



Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y
Acuicultura

DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA PARA LA REMOCIÓN DEL ION CADMIO
(+2) EMPLEANDO LA MICROALGA CLORORÓFITA, *Scenedesmus dimorphus*
(Kützing, 1834), PRESENTE EN AMBIENTES ACUÁTICOS CONTROLADOS

Tesis para optar el grado de Ingeniero Pesquero Acuicultor

AUTOR (A)

Serquén Lévano, Carlos Francisco

ASESOR (A)

Ing. Figueroa Vargas Machuca, Manuel Eduardo

JURADO

Dr. Rodenas Seytuque, Pedro José

Dr. Blas Ramos, Walter Eduardo

Ing. Mogollón Ávila, Santos Valentín

Lima – Perú

2020

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación, fruto de todos mis esfuerzos y aprendizajes adquiridos, a todos aquellos que han influenciado en cada aspecto de mi vida que me ha permitido concluir el presente documento, haciendo especial mención a quienes llevo conmigo en todo momento...

A mi abuela Bertha Tapia Moreno:

Por siempre enseñarme con el ejemplo a ser perseverante con mis objetivos y a nunca rendirme ante cualquier situación. Por ser ese ejemplo magnánimo de lucha que siempre admiraré.

A mi amada compañera de vida Stephanie Dolores:

Por haber estado a mi lado durante toda esta etapa, por su fervorosa preocupación y por ser ese empuje que siempre me ayuda a avanzar.

A mis padres Agustín y Lucia:

Por su gran paciencia y amor incondicional que me han demostrado a lo largo de los años.

AGRADECIMIENTOS

Al Ingeniero Manuel Figueroa:

Por ser un gran amigo y ayudarme con todas sus enseñanzas a ser un mejor ser humano, por instruirme con todos sus conocimientos que me ayudaron a concluir este trabajo y por la confianza brindada a lo largo de mi etapa universitaria.

Al Ingeniero Andrés Kostelac:

Por ser como un padre para mí y enseñarme con su valiosa amistad a ser un hombre de bien, ir por el camino correcto y siempre actuar con la mejor intención. Por ayudarme al desarrollo de este trabajo con sus grandes ideas y practicidad para afrontar las dificultades.

A los Ingenieros Valentín Mogollón, Edgar Revilla, Walter Blas y Pedro Rodenas:

Por su afable amistad y sus valiosos consejos que me sirvieron de guía durante toda mi etapa universitaria. Por transmitirme esa energía armoniosa y buena vibra que me ayuda a llevar la vida con alegría.

A mis grandes amigos y compañeros de la FOPCA:

Por poner su confianza en mí y darme el apoyo en los momentos más difíciles. Gracias por darme el impulso a conseguir este título y retarme cuando me desviaba del camino.

Al equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivos Menores:

Por su asistencia y apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación, por siempre motivarme y ayudarme cuando lo necesité.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Federico Villarreal:

Por todos estos años de aprendizaje y los conocimientos conseguidos.

Al Laboratorio de Cultivos Menores de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura:

Por el uso de las instalaciones, y brindarme todas las facilidades para el desarrollo de mi investigación.

Al Laboratorio de Contaminación Ambiental de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura:

Por el apoyo brindado de su jefatura y equipo de trabajo en la parte de análisis químicos de mi proyecto y el uso de sus equipos.

INDICE GENERAL**CONTENIDO**

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES	III
INDICE GENERAL	IV
CONTENIDO DE TABLAS	X
CONTENIDO DE FIGURAS	XIV
RESUMEN	XX
ABSTRACT	XXI
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción y formulación del problema.....	3
1.2. Antecedentes	6
1.3. Objetivos	7
1.4. Justificación	8
1.5. Hipótesis.....	11
II. Marco teórico	12
2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación	12
2.1.1. La contaminación ambiental y sus tipos	12
2.1.1.1. Contaminación atmosférica.....	14

2.1.1.2. Contaminación del suelo.....	15
2.1.1.3. Contaminación acuática	17
2.1.1.3.1. Aguas residuales	20
2.2. Metales pesados.....	24
2.2.1. Descripción.....	24
2.2.2. Características	26
2.3. Toxicidad.....	31
2.3.1. Mecanismo de acción tóxica	32
2.4. Microalgas	33
2.4.1. Características	34
2.4.2. Clasificación.....	36
2.4.2.1. Clorofitas.....	37
2.4.2.1.1. <i>Scenedesmus</i> <i>dimorpha</i>	
.....	39
2.4.3. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas	40
2.5. Biorremediación	46
2.5.1. Fitorremediación	47
III. Método.....	49
3.1. Tipo de investigación	49
3.2. Ámbito temporal y espacial.....	49

3.3. Variables.....	49
3.4. Población y Muestra.....	49
3.5. Instrumentos.....	50
3.5.1. Materiales.....	50
3.5.2. Equipos.....	51
3.5.3. Reactivos.....	52
3.5.4. Medios de cultivo.....	52
3.6. Procedimientos.....	52
3.6.1. Preparación de material de trabajo.....	52
3.6.1.1. Lavado de material.....	53
3.6.1.2. Secado del material.....	53
3.6.1.3. Esterilización del material.....	54
3.6.1.4. Rotulado y conservación del material estéril.....	56
3.6.2. Preparación de medio de cultivo.....	56
3.6.2.1. Destilación de agua.....	58
3.6.2.2. Esterilización de volúmenes de agua destilada.....	60
3.6.2.3. Pesaje y dilución de compuestos.....	63
3.6.3. Muestreo y aislamiento de la cepa algal.....	65
3.6.3.1. Colecta de muestra.....	65

3.6.3.2. Identificación de microorganismos.....	66
3.6.3.3. Aislamiento de microalgas de organismos zooplantónicos por sofocamiento.....	67
3.6.3.4. Aislamiento por dilución de organismos fitoplanctónicos	72
3.6.3.5. Obtención de cultivo axénico.....	73
3.6.4. Cultivo de Microalgas	74
3.6.4.1. Cultivos primarios.....	74
3.6.4.2. Cultivo exponencial	77
3.6.4.3. Conteo de Microalgas en la cámara Neubauer.....	78
3.6.5. Preparación de medios contaminados para el bioensayo	80
3.6.5.1. Dilución del Nitrato de Cadmio en solución patrón de 1000 ppm	81
3.6.5.2. Cálculos químicos para el desdoblamiento de Nitrato de Cadmio en soluciones de concentraciones menores de 10 y 1 ppm.....	82
3.6.5.3. Cálculos químicos para la preparación de medios contaminados para los bioensayos	84
3.6.6. Bioensayos	87
3.6.6.1. Bioensayo preliminar	88
3.6.6.2. Bioensayo final	89
3.6.6.3. Cosecha de biomasa y fijación de muestras.....	91

3.6.7. Análisis de absorción atómica en el espectrofotómetro	95
3.6.7.1. Preparación de equipo	95
3.6.7.2. Calibración de equipo	97
3.6.7.3. Lectura de muestras	99
3.6.7.4. Hoja de reporte de resultados	102
3.7. Análisis de datos	103
IV. Resultados	104
4.1. Recolección de la muestra	104
4.2. Cultivo inicial	104
4.2.1. Producción obtenida	106
4.3. Ensayos preliminares	108
4.3.1. Control de parámetros físico-químicos a las 0, 24 y 48 horas del cultivo	108
4.3.2. Resultados del conteo de células en la cámara Neubauer durante el ensayo preliminar	110
4.3.3. Resultados de la densidad (número de células/ml) durante el ensayo preliminar	112
4.3.4. Análisis de los resultados de los ensayos preliminares aplicando Análisis paramétrico para toda variación del tiempo.	114
4.4. Ensayos finales	118

4.4.1.Resultados del conteo de células en la cámara Neubauer durante el ensayo final.....	120
4.4.2.Resultados de la densidad (número de células/ml) durante el ensayo final	122
4.4.3.Cuadro resumen de los ensayos finales y su representación gráfica	124
4.4.4.Análisis de los resultados de los ensayos finales aplicando Análisis paramétrico para toda variación del tiempo.....	128
4.5. Análisis de los resultados de los valores obtenidos de la prueba de absorción atómica en el espectrofotómetro	134
4.5.1.Representación gráfica de los resultados de las pruebas espectrofotométricas para cada muestra analizada	136
4.5.2. Cuadro resumen del análisis espectrofotométrico	138
V. Discusión de resultados	141
VI. Conclusiones	143
VII. Recomendaciones	145
VIII. Referencias.....	146

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. <i>Substancias contaminantes del agua en el sector industrial.</i>	17
Tabla 2. <i>Métodos de tratamientos de aguas residuales.</i>	24
Tabla 3. <i>Límites fijados para la presencia de metales pesados en el agua de consumo humano</i>	25
Tabla 4. <i>Fuentes de contaminación de metales en los alimentos</i>	27
Tabla 5. <i>Clasificación taxonómica de Scenedesmus dimorphus.</i>	39
Tabla 6. <i>Componentes del medio de cultivo CHU 10</i>	57
Tabla 7. <i>Componentes de la Solución Stock CHU</i>	57
Tabla 8. <i>Componentes de la Solución Stock para CHU de Citrato Férrico</i>	58
Tabla 9. <i>Componentes de la Solución CHU de Micronutrientes</i>	58
Tabla 10. <i>Parámetros físico-químicos medidos durante el cultivo inicial.</i>	105
Tabla 11. <i>Cantidad de células/ml encontradas en los conteos durante el cultivo inicial</i>	106
Tabla 12. <i>Diseño experimental básico con un tratamiento control y tratamientos con diferentes concentraciones de Cadmio</i>	108
Tabla 13. <i>Parámetros físico-químicos obtenidos a las 0, 24 y 48 horas del cultivo</i>	109
Tabla 14. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas</i>	110
Tabla 15. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas</i>	111

Tabla 16. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas</i>	111
Tabla 17. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas ...</i>	112
Tabla 18. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas ...</i>	113
Tabla 19. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas ...</i>	113
Tabla 20. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas.</i>	114
Tabla 21. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas.</i>	115
Tabla 22. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas.</i>	115
Tabla 23. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas</i>	116
Tabla 24. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas</i>	117
Tabla 25. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas</i>	117
Tabla 26. <i>Diseño experimental básico con un tratamiento control y tratamientos con diferentes concentraciones de Cadmio</i>	118
Tabla 27. <i>Parámetros físico-químicos obtenidos a las 0, 24, 48 y 96 horas del cultivo</i>	119
Tabla 28. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas</i>	120

Tabla 29. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas</i>	121
Tabla 30. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas</i>	121
Tabla 31. <i>Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 96 horas</i>	122
Tabla 32. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas ...</i>	123
Tabla 33. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas ...</i>	123
Tabla 34. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas ...</i>	124
Tabla 35. <i>Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 96 horas ...</i>	124
Tabla 36. <i>Cuadro resumen de promedios en la densidad del cultivo durante el ensayo final</i>	125
Tabla 37. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas.</i>	128
Tabla 38. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas.</i>	129
Tabla 39. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas.</i>	129
Tabla 40. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 96 horas.</i>	130
Tabla 41. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas</i>	131

Tabla 42. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas</i>	132
Tabla 43. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas</i>	132
Tabla 44. <i>Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 96 horas</i>	133
Tabla 45. <i>Resultados obtenidos de la prueba de absorción atómica en el espectrofotómetro para valores de concentración de cadmio.</i>	135
Tabla 46. <i>Cuadro resumen del análisis espectrofotométrico realizado</i>	139

CONTENIDO DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Relación existente entre la contaminación de los tres vectores ambientales aire, agua y suelo.....	11
<i>Figura 2.</i> Esquema general del proceso de contaminación.....	12
<i>Figura 3.</i> Contaminación atmosférica en Lima.....	13
<i>Figura 4.</i> Derrame de petróleo en Loreto, Perú.....	15
<i>Figura 5.</i> Contaminación por derrame minero en el Rio Santa, Ancash.....	18
<i>Figura 6.</i> Microalga. Vista microscópica.....	33
<i>Figura 7.</i> <i>Scenedesmus dimorphus</i>	38
<i>Figura 8.</i> <i>Arthrospira</i> es una cianobacteria ampliamente utilizada y cultivada de forma masiva.....	40
<i>Figura 9.</i> Fotobioreactores tubulares, usados para la obtención de compuestos de alto valor a partir de microalgas.....	41
<i>Figura 10.</i> Cultivadores de microalgas tipo carrusel, utilizados en cultivo masivo de microalgas para la industria cosmética y de alimentos.....	43
<i>Figura 11.</i> El gran potencial de las microalgas como biocombustible.....	44
<i>Figura 12.</i> Lavado de material de laboratorio.....	52
<i>Figura 13.</i> Secado de material en la estufa.....	53

<i>Figura 14.</i> Material de laboratorio cubierto con papel metálico previo al proceso de esterilización.....	54
<i>Figura 15.</i> Material de laboratorio preparado para la esterilización en la estufa.....	55
<i>Figura 16.</i> Destilador de agua del Laboratorio de Cultivos Menores.....	59
<i>Figura 17.</i> Autoclave del Laboratorio de Cultivos Menores.....	60
<i>Figura 18.</i> Volúmenes de agua destilada a punto de ser esterilizados.....	61
<i>Figura 19.</i> Balanza analítica del Laboratorio de Cultivos Menores.....	62
<i>Figura 20.</i> Preparación de soluciones Stock para el medio de cultivo CHU 10.....	63
<i>Figura 21.</i> Colecta de muestra.....	64
<i>Figura 22.</i> Muestra colectada vista en el microscopio.....	65
<i>Figura 23.</i> Muestra colectada filtrada.....	66
<i>Figura 24.</i> Preparación del medio de cultivo con agar agar.....	67
<i>Figura 25.</i> Vertimiento de la solución en placas Petri.....	68
<i>Figura 26.</i> Calentamiento del aza de platino previo a realzar el sembrado.....	69
<i>Figura 27.</i> Sembrado de microalgas en la placa de agar agar.....	69
<i>Figura 28.</i> Vista de la población algal al microscopio.....	70
<i>Figura 29.</i> Colonia de <i>Scenedesmus dimorphus</i> en la muestra tomada.....	70

