

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA



“BIOACUMULACIÓN DE MERCURIO POR LA MICROALGA *Scenedesmus acutus*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO”

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR

TESISTA:

Bach. Alva Reyes Cesar Santiago

ASESOR:

MSc. Sorayda Mendoza Espinoza

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ
2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR

“BIOACUMULACIÓN DE MERCURIO POR LA MICROALGA *Scenedesmus*
***acutus*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO”**

TESISTA:

Bach. Alva Reyes Cesar Santiago

REVISADO Y APROBADO POR EL ASESOR DE TESIS:

MSc. Sorayda Mendoza Espinoza

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ
2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SANTA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA EN
ACUICULTURA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO
ACUICULTOR

“BIOACUMULACIÓN DE MERCURIO POR LA MICROALGA *Scenedesmus*
***acutus*, EN CONDICIONES DE LABORATORIO”**

TESISTA:

Bach. Alva Reyes Cesar Santiago

APROBADO POR EL JURADO CALIFICADOR INTEGRADO POR LOS
SIGUIENTES MIEMBROS:

Dr. Luis Torres Cabrera
Presidente

Dr. Juan Fernando Merino Moya
Secretario

MSc. Sorayda Mendoza Espinoza
Integrante del Jurado

NUEVO CHIMBOTE – PERÚ
2018

DEDICATORIA

Doy gracias a Dios por su gracia y bondad quien guía mis pasos y está siempre a mi lado en todos los momentos de mi vida.

A mi madre Francisca, que es la persona que puso todo de sí, para sacarme adelante y formarme en buenos valores para llegar hacer una persona de bien, y ser el motivo por el cual salir adelante.

A mi tía Gloria por su apoyo incondicional la cual contribuyo a que pueda realizarme profesionalmente, a mi prima Gabriela por ser el ejemplo para seguir superándome diariamente, y en general a toda mi familia que de una u otra manera me apoyo para cumplir mis metas.

ALVA REYES, CÉSAR SANTIAGO

AGRADECIMIENTOS

A mis estimados profesores Sorayda Mendoza Espinoza y Juan Fernando Merino Moya, por su constante guía, incentivo y por motivarnos a ser cada día mejores profesionales.

A los profesores de la Escuela de Biología en Acuicultura, que a lo largo de toda la carrera profesional compartieron con nosotros conocimientos y nos brindaron su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares por su amistad y apoyo durante la realización de esta investigación.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I.INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general:.....	5
1.2. Objetivos específicos:	5
II. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Localización de experimento.....	6
2.2. Característica de la cepa microalgal	6
2.3. Preparación del medio de cultivo	6
2.4. Preparación de las unidades experimentales.....	7
2.5. Diseño experimental.	7
2.6. Acondicionamiento de las unidades experimentales	8
2.7. Preparación de la solución patrón del mercurio	8
2.8. Evaluación de los parámetros de cultivos	9
2.9. Determinación de la biomasa y crecimiento poblacional	9
2.10. Determinación del Hg por espectrofotometría de absorción atómica	11
2.12. Análisis estadístico	11
III.RESULTADOS.....	12
3.1. Evaluación de los parámetros de cultivo.....	12
3.1.1 Temperatura.....	12
3.1.2 pH	12
3.2. Crecimiento de los cultivos de <i>Sc. acutus</i>	13
Crecimiento en biomasa	13
Crecimiento en densidades poblacionales.....	15
Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional de <i>Sc. acutus</i>	17
3.3. Tasa de asimilación de mercurio en <i>Sc. acutus</i>	18
3.4. Cambio de coloración a diferentes concentraciones de Hg en las células de <i>Sc. acutus</i>	20
IV. DISCUSIÓN.....	21
V. CONCLUSIONES	27
VI. RECOMENDACIONES	27
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	36

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo HM.	Pág. 7
Tabla 2. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación.	Pág. 7
Tabla 3. Biomasa microalgal promedio (mg L^{-1}) diaria (\pm desviación estándar) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).	Pág. 13
Tabla 4. Densidades poblacionales promedio ($\times 10^6$ cél. mL^{-1}) diarias (\pm desviación estándar) en los cultivos de <i>Sc. acutus</i> utilizando diferentes concentraciones de mercurio.	Pág. 15
Tabla 5. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional (\pm desviación estándar) de los cultivos de <i>Sc. acutus</i> utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).	Pág. 17
Tabla 6. Tasa de asimilación del mercurio (TA) y contenido de mercurio en la biomasa (B) de <i>Sc. acutus</i> cultivado con diferentes concentraciones de mercurio.	Pág. 19

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Células de *Sc. acutus* observadas al microscopio (obj. 40 x) Pág. 6
- Figura 2. Distribución de las unidades experimentales. Pág. 8
- Figura 3. Curva de calibración para expresar la biomasa algas en g L⁻¹.... Pág. 9
- Figura 4. Variación del promedio diario de la temperatura en los cultivos de *Sc. acutus* a diferentes concentraciones de Hg. Pág. 12
- Figura 5. Variación del promedio diario del pH en los cultivos de *Sc. acutus* a diferentes concentraciones de Hg..... Pág. 12
- Figura 6. Variación de la biomasa microalgal de *Sc. acutus* cultivadas a diferentes concentraciones de Hg..... Pág. 14
- Figura 7. Variación de las densidades celulares de *Sc. acutus* cultivadas a diferentes concentraciones de Hg..... Pág. 16
- Figura 8. Promedios de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional de *Sc. acutus* cultivadas a diferentes concentraciones de Hg. .. Pág. 18
- Figura 9. Formación de granulaciones oscuras intracelulares. Pág. 19
- Fig. 10. Variación de la coloración de los diferentes tratamientos ($T_1 = 1 \text{ mg L}^{-1}$, $T_2 = 2.5 \text{ mg L}^{-1}$ y $T_3 = 5 \text{ mg L}^{-1}$ de Hg) durante los días de cultivo.....Pág. 20

RESUMEN

Se estudió la bioacumulación de mercurio en la microalga *Scenedesmus acutus*, bajo condiciones de laboratorio. El crecimiento poblacional se calculó mediante conteos en cámara Neubauer. La biomasa de los cultivos se obtuvo mediante densidad óptica según Bermeo (2011). La menor tasa de asimilación de Hg se encontró con 5.0 mg L⁻¹ (98.16 %); seguido de 2.5 mg L⁻¹ (99.14 %) y la mayor con 1.0 mg L⁻¹ (99.67 %). Al final del experimento, la menor biomasa se obtuvo con 5.0 mg L⁻¹ de Hg (405.7 mg L⁻¹) seguido de 1.0 mg L⁻¹ (441.9 mg L⁻¹) y 2.5 (437.3 mg L⁻¹), mientras que el control presentó la mayor biomasa (486.2 mg L⁻¹). Asimismo, la menor densidad poblacional fue obtenida con 5.0 de Hg (12.44 x10⁶ cél mL⁻¹) seguido de 2.5 ppm (16.01 x10⁶ cél mL⁻¹); mientras los mayores valores fueron determinados en el control (17.22 x10⁶ cél mL⁻¹) y con 1.0 mg L⁻¹ (16.92 x10⁶ cél mL⁻¹). Las tasas de asimilación del Hg mostraron diferencias estadísticamente significativas con valores de 99.67, 99.14 y 98.16 % en los cultivos dosificados con 1.0, 2.5 y 5.0 mg L⁻¹ de Hg, respectivamente.

Palabras Clave: *Scenedesmus acutus*, microalga, mercurio, bioacumulación.

ABSTRACT

The bioaccumulation of mercury from the microalga *Scenedesmus acutus* was studied in laboratory conditions. Population growth was calculated using Neubauer chamber counts. The biomass of the crops was obtained by optical density according to Bermeo (2011). The lowest rate of assimilation of Hg was found with 5.0 mg L⁻¹ (98.16%); followed by 2.5 mg L⁻¹ (99.14%) and the highest with 1.0 mg L⁻¹ (99.67%). At the end of the experiment, the lowest biomass was obtained with 5.0 mg L⁻¹ of Hg (405.7 mg L⁻¹) followed by 1.0 mg L⁻¹ (441.9 mg L⁻¹) and 2.5 (437.3 mg L⁻¹), while the control presented the highest biomass (486.2 mg L⁻¹). Likewise, the lowest population density was obtained with 5.0 Hg (12.44 x10⁶ cells mL⁻¹) followed by 2.5 ppm (16.01 x 10⁶ cel mL⁻¹); while the highest values were determined in the control (17.22 x10⁶ cel mL⁻¹) and with 1.0 mg L⁻¹ (16.92 x10⁶ cel mL⁻¹). The assimilation rates of Hg showed statistically significant differences with values of 99.67, 99.14 and 98.16% in the cultures dosed with 1.0, 2.5 and 5.0 mg L⁻¹ of Hg, respectively.

Keywords: *Scenedesmus acutus*, microalgae, mercury, bioaccumulation.

I. INTRODUCCIÓN

El aumento de la población y de las actividades industriales cuyos desechos y efluentes, sin previo tratamiento, vertidos al ambiente acuático y/o terrestre se constituyen en uno de los principales problemas de contaminación de ríos, lagos y mares, por la presencia y acumulación de metales pesados y otras sustancias peligrosas, normalmente de origen industrial (Fernández *et al.*, 2005).

En todo el planeta, se estima que más del 80% de las aguas residuales que se generan por las diversas actividades humanas son vertidas sin tratamiento alguno (ONU, 2017). En el Perú, existe una descarga anual de 960.5 millones de metros cúbicos de desagüe sobre el agua superficial, subterránea y marina, de los cuales el 64.0% pertenece a desagües domésticos, 5.6% desagües industriales, 4.4% de desagües pesqueros, 25.4% de efluentes mineros y 0.2% por efluentes petroleros (INEI, 2015), requiriéndose la aplicación de medidas correctivas tendientes a minimizar o eliminar los efectos perjudiciales de estos efluentes.

Una estrategia para limpiar ambientes contaminados es la fitorremediación, que consiste en el uso de algunos vegetales por su capacidad de absorber, acumular o tolerar altas concentraciones de contaminantes como compuestos orgánicos (Ruiz, 2011; Seijas *et al.*, 2012; Ferrera *et al.*, 2006) y metales pesados (Rivera *et al.*, 2002; Tapia *et al.*, 2011; Plaza, 2012; Halder, 2014) ofreciendo como principal ventaja sobre otros procesos su bajo costo y rapidez con que pueden llevarse a cabo ciertos procesos de bioabsorción (Di Paola & Vicién, 2010).

Los metales pesados, por su carácter no biodegradable, provocan efectos nocivos negativos en organismos animales y vegetales, mediante la generación de elementos que al formar complejos con sustancias orgánicas celulares inducen desequilibrios metabólicos (Mount & Stephan, 1997), por su gran afinidad con los grupos sulfhídrico, radicales amino, fosfato carboxilo e hidroxilo, originando uniones ligando-metal que afectan a la célula por la

disrupción de la estructura de proteínas, que implica la inhibición de su actividad, desplazamiento de elementos esenciales de su metabolismo estándar produciendo efectos de deficiencia y por catálisis de las reacciones de generación de moléculas ROS (Reactive Oxygen Species) (Navarro *et al.*, 2007).

El mercurio (Hg) es uno de los metales pesados que causa mayor preocupación por su alta toxicidad en los seres vivos, debido a que su presencia afecta importantes vías enzimáticas que generan síntomas de pérdida sensorial, reducción del campo visual, trastornos de coordinación, disartria, alteración auditiva (Osores *et al.*, 2010). Aunque se considera poco peligroso en forma metálica y en sales minerales, sus compuestos orgánicos son muy tóxicos para el hombre (Roldán, 1992). Su baja concentración en los océanos (0.3 ppm) representa serio peligro por su acumulación en los peces (a través de la cadena alimenticia) que sirven de alimento humano o animal, ocasionando intoxicaciones graves (Meseldzic, 1977).

El Hg es un elemento sumamente tóxico que ocasiona la muerte de organismos a concentraciones muy bajas, habiéndose determinado la LC_{50} de 0.8 a 0.23 ppm en peces, de 0.5 a 0.05 ppm en crustáceos y de 0.5 a 32 ppm en moluscos durante 96 horas de exposición (Armas & Armas, 2001). En *Emerita análoga* la LC_{50} de mercurio se presenta a una concentración de 14.2 $mg L^{-1}$ a 48 de exposición (Iannacone y Alvariño, 2003). Para el ser humano, se considera aceptable una concentración de mercurio en sangre de 10 μL^{-1} (Osores *et al.*, 2010).

Este metal pesado procede de diferentes industrias, principalmente de la actividad minera, la cual emplea mercurio en la refinación de metales tales como el oro la plata y el zinc (UNEP, 2008). Entre otras fuentes contaminantes de mercurio se hallan productos comerciales como baterías, instrumental médico, cosméticos, plaguicidas y biocidas, etc. (Weinberg, 2011).

