155.
- Rivera J., N. Tapia, C. Córdova, A. Yarango, F. Torres, N. Rojas, V. Caja & H. Galarreta. 2002. Bioabsorción del Cu (II) por el alga marina pretratada *Grateloupia doryophora* (Rhodophyta). *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*. 5(1): 75 – 79.
- Rodríguez, L. & D. Rivera. 1995. Efecto del cobre y cadmio en el crecimiento de *Tetraselmis suecica* (Kyllin) Butcher y *Dunaliella salina* Teodoresco. *Estudios Oceanológicos*. 14: 61-74.
- Rodríguez T. & D. Sandoval. 2001. El concepto de capital natural en los modelos de crecimiento exógeno: *Análisis Económico*, 16(33): 109-128.
- Rojas De Astudillo, L., I. Chang Yen & I. Bekele. 2005. Heavy metals in sediments, mussels and oysters from Trinidad and Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 53 (Suppl. 1): 33-40.
- Ruiz A. 2011. Puesta en marcha de un cultivo de microalgas para la eliminación de nutrientes de un agua residual urbana previamente tratada anaeróbicamente. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia – España

- Tapia P, M. Santander, O. Pávez, L. Valderrama, D. Guzmán & L. Romero. 2011. Biosorción de iones cobre con biomasa de algas y orujos deshidratados. *Revista de metalurgia*, 47 (1) Copiapó - Chile. 15 – 28 p.
- Seijas S., V. Alcántara, C. Esquivel, L. Benites, J. Gonzales, P. Seijas & N. Seijas. 2012. Escalamiento de fotobiorreactor solar secuestrante de CO₂ de gases de combustión optimizando producción de "*Espirulina*". *SCIÉENDO*15(1): 7-21.
- Schat H., Llugany M., Vooijs R., Hartley-Whitaker J. Y Bleeker P.M. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany* 53:2381-2392.
- Shanab, S.M.M., S.S.M. Mostafa, E.A. Shalaby & G.I. Mahmoud. 2012. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(8): 608–615.
- Spongberg, A.L. 2004c. PCB contamination in marine sediments from Golfo Dulce, Pacific coast of Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 52 (Suppl. 2): 23-32.
- Tadros, M., Bulthia, P. & W. Smith. 1990. Differential response of marine diatoms to trace metals. *Bulletin Environmental Contamination Toxicology.* 44: 826-831.
- Tien C. J. 2002. Biosorption of metal ions by freshwater algae with different surface Characteristics. *Process Biochemistry* 38: 605-613.
- Walsh, G., M. Yoder, L. Laughlin & E. Lores. 1987. Responses of Marine Unicellular Algae to Brominated Organic Compound in Six Growth Media. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 14: 215-222.
- Walsh, G. 1988. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 7: 979-987.
- Won, E.J., S. Raisuddin & K.H. Shin. 2008. Evaluation of induction of metallothionein – like proteins (MTLPs) in the polychaetes for biomonitoring of heavy metal pollution in marine sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 57: 544–551.

- Vargas F. 2005. La contaminación ambiental como factor determinante de la salud. Rev. Esp. Salud Pública. 79(2): 117-127.
- Van der Meer, J.R., Tropel, D. & Jaspers. M. 2004. Illuminating the detection chain of bacterial bioreporters. Environmental Microbiology 6(10): 1005 – 1020.
- Veranes O., A. Pellón, M. Espinoza, A. Oña & E. Pérez. 2011. Estudio del comportamiento de la microalga *Scenedesmus obliquus* para la precipitación de cromo en albañal sintético. Revista Cubana de Química, 24: 48-56.
- Villavicencio, A. & O. Sagástegui, 2013. Efecto de la concentración y dosificación de acetato de sodio en el crecimiento poblacional y el contenido de β caroteno en *Dunaliella salina*, en el laboratorio. Tesis de Título. Universidad Nacional del Santa. Chimbote, Perú.
- Wilde, E.W. & J.R. Benemann. 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. Biotechnology Advances 11: 781- 812.