<i>Figura 30.</i> Batería de tubos de ensayo con microalgas sembradas en el medio CHU 10.....	71
<i>Figura 31.</i> Proceso de aislamiento de microalgas por dilución.....	72
<i>Figura 32.</i> Población algal en crecimiento en la batería de tubos de ensayo.....	73
<i>Figura 33.</i> Repique de microalgas en zona en la zona de siembra del Laboratorio de Cultivos Menores.....	74
<i>Figura 34.</i> Matraces con microalgas en crecimiento dentro del cepario del Laboratorio de Cultivos Menores.....	75
<i>Figura 35.</i> Botellas de plástico con población algal en la etapa de crecimiento exponencial.....	77
<i>Figura 36.</i> Vista de la cámara Neubauer.....	78
<i>Figura 37.</i> Vista de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> en el microscopio con aumento 10.....	78
<i>Figura 38.</i> Vista de la microalga <i>Scenedesmus dimorphus</i> en el microscopio con aumento 40 X.....	79
<i>Figura 39.</i> Vista de la población algal expuesta al bioensayo preliminar.....	88
<i>Figura 40.</i> Vista de la población algal expuesta al tratamiento final.....	89
<i>Figura 41.</i> Cosecha de microalgas luego del bioensayo final.....	90
<i>Figura 42.</i> Vista de la cosecha de microalgas en diferentes matraces de prueba.....	91

<i>Figura 43.</i> Vista de las muestras luego de la cosecha previa aplicación del Ácido Nítrico.....	91
<i>Figura 44.</i> Aplicación de Ácido Nítrico a las muestras cosechadas.....	92
<i>Figura 45.</i> Muestras fijadas con Ácido Nítrico.....	92
<i>Figura 46.</i> Vista de las muestras trabajadas en los bioensayos.....	93
<i>Figura 47.</i> Vista del trabajo de laboratorio en los bioensayos realizados.....	93
<i>Figura 48.</i> Vista de la zona de trabajo para el análisis espectrofotométrico.....	94
<i>Figura 49.</i> Vista de la interfaz del software GBA Avanta Ver. 2.02.....	95
<i>Figura 50.</i> Configuración de parámetros para el análisis espectrofotométrico.....	96
<i>Figura 51.</i> Solución patrón de Cadmio de 1000 ppm.....	97
<i>Figura 52.</i> Preparación de las soluciones estándar para la curva de calibración....	97
<i>Figura 53.</i> Análisis de soluciones estándar para calibrar del equipo.....	98
<i>Figura 54.</i> Ejecución del software para lectura de muestras.....	99
<i>Figura 55.</i> Vista de la flama del espectrofotómetro en operación.....	100
<i>Figura 56.</i> Vista de las muestras del bioensayo final a ser analizadas.....	100
<i>Figura 57.</i> Vista de operación del equipo al realizar las lecturas.....	101
<i>Figura 58.</i> Vista de la hoja de reporte de resultados del software.....	101
<i>Figura 59.</i> Vista del espectrofotómetro utilizado durante el procedimiento.....	102

<i>Figura 60.</i> Curva de crecimiento durante el cultivo inicial.....	106
<i>Figura 61.</i> Curva de crecimiento para el tratamiento control durante el ensayo final.....	124
<i>Figura 62.</i> Curva de crecimiento para la concentración de 0,01 mg/l de durante el ensayo final.....	125
<i>Figura 63.</i> Curva de crecimiento para la concentración de 0,05 mg/l de durante el ensayo final.....	125
<i>Figura 64.</i> Curva de crecimiento para la concentración de 0,1 mg/l de durante el ensayo final.....	126
<i>Figura 65.</i> Curva de crecimiento para la concentración de 0,15 mg/l de durante el ensayo final.....	126
<i>Figura 66.</i> Resultados para el tratamiento CC1 - control con una concentración inicial de 0 mg/l.....	135
<i>Figura 67.</i> Resultados para el tratamiento CC2 con una concentración inicial de 0,01 mg/l.....	136
<i>Figura 68.</i> Resultados para el tratamiento CC3 con una concentración inicial de 0,05 mg/l.....	136
<i>Figura 69.</i> Resultados para el tratamiento CC4 con una concentración inicial de 0,1 mg/l.....	137

<i>Figura 70.</i> Resultados para el tratamiento CC5 con una concentración inicial de 0,15 mg/l.....	137
<i>Figura 71.</i> Valores Promedio de la cantidad removida de ppm de Cd(NO ₃) ₂ para cada concentración estudiada.....	138
<i>Figura 72.</i> Promedios de % de cantidad removida de Cd(NO ₃) ₂ para cada concentración estudiada.....	139
<i>Figura 73.</i> Valores promedio de la media de absorbancia para cada concentración estudiada.....	139

RESUMEN

Se estudió la eficiencia de la microalga clorofita dulceacuícola, *Scenedesmus dimorphus* (Kützing, 1834), en la remoción del ion divalente del cadmio (+2) en ambientes acuáticos controlados. El estudio fue experimental y se realizó en los laboratorios de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias Alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villarreal. *Scenedesmus dimorphus* fue aislado de un estanque de crianza de tortugas ubicado dentro de la FOPCAA, mediante diluciones sucesivas hasta conseguir un cultivo axénico. Cuando las microalgas se encontraba en la fase exponencial de cultivo, fueron expuestas a diferentes concentraciones del contaminante. Las pruebas se realizaron por triplicado en un lapso de 96 horas a concentraciones de 0,01-1,0 ppm de cadmio divalente, concentraciones estándar en las que se encuentra en los ecosistemas acuáticos del Perú; se removió hasta el 95% del metal pesado, mientras que a concentraciones de 5-10 ppm, las microalgas sufrieron un fuerte estrés y se deformaron sus estructuras. Se realizó la Prueba F para el análisis de la varianza, determinándose que existe una diferencia significativa en el número de células en las muestras para los periodos de tiempo determinados en el bioensayo. Los resultados indican que *Scenedesmus dimorphus* es eficiente en la remoción de cadmio divalente y puede usarse en la recuperación de ambientes acuáticos contaminados con metales pesados que, aunque se encuentran a bajas concentraciones, tienen alta toxicidad. Este tratamiento es práctico, eficiente y de bajo costo.

Palabras clave: microalga clorofita, *Scenedesmus dimorphus*, ion cadmio divalente, ambiente acuático, contaminante, toxicidad.

ABSTRACT

The efficiency of the freshwater chlorophyte microalgae, *Scenedesmus dimorphus* (Kützing, 1834), in the removal of the divalent ion of cadmium (+2) in controlled aquatic environments was studied. The study was experimental and was carried out in the laboratories of the Faculty of Oceanography, Fisheries, Food Sciences and Aquaculture of the Federico Villarreal National University. *Scenedesmus dimorphus* was isolated from a turtle breeding pond located within the FOPCAA, by successive dilutions until an axenic culture was obtained. Microalgae cultivation and heavy metal removal experiments were performed at the Minor Cultures Laboratory. When the microalgae were in the exponential phase of cultivation, they were exposed to different concentrations of the contaminant. The tests were carried out in triplicate in a period of 96 hours. At concentrations of 0.01-1.0 ppm of divalent cadmium, which are typically the concentrations found in Peru's freshwater ecosystems, microalgae removed up to 95% of the heavy metal, while at concentrations of 5- 10 ppm, under heavy stress and their structures deformed. Test F was performed for the analysis of variance, determining that there is a significant difference in the values of the number of cells in the samples in the time periods determined for the bioassay. The results indicate that *Scenedesmus dimorphus* is efficient in removing divalent cadmium and can be used in the recovery of aquatic environments contaminated with heavy metals that, although in low concentrations, have high toxicity. This treatment is practical, efficient and inexpensive.

Key words: chlorophyte microalgae, *Scenedesmus dimorphus*, divalent cadmium ion, aquatic environment, pollutant, toxicity.

I. INTRODUCCIÓN

El trabajo de investigación tuvo como objetivo, determinar la eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* que afectan en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) presentes en ambientes acuáticos controlados; en ese sentido, el mencionado trabajo fue dividido en capítulos, desarrollándose de acuerdo a las diferentes etapas que son los siguientes:

En el Capítulo I, se explica la descripción y formulación del problema que motivó la ejecución del presente trabajo en función a los antecedentes desarrollados por otros autores en la misma línea de investigación, con la finalidad de dar los alcances necesarios para poner en contexto la temática elaborada.

En el Capítulo II, se desarrolla las bases teóricas sobre el tema de investigación, donde esencialmente se presenta el sustento técnico encontrado a través de la revisión bibliográfica de diferentes autores.

En el Capítulo III, se presenta la metodología utilizada en la presente investigación, las características de la misma, así como la población algal, los materiales y equipos utilizados en la parte experimental.

En el Capítulo IV, se muestran los resultados obtenidos mediante los bioensayos realizados y el análisis de espectrofotometría por absorción atómica; asimismo, también se presenta el análisis estadístico de los resultados obtenidos con la ejecución de la Prueba de Fisher para el análisis de la varianza.

En el Capítulo V, se realiza la discusión de los resultados obtenidos a través de los procedimientos descritos en los capítulos anteriores con investigaciones realizadas por otros autores acorde a la temática desarrollada.

En el Capítulo VI, se presentan las conclusiones a las cuales se llegó con los resultados obtenidos en función al objetivo general y los objetivos específicos planteados para el desarrollo de la presente investigación.

En el Capítulo VII, se describen las recomendaciones, que son propuestas con el objetivo de darle continuidad a la línea de investigación abarcada en este trabajo.

En el Capítulo VII, finalmente se incluyen las referencias bibliográficas que fueron consultadas como bases teóricas del tema de investigación tratado.

1.1. Descripción y formulación del problema

En el 2006 el Foro Intergubernamental sobre seguridad Química (IFCS, por sus siglas en inglés) sostuvo que la evaluación de los metales pesados en el contexto de políticas internacionales químicas y del medio ambiente ha ido en incremento durante los últimos años.

La emisión de metales pesados dentro del ambiente puede ocurrir tanto por causas naturales como antropogénicas. La mayor causa de emisión son las fuentes antropogénicas, especialmente las operaciones de la minería (Duruibe, Ogwuegbu y Egwurugwu, 2007). Las fuentes antropogénicas son los distintos procesos industriales, incluyendo los emprendimientos mineros pasados y presentes, hornos y fundiciones, subproductos de la combustión y tráfico (Bremauntz, 2004). En algunos casos, aun mucho después de que las actividades mineras han cesado, la emisión de metales continúa estando presente en el ambiente.

Estos metales en su forma iónica contienen una elevada toxicidad y pueden llegar a transportarse por el aire hasta llegar a suelos o ecosistemas acuáticos lejos del foco real de contaminación. Además, pueden ser vertidos directamente en los recursos hídricos como consecuencia de relaves no tratados sin un debido control ambiental (Jurado et al., 2016). Según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) los metales pesados pueden ser clasificados en 3 categorías importantes: metales tóxicos: Mercurio (Hg), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Zinc (Zn), Cadmio (Cd), Cobre (Cu), Níquel (Ni), etc.; metales preciosos: Platino (Pt), Plata (Ag), Oro (Au), Rubidio (Ru), etc.; y radio nucleicos: Uranio (U), Torio (Th), Radio (Ra), etc., muchos de los cuales son de considerable peligro ambiental, debido a la toxicidad a

largo plazo que pueden causar a la salud humana (daños hepáticos, respiratorios y sanguíneos) y al medio ambiente; asimismo, algunos metales como el Mercurio (Hg), el Cadmio (Cd) y el Plomo (Pb), presentan una toxicidad demasiado elevada incluso a pequeñas concentraciones, tales como de 0,0001 a 0,1 ppm (Cuizano y Navarro, 2008). Sin embargo, en la actualidad se reportan concentraciones de iones de metales pesados hasta de 450 ppm en los efluentes industriales (Tejada, Villabona y Garcés, 2015)

En el año 2016 un estudio efectuado por la Autoridad Nacional del Agua (ANA) en 129 de las 159 cuencas hídricas del Perú permitió conocer que todos los ríos analizados están contaminados, ya que presentan concentraciones más elevadas de lo permisible en cuanto a los iones de metales pesados. Los estudios realizados arrojaron la presencia de cobre, mercurio, plomo, zinc, manganeso, y cadmio. También cabe mencionar que no sólo las cuencas están contaminadas, en cuanto a los depósitos naturales de agua, el lago Titicaca (Puno) es el más contaminado con residuos de plomo y mercurio, seguido por los lagos y lagunas de la sierra central del país, como el lago Chinchaycocha (Junín y Pasco), contaminado con zinc, cobre y cadmio, y las lagunas en la sierra de Lima, Anilcocha y Patón, que están contaminadas por manganeso, plomo y otros iones metálicos.

Esta situación es preocupante porque la calidad del agua destinada al consumo humano y a actividades como la agricultura y la acuicultura, se ve seriamente comprometida, al ser el Perú un país con gran actividad minera y poco control en regiones alejadas. La contaminación de ambientes acuáticos es un problema que debe tomarse en serio y ser combatido en el corto plazo, con el uso de tecnologías

sostenibles y ecológicas que permitan la recuperación de los lugares impactados por actividades antropogénicas, como es el caso de la minería, producción industrial, entre otras.

La biorremediación y recuperación de ambientes acuíferos es posible mediante el uso de biotecnologías que son cada vez más utilizadas en los últimos años, donde se utiliza organismos vivos para la remoción de contaminantes y así poder mitigar los impactos negativos ocasionados por las actividades industriales antropogénicas. Por ejemplo, las microalgas poseen una capacidad biorremediadora que consiste en la eliminación o biotransformación de contaminantes de un medio líquido o gaseoso, donde los compuestos contaminantes son captados por la biomasa algal y pueden ser recuperados mediante su cosecha. Esta capacidad resulta en un sistema de cultivo novedoso y rentable con dos propósitos a mediano plazo: eliminación de contaminantes y producción de biomasa con fines comerciales (Hernández y Labbé, 2014)

Formulación del Problema:

En tal sentido, de acuerdo a lo explicado líneas atrás, se plantea la siguiente interrogante:

¿En qué medida la eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* afectan en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) presentes en ambientes acuáticos controlados?