Debido a la alta toxicidad del Hg, es necesaria la aplicación de medidas de atenuación o remediación, destacando el uso de las microalgas que, por sus características de nutrición mineral, tienen la capacidad de neutralizar o

asimilar una amplia gama de sales minerales y elementos químicos tales como los metales pesados. Las microalgas son organismos autótrofos unicelulares que habitan diversos ambientes acuáticos en todas las latitudes y ecosistemas del planeta (Barsanti & Gualtieri, 2006; Ynga, 2011; Drekman *et al.*, 2013).

La eliminación de iones de metales pesados utilizando microorganismos se ha convertido en un tema de interés científico (Kim *et al.*, 1995). Elevadas concentraciones de metales pesados pueden ser tóxicos para muchas especies (Konopka *et al.*, 1999) sin embargo, algunos microorganismos son capaces de tolerar concentraciones relativamente altas, regulando mecanismos biológicos para desintoxicarse (Vilensky *et al.*, 2002; Al-Homaidan, 2006).

Actualmente, las microalgas han cobrado especial interés como una alternativa para el tratamiento de efluentes por las ventajas que representa la obtención de biomasa útil y la posibilidad de mitigar emisiones de efecto invernadero; además, por su capacidad remediadora mediante la eliminación o biotransformación de contaminantes presentes en medio líquido o gaseoso en biomasa algal. Las microalgas permiten la recuperación de elementos químicos asimilados mediante la cosecha o concentración de la biomasa generada resultando en un sistema de cultivo con doble beneficio: eliminación de contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales (Hernández & Labbé, 2014).

Scenedesmus, es un género de clorofita ampliamente estudiado con probadas capacidades para la remoción de iones metálicos como uranio, cobre, cadmio, zinc, cobalto y cromo (Travieso *et al.*, 2002; Peña *et al.*, 2004; Perales, 2006). La microalga *Sc. acutus* (Meyen, 1829) se caracteriza, según Garibay *et al.*, (2009), por su organización cenobial que habita cuerpos de agua dulce y/o contaminadas creciendo en condiciones adecuadas de temperatura (28 ± 2 °C) y de pH (6,5–9,5); asimismo, comúnmente se presentan en cenobios de cuatro células con o sin espinas (Azpiroz, 1984). También se caracteriza por su capacidad de soportar elevadas concentraciones de nutrientes contenidos en aguas residuales, poseer actividad metabólica elevada, resistir variaciones ambientales que le permiten sobrevivir en condiciones extremas (Andrade, 2009), lo que le permite ser muy eficientes en el tratamiento de efluentes

contaminados (Sáenz *et al.*, 2003; Méndez *et al.*, 2010; Ardila, 2012; Barreto & Purizaga, 2013).

La especie *Sc. obliquus* ha sido exitosa en la eliminación de cromo de aguas galvánicas con eficiencia del 27%, elevando su eficiencia hasta 95% cuando son inmovilizadas (Pellon *et al.*, 2003). Por otro lado, Cordero *et al.* (2005), en cultivos de *Tetraselmis chuii*, determinó que 5 ppm de mercurio ocasiona la mayor letalidad al 50% de la población en 48 h de exposición.

Por otro lado, Moreno (2007) evaluó el efecto que ejercen los metales cadmio y vanadio sobre el crecimiento, morfología y contenido de pigmentos de las microalgas *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 observó mayor efecto inhibitorio en el crecimiento poblacional de *Scenedesmus sp.*; sin embargo, ambas especies presentaron mecanismos de adaptabilidad al estrés, lo que permitiría su utilización como biorremediadores o bioindicadores de la contaminación de los cuerpos de agua.

La eliminación del mercurio por microalgas ha sido estudiada por Gracia (2016), quien evalúa la remoción de este metal en aguas residuales, procedentes de la extracción artesanal del oro, utilizando cepas nativas de Ecuador de los generos *Pleurococcus*, *Scenedesmus* y *Chlorella*, obtuvo porcentajes de remoción del 93, 76 y 97 % para cada especie respectivamente. Esto demuestra la alta capacidad que tienen los microorganismos, como las microalgas, para asimilar el mercurio contenido en efluentes contaminados.

Debido a la alta toxicidad de los metales pesados, especialmente el mercurio, la salud humana se ve perjudicada por la exposición crónica, sobre todo efectos negativos como temblores, hipertrofia de tiroides, taquicardia, gingivitis, cambios en la personalidad, eretismo, pérdida de memoria, depresión severa, delirios y alucinaciones; además, hay daño renal por exposición crónica al mercurio, siendo los aspectos neurológicos los principales efectos del metilmercurio en adultos, mientras que la exposición durante el embarazo

provoca la aparición de lesiones congénitas del sistema nervioso (Soo *et al.*, 2013), por ello es necesario desarrollar una metodología o sistema que permite su retiro del ambiente líquido mediante el uso de los cultivos microalgales.

En tal sentido, los resultados del presente trabajo están orientados a sentar las bases para establecer una metodología conducente a reducir o eliminar el mercurio presente en los efluentes, principalmente mineros, y mitigar su negativo impacto en el medio acuático; asimismo, propiciar la búsqueda de nuevas especies microalgales con mayores tasas de asimilación del mercurio a fin de ampliar el uso de microalgas en la biorremediación de efluentes contaminados con metales pesados y escalar los resultados con la finalidad de remediar grandes volúmenes de agua y reducir los costos de remediación. En consecuencia, se plantean los siguientes objetivos:

1.1. Objetivo general:

- Determinar la bioacumulación de mercurio por la microalga *Sc. acutus*, en condiciones de laboratorio.

1.2. Objetivos específicos:

- Determinar la tasa de asimilación a diferentes concentraciones de mercurio (1, 2.5 y 5.0 mg L⁻¹) por la microalga *Sc. acutus* en condiciones de laboratorio.
- Determinar la biomasa y crecimiento poblacional de la microalga *Sc. acutus* de diferentes concentraciones de mercurio (1, 2.5 y 5.0 mg L⁻¹) en condiciones de laboratorio.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Localización de experimento

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares de la E.A.P. de Biología en Acuicultura y en el Instituto de Investigación de Agroindustria, pertenecientes a la Universidad Nacional del Santa, ubicada en la ciudad de Nuevo Chimbote.

2.2. Característica de la cepa microalgal

La cepa de la microalga *Sc. acutus* fue proporcionada del Laboratorio de Cultivo de Especies Auxiliares y mantenida en crecimiento con el medio de cultivo HM (Merino, 2003). Las principales características son su forma ovalada carente de movimiento propio y la formación de colonias, generalmente, de cuatro células (Fig. 1).



Figura 1. Células de *Sc. acutus* observadas al microscopio (obj. 40 x).

2.3. Preparación del medio de cultivo

Los cultivos iniciales para la generación de inóculo, así como los cultivos experimentales y controles fueron dosificados con el medio de cultivo HM, preparado con fertilizantes agrícolas en la que los nutrientes N, P, K y Fe fueron abastecidos de soluciones patrones cuyas preparaciones están consignadas en la Tabla 1. Las soluciones patrones, por contener altas concentraciones (g L^{-1}) de determinado nutriente, son dosificados volumétricamente a la suspensión microalgal (mL L^{-1}) con la ventaja de su facilidad y precisión de su dosificación.

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo HM.

Sustancia	Soluciones Stock	Macronutriente	
		Stock (g/100 mL)	Cultivo (mg L ⁻¹)
Urea	20.6 g/100 mL	N 9.613	96.13
KCl	1.9 g/100 mL	P 0.996	9.96
H ₃ PO ₄ (85%)	3.5 g/100 mL	K 1.116	11.16
FeSO ₄ .5H ₂ O	0.25 g/100 mL	Fe 0.060	0.60

2.4. Preparación de las unidades experimentales

Las unidades experimentales fueron inoculadas con una cepa de *Sc. acutus* en fase exponencial procedente de cultivos mantenidas en laboratorio e iniciándose los cultivos experimentales con concentración de 1.00×10^6 cel mL⁻¹, las mismas que fueron dispuestas linealmente sobre una mesa de concreto del laboratorio de Cultivos de Especies auxiliares de la E.A.P. Biología en Acuicultura.

2.5. Diseño experimental.

Se empleó el diseño experimental de estímulo creciente con tres tratamientos experimentales y un tratamiento control y tres repeticiones cada una. Los cultivos fueron dosificados con 1,0, 2,5 y 5,0 mg L⁻¹ (Tabla 2) de Hg una sola vez al inicio de los ensayos.

Tabla 2. Tratamientos en los cultivos microalgales de la investigación.

Tratamientos	Repeticiones	Especificaciones
T _c	r ₁ , r ₂ , r ₃	0 mg L ⁻¹ Hg
T ₁	r ₁ , r ₂ , r ₃	1.0 mg L ⁻¹ Hg
T ₂	r ₁ , r ₂ , r ₃	2.5 mg L ⁻¹ Hg
T ₃	r ₁ , r ₂ , r ₃	5.0 mg L ⁻¹ Hg

2.6. Acondicionamiento de las unidades experimentales

Los cultivos de *Sc. acutus* fueron realizados en botellas plásticas de 1.5 L de volumen total con 1 L de cultivo distribuidos al azar (Fig. 2), y mantenidos con iluminación constante con fluorescentes de 40 watts. Todos los cultivos fueron agitados mediante la inyección de 1 L min^{-1} de aire con la finalidad de evitar la sedimentación de las microalgas, así como optimizar el contacto alga-mercurio.



Figura 2. Distribución de las unidades experimentales.

2.7. Preparación de la solución patrón del mercurio

Se utilizó cloruro de mercurio (HgCl_2), proporcionado por el Laboratorio de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional del Santa, en cantidades (g) que permitan obtener la concentración final de 1000 ppm de mercurio considerando el peso atómico del mercurio (200.59) y peso molecular del HgCl_2 (270.69) aplicando la siguiente ecuación.

$$\frac{1000 \text{ mg. Hg}}{\text{L}} \quad \times \quad \frac{\text{Peso molecular HgCl}_2}{\text{Peso atómico Hg}}$$

Reemplazando:

$$\frac{1000 \text{ mg. Hg}}{\text{L}} \quad \times \quad \frac{270.69 \text{ HgCl}_2}{200.59 \text{ Hg}} = 1.35 \text{ mg L}^{-1} \text{ HgCl}_2$$

En consecuencia, 1.35 g de HgCl_2 diluido en 1 L de agua bidestilada contendrá 1000 mg L^{-1} de mercurio. Los cultivos experimentales fueron

dosificados con 1.0, 2.5 y 5.0 mL de la solución patrón por litro de cultivo, equivalente a 1.0, 2.5 y 5.0 mg L⁻¹ (ppm) de mercurio, respectivamente.

2.8. Evaluación de los parámetros de cultivos

Se registraron diariamente las variaciones de la temperatura con un termómetro digital marca BOECO de 0.1 de sensibilidad y el pH con un pH-metro digital marca OAKCTO de 0.1 de sensibilidad.

2.9. Determinación de la biomasa y crecimiento poblacional

La biomasa algal (g L⁻¹) de los cultivos fueron determinados por fotocolorimetría requiriéndose la elaboración de una curva de calibración para correlacionar la biomasa (Fig. 3) con el método gravimétrico (Ayala, 2007). Las determinaciones fotocolorimétricas fueron realizadas con un espectrofotómetro marca Thermo Fisher Scientific utilizando longitudes de onda de 680 nm, según lo establecido por Bermeo (2011), aplicando la siguiente formula:

$$\text{Biomasa (g L}^{-1}\text{)} = (\text{Abs.}_{680} - \text{ordenada del origen}) / \text{pendiente}$$

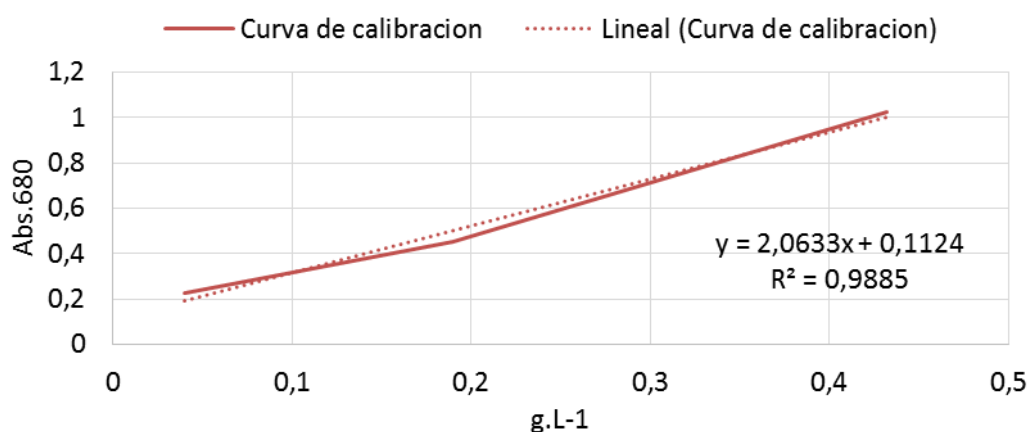


Figura 3. Curva de calibración para expresar la biomasa algas en g L⁻¹.