ANEXOS

Anexo 1. Curva de calibración de absorción y concentración de plomo (Pb).



Anexo 2. Crecimiento poblacional promedio de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de Pb (5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹).

DÍA	CONCENTRACIÓN MP (ppm)											
	0			5			10			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1
1	6,0	3,9	6,5	5,2	8,1	8,5	9,8	8,0	8,3	6,0	8,0	5,8
2	11,3	10,0	9,1	8,1	6,9	9,4	6,0	6,0	7,0	5,0	4,1	6,6
3	16,9	22,5	19,1	13,8	12,9	21,0	13,1	18,1	16,6	13,8	12,3	13,8
4	32,5	26,9	25,4	26,6	28,5	21,0	25,0	27,8	25,6	24,1	20,4	23,8
5	41,3	40,6	43,8	33,5	38,1	37,9	28,5	27,9	31,6	35,6	29,4	38,1
6	51,6	41,6	53,1	40,6	45,4	46,9	36,0	34,8	44,1	31,6	36,3	40,4
7	52,5	44,4	49,8	51,5	46,5	46,3	43,9	44,4	47,3	38,1	32,8	35,0

Anexo 3. Valores de Crecimiento en biomasa (mg L⁻¹) de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de plomo.

DÍA	CONCENTRACIÓN MP (ppm)											
	0			5			10			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	73,5	71,8	71,2	77,6	84,1	64,4	74,6	70,1	70,6	72,3	71,8	72,9
1	113,5	93,4	91,8	96,0	98,8	69,5	96,5	100,7	88,2	126,0	105,1	97,3
2	175,9	169,3	207,4	139,8	120,3	166,5	102,2	117,9	127,6	112,0	91,8	126,1
3	271,7	253,5	273,4	202,9	209,7	271,6	207,0	222,8	226,0	207,2	226,3	230,4
4	267,6	342,6	342,8	311,0	311,6	332,5	233,6	277,4	332,5	352,1	254,5	254,1
5	349,6	363,1	429,7	396,8	368,0	424,2	362,0	449,0	434,6	395,2	418,7	456,2
6	505,6	356,0	520,0	484,8	464,7	388,5	343,0	469,5	500,6	452,0	470,7	486,8
7	409,8	367,3	457,3	511,4	526,4	414,1	370,4	503,6	526,6	501,1	482,7	534,8

Anexo 4. Valores de la concentración del Pb (mg L⁻¹) en los cultivos de *T. suecica*.

DÍA	CONCENTRACIÓN MP (ppm)											
	0			5			10			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	0,05	0,05	0,05	5,03	5,06	5,03	10,00	10,20	10,30	20,00	20,00	20,02
1	0,00	0,00	0,00	1,91	1,89	1,90	2,50	2,45	2,47	2,73	2,67	2,72
2	0,00	0,00	0,00	1,71	1,68	1,70	2,43	2,36	2,39	2,64	2,58	2,61
3	0,00	0,00	0,00	1,45	1,43	1,46	2,14	2,04	2,09	2,57	2,53	2,65
4	0,00	0,00	0,00	1,27	1,24	1,25	2,13	2,04	2,11	2,42	2,38	2,45
5	0,00	0,00	0,00	1,06	1,12	1,20	2,12	2,03	2,08	2,10	2,16	2,06
6	0,00	0,00	0,00	0,79	0,76	0,77	1,88	1,82	1,85	1,83	1,73	1,79
7	0,00	0,00	0,00	0,45	0,41	0,43	1,28	1,19	1,24	1,62	1,58	1,60

Anexo 5. Valores diarios de la temperatura (°C) en los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de plomo (Pb).