1.2. Antecedentes

El empleo de microalgas para el tratamiento de aguas residuales data desde hace varias décadas, y la concepción de utilizar los medios acuáticos contaminados como sustrato para el crecimiento de biomasa algal es un campo poco estudiado; sin embargo, ha obtenido creciente atención de parte de la comunidad científica debido a la presencia de compuestos que no se degradan fácilmente, como los metales pesados e hidrocarburos. La importancia y aplicación de las microalgas en el tratamiento de aguas residuales, tiene sus antecedentes en la época de Cadwell (1946), quien reporta los primeros estudios sobre la posibilidad de utilizar las microalgas como microorganismos “purificadores de aguas residuales”, debido al aprovechamiento de los “nutrientes” inorgánicos contenidos en esta agua, para así favorecer el crecimiento de las microalgas, funcionando este como medio de cultivo.

La habilidad de las microalgas de absorber metales del medioambiente reduciendo los niveles de toxicidad de las aguas residuales industriales, es una característica de gran interés. El principal objeto de estudio es la capacidad de las microalgas para acumular metales pesados como Mn, Cd, Cr, Ni, Zn y Cu. Un sistema químico biológico para la eliminación de metales del medioambiente es obtenido por ajuste óptimo de pH por la precipitación química de los metales y su absorción por las algas (Yu y Guoting, 1992).

A diferencia de otros métodos, esta tecnología es una de las más baratas, requiere menos energía y supervisión manual entre las muchas que se usan para el tratamiento de desechos peligrosos; puede llevarse a cabo en el propio sitio de contaminación y

con mínima alteración física alrededor del área tratada (Davis, Volesky y Mucci, 2003).

De acuerdo con el Instituto de Energía y Desarrollo (IED, 2016), el tratamiento de remediación de aguas contaminadas con metales pesados utilizando microalgas, representa un enfoque biotecnológico prometedor para el saneamiento de los cuerpos de agua, ya que es muy eficiente para remover incluso bajos niveles de metales pesados y no generan desechos tóxicos; además, no requieren del agregado de materia orgánica y, conjuntamente, remueven nutrientes tales como N y P que pueden estar presentes en los efluentes.

1.3. Objetivos

- **Objetivo general:**

Determinar la eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* que afecta en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) presentes en ambientes acuáticos controlados.

- **Objetivos específicos:**

- Comprobar la hipótesis referente a si la eficiencia de la microalga *Scenedesmus dimorphus* presenta diferencias significativas en la remoción del ion divalente de cadmio en ambientes acuáticos controlados
- Determinar los efectos sobre la población de microalgas de *Scenedesmus dimorphus* frente la exposición del metal pesado Cadmio (+2) a diferentes concentraciones durante los diferentes tratamientos.

- Establecer las condiciones idóneas para el tratamiento de ambientes acuáticos controlados para la remoción del ion divalente cadmio (+2) con la microalga *Scenedesmus dimorphus* en relación a las diferentes concentraciones de exposición.
- Determinar mediante un análisis estadístico las diferencias significativas en los resultados obtenidos durante los tratamientos.
- Precisar la viabilidad del uso de microalgas para el tratamiento de medios acuáticos contaminados por metales pesados.

1.4. Justificación

Habiendo identificado la contaminación en ambientes acuáticos como un problema real, es necesario conocer cuáles son las consecuencias que los iones metálicos traen no solo al recurso hídrico, sino también a todos los seres vivos que residen en él. Podemos mencionar también que los metales pesados presentan gran estabilidad ante los procesos de biodegradación, por lo cual los seres vivos son incapaces de metabolizarlos y constituye uno de los peligros más grandes para los ecosistemas acuáticos y las especies presentes en ellos.

Los peces tienen la capacidad de almacenar en su organismo una concentración mayor de estos compuestos en relación a la del medio ambiente, lo cual se puede convertir en un problema de salud para las poblaciones que se alimentan de este recurso, llevando la contaminación a los diferentes niveles de la cadena trófica (Mancera y Álvarez, 2006). Asimismo, la presencia de metales pesados en los peces no solo da lugar a efectos perjudiciales para sí mismo, sino que también conducen a una disminución en la calidad del pez por estrés oxidativo (Alavez, 2009), lo cual se traduce en pérdidas y defectos a nivel de producción en la piscicultura. Además, se

ha informado que no se conoce que estos compuestos tengan alguna función bioquímica o fisiológica en el ser humano, y no se presentan normalmente en los organismos vivos (Lenntech, 2004) llegando así a ser perjudicial para el humano con el pasar de los años provocando daños celulares en los tejidos y órganos, incluso llegando al sistema nervioso.

Por ejemplo, la acumulación de ciertos metales como cadmio, plomo y cromo, en tejidos humanos especialmente riñón y pulmón, altera sus funciones básicas provocando efectos tóxicos como neumonía, disfunción renal y enfisemas. En intoxicaciones crónicas son habituales las osteopatías que parecen estar relacionadas con alteraciones del metabolismo del calcio, y además, algunos tipos de cáncer relacionados con el aparato reproductor masculino (Bernard y Lauwerys, 1984)

La bioacumulación por medio de biomateriales como microalgas, hongos, bacterias y levaduras, es considerada como una biotecnología rentable y de gran aplicabilidad para el tratamiento de volúmenes de aguas residuales que contienen bajas concentraciones de metales pesados (Cuizano y Navarro, 2008).

El uso de microalgas para la remoción de contaminantes es una biotecnología que permite el tratamiento de efluentes contaminados de diferentes orígenes; presentando una relación costo-beneficio muy alta, debido a que la presencia de contaminantes no disminuye el crecimiento algal (Renuka, Prasanna y Ahluwalia, 2015).

Es por esto que en los últimos años el estudio de las microalgas como biosorbentes de iones metálicos está ganando mucha relevancia gracias a la versatilidad que presentan para usos en biotecnología de descontaminación y recuperación de ecosistemas acuáticos, lo cual favorece a la sostenibilidad del medio ambiente,

disminuyendo el impacto dejado por las actividades antropogénicas realizadas a través del tiempo.

Las microalgas son recursos naturales muy abundantes en nuestro planeta, que podemos encontrar con cierta facilidad y además presentan diversidad de géneros que pueden ser aprovechados de diferentes maneras. Pueden crecer de forma natural o cultivarse dentro de un ambiente controlado y se han empleado en diferentes campos relacionados con el medio ambiente, tales como el tratamiento de aguas residuales, desintoxicación biológica y control de metales pesados en aguas naturales o flujos de residuos industriales han sido propuestos y desarrollados (Abalde, Cid, Fidalgo, Torres y Herrero, 1995).

Teniendo en cuenta lo planteado, en este proyecto de investigación se determinará la eficiencia para la remoción del ion Cadmio (+2) en ambientes acuáticos controlados, realizando pruebas de laboratorio para cuantificar la absorción de este contaminante con la clorofita unicelular: *Scenedesmus dimorphus*, con el fin de determinar la efectividad en la eliminación de este contaminante a diferentes concentraciones.

Los resultados permitirán establecer un protocolo como una opción viable para futuros proyectos de descontaminación con el cultivo controlado de microalgas y sus aplicaciones.

1.5. Hipótesis

La eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* afecta significativamente en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) presentes en ambientes acuáticos controlados.

H₀: La eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* NO afecta significativamente en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) presentes en ambientes acuáticos controlados.

H₁: La eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* SI afecta significativamente en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) presentes en ambientes acuáticos controlados.

II. Marco teórico

2.1. Bases teóricas sobre el tema de investigación

2.1.1. La contaminación ambiental y sus tipos

Se entiende por contaminación la presencia en el aire, agua o suelo de sustancias nocivas o formas de energía no deseables en concentraciones tales que puedan afectar al confort, salud y bienestar de las personas, y al uso y disfrute de lo que ha sido contaminado. Esto es, un medio o vector ambiental (aire, agua o suelo) estará contaminado si tiene algo (sustancias materiales, energía en forma de ruido, calor, etc.) que provoca efectos negativos en él. Si ese algo no provoca efectos negativos, no se dirá que el medio está contaminado y, por supuesto, ese algo no será nunca un contaminante (Encinas, 2011).

La contaminación ambiental es una consecuencia producida por las diferentes actividades principalmente creadas por el hombre; las cuales han tenido repercusión en la integridad física del ambiente, además, la contaminación del aire, del agua y del suelo están muy relacionadas entre sí y no se pueden separar (Encinas, 2011).

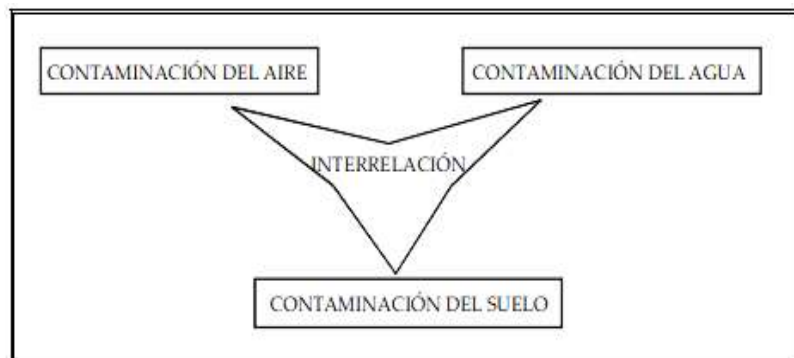


Figura 1. Relación existente entre la contaminación de los tres vectores ambientales: aire, agua y suelo.

Fuente: Encinas, 2011.

A medida que el hombre va adquiriendo más poder en la naturaleza; las posibilidades de empeorar la situación ambiental se incrementan, ya que, muchas de las actividades realizadas por nuestra población deterioran las condiciones que integran el medio ideal (COP 20, 2017).

El comportamiento social del hombre en conjunto con su cultura siempre va adaptando el ambiente de acuerdo a sus necesidades, y muchas veces estos requerimientos no son compatibles con el equilibrio ecológico; lo que hace que la población humana busque los medios para mantenerse en confort, sea o no bueno para la salud del ecosistema.

Los contaminantes son emitidos por fuentes que pueden ser naturales o artificiales. Las fuentes artificiales a su vez pueden ser estacionarias o fijas (por ejemplo, las industrias) o móviles (por ejemplo, el tráfico), estos contaminantes que son emitidos directamente por la fuente se conocen como contaminantes primarios. Una vez emitidos al medio (al aire, al agua o al suelo), los contaminantes sufren una serie de procesos, no solo transporte y dispersión, sino también reacciones químicas, convirtiéndose en los contaminantes secundarios (Álvarez et al., 2017).

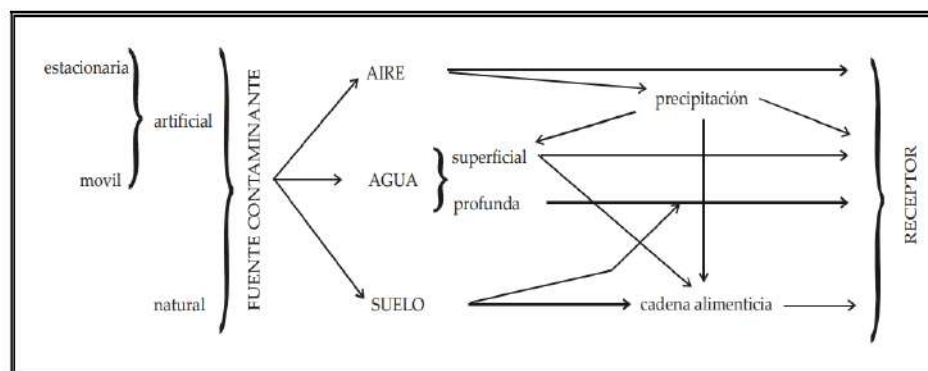


Figura 2. Esquema general del proceso de contaminación

Fuente: Encinas, 2011.

2.1.1.1. Contaminación atmosférica

La contaminación atmosférica se da como consecuencia de la expedición de humo procedente de las industrias, fábricas, así como combustibles fósiles descargados de los automóviles, además, son los que se acumulan en la extensión de la atmósfera; por lo cual, la contaminación atmosférica es la presencia de sustancias, que en una cantidad implica molestias o riesgo para la salud de las personas y de los demás seres vivos (COP 20, 2017).

Los principales mecanismos de contaminación atmosférica son los procesos industriales que implican combustión, tanto en industrias como en automóviles y calefacciones residenciales, que generan dióxido y monóxido de carbono, óxidos de nitrógeno y azufre, entre otros contaminantes. Igualmente, algunas industrias emiten gases nocivos en sus procesos productivos, como cloro o hidrocarburos que no han realizado combustión completa (Johnson, 2012).



Figura 3. Contaminación atmosférica en Lima.

Fuente: Diario Gestión, 2019.

2.1.1.2. Contaminación del suelo

La contaminación del suelo se da cuando un grupo de sustancias extrañas, tales como desechos sólidos; tóxicos y distintos productos químicos provocando el desequilibrio completo que va afectando a todas las especies de seres vivos por igual (COP 20, 2017).

Es reconocida como contaminación del suelo: cuando las sustancias engloban desechos sólidos, líquidos o gaseosos dentro de la superficie terrestre de cualquier lugar; sea cual sea el origen de las causas. En ese sentido, la contaminación del suelo consiste en la degradación de la calidad de la superficie terrestre asociada a múltiples causas; pero principalmente generada por sustancias químicas (Isan, 2018). Esta alteración de la calidad de la tierra puede obedecer a muy diferentes causas y, del mismo modo, sus consecuencias provocan serios problemas de salubridad que afectan gravemente a la flora, fauna o a la salud humana a lo largo del tiempo (COP 20, 2017).

La contaminación del suelo provoca una reacción en cadena. Altera la biodiversidad del suelo, reduciendo la materia orgánica que contiene y su capacidad para actuar como filtro. También se contamina el agua almacenada en el suelo y el agua subterránea, provocando un desequilibrio de sus nutrientes. Entre los contaminantes del suelo más comunes se encuentran los metales pesados, los contaminantes orgánicos persistentes y los contaminantes emergentes, como los productos farmacéuticos y los destinados al cuidado personal (FAO, 2019), por otro lado, muy aparte del impacto en el medio ambiente, diversos autores y organizaciones a nivel mundial, indican que la contaminación del suelo tiene también un elevado

costo económico, debido a la reducción de los rendimientos y la calidad de los cultivos.