El crecimiento poblacional de los cultivos de *Sc. Acutus* y las tasas de crecimiento (μ) se determinaron mediante contajes diarios de las poblaciones microalgales utilizando una cámara Neubauer de 0,1 mm de profundidad y un microscopio compuesto marca OLYMPUS con aumento de 40x y aplicando la fórmula de Guillard (Guillard, 1973):

$$\mu = \frac{\ln (N_f / N_i)}{t_2 - t_1}$$

Donde N_i y N_f corresponde al número de células inicial y final en los tiempos inicial y final (t_i y t_2), respectivamente. Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de crecimiento poblacional para cada uno de los tratamientos.

Para determinar el tiempo de duplicación poblacional (TD) se utilizó la fórmula según Guillard (1975).

Donde μ corresponde a la tasa de crecimiento y $\ln(2)$ es el logaritmo natural de 2.

2.10. Determinación del Hg por espectrofotometría de absorción atómica

El contenido de Hg (mg L^{-1}) de todas las muestras fueron determinadas por espectrofotometría de absorción atómica en el Laboratorio Colecibi S.A.C. (Anexo 9).

Con los datos de las concentraciones del Hg en las suspensiones algales se procedió a calcular las tasas de asimilación, intensidad y capacidad de absorción de dicho metal por la microalga *Sc. acutus*, aplicando las siguientes ecuaciones:

La tasa de asimilación (T.A):

$$\text{T.A (\%)} = \frac{(\text{Hp}_f - \text{Hp}_i)}{\text{Hp}_i} \times 100$$

Dónde:

Hp_i = concentración de mercurio inicial.

Hp_f = concentración de mercurio final.

2.12. Análisis estadístico

Los datos de crecimiento poblacional y tasa de asimilación de mercurio se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación múltiple de Duncan para demostrar la existencia de diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Para el análisis estadístico se utilizó el software SPSS versión 21 para Windows 8.1

III. RESULTADOS

3.1. Evaluación de los parámetros de cultivo

3.1.1 Temperatura

Las temperaturas registradas tuvieron un promedio mínimo de 24,3 °C y un máximo de 24,9 °C, durante los días de cultivo

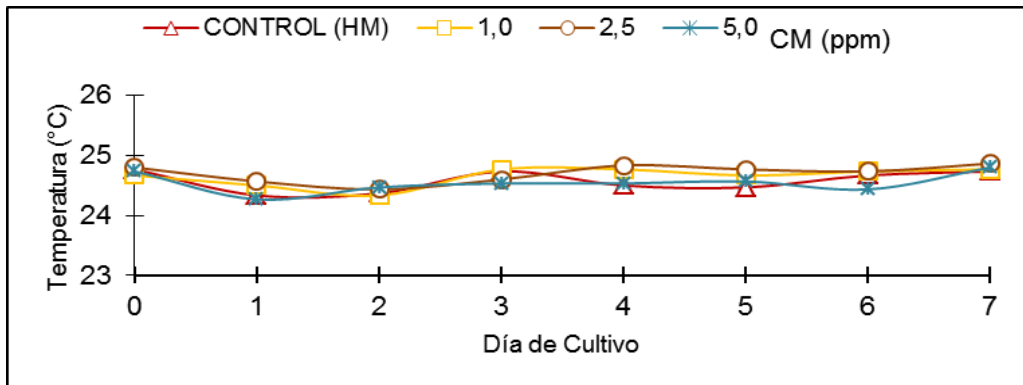


Figura 4. Variación del promedio diario de la temperatura en los cultivos de *Sc. acutus* a diferentes concentraciones de Hg.

Las variaciones diarias de la temperatura de los cultivos mostraron variaciones significativamente similares ($p>0,05$) durante todos los días (fig. 4; anexo 1).

3.1.2 pH

Los valores de pH registrados presentaron un promedio mínimo de 7,40 y un máximo de 8,73, durante los días de cultivo (fig. 5; anexo 3).

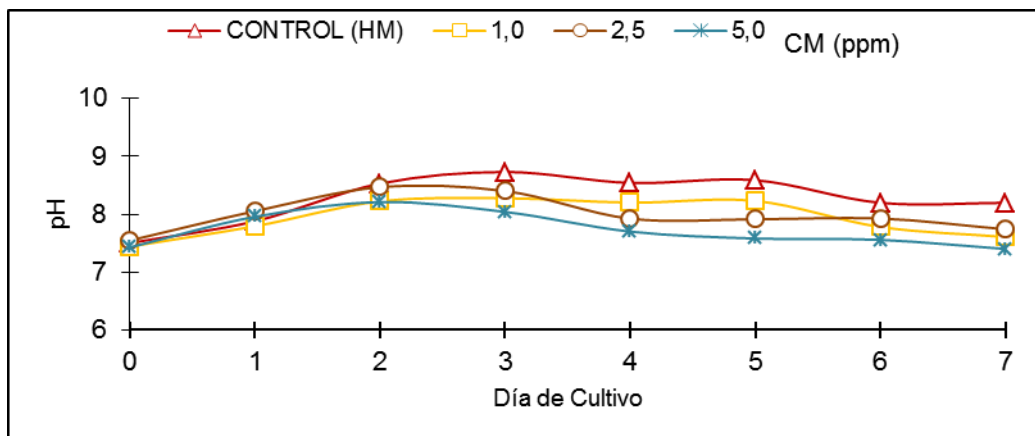


Figura 5. Variación del promedio diario del pH en los cultivos de *Sc. acutus* a diferentes concentraciones de Hg.

Los valores de pH en los tratamientos mostraron paulatinos incrementos durante los primeros días de cultivo, seguido de ligeras declinaciones después del tercer día, manteniéndose condiciones alcalinas con pH encima de 7,40 (fig. 5; anexo 3).

3.1.3 Crecimiento de los cultivos de *Sc. acutus*

Crecimiento en biomasa

La biomasa microalgal (mg L^{-1}) de *Sc. acutus* de todos los tratamientos se muestran la siguiente tabla 3 y están graficados en la figura 6, durante los 7 días de cultivo.

Tabla 3. Biomasa microalgal promedio (mg L^{-1}) diaria (\pm desviación estándar) en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)	CM (mg L^{-1})		
		1.0	2.5	5.0
0	28.2 \pm 0.0 ^a	28.2 \pm 0.0 ^a	28.2 \pm 0.0 ^a	28.2 \pm 0.0 ^a
1	61.6 \pm 5.8 ^a	52.4 \pm 2.7 ^b	41.8 \pm 2.2 ^c	45.6 \pm 5.6 ^{bc}
2	127.3 \pm 8.0 ^a	120.3 \pm 2.7 ^a	106.0 \pm 2.8 ^b	101.9 \pm 2.2 ^b
3	261.8 \pm 7.6 ^a	250.9 \pm 8.1 ^a	236.0 \pm 6.3 ^b	215.0 \pm 3.1 ^c
4	368.9 \pm 15.2 ^a	356.3 \pm 8.2 ^a	324.2 \pm 6.0 ^b	317.6 \pm 3.2 ^b
5	439.8 \pm 10.3 ^a	417.5 \pm 6.7 ^b	411.5 \pm 10.7 ^b	392.8 \pm 3.0 ^c
6	467.3 \pm 9.0 ^a	427.0 \pm 8.2 ^b	415.7 \pm 6.4 ^{bc}	403.6 \pm 7.1 ^c
7	486.2 \pm 13.5 ^a	441.9 \pm 11.6 ^b	437.3 \pm 5.6 ^b	405.7 \pm 7.2 ^c

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

La mayor cantidad de biomasa se obtuvo en el tratamiento control el cual no estuvo sometido a dosis de mercurio. En los tratamientos experimentales la producción de biomasa fue significativamente menor ($p<0,05$) por el efecto toxico del mercurio sobre la microalga. Si bien la biomasa obtenida en los cultivos experimentales fue baja, se observó un incremento de esta en todos los tratamientos durante todo el experimento.

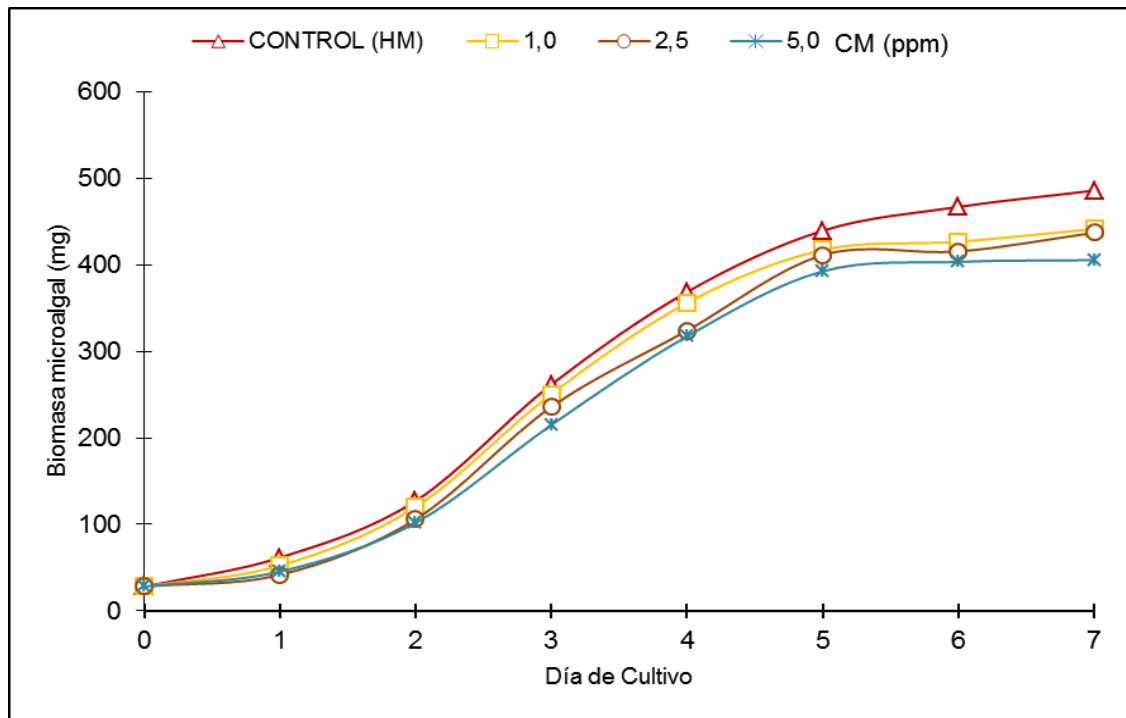


Figura 6. Variación de la biomasa microalgal de *Sc. acutus* cultivadas a diferentes concentraciones de Hg.

Los tratamientos iniciaron con un promedio de biomasa de *Sc. acutus* de 28.2 mg L^{-1} , las mismas que se incrementaron en el tiempo. El primer día de cultivo, los menores promedios de biomasa de *Sc. acutus* ($p < 0,05$) fueron determinadas en los tratamientos de 2.5 y 5.0 ppm de Hg con valores de 41.8 mg L^{-1} y 45.6 mg L^{-1} , respectivamente, y el mayor valor (61.6 mg L^{-1}) en los cultivos controles. En el segundo día, los menores valores promedios se determinaron en los cultivos dosificados con 2.5 y 5.0 ppm, con valores de 106.0 mg L^{-1} y 101.9 mg L^{-1} , respectivamente, mientras que los valores más altos de 127.3 y 120.3 mg L^{-1} se determinaron en los controles y con 1.0 ppm de Hg, respectivamente.

Similares tendencias se presentaron en el día 3, con los menores valores en los cultivos dosificados con 2.5 y 5.0 mg L^{-1} (236.0 y 215.0 mg L^{-1} , respectivamente), seguido de los de 1.0 ppm de Hg con 250.9 mg L^{-1} ; mientras que los controles presentaron el mayor valor (261.8 mg L^{-1}). Igualmente, en el cuarto día, los cultivos dosificados con 2.5 mg L^{-1} y 5.0 mg L^{-1} , presentaron los menores valores de 324.2 y 317.6 mg L^{-1} , respectivamente; mientras que los controles y los dosificados con 1.0 ppm de Hg, presentaron los valores más altos (368.9 y 356.3 mg L^{-1} , respectivamente).