DÍA	CONCENTRACIÓN MP (ppm)											
	0			5			10			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6	21,5	21,4	21,6
1	22,0	22,0	21,4	22,0	22,0	22,1	22,0	22,2	21,4	21,9	22,0	22,0
2	22,2	22,1	22,1	22,2	22,2	22,3	22,6	22,4	22,2	22,4	22,7	22,3
3	22,3	22,2	22,1	22,3	22,2	22,3	22,7	22,5	22,3	22,6	22,7	22,2
4	22,0	21,9	21,8	21,8	21,8	22,0	22,4	22,2	22,1	22,1	22,4	22,0
5	21,7	21,5	21,5	21,9	21,7	21,8	22,1	22,0	21,7	21,8	22,0	21,7
6	21,4	21,2	21,1	21,2	21,2	21,3	21,6	21,4	21,1	21,2	21,4	21,4
7	21,3	21,3	21,2	21,3	21,1	21,2	21,7	21,5	21,2	21,3	21,4	21,4

Anexo 6. Valore diarios del pH de los cultivos de *T. suecica* dosificados con diferentes concentraciones de plomo (Pb).

DÍA	CONCENTRACIÓN MP (ppm)											
	0			5			10			20		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	8,6	8,6	8,7	8,6	8,6	8,6	8,5	8,5	8,6	8,5	8,6	8,5
1	8,9	9,1	8,9	8,8	8,6	8,9	8,6	8,7	8,6	8,6	8,6	8,6
2	9,3	9,9	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	9,1	8,1	9,1	9,1
3	9,5	10,9	9,4	9,1	9,1	9,4	9,3	9,1	8,9	9,4	9,7	9,3
4	8,9	9,9	8,9	8,5	8,7	8,9	8,9	8,6	8,5	9,0	9,0	9,0
5	9,0	9,9	9,0	8,7	8,6	8,8	8,9	8,4	8,2	8,7	9,2	8,7
6	8,8	9,9	8,9	8,5	8,4	8,7	8,5	8,2	8,2	8,2	8,6	8,2
7	9,8	9,7	8,9	8,7	8,5	8,8	8,4	8,5	8,2	8,3	8,5	8,3

Anexo 7. Asimilación (X/M, mg g⁻¹) del Pb obtenidos de la concentración del metal (mg L⁻¹) y la densidad óptica algal (g L⁻¹).

Días	0			5			10			20		
	Pb mg L ⁻¹	D.O g L ⁻¹	X/M mg g ⁻¹	Pb mg L ⁻¹	D.O g L ⁻¹	X/M mg g ⁻¹	Pb mg L ⁻¹	D.O g L ⁻¹	X/M mg g ⁻¹	Pb mg L ⁻¹	D.O g L ⁻¹	X/M mg g ⁻¹
0	0,05	0,0722	0,693	5,04	0,0754	66,844	10,20	0,0718	142,061	20,00	0,0723	276,625
1	0,0	0,0996	0,0	1,90	0,0881	21,566	2,47	0,0951	25,973	2,70	0,1095	24,658
2	0,0	0,1842	0,0	1,70	0,1422	11,955	2,39	0,1159	20,621	2,61	0,1100	23,727
3	0,0	0,2662	0,0	1,45	0,2281	6,357	2,09	0,2186	9,561	2,58	0,2213	11,658
4	0,0	0,3177	0,0	1,25	0,3184	3,926	2,09	0,2812	7,432	2,42	0,2869	8,435
5	0,0	0,3808	0,0	1,13	0,3963	2,851	2,08	0,4152	5,010	2,01	0,4234	4,747
6	0,0	0,4605	0,0	0,77	0,4460	1,726	1,85	0,4377	4,227	1,78	0,4698	3,789
7	0,0	0,4115	0,0	0,43	0,4840	0,888	1,60	0,4669	3,427	1,24	0,5062	2,450

D.O.= densidad óptica (g L⁻¹)

X = concentración de plomo (mg L⁻¹)

M = biomasa en g L⁻¹(D.O)