Figura 4. Derrame de petróleo en Loreto, Perú.

Fuente: Diario Gestión, 2019.

Una parte importante sobre la contaminación de los suelos es que existe un riesgo para la salud pública. Algunos antibióticos –utilizados ampliamente en la agricultura y en el ámbito de la salud humana– se liberan en el medio ambiente tras ser excretados del organismo al que se les administra. Estos antibióticos pueden filtrarse en los suelos y propagarse en el ambiente. Esto produce bacterias resistentes a los antimicrobianos, lo que disminuye la eficacia de los antibióticos. Cada año, unas 700 000 muertes son atribuibles a bacterias resistentes a los antimicrobianos. Para 2050, si no se ataja el problema, la resistencia a los antimicrobianos matará a más personas que el cáncer y tendrá un coste global mayor que el actual volumen de la economía mundial (FAO, 2019).

2.1.1.3. Contaminación acuática

La contaminación del agua se da cuando se integran al agua: componentes extraños, tales como microorganismos, residuos de productos químicos, restos industriales, así como de otras aguas residuales; conllevando a la desintegración del agua pura y dejando al agua sin calidad de purificación, inservible para la toma y otras utilidades. En términos generales, la contaminación del agua es la acumulación de sustancias tóxicas y derrame de fluidos en un sistema hídrico (río, mar, cuenca, etc.) alterando la calidad del agua (COP 20, 2017).

Actualmente, el desarrollo y la industrialización suponen un mayor uso de agua, una gran generación de residuos muchos de los cuales van a parar al agua y el uso de medios de transporte fluviales y marítimos que, en muchas ocasiones, son causa de contaminación de las aguas (Echarri, 2017).

En nuestro país, como ejemplo de lugares críticos donde se produce una contaminación permanente del ambiente por productos químicos, podemos citar a la ciudad de La Oroya con plomo, cadmio y otros metales en el aire y agua; la ciudad de Ilo por la lluvia ácida y presencia natural de arsénico; Cerro de Pasco por metales como plomo, cadmio, arsénico en el agua; Madre de Dios por mercurio y cianuro en el agua; río Rímac por presencia de arsénico, plomo, cadmio; Puno por metales tóxicos en el agua y desechos de toda índole en el lago Titicaca; Cajamarca y Ancash por plomo, cadmio, arsénico en sus ríos, etc. (Villena, 2006).

Tabla 1.

Substancias contaminantes del agua en el sector industrial.

Sector industrial	Substancias contaminantes principales
Construcción	Sólidos en suspensión, metales, pH.
Minera	Sólidos en suspensión, metales pesados, materia orgánica, pH, cianuros.
Energía	Calor, hidrocarburos y productos químicos.
Automoción	Aceites lubricantes, pinturas y aguas residuales.
Navales	Petróleo, productos químicos, disolventes y pigmentos.
Siderurgia	Cascarillas, aceites, metales disueltos, emulsiones, sosas y ácidos.
Química inorgánica	Hg, P, fluoruros, cianuros, amoníaco, nitritos, ácido sulfhídrico, F, Mn, Mo, Pb, Ag, Se, Zn, etc. y los compuestos de todos ellos.
Química orgánica	Organohalogenados, organosilícicos, compuestos cancerígenos y otros que afectan al balance de oxígeno
Fertilizantes	Nitratos y fosfatos
Plaguicidas	Organohalogenados, organofosforados, compuestos cancerígenos, biocidas, etc.
Fibras químicas	Aceites minerales y otros que afectan al balance de oxígeno.

Fuente: Echarri, 2017.

En todos estos lugares, la actividad principal contaminante es el sector minería, y se estima que los contaminantes principales son los metales pesados y tóxicos como plomo, arsénico, mercurio, cadmio, cobre, zinc, cromo, vanadio, tungsteno, molibdeno, hierro, manganeso, cianuros, etc. Especialmente la minería informal contamina con indeterminadas pero grandes cantidades de mercurio y cianuro (Ferrer, 2003).



Figura 5. Contaminación por derrame minero en el Rio Santa, Ancash

Fuente: Diario Gestión, 2019.

Por otro lado, la actividad doméstica también genera contaminación en el agua, produciendo principalmente residuos orgánicos. La Directiva 91/271/CEE de la Unión Europea sobre el Tratamiento de las Aguas Residuales Urbanas, aprobada en mayo de 1991, urge a los estados miembros a tomar las medidas para lograr que todas las aguas residuales sean adecuadamente recogidas y sometidas a tratamientos secundarios o equivalentes antes de ser vertidas. También exigía a los estados miembros la identificación de las llamadas áreas sensibles, aquellas que se van a

dedicar al consumo humano y no cumplen las condiciones de las anteriores directivas europeas antes de 1993 (Echarri, 2017).

2.1.1.3.1. Aguas residuales

Uno de los desechos contaminantes más peligrosos que produce el ser humano son las aguas residuales. Con este nombre se agrupan todas las aguas que, debido a la acción del hombre, han sido contaminadas y son potencialmente peligrosas en el caso de que sean vertidas en el medio ambiente sin un tratamiento previo (Arriola, 2019).

En este sentido, las aguas residuales son todas aquellas aguas que han sido usadas en los entornos domésticos y urbanos, en las industrias y ganaderías, así como las aguas naturales que, por accidente o mala praxis, se hayan mezclado con las anteriores. Así que, nos encontramos con que las aguas residuales son agua, pero, además de agua, también contienen una gran cantidad de elementos contaminantes, ya sean sólidos o disueltos en la misma agua (Aguas Residuales, 2019).

En el Perú, como en la mayoría de países, se tiene dos panoramas frente al tratamiento de agua residual. Las aguas residuales domésticas o industriales que van al alcantarillado, y, las aguas residuales que debe tratar cada empresa privada o pública, bajo su responsabilidad y cumpliendo los estándares indicados por la ley nacional. Esta problemática es mundial y según información oficial de la ONU, el 80 % de las aguas residuales mundiales no se descontaminan antes de su vertimiento o rehúso, lo que ocasiona, no sólo la contaminación de la flora y fauna, sino, enfermedades y muertes prematuras que cuestan anualmente varios cientos de miles de millones al PBI del planeta (COP 20, 2017).

Las zonas con inadecuado abastecimiento de agua sufren por lo general de enfermedades como el cólera, la hepatitis, la disentería, gastroenterocolitis, etc.; por lo que el tratamiento de aguas residuales requiere del diseño de políticas de saneamiento ambiental, en ese sentido, las plantas de tratamiento de aguas residuales deben ser diseñadas, construidas y operadas con el objetivo de convertir el líquido cloacal proveniente del uso de las aguas de abastecimiento, en un efluente final aceptable, y para disponer adecuadamente de los sólidos ofensivos que necesariamente son separados durante el proceso. Esto obliga a cumplir ciertas normas y/o reglas capaces de garantizar la preservación de las aguas tratadas al límite de que su uso posterior no sea descartado (Aguas Residuales, 2019).

Origen y clasificación de las aguas residuales.

Las aguas residuales, como se menciona anteriormente pueden tener uno o diversos orígenes, entre estos podemos mencionar aquellos de origen doméstico, industrial, pecuario, agrícola, recreativo, entre otras, los cuales determinan sus características que estas aguas puedan tener. Las aguas residuales se clasifican de la siguiente manera:

a) Agua residual doméstica:

Estas aguas se caracterizan por ser residuos líquidos de viviendas, zonas residenciales, establecimientos comerciales o institucionales (Pulido y Vidal, 2019).

b) Agua residual municipal o urbana:

Estas aguas se caracterizan por ser residuos líquidos de un conglomerado urbano; de lo cual tiene actividades domésticas e industriales, transportadas por una red de alcantarillado (Pulido y Vidal, 2019).

c) Agua residual industrial:

Este tipo de agua residual es el que resulta de los procesos que se llevan a cabo en el sector secundario de la economía, es decir, el referido a las actividades industriales. Este tipo de agua residual se caracteriza por contener un elevado nivel de componentes contaminantes del tipo de metales pesados, entre los que se encontrarían el plomo, el níquel, el cobre, el mercurio, o el cadmio entre muchos otros (Arriola, 2019).

d) Aguas residuales agrícolas y ganaderas:

Estas aguas se caracterizan por ser las que provienen de la escorrentía superficial de las zonas agrícolas y se caracterizan por la presencia de pesticidas, sales y un alto contenido de sólidos en suspensión (Pulido y Vidal, 2019).

Tratamiento de aguas residuales

El tratamiento de las aguas residuales consiste en poner en marcha procesos físicos, químicos o biológicos para poder eliminar los contaminantes físicos, biológicos o químicos de las aguas residuales, con el fin de producir efluentes no dañinos, que se puedan reutilizar; también se produce un residuo biosólido o fango que luego también se reutiliza (Cornejo, 2017).

Al tratamiento de las aguas residuales también se le conoce como depuración de aguas residuales. No existe un único procedimiento, para la depuración de las aguas residuales de la actividad minera, por la amplia diversificación en la composición de las aguas residuales de esta actividad (Eweis, Chang y Ergas, 1999).

El tratamiento de aguas residuales depende principalmente del nivel de contaminación del agua, en ese sentido se requieren de diferentes tipos o niveles de tratamiento, en ese sentido Reynolds (2001) refiere que los pasos básicos para el tratamiento de aguas residuales son:

- Pre tratamiento—remoción física de objetos grandes.
- Deposición primaria—sedimentación por gravedad de las partículas sólidas y contaminantes adheridos.
- Tratamiento secundario—digestión biológica usando lodos activados o filtros de goteo que fomentan el crecimiento de microorganismos.
- Tratamiento terciario—tratamiento químico (por ejemplo, precipitación, desinfección).

Larios, González, y Morales (2015) hacen mención de un estudio patrocinado por el Banco Mundial en 1997, donde se indica que la construcción de una planta convencional para el tratamiento secundario de aguas residuales para una población de 1 millón de habitantes requiere una inversión capital de aproximadamente US\$100 millones, sin mencionar los costos sustanciales de operación y mantenimiento para su operación continua.

Entre los métodos de tratamientos de aguas residuales se ven en la tabla 2.

Tabla 2.

Métodos de tratamientos de aguas residuales.

Tratamientos utilizados
Tratamientos fisicoquímicos
Ultrafiltración
Oxidación
Empleo de adsorbentes
Tratamientos biológicos
Tratamiento con membranas
Tratamientos combinados
Tratamientos avanzados
Nanofiltración con membranas

Fuente: Aguas Residuales, 2019.

En nuestro país más de la tercera parte de la población no cuenta con un adecuado método de saneamiento, con lo cual se pone en riesgo a la tercera parte de la población por falta de políticas y gestión del Tratamiento de Agua Potable y de Aguas Residuales (Aguas Residuales, 2019).

2.2. Metales pesados

2.2.1. Descripción

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre. Metales pesados son aquellos cuya densidad es por lo menos cinco veces mayor que la del agua. Tienen aplicación directa en numerosos procesos de producción de bienes y servicios. Son en general tóxicos para los seres humanos y entre los más susceptibles

de presentarse en el agua destacamos mercurio, níquel, cobre, plomo y cromo (Greenwood y Earnshaw, 2019).

Los metales pesados son, en general, tóxicos para los seres humanos, y además tienen la característica de ser bioacumulativos (no pueden ser eliminados por el cuerpo). Al tratarse de varios elementos, mostraremos a modo de ejemplo una lista con los límites establecidos en el agua de consumo humano para los principales metales pesados (Reyes, Vergara, Torres, Días y Gonzales, 2016).

Tabla 3.

Límites fijados para la presencia de metales pesados en el agua de consumo humano

Metal pesado	Límite fijado
Mercurio	1 microgramo/l
Níquel	20 microgramos/l
Cobre	2 miligramos/l
Plomo	25 microgramos/l
Cromo	50 microgramos/l

Fuente: Kent, 1998.

En lugares donde se ha utilizado agua residual para el riego agrícola, se reporta una tendencia creciente en las concentraciones de metales pesados, (Kent, 1998). El incremento de concentración en las aguas de estos compuestos se debe principalmente a contaminación puntual de origen industrial o minero. Los lixiviados de vertederos o vertidos de aguas residuales pueden ser asimismo una fuente de contaminación.

Algunos metales son indispensables en bajas concentraciones, ya que forman parte de sistemas enzimáticos, como el cobalto, zinc, molibdeno, o como el hierro que forma parte de la hemoglobina. Su ausencia causa enfermedades, su exceso intoxicaciones. El envenenamiento por metal pesado podría resultar, por ejemplo, de la contaminación del agua de consumo (tuberías de plomo), las concentraciones en el aire ambiente de alta cerca de las fuentes de emisión, o la ingesta a través de la cadena alimentaria (Londoño, Londoño y Muñoz, 2016).

2.2.2. Características

Según la tabla periódica, los metales pesados son elementos químicos con alta densidad (mayor a 4 g/cm³), masa y peso atómico por encima de 20. Algunos de estos elementos son: aluminio (Al), bario (Ba), berilio (Be), cobalto (Co), cobre (Cu), estaño (Sn), hierro (Fe), manganeso (Mn), cadmio (Cd), mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), cromo (Cr), molibdeno (Mo), níquel (Ni), plata (Ag), selenio (Se), talio (Tl), vanadio (Va), oro (Au) y zinc (Zn) (Londoño, Londoño y Muñoz, 2016).

Origen y distribución de los metales pesados

Se encuentran de manera natural en el ambiente en concentraciones, que, por lo general, no perjudican las diferentes formas de vida. Los metales pesados no pueden ser degradados o destruidos, pueden ser disueltos por agentes físicos y químicos y ser lixiviados. Algunos forman complejos solubles y son transportados y distribuidos a los ecosistemas hasta incorporarse en la cadena trófica (suelo, agua, plantas, semillas y forrajes) (Londoño, Londoño y Muñoz, 2016).

Tabla 4.