A partir del quinto día de cultivo, se observan ligeros incrementos de la biomasa de los cultivos, siendo menores en aquellos dosificados con 5.0 ppm de Hg (392.8 mg L⁻¹) seguido de los de 1.0 ppm (417.5 mg L⁻¹) y de los de 2.5 ppm (411.5 mg L⁻¹). El mayor valor promedio de biomasa fue determinado en el control (439.8 mg L⁻¹). Asimismo, en el día 6, los menores valores de biomasa fueron determinados en los dosificados con 5.0 ppm (403.6 mg L⁻¹) seguido de las de 1.0 ppm (427.8 mg L⁻¹) y de las de 2.5 ppm (415.7 mg L⁻¹); mientras que los controles mantienen los valores más altos (467.3 mg L⁻¹).

Finalmente, en el día 7, los cultivos mantuvieron la misma tendencia con los valores de 405.7, 441.9 y 437.3 mg L⁻¹ en los cultivos dosificados con 5.0, 1.0 y 2.5 ppm de Hg, respectivamente; mientras que los controles mantuvieron el mayor valor (486.2 mg L⁻¹).

Crecimiento en densidades poblacionales

Las densidades poblacionales (cél mL⁻¹) durante los 7 días de crecimiento de los diferentes tratamientos de los cultivos de *Sc. acutus* son mostradas en la tabla 4 y fig. 7.

Tabla 4. Densidades poblacionales promedio (x10⁶ cél. mL⁻¹) diarias (± desviación estándar) en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio.

DÍA DE CULTIVO	CONTROL	Hg (mg L ⁻¹)		
		1.0	2.5	5.0
0	1.00 ±0.00 ^a	1.00 ±0.00 ^a	1.00 ±0.00 ^a	1.00 ±0.00 ^a
1	2.18 ±0.21 ^a	1.86 ±0.09 ^b	1.48 ±0.08 ^c	1.61 ±0.20 ^{bc}
2	4.51 ±0.28 ^a	4.26 ±0.10 ^a	3.75 ±0.10 ^b	3.60 ±0.08 ^b
3	9.27 ±0.27 ^a	8.84 ±0.21 ^b	8.34 ±0.22 ^c	8.34 ±0.11 ^d
4	13.06 ±0.54 ^a	12.62 ±0.29 ^a	11.45 ±0.21 ^b	10.05 ±0.10 ^c
5	15.57 ±0.36 ^a	14.80 ±0.24 ^b	14.53 ±0.38 ^b	13.27 ±0.10 ^c
6	16.55 ±0.32 ^a	16.35 ±0.32 ^a	15.22 ±0.23 ^b	13.19 ±0.23 ^c
7	17.22 ±0.48 ^a	16.92 ±0.45 ^a	16.01 ±0.21 ^b	12.44 ±0.22 ^c

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

Todos los tratamientos iniciados con densidades poblacionales de 1.00×10^6 cél mL⁻¹ muestran similares tendencias en el crecimiento durante los 3 primeros días, mostrando los cultivos controles los valores mayores seguidos de aquellos dosificados con 1.0, 2.5 y 5.0 ppm de Hg. Así tenemos que el día 1 los controles alcanzaron densidades de 2.18×10^6 cél mL⁻¹, seguido de 1.86; 1.48 y 1.61×10^6 cél mL⁻¹, respectivamente; mientras que los valores en los días 2 y 3 son, respectivamente, de 4.51 , 4.26 , 3.75 y 3.60×10^6 cel mL⁻¹, y de 9.27 , 8.84 , 8.34 y 8.34×10^6 cel mL⁻¹.

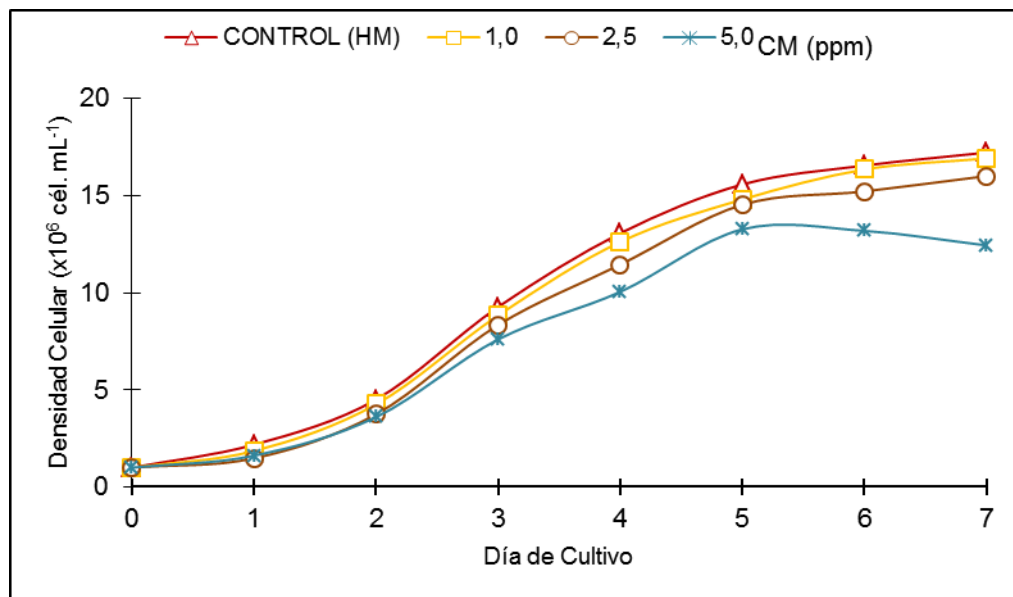


Figura 7. Variación de las densidades celulares de *Sc. acutus* cultivadas a diferentes concentraciones de Hg.

Al cuarto día de cultivo, los cultivos dosificados con 5.0 ppm de Hg presentaron la menor densidad poblacional (10.05×10^6 cél mL⁻¹) seguido del tratamiento con 2.5 ppm de Hg (11.45×10^6 cél mL⁻¹), y los mayores valores en los controles (13.06×10^6 cél mL⁻¹) y en los de 1.0 ppm de Hg (12.62×10^6 cél mL⁻¹). Estas mismas tendencias fueron observadas en los siguientes días, así tenemos que en el día 5, las menores densidades poblacionales fueron determinados en los dosificados con 5.0 ppm de Hg (13.27×10^6 cél mL⁻¹), seguido de los tratamientos con 1.0 ppm y 2.5 ppm de Hg, con 14.80×10^6 cél mL⁻¹ y 14.53×10^6 cél mL⁻¹, respectivamente, y los controles alcanzaron valores más altos (15.57×10^6 cél mL⁻¹). En el día 6, los menores valores de la densidad poblacional fueron determinados en los tratamientos, con valores de 13.19 , 15.22 y 16.35×10^6 cél mL⁻¹ para las dosificaciones de 5.0, 2.5 y 1.0 ppm de Hg,

respectivamente; sin embargo, los controles presentaron valores (16.55×10^6 cel mL⁻¹) estadísticamente similares al tratamiento con 1.0 ppm de Hg.

Al final del cultivo, las menores densidades poblacionales se estuvieron en los dosificados con 5.0 ppm de Hg (12.44×10^6 cél mL⁻¹), seguido del tratamiento con 2.5 ppm de Hg (16.01×10^6 cél mL⁻¹), mientras que las mayores densidades celulares fueron determinadas en el control y 1.0 mg L⁻¹ de Hg, con 17.22×10^6 y 16.92×10^6 cél mL⁻¹, respectivamente.

Tasa de crecimiento y tiempo de duplicación poblacional de *Sc. acutus*

La tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación poblacional de la microalga *Sc. acutus*, fueron evaluadas al quinto día de cultivo cuyos valores se muestran en la tabla 5 y fig. 8.

Tabla 5. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional (\pm desviación estándar) de los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

PARÁMETRO CONTROL (HM)	CM (mg L ⁻¹)			
	1.0	2.5	5.0	
N₀	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00	1.00 ±0.00
N_f	15.57 ±0.36	14.80 ±0.24	14.53 ±0.38	13.27 ±0.10
μ (d⁻¹)	0.549 ±0.005 ^a	0.539 ±0.003 ^b	0.535 ±0.005 ^b	0.517 ±0.002 ^c
TD (d)	1.263 ±0.011 ^a	1.286 ±0.007 ^b	1.296 ±0.012 ^b	1.342 ±0.004 ^c

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

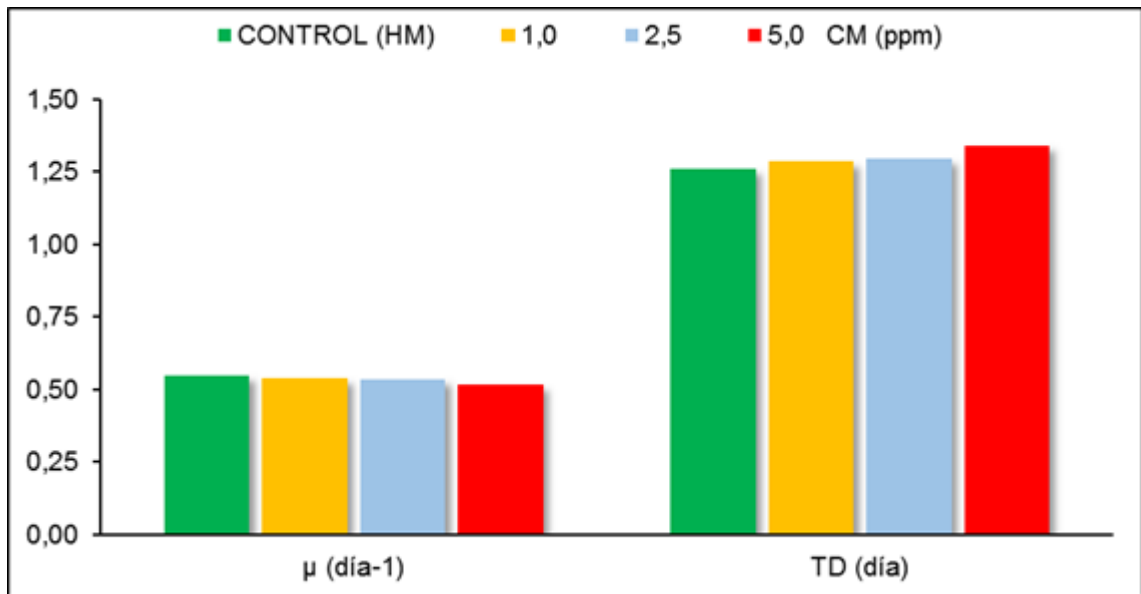


Figura 8. Promedios de la tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) poblacional de *Sc. acutus* cultivadas a diferentes concentraciones de Hg.

La tasa de crecimiento poblacional (μ), durante los primeros 5 días de crecimiento de los cultivos, fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el tratamiento con 5.0 ppm de Hg (0.517 d^{-1}) seguido de los tratamientos con 1.0 ppm y 2.5 ppm de Hg con valores de 0.539 d^{-1} y 0.535 d^{-1} , respectivamente, y el control presentó el mayor valor (0.549 d^{-1}); asimismo, el tiempo de duplicación poblacional (TD) fue significativamente menor ($p < 0,05$) en el control (1.263) seguido de los tratamientos con 1.0 ppm y 2.5 ppm de Hg con 1.286 y 1.296, respectivamente, mientras que los dosificados con 5.0 ppm de Hg presentaron el valor más alto (1.342).

3.3. Tasa de asimilación de mercurio en *Sc. acutus*

La tasa de asimilación de mercurio (TA) y el contenido del mercurio asimilado por gramo de biomasa de *Sc. acutus* de todos los tratamientos, en el día 7, se observa que, pese a las diferencias estadísticamente significativas, dichas tasas son bastante altas con valores de 98.16 %, 99.14 % y 99.67 % para los cultivos dosificados con 5, 2.5 y 1.0 respectivamente; asimismo, la cantidad de mercurio asimilado por la biomasa algal (mg g^{-1}) presentan notoria tendencia a incrementarse con el aumento de la dosificación del mercurio (Tabla 6).

Tabla 6. Tasa de asimilación del mercurio (TA) y contenido de mercurio en la biomasa (B) de *Sc. acutus* cultivado con diferentes concentraciones de mercurio a 7 días de cultivo.

PARÁMETRO	Mercurio (mg L ⁻¹)					
	1		2.5		5	
Ci (mg L ⁻¹)	1.004	±0.000	2.511	±0.000	5.026	±0.000
Cf (mg L ⁻¹)	0.003	±0.001	0.022	±0.008	0.093	±0.014
Δ asimilación	1.001	±0.001	2.489	±0.008	4.933	±0.014
TA (%)	99.67	±0.06 ^a	99.14	±0.33 ^b	98.16	±0.28 ^c

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

PARÁMETRO	Mercurio (mg L ⁻¹)					
	1		2.5		5	
Bi (mg L ⁻¹)	28.2	±0.0 ^a	28.2	±0.0 ^a	28.2	±0.0 ^a
Bf (mg L ⁻¹)	441.9	±11.6 ^b	437.3	±5.6 ^b	405.7	±7.2 ^c
Δ (mg L ⁻¹)	413.7	±11.5 ^b	409.1	±5.5 ^b	377.5	±7.1 ^c
B (mg g ⁻¹)	2.42	±0.066	6.08	±0.081	13.07	±0.233

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

3.4. Cambio de coloración a diferentes concentraciones de Hg en las células de *Sc. acutus*.

Durante el desarrollo de los ensayos se han observado cambios en la coloración de los cultivos que van desde el color verde característico hasta su total decoloración para luego tornar paulatinamente a su color natural (Fig. 9), asimismo, se han observado formación de granulaciones oscuras intracelulares (Fig. 10).



Figura 9. Formación de granulaciones oscuras intracelulares.

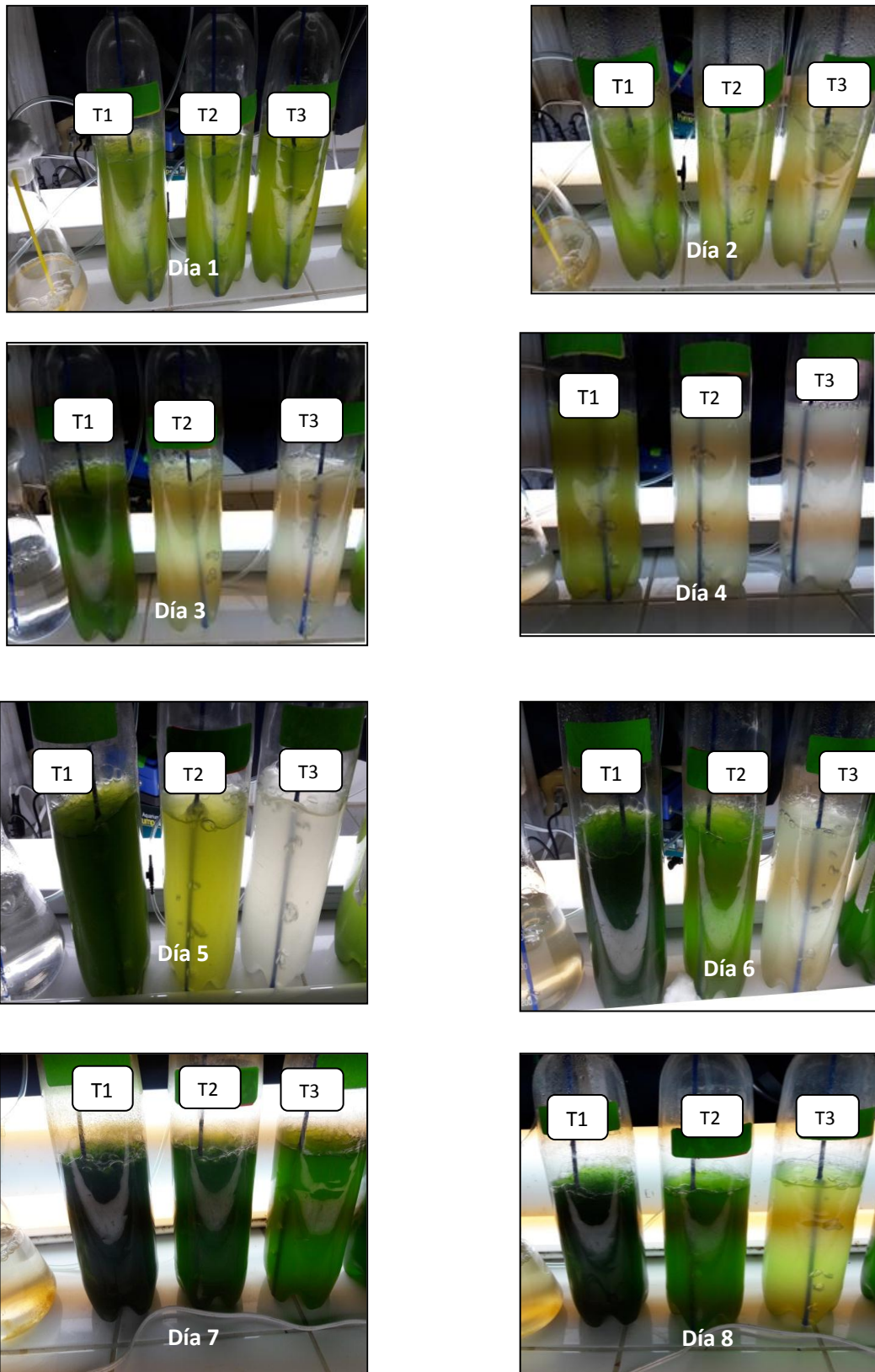


Fig. 10. Variación de la coloración a diferentes concentraciones ($T_1 = 1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}$, $T_2 = 2.5 \text{ mg L}^{-1}$, $T_3 = 5 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}$) durante los días de cultivo.

IV. DISCUSIÓN

Durante la realización de los ensayos, la temperatura y el pH de los cultivos no influyeron en los resultados obtenidos por estar dentro de los rangos adecuados, así tenemos que el rango de 24.3 °C y 24.9 °C es cercano al recomendado (Abalde *et al.*, 1995; Márquez, 2016), y el pH de 7.40 y 8.73 está en el rango de 6.5 a 9.5 recomendado por Garibay *et al.* (2009).

En el crecimiento microalgal, denota la eficiente utilización de los nutrientes y el efecto negativo del mercurio en el crecimiento de *Sc. acutus*; sin embargo, como menciona Inthorn *et al.* (2002), menores densidades poblacionales serán encontrados cuanto mayor es la concentración de Hg, y en comparación al grupo control, sería consecuencia de la toxicidad del metal.

Del mismo modo, considerando la tasa de crecimiento control (μ) de 0.549 d⁻¹, los menores valores determinados en los cultivos dosificados con 5 ppm de mercurio (0.517 d⁻¹) revelan que su efecto es mayor, que aquellos dosificados con 1.0 ppm (0.539 d⁻¹) y con 2.5 ppm (0.535 d⁻¹) de Hg (Tabla N° 5). Según Griffiths *et al.*, (2012) y Roleda *et al.* (2013); La tasa máxima del crecimiento indica el potencial biológico de una especie cuando su concentración celular o biomasa no es la más alta en la cual no existe deficiencia de nutrientes o de la luz, por lo tanto, las menores concentraciones de Hg (1.0 y 2.5 mg L⁻¹) no afectan notoriamente el crecimiento microalgal en comparación a la mayor concentración del mercurio (5.0 ppm) utilizada en la presente experiencia. Esto tiene cierta relación con lo observado por Imani *et al.* (2011) en *Dunaliella* que toleró 30 y 40 ppm de mercurio, pero disminuyó su crecimiento como un efecto negativo en el crecimiento poblacional.

También se han demostrado que el Hg no afecta sensiblemente el crecimiento poblacional, así tenemos los valores reportados por Toyub *et al.* (2008) en *Sc. obliquus* (0.32 d⁻¹ a 0.42 d⁻¹) y los de Roleda *et al.* (2013), en *Nannochloropsis oculata* (0.481 d⁻¹); *Isochrysis galbana* (0.451 d⁻¹) y *Odontella aurita* (0.131 d⁻¹), de tal manera que el crecimiento de *Scenedesmus* se ve afectado por la presencia de Hg, incluso a concentraciones bajas; por lo que algunas cepas no

deben considerarse estrictamente resistente al Hg sino más bien tolerante (Baldi, 1997).

La tolerancia al Hg de *Scenedesmus* spp. Se debe a la producción de cenobios que protegen las células del estrés del metal Hg, además, los mecanismos de conversión química, que presumiblemente ocurren intracelularmente, y produce una especie de Hg con menos reactividad en el metabolismo celular (Capolino *et al.*, 1997), pero que permite, como lo demostrado en el experimento, que la especie de *Sc. acutus*, logre importantes densidades poblacionales, dado su carácter tolerante para las concentraciones entre 1 a 5ppm de Hg,

En el caso de la biomasa microalgal, al final del experimento, los cultivos controles presentaron mayor biomasa (486.2 mg L^{-1}) que los dosificados con 5.0 mg L^{-1} de (405.7 mg L^{-1}), seguido de los de 1.0 mg L^{-1} y 2.5 mg L^{-1} de Hg, con 441.9 mg L^{-1} y 437.3 mg L^{-1} , respectivamente. De acuerdo a Davis *et al.*, (2003), el incremento de la biomasa es a expensas de los nutrientes aportados inicialmente y que son paulatinamente consumidos, no obstante, este incremento puede ser interferido por la presencia y concentración del mercurio en la suspensión microalgal, más aún, el efecto negativo es mayor con la mayor concentración del Hg, siendo el natural intercambio iónico de la biomasa una propiedad que permite la eliminación selectiva de metales pesados divalentes tóxicos como el mercurio.

Como se ha mencionado anteriormente, las concentraciones del Hg ($1 - 5 \text{ mg L}^{-1}$) no alteran sensiblemente la generación de biomasa de *Sc. acutus*, que según Monteiro *et al.* (2012), la cantidad de metales eliminados mejora con el aumento de la biomasa, debido a la disponibilidad de mayor número de sitios de unión al metal; sin embargo, altos niveles de biomasa presentan disminuciones en la eliminación de metales debido a la reducción de la superficie efectiva para la adsorción, además de la disminución de la distancia media entre los sitios de adsorción disponibles de cada célula presentándose un “efecto de pantalla” por la densa capa externa de células y bloqueo de los sitios de unión dando como resultado una menor eliminación de metal por unidad de biomasa (Bishnoi *et al.*, 2004). Este efecto se ha demostrado en la marcada reducción de la absorción de Pb^{2+} (121 a 21 mg g^{-1}) en *Spirulina*

maxima cuando la concentración de biomasa aumenta de 0.1 a 20 g L⁻¹ (Gong *et al.*, 2005); en consecuencia, existe una biomasa óptima para obtener una mejor absorción metales, ya que el aumento de la concentración de biomasa más allá de un cierto umbral podría probablemente causar una disminución en el nivel de unión de metal por unidad de masa celular (Esposito *et al.*, 2001). Por lo que la especie en estudio (*Sc. acutus*), es buena candidata para el tratamiento de aguas residuales, dado que permite el crecimiento y la generación de biomasa entre las concentraciones de 1 a 5ppm de Hg.

Las microalgas son los bioabsorbentes más importantes para concentrar elementos contaminantes, cuyas capacidades son altas, por ejemplo, Inthorn *et al.* (2002), determinaron remociones de Hg de las microalgas verdes *Scenedesmus sp.* (97 %), *Chlorococcum sp.* (96 %), *Chlorella vulgaris* (94 %) y *Fischerella sp.* (92 %); y de las verde-azuladas *Lyngbya spiralis* (96 %), *Tolypothrix tenuis* BBC 100 (94 %), *Stigonema sp.* BCC 92 (94 %) *Phormidium molle* (93 %) y *Lyngbya heironymusii* (92 %). En nuestras experiencias se ha demostrado la elevada capacidad de *Sc. acutus* de asimilar Hg en todos los tratamientos experimentales, con valores de 99.67, 99.14 y 98.16% en los cultivos dosificados con 1.0, 2.5 y 5.0 ppm de Hg. La asimilación del mercurio por la biomasa algal aumenta con la dosificación de dicho metal alcanzando valores de 2.42, 6.08 y 13.07 en los cultivos dosificados con 1.0, 2.5 y 5.0 ppm de Hg, respectivamente.

La capacidad de asimilación, se explica por la unión del Hg a las células, seguido de un transporte activo a través de la membrana celular al citoplasma, precipitación intracelular de complejos de metal insoluble, formación de complejos con metabolitos excretados, asimismo, se activa el bombeo celular para mantener bajos niveles del elemento tóxico dentro de la célula, cambio del estado de oxidación del metal tornándola menos tóxica, vaporización y eliminación mediante la conversión de un metal tóxico en una especie química volátil, unión a proteínas o polisacáridos citoplasmáticos para restringir la toxicidad del metal y la metilación enzimática para impedir reacciones tóxicas dentro de la célula (Monteiro *et al.* 2012). De todos los mecanismos de resistencia a los metales tóxicos mencionados, Mehta & Gaur (2005),

consideran que los más comunes y eficientes son la complejación y la microprecipitación.