Fuentes de contaminación de metales en los alimentos

Origen de contaminación	Metal pesado involucrado
Natural, proveniente del suelo	Cadmio, bromo, flúor, cobre
Uso de insecticidas, desinfectantes y medicamentos	Arsénico, cobre, plomo, mercurio
Del suelo arenoso y envase de vidrio	Silicio
Por el equipo de procesamiento	Cobre, hierro, níquel, estaño, plomo, zinc
Debido al almacenamiento	Hierro, níquel, estaño, plomo, cadmio, estroncio
Por oxidación en el envase	Hierro y cobre
Debido al procesamiento	Cobre, cadmio, arsénico
Suplementos alimenticios en dietas de animales	Cobre, cadmio, hierro, zinc, arsénico

Fuente: Londoño, Londoño y Muñoz, 2016

Arsénico (As):

En la naturaleza se encuentra como mineral de cobalto, aunque regularmente está en la superficie de las rocas combinado con azufre o metales como Mn, Fe, Co, Ni, Ag o Sn. El principal mineral del arsénico es el FeAsS (arsenopirita) y se usa en tratamiento de maderas, productos agrícolas (pesticidas, herbicidas) bronceadores de piel, anticorrosivos, vidrio, cerámica, pinturas, pigmentos, medicamentos. En alimentación animal como factor de crecimiento, gases venenosos de uso militar, etc. (Pereira, Pereira y Schmidt, 2013)

Cadmio (Cd):

El cadmio tiene efectos tóxicos en los riñones y en los sistemas óseo y respiratorio; además, está clasificado como carcinógeno para los seres humanos. Por lo general está presente en el medio ambiente en niveles bajos. Sin embargo, la actividad humana ha incrementado considerablemente esos niveles. La exposición humana se produce en mayor medida a través del consumo de alimentos contaminados, la inhalación activa y pasiva del humo del tabaco, y la inhalación en el caso de los trabajadores de la industria de metales no ferrosos. Asimismo, se acumula rápidamente en muchos organismos, principalmente moluscos y crustáceos. También se pueden encontrar concentraciones, aunque más bajas, en vegetales, cereales y tubérculos ricos en almidón. El cadmio se usa en pinturas, plásticos, pilas, baterías, abonos, soldaduras, asbestos, pigmentos, barras (reactores nucleares), farmacéutica, fotografía, vidrio, porcelana, etc. (Wasson, et al., 2005).

Para la mayoría de los seres vivos la principal fuente de exposición al cadmio son los alimentos y el agua, pequeñas partículas de cadmio son absorbidas por el aparato respiratorio, especialmente en trabajadores de la industria del cadmio y en personas expuestas al humo del tabaco. En animales, los rangos de absorción son muy diversos, pero más bajos que en humanos. Las especies con dieta vegetal son las de mayor acumulación de cadmio, debido a que los alimentos ricos en fibra como cereales, vegetales y papas contribuyen a una mayor exposición.

Cobre (Cu):

El cobre se usa en equipo eléctrico, maquinaria industrial, construcción, en aleaciones de bronce: latón, níquel, clavos, pernos, objetos decorativos, tuberías, techos, monedas, utensilios de cocina, joyería, muebles, maquillaje, pinturas, instrumentos musicales y medios de transporte (Londoño, Londoño y Muñoz, 2016).

Hierro (Fe):

El hierro es uno de los 8 grandes elementos en la corteza terrestre, siendo el cuarto elemento más abundante con alrededor de un 5% en peso. El mineral de hierro es abundante, pero su aislamiento es un proceso que consume intensa energía. Por otro lado, el hierro es un mineral necesario para el crecimiento y desarrollo del cuerpo.

El cuerpo utiliza el hierro para fabricar la hemoglobina, una proteína de los glóbulos rojos que transporta el oxígeno de los pulmones a distintas partes del cuerpo, y la mioglobina, una proteína que provee oxígeno a los músculos. El cuerpo también requiere hierro para elaborar hormonas y tejido conectivo. En las células hay compuestos que contienen hierro llamados citocromos, que juegan un papel en la oxidación de las moléculas de alimento (Pereira, Pereira y Schmidt, 2013).

Mercurio (Hg):

El mercurio forma soluciones- amalgamas con otros metales (oro, plata, platino, uranio, cobre, plomo, sodio y potasio), se encuentra comúnmente como sulfuro, también como rojo de cinabrio, en menor abundancia metalcinabrio negro y el menos común cloruro de mercurio.

Se usa en empastes dentales, fabricación de pilas, lámparas fluorescentes, aparatos eléctricos (baterías, conmutadores), pinturas, catálisis, agricultura (fungicidas, pesticidas), productos farmacéuticos, pulpa, papel, cosméticos, cremas y jabones para la piel y drogas herbales, termómetros clínicos (Soo, et al., 2013).

La intoxicación crónica por mercurio se presenta temblores, hipertrofia de tiroides, taquicardia, gingivitis, cambios en la personalidad, eretismo, pérdida de memoria, depresión severa, delirios y alucinaciones. Los tres rasgos más usados para reconocer la enfermedad profesional en la industria son la excitabilidad, los temblores y la gingivitis. La inhalación de altas concentraciones de mercurio puede provocar bronquitis corrosiva y neumonías agudas que causan la muerte. La exposición crónica ocasiona daños al sistema nervioso central (Londoño, Londoño y Muñoz, 2016).

Plomo

El plomo se encuentra en metales de uranio y de torio, ya que proviene de la división radiactiva. Los minerales comerciales suelen contener poco plomo (3%), lo más común es que sea del (10%). Los minerales antes de fundirse pueden acumular hasta 40% o más de plomo. Se usa como aditivo antidetonante en la gasolina, baterías, en monitores de computadores y pantallas de televisión, joyería, latas de conserva, tintes para el pelo, grifería, pigmentos, aceites, cosmetología, aleaciones, cerámicas, municiones, soldaduras, plomadas, armamento, radiación atómica, insecticidas, etc. (Londoño, Londoño y Muñoz, 2016).

La absorción de plomo es un grave riesgo de salud pública; provoca retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños, causa hipertensión y enfermedades

cardiovasculares en adultos. La intoxicación se debe a la ingestión accidental de compuestos de plomo o a la ingestión por parte de los animales de forrajes o alimentos con plomo, procedentes de áreas ambientalmente contaminadas (Pereira, Pereira y Schmidt, 2013).

Cromo

La gente puede estar expuesta al cromo a través de respirarlo, comerlo o beberlo y a través del contacto con la piel con cromo o compuestos del cromo. El nivel de cromo en el aire y el agua es generalmente bajo. En agua para beber el nivel de cromo es usualmente bajo como en el agua de pozo, pero el agua de pozo contaminada puede contener el peligroso cromo. El cromo es un peligro para la salud de los humanos, mayoritariamente para la gente que trabaja en la industria del acero y textil. La gente que fuma tabaco también puede tener un alto grado de exposición al cromo.

El cromo es conocido porque causa varios efectos sobre la salud. Cuando es un compuesto en los productos de la piel, puede causar reacciones alérgicas, como es erupciones cutáneas. Después de ser respirado el cromo puede causar irritación del nariz y sangrado de la nariz (Pereira, Pereira y Schmidt, 2013).

2.3. Toxicidad

El contacto humano con compuestos metálicos se produce a través del agua y los alimentos, normalmente a dosis bajas, pero su toxicidad a lo largo de la historia se ha expresado sobre todo por una exposición profesional en las actividades mineras y, más anecdóticamente, al emplearse con fines homicidas. Los principales autores clásicos que se ocuparon de temas toxicológicos describieron ya intoxicaciones

crónicas por metales relacionados con la minería de los elementos más tóxicos como el mercurio o el plomo (Ferrer, 2003).

En términos generales, la toxicidad la capacidad relativa de un compuesto para ocasionar daños mediante efectos biológicos adversos, una vez alcanzado un punto susceptible del organismo. La toxicidad se refiere a los efectos biológicos adversos que pueden aparecer tras la interacción de la sustancia con el cuerpo. La toxicidad es pues uno de los factores que determinan el riesgo, pero éste responde además a otros varios factores, como la intensidad y la duración de la exposición, la volatilidad del compuesto y el tamaño de las partículas.

2.3.1. Mecanismo de acción tóxica

La toxicidad de los compuestos metálicos se diferencia de la mayoría de las moléculas orgánicas por el hecho de depender de manera muy característica del elemento metálico en cuestión, aunque, como se ha indicado, la expresión de esa toxicidad depende también de las modificaciones toxicocinéticas derivadas del tipo de molécula: por ejemplo, el mercurio orgánico es principalmente neurotóxico por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que el cloruro mercúrico es nefrotóxico al eliminarse por el riñón (Ferrer, 2003). Asimismo, el control biológico de un determinado contaminante en una población dada, se conoce a través de la cadena de correlaciones:

EXPOSICIÓN → DOSIS → EFECTO

Por otro lado, el trabajar en lugares de riesgos de contaminación química hace necesario realizar un control preventivo muy riguroso de los trabajadores expuestos

a tales riesgos, para poder determinar la magnitud y el tiempo reales de su exposición y vigilar su estado de salud mediante técnicas diagnósticas capaces de revelar cualquier alteración en la salud lo antes posible (Wasson, et al., 2005).

2.4. Microalgas

Las microalgas son organismos unicelulares que forman parte del fitoplancton marino. Se encuentran flotando tanto en aguas saladas como dulces, cerca de la superficie del agua donde hay abundancia de luz solar. Su importancia para el mantenimiento de la vida y la salud del planeta Tierra es esencial, ya que a través de la fotosíntesis nos proporcionan gran parte del oxígeno que necesitamos para respirar. Son además esenciales para indicarnos la salud de las aguas y del medio ambiente. Un cambio en la temperatura o en el pH. del agua, o el aumento de la polución, todos ello puede afectar dramáticamente al fitoplancton marino y darnos la voz de alarma (Planctonmarino, 2019).

Las microalgas tienen una composición rica en proteínas, lípidos, carbohidratos, conteniendo vitaminas y minerales como el calcio, hierro y el yodo. También es de destacar su riqueza en ácidos grasos poliinsaturados esenciales (omega 3 y omega 6) y antioxidantes de alto valor como los carotenoides, la luteína y la astaxantina. Todos ellos son esenciales para combatir el estrés oxidativo y muy beneficiosos para la piel, la vista y la salud celular. Entre las vitaminas además de la C y la E, ambas con gran poder antioxidante, queremos poner el foco de atención por su excepcionalidad en su contenido en vitamina B12 (Pardomo, 2019).

2.4.1. Características

La mayoría de las microalgas presentan coloración verde por contener clorofila (pigmento vegetal tetrapirrólico), fotorreceptor de energía luminosa que permite llevar a cabo la fotosíntesis. Sin embargo, algunas microalgas presentan coloración roja o marrón, debido a que contienen xantofilas (pigmentos carotenoides de color amarillo), que enmascaran el color verde (Pardomo, 2019). Habitan diversos ambientes acuáticos dulces y salados, naturales y artificiales (como piscinas y peceras). Algunas son capaces de crecer en el suelo, en hábitats ácidos y dentro de las rocas porosas (endolíticas), en lugares muy secos y muy fríos.

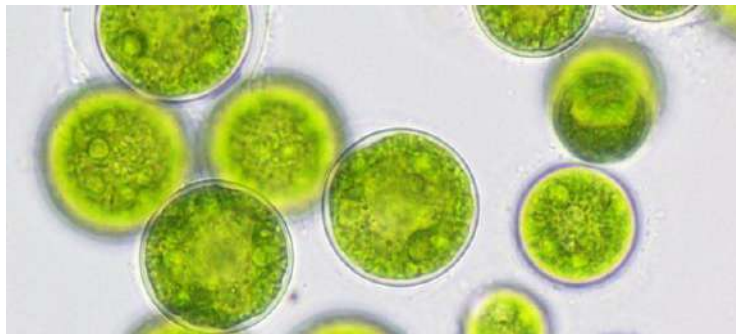


Figura 6. Microalga. Vista microscópica.

Fuente: Planctonmarino, 2019.

Entre los componentes celulares de las microalgas eucariotas destacan los cloroplastos que son los orgánulos donde se encuentran ubicados los pigmentos fotosintéticos; los ribosomas 80S y 70S; gránulos de reserva (gotas de aceite, gránulos de almidón, etc.); muchos flagelados dulceacuícolas contienen vacuolas contráctiles para el control de la presión osmótica, aunque este no es el único mecanismo de osmorregulación en microalgas, ya que pueden acumular diferentes sustancias, como glicerol, galactosil glicéridos, manitol o prolina, en función de la salinidad. Algunas microalgas están rodeadas solamente por la membrana plasmática, que puede estar

envuelta en mucílago, pero la mayoría de las microalgas están rodeadas de pared celular (Villa, 2010).

Las cianobacterias son mucho más simples. Pueden aparecer como células individuales, aunque son más frecuentes las formas filamentosas. El ácido nucleico se acumula en la parte central, conteniendo sólo una molécula de DNA. La envoltura externa está compuesta de membrana citoplasmática y pared celular de estructura y composición características de las bacterias Gram-negativas, rodeada frecuentemente de mucílago. En el citoplasma se encuentran ribosomas 70S. En muchas especies de cianobacterias las células vegetativas pueden diferenciarse en células estructural y funcionalmente distintas, formándose así los heterocistos, especializados en la fijación del nitrógeno molecular, y los acinetos, formas de resistencia(esporas), (Morales, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la reproducción es generalmente por división binaria, con tiempos de duplicación de 1 hora o menos para los procariotas, pero de 8 a 24 h o más para los eucariotas. Muchas tienden a dividirse en un momento particular del ciclo día-noche. Las especies que se dividen durante el periodo de oscuridad sintetizan el material celular durante el periodo de luz. La reproducción sexual es menos frecuente que la asexual y no existe en las cianobacterias. Numerosas microalgas son capaces de producir formas latentes, además de los acinetos de las cianobacterias, que permiten sobrevivir durante periodos desfavorables (Villa, 2010).

2.4.2. Clasificación

Las microalgas representan un grupo altamente heterogéneo, debido a que es polifilético, es decir, que agrupa especies descendientes de distintos ancestros. Para clasificar estos microorganismos, se han utilizado diversas características, entre las cuales se encuentran: la naturaleza de sus clorofilas y de sus sustancias de reserva energética, la estructura de la pared celular y el tipo de movilidad que presentan (Pardomo, 2019), a continuación, se especifican:

a. Naturaleza de sus clorofilas

La gran mayoría de las algas presentan clorofila tipo a y una pocas presentan otro tipo de clorofila derivada de ésta. Muchas son fotótrofas obligadas y no crecen en la oscuridad. Sin embargo, algunas crecen en la oscuridad y catabolizan azúcares sencillos y ácidos orgánicos en ausencia de luz. Por ejemplo, algunos flagelados y clorofitas pueden usar el acetato como fuente de carbono y energía. Otras asimilan compuestos simples en presencia de luz (fotoheterotrofia), sin usarlos como fuente de energía.

b. Polímeros carbonados como reserva energética

Como producto del proceso fotosintético, las microalgas producen una gran variedad de polímeros carbonados que les sirven como reserva energética. Por ejemplo, las microalgas de la división Chlorophyta, generan almidón de reserva (α -1,4-D-glucosa), muy similar a los almidones de las plantas superiores.

c. **Estructura de la pared celular**

Las paredes de las microalgas presentan considerable variedad de estructuras y composición química. La pared puede estar constituida por fibras de celulosa, usualmente con la adición de xilano, pectina, mananos, ácidos algínicos o ácido fucínico. En algunas algas llamadas calcáreas o coralinas, la pared celular presenta deposición de carbonato cálcico, mientras que otras presentan quitina.

d. **Tipo de movilidad**

Las microalgas pueden presentar flagelos (como *Euglena* y los dinoflagelados), pero nunca presentan cilios. Por otra parte, algunas microalgas presentan inmovilidad en su fase vegetativa, sin embargo, sus gametos pueden ser móviles.

2.4.2.1. Clorofitas

Las Chlorophytas, clorófitas o, más comúnmente conocidas como algas verdes, son el grupo más numeroso de algas. Se han diversificado de tal forma que existen como organismos unicelulares, coloniales, cenocíticas y pluricelulares de variados tamaños y formas, con células flageladas o no (Polanco, 2017).

Las clorófitas son típicamente abundantes en ambientes de agua dulce, incluyendo lagos, estanques, arroyos y humedales. En estos sitios pueden llegar a ser una molestia en condiciones de contaminación de nutrientes. Las algas verdes abundan en hábitats

costeros. Algunas algas verdes pueden formar floraciones costeras flotantes extensivas, denominadas “marea verde” (Blanco, 2019).

Algunos linajes de las clorófitas se pueden encontrar en simbiosis con diversos rangos de eucariotas, incluyendo hongos, líquenes, ciliados, foraminíferos, cnidarios, moluscos y vertebrados. Otros han evolucionado para tener un estilo de vida heterótrofo obligado como parásitos o especies de vida libre. Por ejemplo, el alga verde *Prototheca* crece en aguas residuales y en suelo y puede causar infecciones en humanos y animales conocidas como prototecosis.

Anteriormente, la división Chlorophyta incluía la clase Charophyceae pero con análisis celulares y moleculares fue excluida de esta división, aunque para fines didácticos aún se acostumbra estudiarla como miembro de la división Chlorophyta. Sin embargo, es importante mencionar que los representantes de esta antigua clase pasaron a formar parte de una nueva división llamada Streptophyta, que es mucho más amplia. De igual forma, Chlorophyta y Streptophyta son las únicas divisiones que pertenecen al clado Viridiplantae, al que también pertenecen las plantas verdaderas. De esta manera, las divisiones Chlorophyta y Streptophyta se separan evolutivamente del resto de los organismos que son conocidos como “algas” (Blanco, 2019).

2.4.2.1.1. *Scenedesmus dimorphus*

Scenedesmus dimorphus (Turpin) Kützing 1834: 608

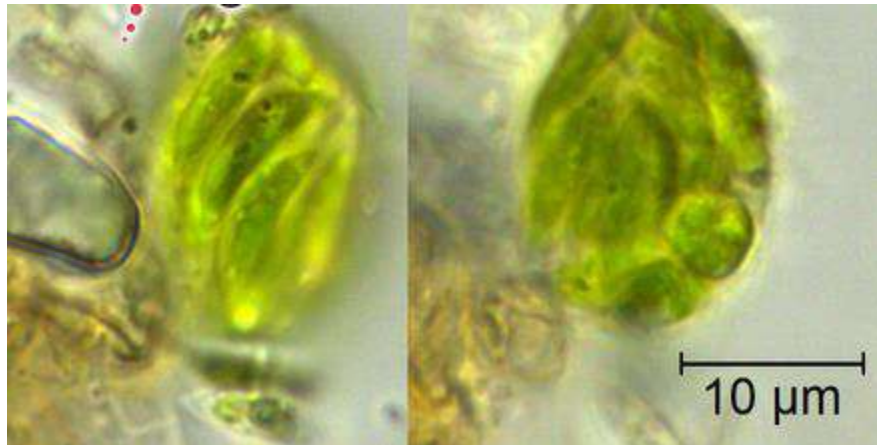


Figura 7. *Scenedesmus dimorphus*

Fuente: Algaebase, 2019. Recuperado de:

https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=58629

Tabla 5.

Clasificación taxonómica de Scenedesmus dimorphus.

Reino	Plantae
Phylum	Chlorophyta
Clase	Chlorophyceae
Orden	Sphaeropleales
Familia	Scenedesmaceae
Genero	Scenedesmus
Especie	<i>Scenedesmus dimorphus.</i>

Fuente: Algaebase, 2019. Recuperado de:

https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=58629

Scenedesmus dimorphus es una chlorofita que tienen un amplio rango de hábitat respecto a las condiciones ambientales y se encuentran en el agua dulce. Es una microalga verde, en forma de frijol de aproximadamente 10 um de tamaño.

Categorizado como un alga pesada por poseer paredes celulares muy gruesas (Mercado, 2016).

2.4.3. Aplicaciones biotecnológicas de las microalgas

Las microalgas tienen una composición bioquímica compleja debida a la presencia del aparato fotosintético, que le da una gran riqueza en pigmentos y componentes como citocromos y ácidos poliinsaturados de cadena larga (PUFAs). Esto resulta en un elevado contenido en productos de alto valor, como los carotenoides luteína y astaxantina o los PUFAs DHA y EPA. Como captadoras de CO₂ y asimiladoras del nitrógeno, son además una fuente sostenible de biocombustibles y biofertilizantes (Fernández, 2014).

En ese sentido, las microalgas son una fuente de múltiples beneficios para el hombre, extendiéndose su aplicación tanto a la alimentación funcional, la agricultura, la acuicultura, farmacología y la cosmética, entre otros. Asimismo, cada vez más estudios apuntan a que las microalgas pueden generar energía limpia y biocombustibles de segunda generación, contribuyendo con ello al desarrollo sostenible de la economía (PlanctonMarino, 2019).

Alimentación humana y animal

En la década de 1950, científicos alemanes comenzaron a cultivar microalgas en forma masiva para obtener lípidos y proteínas que reemplazarían a las proteínas animales y vegetales convencionales, con el objetivo de cubrir el consumo del ganado y del hombre.

Recientemente, los cultivos masivos de microalgas se han proyectado como una de las posibilidades para combatir del hambre y la desnutrición mundial. Las microalgas poseen concentraciones de nutrientes poco comunes, las cuales son superiores a las observadas en cualquier especie de planta superior. Un gramo diario de microalgas constituye una alternativa para complementar una dieta deficiente (Pardomo, 2016).

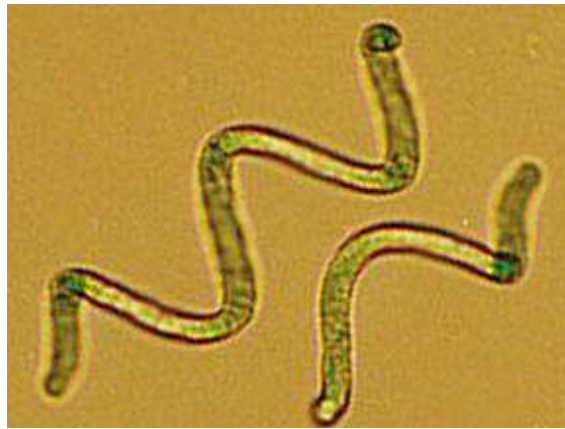


Figura 8. *Arthrospira* es una cianobacteria ampliamente utilizada y cultivada de forma masiva.

Fuente: Plancton Marino, 2019

Acuicultura

Las microalgas se utilizan como alimento en la acuicultura por su alto contenido proteico (de 40 a 65 % en peso seco) y capacidad de incrementar con sus pigmentos, el color de salmónidos y crustáceos. Por ejemplo, se usa como alimento para bivalvos en todos sus estadios de crecimiento; para estados larvales de algunas especies de crustáceos y para estadios tempranos de algunas especies de peces (Duerr, Molnar y Sato, 1998).

Pigmentos en la industria alimenticia

Algunos pigmentos microalgales se utilizan como aditivos en forrajes para incrementar la pigmentación de la carne de pollo y de las yemas de huevos, así como para aumentar la fertilidad del ganado. También se usan estos pigmentos como colorantes en productos tales como margarinas, mayonesas, jugos de naranja, helados, quesos y productos de panificación (Benavente, Aguilar, Mendez y Montañez, 2012).



Figura 9. Fotobioreactores tubulares, usados para la obtención de compuestos de alto valor a partir de microalgas.

Fuente: Benavente, Aguilar, Mendez y Montañez, 2012.

Medicina humana y veterinaria

En el campo de la medicina humana y veterinaria, es reconocido el potencial de las microalgas, debido a que:

- Reducen el riesgo de diversos tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y oftálmicas (gracias a su contenido en luteína).

- Ayudan a prevenir y tratar enfermedades coronarias, agregación plaquetaria, niveles anómalos de colesterol, siendo además altamente promisorias para el tratamiento de ciertas enfermedades mentales (por su contenido en omega-3).
- Presentan acción antimutagénica, estimuladora del sistema inmune, reductora de hipertensión y desintoxicante.
- Presentan acción bactericida y anticoagulante.
- Incrementan la biodisponibilidad de hierro.
- Se han generado medicamentos a base de microalgas terapéuticos y preventivos de colitis ulcerativas, gastritis y anemia, entre otras afecciones.

Fertilizantes

Las microalgas se utilizan como biofertilizantes y acondicionadoras del suelo. Estos microorganismos fotoautótrofos recubren rápidamente los suelos removidos o quemados, reduciendo el peligro de erosión. Algunas especies favorecen la fijación de nitrógeno, y han hecho posible, por ejemplo, el cultivo de arroz en terrenos anegados durante siglos, sin adición de fertilizantes (Gómez, 2007).

Indicadores de contaminación

Dada la importancia ecológica de las microalgas como productoras primarias de los ambientes acuáticos, son organismos indicadores de contaminación ambiental.

Además, presentan gran tolerancia a metales pesados tales como cobre, cadmio y plomo, así como a los hidrocarburos clorados, por lo cual pueden ser indicadores de la presencia de estos metales (Kumar, Dahms, Won, Lee y Shin, 2015).



Figura 10. Cultivadores de microalgas tipo carrusel, utilizados en cultivo masivo de microalgas para la industria cosmética y de alimentos.

Fuente: Fuente: Gomez, 2007

Biogás

Algunas especies (por ejemplo, *Chlorella* y *Spirulina*), han sido utilizadas para purificar biogás, ya que consumen el dióxido de carbono como fuente de carbono inorgánico, además de controlar simultáneamente el pH del medio.

Biocombustibles

Las microalgas biosintetizan una amplia gama de subproductos bioenergéticos comercialmente interesantes, tales como grasas, aceites, azúcares y compuestos bioactivos funcionales.

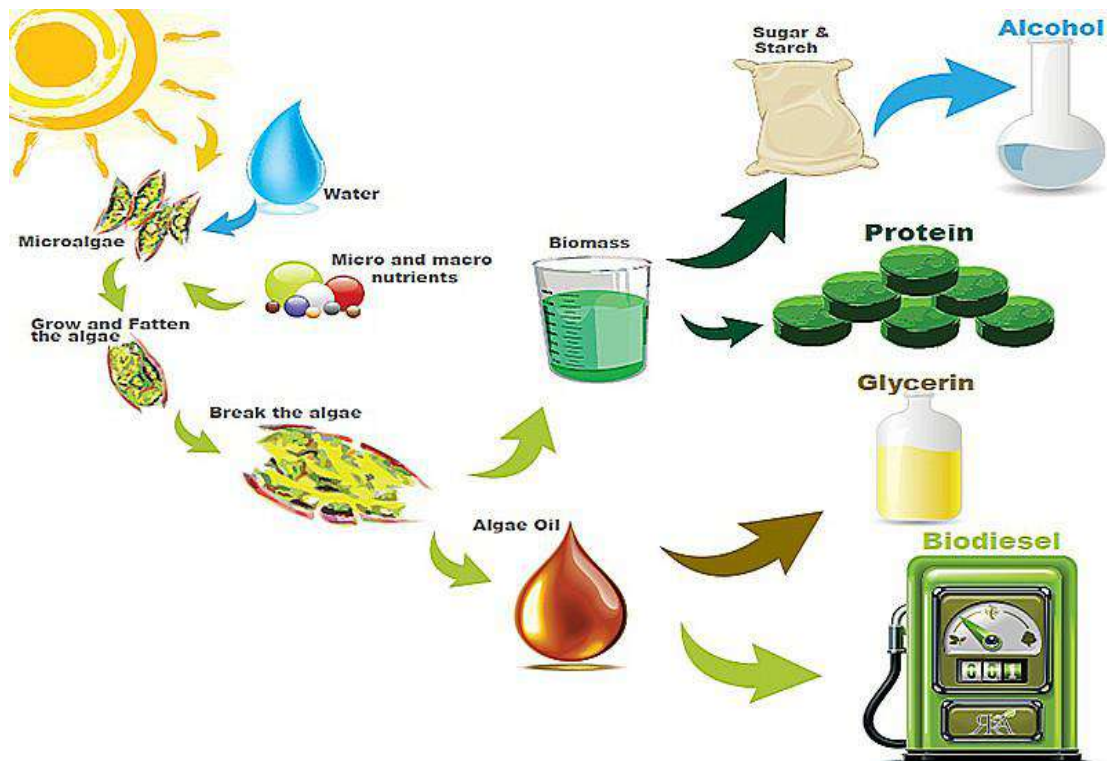


Figura 11. El gran potencial de las microalgas como biocombustible.