Entonces, el proceso de asimilación de iones metálicos por las microalgas, especialmente en *Sc. acutus*, se realiza en un primer momento en la pared celular, que es la primera barrera, por lo que se ha propuesto que la interacción con las paredes o membranas celulares es la fase inicial de exposición y reacción de los metales pesados con las proteínas, carbohidratos y lípidos presentes en dichas superficies (Crist *et al.*, 1981; Dönmez *et al.*, 1999; Monteiro *et al.*, 2012).

Las áreas celulares que participan en la asimilación de Hg, se han demostrado con los estudios en microscopía electrónica, incluyendo el análisis de energía-dispersión de rayos X, muestran que la mayoría de los sitios de adsorción de metales se localizan en las superficies celulares y la adsorción vía intercambio iónico parece ser la principal contribución (hasta 90%) al total de la absorción de iones metálicos por las células de microalgas (Chojnacka *et al.*, 2005; Tiantian *et al.*, 2011; Maznah *et al.*, 2012; Monteiro *et al.*, 2012), de tal manera que la acumulación de metales son bioprocesos basados en el grado de dependencia metabólica (Gadd, 1990), acumulación extracelular/precipitación facilitada por adsorción o complejación que ocurre con microorganismos vivos o muertos; y la acumulación intracelular activa (Cossich *et al.*, 2002). En tal sentido, la asimilación activa o pasiva de elementos metálicos se denomina "bioacumulación", fenómeno complejo que comprende típicamente dos etapas: una remoción inicial pasiva que ocurre en la superficie de la célula, y una activa más lenta que ocurre dentro de la célula (Monteiro *et al.*, 2012). Ambas formas, han determinado que la asimilación de Hg por *Sc. acutus*, se presente de forma bastante eficiente y permita reciclar casi el total del metal presente en el medio de cultivo.

Dentro de otras características de las microalgas sometidas a metales pesados, se han observado gránulos intracelulares que demuestran la capacidad de asimilación activa dentro de vacuolas o libres en el citoplasma como un mecanismo de tolerancia a los metales pesados o de protección celular (Shanab *et al.*, 2012), que según Arunakumara & Xuecheng (2008), los

metales rompen el equilibrio oxidativo de las microalgas, induciendo enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX) y la ascorbato peroxidasa (APX) cuyas cantidades es un indicador de la gravedad del estrés causado por los iones metálicos, que para el presente experimento, si bien es cierto no se ha registrado específicamente esa característica, se ha evidenciado una estructura poblacional tendiente a presentar células solitarias (Fig. 10), a una mayor concentración de Hg, lo que demuestra el estrés al que está sometida.

Otro fenómeno observado en el experimento, ha sido la pérdida de coloración celular, probablemente debido al impacto negativo de la Hg sobre los componentes pigmentarios de *Sc. acutus*; sobre ello se conoce, que la fotosíntesis, un proceso metabólico importante para los organismos autótrofos, y se sabe que son muy sensibles a los metales pesados, sobre todo el Hg es capaz de alterar la maquinaria fotosintética, incluyendo la subunidad II del centro de reacción del fotosistema I, la proteína relacionada con el oxígeno y la subunidad β de la ATP sintasa cloroplástica (Nicolardi *et al.*, 2012). La toxicidad de los metales y sus compuestos, sin embargo, depende en gran medida de su biodisponibilidad, es decir, los mecanismos de captación a través de las membranas celulares, la distribución intracelular, y la unión a macromoléculas celulares (Azevedo & Rodríguez, 2012).

Ante la pérdida de pigmentos, las microalgas, como muchos organismos, han desarrollado diferentes mecanismos de tolerancia a la toxicidad por metales (Perales-Vela *et al.*, 2006). En respuesta a la absorción excesiva de metales, las microalgas inducen la producción de péptidos que se unen al metal, conocidos como las metalotioneínas clase III o fitoquelatinas y que impiden que estos actúen sobre las dianas celulares (Gekeler *et al.*, 1988). Varios estudios han confirmado la síntesis de fitoquelatinas en respuesta a metales pesados en microalgas (Robinson, 1989), por lo que se recomienda la utilización de las microalgas como mecanismo de absorción de la contaminación ambiental (Monteiro *et al.*, 2012). Además, en las microalgas, la pérdida de clorofilas está asociada a estrés ambiental (Hendry & Price, 1993), el contenido de pigmentos es utilizado como biomarcador en la exposición a diversos tóxicos como

químicos diversos y los metales pesados (Couderchet & Vernet, 2003; Monteiro *et al.*, 2012). Siendo ello criterios para seleccionar una cepa adecuada para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados, sobre todo el Hg, el que tolere las concentraciones utilizadas (1 - 5 mg L⁻¹), las mismas que permitan el crecimiento de *Sc. acutus* conservando el crecimiento en calores importantes.

Algunas microalgas han adquirido mecanismos de adaptación exitosos después de la exposición a contaminantes (Stockner & Antia, 1976) en la que capacidad de tolerancia del metal varia. Wong & Beaver (1980), compararon dos especies de microalgas: *Chlorella fusca* habitante común en lagos con altas concentraciones de metales, y *Ankistrodesmus bibraianum* muy sensible a los metales. Este efecto es más pronunciado en *Phormidium* que en *Pseudochlorococccum* y *Scenedesmus*, según la concentración del Hg, lo que significa que la eficacia del aparato fotosintético parecía estar severamente alterada por el Hg (Shanab *et al.*, 2012).

Asimismo, Shanab *et al.* (2012), encontraron que el cambio en el color en células de *Sc. quadricauda* tratadas con una concentración de Hg²⁺ de 5 a 10 mg L⁻¹, el contenido de clorofila "a" fue fuertemente destruido mientras que el contenido de proteína fue marcadamente elevado con Hg 5 mg L⁻¹, que fue acompañado con la considerable reducción en el crecimiento, significando que este organismo transmitió la mayor parte de la proteína fabricada desde un estado de crecimiento hasta un estado de supervivencia, así, el aumento de la proteína podría ser utilizado en la producción de fitoquelatina como mecanismo de defensa (Shanab *et al.*, 2012). Como es conocido, aquí existen varios genes implicados en la división celular y los implicados en la organización celular, en ambos casos los genes fueron desregulados; por ejemplo, se afectó la expresión de fibrilina asociada con los plástidos-lípidos; siendo la fibrilina parte del proteoma plastoglobulado, lo que sugiere un impacto de la exposición a mercurio sobre la síntesis de cuerpos lipídicos de reserva (Grennan, 2008; Beauvais-Flück *et al.*, 2017). Esto denota, que la capacidad de asimilación y el crecimiento, junto con la tolerancia al metal utilizado (Hg), es a nivel de

especie, lo que hace a *Sc. acutus* una especie potencial para el reciclaje de metales en el medio acuático.

V. CONCLUSIONES

- La mayor tasa de asimilación de Hg ($p < 0,05$) 99.67%, se obtuvo con la concentración de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$, en comparación con las concentraciones de $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ 99.14% y $5,0 \text{ mgL}^{-1}$ 98.16%, respectivamente.
- La mayor producción de biomasa de *Sc. acutus* ($p < 0,05$) se obtuvo con la concentración de $1,0 \text{ mgL}^{-1}$ 441.9 mg L^{-1} en comparación cultivos dosificados con $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ 441.9 mg L^{-1} y de 5.0 mgL^{-1} $405,7 \text{ mgL}^{-1}$
- Las densidades poblacionales significativamente mayores se obtuvieron en el control $17.22 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$ y 1.0 mg L^{-1} de Hg, siendo $16.92 \times 10^6 \text{ cél mL}^{-1}$, en comparación a los cultivos de 5.0 mg L^{-1} con $12.44 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$ y 2.5 mg L^{-1} $16.01 \times 10^6 \text{ cél. mL}^{-1}$.

VI. RECOMENDACIONES

- Evaluar las características morfológicas y fisiológicas de *Sc. acutus* expuestas al metal mercurio.
- Evaluar el efecto del mercurio en el contenido de pigmentos clorofílicos de *Sc. acutus*.
- Evaluar la tasa de asimilación diaria de Hg y su efecto en el crecimiento de *Sc. acutus*.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abalde, J.; A. Cid; P. Fidalgo; E. Torres & C. Herrero. 1995. *Microalgas: Cultivos y Aplicaciones*. Monografía N° 26. Coruña: Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Coruña. La Coruña, España. 181p.
- Abd-El-Monem, H.; M. Corradi & G. Gorbi. 1998. Toxicity of copper and zinc to two strains of *Scenedesmus acutus* having different sensitivity to chromium. *Environ. Exp. Bot.* 40:59-66.
- Al-Homaidan, A. 2006. Heavy metal levels in Saudi Arabian *Spirulina*. *Pakistan J. Biol. Sci.* 9(14):2693-2695.
- Andrade, C.; A. Vera; C. Cárdenas & E. Morales. 2009. Biomass Production Microalgae *Scenedesmus* sp. with wasterwater from fishery. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia.* 32 (2): 126-134.
- Ardila, L. 2012. Medición de la capacidad de *Chlorella vulgaris* y *Scenedesmus acutus* para la remoción de cromo de aguas de curtiembre. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ingeniería, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Bogotá – Colombia.
- Armas, C. & C. Armas. 2001. Tecnología Ambiental: En nuestro hogar la nave sideral tierra. Editorial APLI GRAF S.R.L. Trujillo – Perú. 425, 242 p.
- Arunakumara, K. & Z. Xuecheng. 2008. Heavy metal bioaccumulation and toxicity with special reference to microalgae. *J. Ocean Univ. China.* 7(1):25-30.
- Ayala, J. 2007. Caracterización bioquímica de dos especies de microalgas marinas en cultivos al exterior en dos estaciones del año. Universidad de Sonora. Sonora – México. 103 p.
- Azevedo, R. & E. Rodriguez. 2012. Phytotoxicity of mercury in plants: A review. *J. Bot.* Article ID 848614, 6p. doi:10.1155/2012/848614.
- Azpiroz, R. 1984. Relación entre la morfología y el contenido proteico de *Scenedesmus quadricauda* como respuesta a la concentración de nitrógeno y fosforo en el medio. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa – México. 1 p.
- Baldi, F. 1997. Microbial transformation of mercury species and their importance in the biogeochemical cycle of Hg. *In: Sigel H, Sigel A, eds.*

- Mercury and its Effects on Environment and Biology, Vol 34. New York: Marcell Dekker, Inc.; 213-257pp.
- Barsanti, L. & P. Gualtieri. 2006. *Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology*. Taylor & Francis Group, LCC. New York – United States of America. 1 p.
- Barreto, E. & H. Purizaga. 2013. Efecto de diferentes concentraciones de efluente de cultivo semi intensivo de *Oreochromis niloticus* “tilapia gris”, en el crecimiento poblacional y contenido de lípidos de *Secenedesmus acutus* en condiciones de laboratorio. Universidad Nacional del Santa. Chimbote – Perú.
- Beauvais-Flück, R.; V. Slaveykova & C. Cosio. 2017. Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Scientific Reports*. 7:1-12.
- Bermeo, L. 2011. Estudio del cosechado de cultivo de microalgas en agua residual mediante técnicas de centrifugado. Universidad Técnica Particular de Loja. Cádiz – España. 23 p.
- Bishnoi, N.; A. Pant & P. Garima. 2004. Biosorption of copper from aqueous solution using algal biomass. *J. Sci. Ind. Res.* 63:813-816.
- Capolino, E.; M. Tredici; M. Pepi & F. Baldi. 1997. Tolerance to mercury chloride in *Scenedesmus* strains. *BioMetals*. 10:85-94.
- Chojnacka, K.; A. Chojnacki & H. Górecka. 2005. Biosorption of Cr³⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the process. *Chemosphere*. 59:75-84.
- Cordero, J.; M. Guevara; E. Morales & C. Lodeiros 2005. Efecto de metales pesados en el crecimiento de la microalga tropical *Tetraselmis chuii* (Prasinophyceae) 2005. Redalyc.org. Vol. 53. Universidad de Costa Rica. Costa rica.
- Cossich, E.; C. Tavares & T. Ravagnani. 2002. Biosorption of chromium (III) by *Sargassum* sp. biomass. *Electron. J. Biotechnol.* 5(2):133-140.
- Couderchet, M. & G. Vernet. 2003. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 55:271-277.