Fuente: Gomez, 20017

Muchas especies son ricas en lípidos e hidrocarburos adecuados para uso directo como biocombustibles líquidos de alta energía, a niveles superiores a los presentes en las plantas terrestres, y también tienen potencial como sustitutos de los productos de refinación de los combustibles fósiles. Esto no es sorprendente, teniendo en cuenta que la mayoría del petróleo se cree que se originó a partir de microalgas (Martínez, Chávez, Olvera y Abdo, 1996).

2.5. Biorremediación

La biodegradación es el proceso natural por el cual los microorganismos degradan o alteran moléculas orgánicas transformándolas en moléculas más pequeñas y no tóxicas. Sin embargo, este proceso es muy lento y puede acelerarse introduciendo determinadas bacterias o plantas en los ambientes contaminados.

Esta intervención se denomina “biorremediación” o “biocorrección” y se define como el empleo de organismos vivos para eliminar o neutralizar contaminantes del suelo o del agua. En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas definidas de bacterias u hongos. Actualmente se están desarrollando microorganismos, algas (especialmente cianobacterias o algas azules) y plantas genéticamente modificadas para ser empleadas en biorremediación (ArgenBio, 2017).

Las bacterias pueden degradar prácticamente cualquier sustancia orgánica y valiéndonos de esta capacidad hemos orientado nuestras primeras investigaciones a la identificación de microorganismos nativos (principalmente bacterias) con la capacidad de degradar el cianuro.

La lixiviación con cianuro es actualmente el proceso dominante utilizado por la industria minera para extraer oro y plata. El cianuro es un compuesto tóxico para la mayoría de los organismos vivos; sin embargo, muchos microorganismos son capaces de tolerarlo e incluso degradarlo (Cornejo, 2017).

2.5.1. Ficorremediación

La ficorremediación, consiste en el uso de macro o microalgas para la remoción o biotransformación de contaminantes, incluidos nutrientes, xenobióticos y CO₂ del agua residual. Esta tecnología es económica, versátil y tecnológicamente sencilla, además, la ficorremediación constituye una alternativa que puede complementar los procesos tradicionales y, al mismo tiempo, reducir costos energéticos, mejorar la eficiencia del proceso y generar una biomasa microalgal enriquecida en bioproductos de valor agregado destinados a diversos fines comerciales, destacándose biofertilizantes, por ejemplo, para animales y biocombustibles, entre otros (Ayala, 2015).

Las algas fijan más del 40% del carbono de la tierra y ofrecen a la biósfera una considerable proporción de oxígeno, dentro de su interés comercial se encuentra que pueden hacer uso de residuos como fuente de nutrientes (Forero, 2017). Adicionalmente posee genes catabólicos para degradar contaminantes, que facilitan su utilización por su adaptabilidad a condiciones extremas y su alta tasa de crecimiento (Pachon, 2013).

Según la literatura científica, las microalgas con propiedades remediadoras de metales son: *Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella miniata*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella sorokiniana*. Las cuales se destacan por su eficiencia en la eliminación de metales pesados de las aguas residuales ya que poseen gran área superficial y alta afinidad de unión (Forero, 2017).

Ventajas de la Ficorremediación:

La relación costo-beneficio es muy alta, debido a que éstos microorganismos no requieren de la adición continua ni excesiva de nutrientes. Tampoco se ven disminuidos por la presencia de uno o varios contaminantes. El hecho de que sean de origen biológico, les ha permitido tener una gran acogida en diferentes sectores, debido a que en la remediación no habrá generación de contaminantes ni químicos residuales peligrosos para el ambiente ni para la comunidad. Su amplia diversidad, le permite a las microalgas adaptarse a un gran número de ambientes en los cuales pueden formar consorcios con otros microorganismos (hongos, bacterias y/o arqueas) que tienen un efecto de sinergia degradativo en los diferentes ambientes contaminados (Renuka, Prasanna y Ahluwalia, 2015).

Desventajas de la Ficorremediación:

Una de las desventajas más notorias del uso de micro o macro algas es la limitación de la aplicabilidad en ambientes no acuáticos, debido a que únicamente su crecimiento se encuentra altamente favorecido en recursos hídricos. Asimismo, existe una dependencia fuerte del recurso solar, puesto que son microorganismos fotosintéticos. Finalmente, los resultados de la degradación tienden a tomar más tiempo si se compara con un tratamiento químico (Ayala, 2015).

III. Método

3.1. Tipo de investigación

La investigación realizada reúne las características para ser del tipo experimental, debido a que está basada en la manipulación de las variables en condiciones controladas, simulando situaciones específicas y observando el grado de afectación de las variables involucradas y manipuladas sobre un efecto determinado.

3.2. Ámbito temporal y espacial

El proyecto de investigación realizado se desarrolló en el Laboratorio de Cultivos Menores de la Facultad de Oceanografía, Pesquerías, Ciencias Alimentarias y Acuicultura (FOPCAA) de la Universidad Nacional Federico Villarreal (UNFV), ubicada en la Calle Roma N° 350, distrito de Miraflores, durante el periodo comprendido entre febrero 2018 hasta marzo del 2019.

3.3. Variables

Variabes independientes: Concentraciones de Cadmio

Variabes dependientes: Cepas de la microalga *Scenedesmus dimorphus*

3.4. Población y Muestra

La población con la que se trabajó en la presente investigación fue la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus*, colectada del estanque de cultivo de tortugas amazónicas del Laboratorio de Cultivos Menores de la FOPCA-UNFV.

La muestra tomada fue de 50 ml de agua del estanque de cultivo, la cual contenía diversos organismos vivos; por lo cual, se realizaron variados procedimientos de aislamiento celular para fines de la investigación.

3.5. Instrumentos

3.5.1. Materiales

- Pizetas de Agua destilada
- Balón de 1000 ml
- Fiolas de 100 ml, 250 ml, 500 ml y 1000 ml
- Baguetas de vidrio
- Vasos de precipitado de 1000 ml, 500 ml, 250 ml y 100 ml
- Matraces Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas de 0,5 ml, 1ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Pipetas Pasteur
- Embudos de vidrio
- Tubos de Ensayo
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes de látex talla “S”
- Guardapolvo
- Frasco colector de muestras
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Placas Petri
- Mechero
- Aza de platino
- Goteros

- Algodón
- Mangueras de aireación
- Difusores de aire
- Papel filtro whatman 40
- Termómetro
- Papel Tornasol
- Papel aluminio
- Cámara de conteo Neubauer
- Ligas
- Esponjas
- Marcador permanente (rotulador)

3.5.2. Equipos

- Autoclave, Marca Boeco Germany, modelo F154
- Balanza analítica Ohaus, modelo Pioneer TM, precisión 0,01 mg
- Destilador de Agua, Marca Boeco Germany, modelo G532
- Estufa de secado, Marca Selecta, modelo 20F2
- Espectrofotometro de Absorción Atómica, marca GBC, modelo 084-003
- Microscopio Compuesto, Marca Olympus, modelo CH20
- Refrigeradora Smart Cooling, Marca Daewoo, modelo RGP-480
- Camara fotográfica, Marca Canon, modelo FT-310
- Laptop, Marca Toshiba, modelo Satellite XT-31726

3.5.3. Reactivos

- Nitrato de Cadmio
- Ácido Nítrico
- Alcohol de 70°

3.5.4. Medios de cultivo

- CHU 10
- Agar

3.6. Procedimientos

Todo procedimiento a realizar en las instalaciones de un laboratorio, debe de mantener las zonas de trabajo y materiales a utilizar en condiciones asépticas, debido a que este primer eslabón en la cadena de trabajo, es uno de los más importantes para mantener las condiciones idóneas y necesarias para el desarrollo de investigaciones experimentales en ambientes controlados; especialmente, las que requieren el cultivo de microorganismos y generación de cepas axénico, como es el caso del presente proyecto.

3.6.1. Preparación de material de trabajo

Para esta etapa fue necesario hacer un listado de las actividades a realizar, para determinar a partir de ahí, el requerimiento de material de laboratorio que se debe tener a disposición y en las condiciones estériles idóneas necesarias para cada etapa de la investigación.

Luego, el material proyectado para el desarrollo del proyecto, entra en un proceso de preparación para cumplir con las condiciones asépticas necesarias para su uso en

las actividades de laboratorio dispuestas para la investigación; dicha preparación, consta de varias etapas, las cuales serán descritas a continuación.

3.6.1.1. Lavado de material

En este procedimiento se realizaron dos lavados; el primero, con detergente y la ayuda de una escobilla para retirar todos los posibles residuos que hayan quedado de labores anteriores o por consecuencia del tiempo en desuso; y un segundo lavado, con una solución de lejía al 1% para eliminar cualquier impureza residual que aún se encuentre en el material a utilizar. Luego de estos lavados, se procedió a enjuagar con abundante agua, realizando este procedimiento alrededor de diez veces aproximadamente para que no quede ningún residuo químico en el material.



Figura 12. Lavado de material de laboratorio.

Fuente: Propia

3.6.1.2. Secado del material

Posterior a la culminación del lavado de material necesario para el desarrollo de la presente investigación, es decir: beakers, vasos de precipitados, pipetas, baguetas, matraces Erlenmeyer, fiolas, etc.; se procedió a introducir dichos materiales en la

estufa del laboratorio para realizar el procedimiento respectivo de secado. Para esto, se verificó que la estufa este bien cerrada, para luego conectarla al enchufe y encenderla. Luego se graduó la temperatura en 150 °C, que es la temperatura adecuada para el secado del material; consecutivamente, se dejó el equipo en operación por el lapso de 3-4 horas para poder eliminar toda humedad existente en los materiales utilizados; finalmente, la estufa cerrada fue desenchufada y se esperó 3 horas más para que el equipo se enfrié y sea posible sacar el material del interior.



Figura 13. Secado de material en la estufa.

Fuente: Propia

3.6.1.3. Esterilización del material

Posteriormente a las actividades desarrolladas, es necesario realizar un proceso de esterilización al material de laboratorio, a fin de eliminar cualquier organismo microscópico resistente que haya logrado sobrevivir a las de limpieza anteriormente realizadas.

Para esto, fue necesario preparar el material que fue secado en la estufa, cubriéndolo con papel metálico dependiendo de la naturaleza de la forma del material que deseamos esterilizar. Por ejemplo, a los beakers, vasos de precipitado, matraces y fiolas que tienen la forma de recipientes, se procedió a cubrir la zona donde tienen la abertura, también conocida como boca, ajustando el papel metálico a modo que el material quede hermético. Mientras que con las pipetas y las baguetas, que son de forma alargada, se procedió a envolverlas en grupos de 5 en una especie de sobres con el papel metálico, lo cual sirve para proteger el material y hacer más fácil su manipulación.



Figura 14. Material de laboratorio cubierto con papel metálico previo al proceso de esterilización.

Fuente: Propia

Luego de esto, se llevó el material trabajado al interior de la estufa nuevamente, para luego cerrarla, a fin de enchufar y se prender el equipo para su respectivo funcionamiento; sin embargo, esta vez la temperatura se graduará en 180 °C para poder eliminar cualquier tipo de contaminación microbiana que no resistirá la exposición a esta temperatura. Para este procedimiento, el equipo se mantuvo en

funcionamiento durante cuatro horas, y luego se dejó enfriando por otras tres horas; consiguiendo finalmente material estéril listo y preparado para su posterior uso en las labores del laboratorio en el marco del presente proyecto de investigación.



Figura 15. Material de laboratorio preparado para la esterilización en la estufa.

Fuente: Propia

3.6.1.4. Rotulado y conservación del material estéril

Finalmente, es preciso rotular con un marcador indeleble el material de laboratorio dispuesto para las diferentes actividades a realizar, a fin de que no existan confusiones que generen dificultades y/o posibles contaminaciones en su uso.

Para un eficiente rotulado, se recomienda utilizar códigos que permitan identificar la especificidad del material con facilidad, así como la fecha y otros datos que sean de relevancia.

3.6.2. Preparación de medio de cultivo

En la presente investigación se utilizó la microalga *Scenedesmus dimorphus*, la cual es un microorganismo de agua dulce, por lo que se realizó la preparación del

medio de cultivo CHU 10, tal como describen Bold y Wynne en 1978, utilizando los componentes descritos en las Tablas 6, 7, 8 y 9.

En la Tabla 6 se muestran los componentes del medio de cultivo CHU 10.

Tabla 6.

Componentes del medio de cultivo CHU 10

N°	Componente	Cantidad	Concentración
1	Solución Stock CHU	10 ml/l	
2	NaHCO ₃	1 ml/l	1,26 g/90 ml

Fuente: Bold y Wynne, 1978

En la Tabla 7 se muestran los componentes de la Solución Stock CHU.

Tabla 7.

Componentes de la Solución Stock CHU

N°	Componente	Cantidad	Concentración
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	10 ml	3,67 g/100 ml
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	10 ml	3,69 g/100 ml
3	K ₂ HPO ₄	10 ml	0,87 g/100 ml
4	NaNO ₃	10 ml	8,5 g/100 ml
5	Na ₂ SiO ₃ .9H ₂ O	10 ml	2,84 g/100 ml
6	Solución Stock para CHU de Citrato Férrico	10 ml/100 ml	
7	Solución CHU de Micronutrientes	10 ml/100 ml	

Fuente: Bold y Wynne, 1978

En la Tabla 8 se muestran los componentes de la Solución Stock para CHU de Citrato Férrico.

Tabla 8.

Componentes de la Solución Stock para CHU de Citrato Férrico

N°	Componente	Cantidad
1	Ácido Citrico.H ₂ O	3,35 g/100 ml
2	Citrato Férrico	3,35 g/100 ml

Fuente: Bold y Wynne, 1978

En la Tabla 9 se muestran los componentes de la Solución CHU de Micronutrientes

Tabla 9.

Componentes de la Solución CHU de Micronutrientes

N°	Componente	Cantidad
1	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,02 g/L
2	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,044 g/L
3	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,02 g/L
4	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,012 g/L
5	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,012 g/L
6	H ₃ BO ₃	0,62 g/L
7	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	0,05 g/L

Fuente: Bold y Wynne, 1978

Asimismo, para la preparación de dichas soluciones, se requirió de la realización de una serie de procedimientos previos para la obtención de la Solución final del Medio CHU 10, los mismos que se detallan a continuación.