- Crist, R.H.; K. Oberholser; N. Shank & M. Nguyen. 1981. Nature of bonding between metallic ions and algal cell walls. *Environ. Sci. Technol.* 15:1212-1217.
- Davis, T.; B. Volesky & A. Mucci. 2003. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research.* 37:4311-4330.
- De-Bashan, L. & Y. Bashan. 2010. Immobilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresour. Technol.* 101:1611-1627.
- Di Paola, M. & Carmen Vicién. 2010. Biorremediación. Proyecto "Potencialidades de la biotecnología para el desarrollo industrial en Argentina" CEUR-CONICET.
- Drekman, K, A. Senties & M. Nuñez. 2013. Manual de prácticas de laboratorio. Biología de algas. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa – México. 13 p.
- Dönmez, G.; Z. Aksu; A. Öztürk & T. Kutsal. 1999. A comparative study on heavy metal biosorption characteristics of some algae. *Process Biochem.* 34:885-892.
- Esposito, A.; F. Pagnanelli; A. Lodi; C. Solisio & F. Veglio. 2001. Biosorption of heavy metals by *Sphaerotilus natans*: an equilibrium study at different pH and biomass concentrations. *Hydrometallurgy.* 60:129-141.
- Fernández, J.; E. de Miguel; J. de Miguel & M. Curt. 2005. Manual de Fitodepuración. Filtros de Macrofitas en Flotación. Encuentro Internacional sobre Fitodepuración. Proyecto Life. Murcia – España. 13 p.
- 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.* 48(2):179-187.
- Freundlich, H. 1906. Adsorption in solutions. *Z. Phys Chem (Germany).* 57:385-470.
- Gadd, G.M. 1990. Heavy metal accumulation by bacteria and other microorganisms. *Experientia.* 46(8):834-840.
- García F. 2016. Remoción de mercurio en aguas residuales de la actividad minera con el uso de microalgas. Facultad de Ingeniería Ciencias Agropecuarias. UDLA. Quito. 124 p.

- Garibay, A.; R. Vasquez-Duhalt; M. Sánchez; L. Serrano & A. Martínez. 2009. Biodiesel a partir de Microalgas. *Biotecnología*. 13 (3): 38-61.
- Gekeler, W.; E. Grill; E. Winnacker & M. Zenk. 1988. Algae sequester heavy metals via synthesis of phytochelatin complexes. *Arch. Microbiol.* 150:197-202.
- Gong, R.; Y. Ding; H. Liu; Q. Chen & Z. Liu. 2005. Lead biosorption and desorption by intact and pretreated *Spirulina maxima* biomass. *Chemosphere*. 58:125-130.
- Grennan, A. K. 2008. Plastoglobule proteome. *Plant Physiol.* 147(2):443-445.
- Griffiths, M.; R. Van Hille & S. Harrison. 2012. Lipid productivity, settling potential and fatty acid profile of 11 microalgal species grown under nitrogen replete and limited conditions. *J. Appl. Phycol.* 24:989-1001.
- Guillard, R. 1973. División Rates. In Handbook of phycological methods and growth measurement. J.R. Stein (ed). Cambridge University Pres. London. 290-311pp.
- Halder, S. 2014. Bioremediation of Heavy Metals through Fresh Water Microalgae: A Review Soma Halder (Paul). *Scholars Academic Journal of Biosciences (SAJB)*. 2(11):825-830.
- Hendry, G. & A. Price. 1993. Stress indicators: chlorophylls and carotenoids. In: Hendry GAF, Grime JP (eds), *Methods in comparative plant ecology*. Chapman & Hall, London, UK. 148-152pp.
- Hernández, A. & J. Labbé. 2014. Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. Vol. 49, N°2: 157-173 p.
- Imani, S.; S. Rezaei-Zarchi; H. Borna; A. Javid; A. Zand & H. Abarghouei. 2011. Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella* alga. *J Med Plants Res*. 5(13):2775-2780.
- INEI. 2015. Anuario de Estadísticas Ambientales 2015: Agua. 123 p.
- Iannacone J. & L. Alvaríño. 2003. Efecto Ecotoxicológico agudo del Mercurio sobre Larvas del Muy Muy *Emerita analoga* (Stimpson) (Decapoda: Hippidae) procedentes de cuatro localidades de Lima. *Ecología Aplicada*, 2(1): 111-115.
- Inthorn, D.; N. Sidtitoon; S. Silapanuntakul & A. Incharoensakdi. 2002. Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae. *ScienceAsia*. 28:253-261.

- Konopka, A. 1999. Microbial biomass and activity in lead-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(5):2256-2259.
- Márquez, L.A. 2016. Efecto de las condiciones ambientales y adición de consumidores de oxígeno sobre el crecimiento y la producción de hidrógeno en cultivos de clorofíceas. Tesis de Grado de Doctor en Ciencias. Programa de Posgrado con orientación en Biotecnología Marina. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. Ensenada, Baja California, México. 143p.
- Maznah, W.; A. Al-Fawwaz & M. Surif. 2012. Biosorption of copper and zinc by immobilised and free algal biomass, and the effects of metal biosorption on the growth and cellular structure of *Chlorella* sp. and *Chlamydomonas* sp. Isolated from rivers in Penang, Malaysia. *J. Environ. Sci.* 24(8):1386-1393.
- Mehta, S. & J. Gaur. 2005. Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25:113-152.
- Méndez, L.; I. Albarracín; M. Cravero & y R. Salomón. 2010. Crecimiento de *Scenedesmus quadricauda* en efluentes cloacales de la ciudad de Trelew, Chubut, Argentina. Facultad de Ciencias Naturales – UNPSJB – Roca 115 – 1er. Piso - Trelew. Chubut. Argentina. Estación de Fotobiología. CONICET - Playa Unión. Chubut. Argentina. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Bogotá - Colombia.
- Merino, J. 2003. Cultivo masivo de microalgas de agua salada en laboratorio. Informe de año sabático. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional del Santa. Nuevo Chimbote – Perú. 53p.
- Meseldzic, Z. 1977. Contaminación Ambiental y América Latina. Editorial Lima S.A. Segunda Edición. Lima – Perú. 38 - 45 p.
- Meyen, F. 1829. Beobachtungen über einige niedere algenformen.
- Monteiro, C.M.; P. Castro & F. Malcata. 2012. Metal uptake by microalgae: underlying mechanisms and practical applications. *Biotechnol. Prog.* 28(2):299-311.
- Moreno, P. 2007. Efecto de los metales pesados cadmio y vanadio sobre el crecimiento y morfología de las microalga *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.
- Nicolardi, V.; G. Cai; L. Parrotta; M. Puglia; L. Bianchi; L. Bini & C. Gaggi. The adaptive response of lichens to mercury exposure involves changes in the photosynthetic machinery. *Environ Pollut.* 160:1-10.
- ONU. 2017. Aguas Residuales el Recurso Desaprovechado. Informe Mundial de las Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos 2017. 2 p.
- Osores F., A. Grandéz & J. Fernández. 2010. Mercurio y salud en Madre de Dios, Perú. *Acta Med Per* 27(4): 310-314.
- Pellon, A.; F. Benítez; J. Frades; L. García; A. Cerpa & F. Alguacil. 2003. Empleo de microalga *Scenedesmus obliquus* en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas. *Rev. Metal. Madrid.* 39:9-16.
- Peña, J.; F. Martínez; F. Esparza & R. Cañizares. 2004. Heavy metals removal by the microalga *Scenedesmus incrassatulus* in continuous cultures. *Bioresource Technology.* 94:219-222.
- Perales, H.; J. Peña & R. Cañizares. 2006. Heavy metal detoxification in eukaryoticmicroalgae. *Chemosphere.* 64:1-10.
- Plaza, J. 2012. Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de Química. La Plata – Argentina.
- 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.* Vol. 5 N°1, 2002. 75-79 p.
- Roldán, G. 1992. Fundamentos de limnología tropical. Medellín: Editorial Universidad de Antioquia. 529 p. *Revista cubana de química.* P.193. Cuba.
- Roleda, M.; S. Slocombe; R. Leakey; J. Day; E. Bell & M. Stanley. 2013. Effects of temperature and nutrient regimes on biomass and lipid production by

- six oleaginous microalgae in batch culture employing a two-phase cultivation strategy. *Bioresource Technology*. 129:439-449
- 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.
- 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”. *SCIÉND*O. 15(1):7-21.
- Sáenz, M.; M. Tortorelli & L. Freyre. 2003. Evaluación de la fitotoxicidad de efluentes industriales. *Limnetica*. 22(3-4):137-146.
- Shanab, S.; A. Essa & E. Shalaby. 2012. Bioremoval capacity of three heavy metals by some microalgae species (Egyptian Isolates). *Plant Signal. Behav.* 7 (3):392-399.
- Soo, Y.O.; K. Chow; C. Lam; F. Lai; C. Szeto; M. Chan & P. Li. 2013. Whitened face woman with nephritic syndrome. *American Journal Kidney*. 4(3). 250p.
- Stockner, J. & N. Antia. 1976. Phytoplankton adaptation to environmental stresses from toxicants, nutrients, and pollutants – a warning. *J. Fish. Res. Board Can.* 33(9):2089-2096.
- 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)15-28.
- Travieso, L.; A. Pellón; F. Benítez; E. Sánchez; R. Borja; N. Farrill & P. Weiland. 2002. BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Biochemical Engineering Journal* 12: 87-91.
- Tiantian, Z.; C. Lihua; X. Xinhua; Z. Lin & C. Huanlin. 2011. Advances on heavy metal removal from aqueous solution by algae. *Prog. Chem.* 23(8):1782-1794.
- Toyub, M.; M. Miah; M. Habib & M. Rahman. 2008. Growth performance and nutritional value of *Scenedesmus obliquus* cultured in different concentrations of sweetmeat factory waste media. *Bang. J. Anim. Sci.* 37(1):86-93.

- UNEP. 2008. The Global Atmospheric Mercury Assessment: Sources, Emissions and Transport. United Nations Environment Programme. 11 p.
- Vilensky, M.; B. Berkowitz & A. Warshawsky. 2002. *In situ* remediation of groundwater contaminated by heavy-and transition-metal ions by selective ion-exchange methods. *Environ. Sci. Technol.* 36(4):1851-1855.
- Weinberg J. 2011. Introducción a la Contaminación por Mercurio para las ONG. Red Internacional de Eliminación de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (IPEN). 49 p.
- Wong, S. & J. Beaver. 1980. Algal bioassays to determine toxicity of metal mixtures. *Hydrobiology.* 73(3):199-208.
- Ynga, G. 2011. Cultivo Masivo de Microalgas en Biorreactores Verticales. Universidad Nacional de San Agustín. Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Escuela Profesional y Académica de Biología. Arequipa – Peru. 6 p.

ANEXOS

Anexo 1. Valores de la temperatura (°C) diaria en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			CM (ppm)								
				1,0			2,5			5,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	24,7	24,9	24,7	24,7	24,6	24,7	24,6	25,0	24,8	24,6	24,7	24,9
1	24,1	24,3	24,6	24,7	24,5	24,3	24,5	25,1	24,1	24,1	24,5	24,2
2	24,7	24,3	24,1	24,2	24,2	24,6	24,9	24,3	24,1	24,6	24,3	24,5
3	24,9	24,6	24,7	25,0	24,7	24,6	24,6	24,9	24,3	24,3	24,5	24,8
4	24,8	24,2	24,5	24,5	25,0	24,8	25,0	24,4	25,1	24,2	24,5	24,9
5	24,5	24,8	24,1	24,8	24,5	24,7	24,9	25,0	24,4	25,0	24,1	24,6
6	24,7	24,9	24,4	24,6	24,5	25,1	24,6	24,7	24,9	24,3	24,6	24,4
7	24,8	24,5	24,9	24,6	24,9	24,8	25,3	25,0	24,3	24,5	24,8	25,1

Anexo 2. Valores promedio de la temperatura (°C, \pm desviación estándar) diaria en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)	CM (ppm)		
		1,0	2,5	5,0
0	24,8 \pm 0,1 ^a	24,7 \pm 0,1 ^a	24,8 \pm 0,2 ^a	24,7 \pm 0,2 ^a
1	24,3 \pm 0,3 ^a	24,5 \pm 0,2 ^a	24,6 \pm 0,5 ^a	24,3 \pm 0,2 ^a
2	24,4 \pm 0,3 ^a	24,3 \pm 0,2 ^a	24,4 \pm 0,4 ^a	24,5 \pm 0,2 ^a
3	24,7 \pm 0,2 ^a	24,8 \pm 0,2 ^a	24,6 \pm 0,3 ^a	24,5 \pm 0,3 ^a
4	24,5 \pm 0,3 ^a	24,8 \pm 0,3 ^a	24,8 \pm 0,4 ^a	24,5 \pm 0,4 ^a
5	24,5 \pm 0,4 ^a	24,7 \pm 0,2 ^a	24,8 \pm 0,3 ^a	24,6 \pm 0,5 ^a
6	24,7 \pm 0,3 ^a	24,7 \pm 0,3 ^a	24,7 \pm 0,2 ^a	24,4 \pm 0,2 ^a
7	24,7 \pm 0,2 ^a	24,8 \pm 0,2 ^a	24,9 \pm 0,5 ^a	24,8 \pm 0,3 ^a

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

Anexo 3. Valores de pH diario en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			CM (ppm)								
				1,0			2,5			5,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	7,45	7,55	7,51	7,44	7,38	7,51	7,53	7,49	7,62	7,48	7,37	7,44
1	7,84	7,91	7,89	7,79	7,94	7,65	8,25	7,94	7,97	7,93	7,96	7,98
2	8,56	8,54	8,49	8,19	8,23	8,25	8,38	8,59	8,43	8,17	8,30	8,16
3	8,74	8,77	8,68	8,32	8,27	8,24	8,56	8,30	8,34	8,12	7,94	8,06
4	8,55	8,58	8,49	8,06	8,33	8,21	7,98	7,97	7,82	7,58	7,85	7,67
5	8,61	8,49	8,66	7,87	8,29	8,53	7,65	8,24	7,85	7,59	7,41	7,74
6	8,18	8,15	8,26	7,65	7,85	7,84	8,01	8,09	7,68	7,60	7,52	7,55
7	8,27	8,00	8,32	7,71	7,65	7,46	7,86	7,39	7,97	7,23	7,50	7,47

Anexo 4. Valores promedio de pH (\pm desviación estándar) diaria en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)	CM (ppm)		
		1,0	2,5	5,0
0	7,50 \pm 0,05 ^a	7,44 \pm 0,07 ^a	7,55 \pm 0,07 ^a	7,43 \pm 0,06 ^a
1	7,88 \pm 0,04 ^{ab}	7,79 \pm 0,15 ^b	8,05 \pm 0,17 ^a	7,96 \pm 0,03 ^{ab}
2	8,53 \pm 0,04 ^a	8,22 \pm 0,03 ^b	8,47 \pm 0,11 ^a	8,21 \pm 0,08 ^b
3	8,73 \pm 0,05 ^a	8,28 \pm 0,04 ^b	8,40 \pm 0,14 ^b	8,04 \pm 0,09 ^c
4	8,54 \pm 0,05 ^a	8,20 \pm 0,14 ^b	7,92 \pm 0,09 ^c	7,70 \pm 0,14 ^b
5	8,59 \pm 0,09 ^a	8,23 \pm 0,33 ^{ab}	7,91 \pm 0,30 ^{bc}	7,58 \pm 0,17 ^c
6	8,20 \pm 0,06 ^a	7,78 \pm 0,11 ^{ab}	7,93 \pm 0,22 ^a	7,56 \pm 0,04 ^b
7	8,20 \pm 0,17 ^a	7,61 \pm 0,13 ^b	7,74 \pm 0,31 ^b	7,40 \pm 0,15 ^b

Letras diferentes en el mismo día, indican diferencias significativas con $\alpha=0,05$.

Anexo 5. Densidades celulares ($\times 10^6$ cél. mL⁻¹) diarias en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			CM (ppm)								
				1,0			2,5			5,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1	2,12	2,01	2,41	1,89	1,93	1,75	1,57	1,42	1,45	1,49	1,84	1,51
2	4,83	4,30	4,39	4,25	4,36	4,17	3,71	3,67	3,86	3,58	3,69	3,54
3	8,98	9,51	9,32	8,76	9,07	8,68	8,28	8,59	8,16	7,69	7,63	7,48
4	12,81	13,68	12,70	12,33	12,91	12,61	11,58	11,20	11,56	10,06	10,14	9,94
5	15,49	15,97	15,26	14,57	14,79	15,04	14,16	14,52	14,91	13,36	13,16	13,28
6	16,42	16,91	16,31	16,04	16,33	16,67	15,17	15,47	15,01	13,36	13,28	12,92
7	17,66	17,28	16,71	16,96	16,45	17,34	16,01	16,21	15,80	12,46	12,65	12,21

Anexo 6. Tasa de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (TD) diaria en los cultivos de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

PARÁMETRO	CONTROL (HM)			CM (ppm)								
				1,0			2,5			5,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
N₀	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
N_f	15,49	15,97	15,26	14,57	14,79	15,04	14,16	14,52	14,91	13,36	13,16	13,28
Día	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
μ (d⁻¹)	0,548	0,554	0,545	0,536	0,539	0,542	0,530	0,535	0,540	0,518	0,515	0,517
TD (d)	1,265	1,251	1,272	1,293	1,286	1,279	1,308	1,296	1,284	1,338	1,346	1,341

Anexo 7. Biomasa microalgal diaria (mg L^{-1}) de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM).

DÍA DE CULTIVO	CONTROL (HM)			CM (ppm)									
				1,0			2,5			5,0			
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	
0	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2	28,2
1	59,9	56,8	68,1	53,4	54,5	49,4	44,3	40,1	40,9	42,1	52,0	42,6	
2	136,4	121,4	124,0	120,0	123,1	117,8	105,0	103,8	109,2	101,3	104,4	100,1	
3	253,6	268,6	263,2	247,4	260,1	245,1	234,2	243,0	230,8	217,6	215,9	211,6	
4	361,8	386,3	358,6	348,2	364,6	356,1	327,9	317,2	327,4	318,0	320,5	314,2	
5	437,4	451,0	430,9	411,0	417,2	424,3	401,0	411,2	422,3	395,6	389,7	393,2	
6	463,7	477,5	460,6	419,0	426,5	435,4	414,4	422,6	410,1	408,9	406,5	395,5	
7	498,7	488,0	471,9	443,0	429,7	452,9	437,4	442,9	431,7	406,3	412,5	398,2	

Anexo 8. Tasa de asimilación de mercurio (%) de *Sc. acutus* utilizando diferentes concentraciones de mercurio (CM), concentración inicial de mercurio (CIM) y concentración final de mercurio (CFM).

PARÁMETRO	CM (ppm)								
	1,0			2,5			5,0		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
CI (ppm)	1,004	1,004	1,004	2,511	2,511	2,511	5,026	5,026	5,026
CF (ppm)	0,003	0,004	0,003	0,031	0,015	0,019	0,106	0,078	0,094
(mg L^{-1})	443,0	429,7	452,9	437,4	442,9	431,7	406,3	412,5	398,2
TA (%)	99,70	99,60	99,70	98,77	99,40	99,24	97,89	98,45	98,13

Anexo 9. Datos obtenidos de Mercurio (Hg), realizados en el Laboratorio Colecbi S.A.C. concentración inicial y final.



CORPORACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYOS CLÍNICOS, BIOLÓGICOS E INDUSTRIALES "COLECBI" S.A.C.

REGISTRADO EN LA DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS Y DESARROLLO PESQUERO - PRODUCE

INFORME DE ENSAYO N° 3569-16

Pág. 1 de 1

SOLICITADO POR : SANTIAGO ALVA REYES
DIRECCIÓN : Nuevo Chimbote
PRODUCTO DECLARADO : AGUA POTABLE.
CANTIDAD DE MUESTRA : 08 muestras x 500mL
PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA : Fresco de vidrio con tapa.
FECHA DE RECEPCIÓN : 2016-11-10
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO : 2016-11-10
FECHA DE TÉRMINO DEL ENSAYO : 2016-11-22
CONDICIÓN DE LA MUESTRA : En buen estado.
ENSAYOS REALIZADOS EN : Laboratorio Físico Químico.
CÓDIGO COLECBI : SS 001986-16

RESULTADOS

MUESTRA	Mercurio (mg/L)
T1R1	1.004
T1R2	2.511
T1R3	5.026

METODOLOGÍA EMPLEADA

Mercurio : EPA 200.7

NOTA:

- Informe de ensayo emitido en base a resultados realizados por COLECBI S.A.C.
- Los resultados presentados corresponden solo a la muestra ensayada.
- Estos resultados de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce

Fecha de Emisión: Nuevo Chimbote, Noviembre 23 del 2016.

GVR/jms

A. Guevará Yáñez Ramos
 Gerente de Laboratorios
 C.B.P. 326
 COLECBI S.A.C.

LC-MP-HRIE
 Rev. 04
 Fecha 2015-11-30

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE COLECBI S.A.C.

Urb. Buenos Aires Mz. A - Lt. 7 - 1 Etapa - Nuevo Chimbote - Telefax: 043-310752

Nextel: 839*2893 - RPM #902995 - Apartado 127

e-mail: colecbi@speedy.com.pe/ medioambiente_colecbi@speedy.com.pe

Web: www.colecbi.com



CORPORACIÓN DE LABORATORIOS DE ENSAYOS CLÍNICOS, BIOLÓGICOS E INDUSTRIALES

“COLECBI” S.A.C.

REGISTRADO EN LA DIRECCIÓN GENERAL DE POLÍTICAS Y DESARROLLO PESQUERO - PRODUCE

INFORME DE ENSAYO N° 3447-16

Pág. 1 de 1

SOLICITADO POR : SANTIAGO ALVA REYES

DIRECCIÓN : Nuevo Chimbote

PRODUCTO DECLARADO : AGUA POTABLE.

CANTIDAD DE MUESTRA : 08 muestras x 500mL

PRESENTACIÓN DE LA MUESTRA : Frasco de vidrio con tapa.

FECHA DE RECEPCIÓN : 2016-11-03

FECHA DE INICIO DEL ENSAYO : 2016-11-03

FECHA DE TÉRMINO DEL ENSAYO : 2016-11-16

CONDICIÓN DE LA MUESTRA : En buen estado.

ENSAYOS REALIZADOS EN : Laboratorio Físico Químico.

CÓDIGO COLECBI : SS 001936-16

RESULTADOS

MUESTRA	ENSAYOS
	Mercurio (mg/L)
T1R1	<0,003
T1R2	<0,004
T1R3	<0,003
T2R1	<0,031
T2R2	<0,015
T2R3	<0,019
T3R1	<0,106
T3R2	<0,078
T3R3	<0,094

METODOLOGÍA EMPLEADA

Mercurio : EPA 200.7

NOTA:

- Informe de ensayo emitido en base a resultados realizados por COLECBI S.A.C.
- Los resultados presentados corresponden solo a la muestra ensayada.
- Estos resultados de ensayos no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce

Fecha de Emisión: Nuevo Chimbote, Noviembre 16 del 2016.

GVR/jms

(Firma)
A. Gustavo Vargas Ramos
 Gerente de Laboratorios
 C.B.P. 326
COLECBI S.A.C.

LC-MP-HRIE

Rev. 04

Fecha 2015-11-30

PROHIBIDA LA REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL DE ESTE INFORME SIN LA AUTORIZACIÓN ESCRITA DE COLECBI S.A.C.

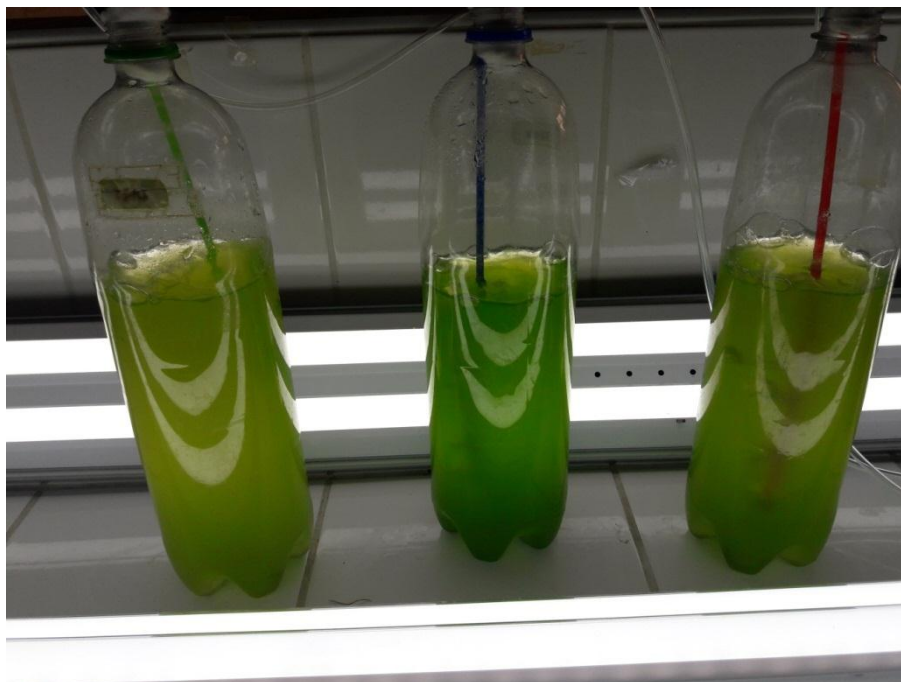
Urb. Buenos Aires Mz. A Lt. 7 I Etapa - Nuevo Chimbote - Telefax: 043-310752

Nextel: 839*2893 - RPM #902995 - Apartado 127

e-mail: colecbi@speedy.com.pe / medioambiente_colecbi@speedy.com.pe

Web: www.colecbi.com

Anexo 10. Levantamiento del cultivo de *SC. Acutus*.



Anexo 11. Acondicionamiento de las unidades experimentales.