3.6.2.1. Destilación de agua

El agua destilada es una solución químicamente pura originada por el calor aplicado en un volumen de agua, donde luego se enfría el vapor producido mediante

un líquido refrigerante a fin de convertirla a su estado líquido otra vez. Dicha agua, se encuentra purificada químicamente conteniendo únicamente un átomo de oxígeno y dos de hidrogeno, por lo cual, es idónea para la preparación de soluciones químicas solubles que posteriormente serán utilizadas en la preparación de medios de cultivo.

El mencionado proceso fue realizado en el destilador de agua del Laboratorio de Cultivos Menores de la FOPCA-UNFV, el cual consta de un funcionamiento básico y manual de la dinámica de los fluidos para obtención del agua destilada.

Dicho sistema, cuenta con un punto de ingreso de agua, el cual servirá para llenar la capacidad de 25 litros que tiene el equipo, para fluir de manera continua hasta llegar al punto de salida, donde el agua excedente en el funcionamiento de este sistema será expulsada a través del rebose en forma de campana.

Una vez el sistema se encuentre en equilibrio, es decir con el tanque lleno, y la entrada y salida de agua, en continuo flujo se procederá a enchufar el equipo y posteriormente levantar la llave térmica que permite la conexión de electricidad para su funcionamiento.

El equipo calentará el volumen de agua contenido hasta la ebullición, demorando aproximadamente unos 10 a 12 minutos; consecuentemente, comenzará a notarse el vapor producido saliendo por un desfogue en la parte superior del equipo; asimismo, parte del vapor producido entrará en contacto con el ingreso de agua fría y se sublimará cambiando al estado líquido formando gotas que, a través de una manguera, se irán depositando en un tanque ubicado externamente donde será almacenada el agua destilada resultante de este proceso. El sistema descrito, tiene una eficiencia de

10 litros por hora, por lo cual, el mencionado tanque con capacidad de 40 litros, será llenado en 4 horas.



Figura 16. Destilador de agua del Laboratorio de Cultivos Menores.

Fuente: Propia

En la presente investigación, el procedimiento descrito fue realizado en diversas oportunidades para la obtención de agua destilada necesaria para la preparación de Soluciones Stock y los volúmenes de agua a utilizar en los medios de cultivo.

3.6.2.2. Esterilización de volúmenes de agua destilada

Luego de haber realizado los procedimientos descritos anteriormente, se procedió a preparar el volumen de agua destilada a utilizar para las soluciones del medio de cultivo; esto se realiza a través de la esterilización de dichos volúmenes mediante su puesta en vasos de precipitado estériles de capacidad de 1 litro, los cuales fueron preparados inicialmente; para esto, fue necesario hacer uso de la autoclave, a fin de mantener las condiciones sépticas requeridas para esta investigación.

Asimismo, manifestar que la autoclave con la que cuenta el Laboratorio de Cultivos Menores de la FOPCA-UNFV, es del tipo canasta, la cual tiene una forma cilíndrica, y funciona a través de la esterilización por vapor al aumentar la temperatura y la presión.



Figura 17. Autoclave del Laboratorio de Cultivos Menores.

Fuente: Propia

Para hacer uso del equipo, fue necesario abrirlo y sacar la canastilla interna que sujeta los vasos de precipitados con agua destilada que se desea esterilizar; luego, una vez habiendo retirado la canastilla, se procedió a agregar 12 litros de agua destilada en el interior de la autoclave, a fin de que dicha agua al entrar en ebullición, produzca el vapor que esterilizará el material contenido; consiguientemente, la canastilla fue

puesta en su lugar para luego colocar dentro tres vasos de precipitados de volumen de 1 litro con agua destilada en su interior sellados herméticamente con papel metálico.



Figura 18. Volúmenes de agua destilada a punto de ser esterilizados.

Fuente: Propia

Posteriormente, se tapó la autoclave, para luego cerrar todos los pestillos asegurando todos los ganchos de seguridad hasta que el equipo se encuentre cerrado y completamente hermético; finalmente, se conectó el equipo a la corriente y se levantó la llave térmica que permite la conexión eléctrica.

El equipo cuenta con un medidor de temperatura y presión, el cual ayuda a llevar un control de los parámetros en cuestión, siendo los valores óptimos de 120 °C y 0,5 mPa, que es cuando la ebullición del agua sucede y se consigue eliminar cualquier residuo biológico que se encuentre en los volúmenes contenidos dentro de los vasos de precipitado colocados al interior de la autoclave.

El tiempo de funcionamiento del equipo fue de 30 minutos aproximadamente, luego de que este tiempo transcurriera, se procedió a apagar el interruptor del equipo,

para desenchufarlo y esperar hasta el día siguiente cuando el equipo este frio para retirar los vasos de precipitado con agua destilada estéril en su interior.

Finalmente, el agua destilada esterilizada obtenida mediante el uso de la autoclave fue almacenada en una zona estéril dentro del laboratorio para su posterior uso en la preparación de los medios de cultivo.

3.6.2.3. Pesaje y dilución de compuestos

En esta etapa se procedió a realizar el pesaje de cada compuesto con ayuda de la balanza analítica del Laboratorio de Cultivos Menores de la FOPCA-UNFV, acorde a las cantidades determinadas para cada Solución Stock en el punto 3.6.2. del presente capitulo.



Figura 19. Balanza analítica del Laboratorio de Cultivos Menores.

Fuente: Propia

Para el pesaje, se utilizaron beakers de 50 ml previamente esterilizados en la estufa para colocarlos dentro de la balanza, aplicar la tara y pesar cada reactivo correspondiente acorde a la solución stock del medio CHU 10 que se desea preparar.

El mismo procedimiento se repitió con todos los reactivos componentes de dicho medio, para luego ser llevados a la mesa de trabajo donde se realizó la combinación de todos los reactivos.

Posteriormente, cada compuesto fue diluido en agua destilada dentro de un beacker de 50 ml con ayuda de una bagueta con movimientos circulares hasta que la solución se homogenice; consiguientemente, la solución obtenida se vierte dentro de una fiola, según el requerimiento de volumen establecido, y se completa con agua destilada esterilizada para su total dilución.



Figura 20. Preparación de soluciones Stock para el medio de cultivo CHU 10.

Fuente: Propia

Finalmente, las tres soluciones stock preparadas y el Medio CHU 10 resultante, se almacenan en la refrigeradora del laboratorio para que conserven sus condiciones sin degradarse.

3.6.3. Muestreo y aislamiento de la cepa algal

En esta etapa se describe el proceso de obtención de la población algal a ser utilizada en la presente investigación, así como las actividades realizadas para el aislamiento de la cepa de *Scenedesmus Dimorphus*.

3.6.3.1. Colecta de muestra

La muestra fue colectada del estanque de crianza de Tortugas acuáticas, la cual contenía diversos organismos biológicos entre los cuales destacaban diferentes especies de fitoplancton y zooplancton de agua dulce; dicho procedimiento, fue realizado con la ayuda de un frasco colector de vidrio color ámbar, para la mantención de sus características.



Figura 21. Colecta de muestra.

Fuente: Propia

3.6.3.2. Identificación de microorganismos

El volumen de agua colectado contiene en su interior diferentes organismos microscópicos dispersos, por lo que fue necesario llevar diferentes alícuotas de la muestra al microscopio para la respectiva identificación y análisis.

Se pudo apreciar diversos géneros de microalgas, donde destacan: *Chlorella*, *Closterium*, *Scenedesmus*, *Anabaena*, *Chroococcus*, entre otros; así como diferentes especies de zooplancton, tales como: rotíferos, copépodos, ciliados, protozoos, etc.

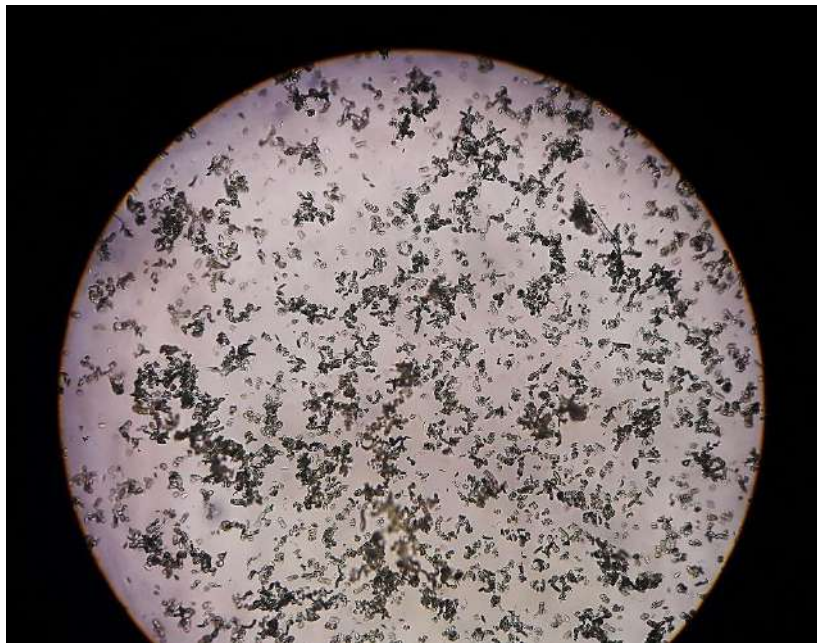


Figura 22. Muestra colectada vista en el microscopio.

Fuente: Propia

Para fines de la presente investigación, se decidió que la especie de interés para el cultivo y desarrollo de la parte experimental, sería la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus*, por lo que, se vio necesario realizar procedimientos que permitan aislar dicho microorganismo para ser cultivado mediante los protocolos de laboratorio establecidos.

3.6.3.3. Aislamiento de microalgas de organismos zooplanctónicos por sofocamiento

El aislamiento de microalgas, consistirá en conseguir cultivos donde únicamente exista fitoplancton, a partir de la muestra colectada en un ambiente natural; para lo cual, como primera acción se procedió a filtrar la muestra de agua con la malla colectora de fitoplancton, que previamente ha debido ser esterilizada, mediante la cual se retendrá todos los microorganismos del zooplancton que sean de tamaños superiores al tamiz de la mencionada malla, el cual es equivalente a 40 μm aproximadamente.

Luego, la muestra resultante contendrá en su mayoría microalgas de diferentes especies, y algunos otros organismos zooplanctónicos como protozoarios que son de un tamaño menor al de las microalgas.



Figura 23. Muestra colectada filtrada.

Fuente: Propia

Posteriormente, lo siguiente es utilizar el método de aislamiento de microalgas por sofocamiento, lo cual consiste en utilizar un volumen de un medio de cultivo determinado y agregarle un 5 % del compuesto agar agar en relación al volumen

utilizado. Por ejemplo, para el caso de esta investigación, se usó 100 ml de Medio CHU 10, para luego pesar 5 g de agar, los cuales se proceden a mezclar en solución, siendo expuestos al calor con la ayuda de un mechero bunsen y unas pinzas metálicas hasta homogenizar.



Figura 24. Preparación del medio de cultivo con agar agar.

Fuente: Propia

Dicha mezcla que contiene el compuesto agar agar, se encontrará en estado líquido en temperaturas superiores a los 80 °C, y es por esta razón que se lleva a un calentamiento previo, para facilitar la disolución. Asimismo, cabe mencionar que se debe tener mucho cuidado para que dicha mezcla no llegue a la ebullición, debido a que podría ocasionar una efervescencia que echaría a perder el resultado.

Una vez disuelta y homogenizada, la mezcla resultante entre el medio CHU 10 y el compuesto de agar agar, se procedió a verter en diferentes placas Petri hasta tener una película delgada de no más de 2 o 3 cm, para luego, tapar dicha placa con su

contraparte para dejar enfriar por 4 horas, tiempo en que esta solución llega a los 40 °C y comienza a solidificarse.



Figura 25. Vertimiento de la solución en placas Petri.

Fuente: Propia

Posteriormente, se trabajó en la zona de siembra de cultivos microalgales del laboratorio, donde con ayuda del mechero bunsen, se crea un área de calor para garantizar una zona de trabajo estéril cerca a la flama; luego, con la ayuda de un asa de platino se realizó la siembra acorde a los protocolos de cultivos microbiológicos, en donde, primero se calentó dicha asa de platino al fuego hasta que el metal tome un color naranja incandescente, para prontamente llevar esta misma asa caliente al matraz Erlenmeyer que contiene las microalgas en un medio líquido, donde se revolverá un poco para asegurarnos que algunas células queden adheridas al asa de platino, a fin de llevarlas a la placa Petri con el medio de cultivo con agar para raspar en líneas paralelas una y otra vez. Dicho procedimiento se repetirá varias veces., para luego cerrar las placas Petri y finalmente, se dejarán en una zona temperada con exposición de luz durante 8 a 10 días.



Figura 26. Calentamiento del aza de platino previo a realizar el sembrado.

Fuente: Propia



Figura 27. Sembrado de microalgas en la placa de agar agar.

Fuente: Propia

Consecutivamente, luego de este tiempo se podrá observar el crecimiento celular de las colonias de microalgas en el medio solido mostrándose como una mancha verde en la placa de agar. Asimismo, cabe mencionar que con este procedimiento teóricamente se debería haber eliminado a los protozoarios, ciliados y otros organismos que son físicamente más pequeños que las microalgas, y que, a su vez,

son difíciles de retirar del medio de cultivo. Al respecto, este procedimiento fue verificado a través de la observación en el microscopio, tomando una muestra con el asa de platino caliente y raspando ligeramente la colonia de microalgas desarrollada en la placa de agar, para luego, diluir esta muestra en una gota con la ayuda de una pipeta Pasteur en una porta objetos. Al observar dicha muestra no se evidencio la presencia de zooplancton u otros organismos que podrían perjudicar el posterior cultivo, por lo que, el aislamiento fue exitoso.



Figura 28. Vista de la población algal al microscopio.

Fuente: Propia



Figura 29. Colonia de *Scenedesmus dimorphus* en la muestra tomada.

Fuente: Propia

Finalmente, luego de conseguir el aislamiento exitoso, se procedió mediante la ayuda del asa de platino en la placa de agar, para a repicar una muestra y sembrarla en una batería de tubos de ensayo, los cuales contienen 2 ml de medio CHU 10 cada uno; para luego, a los 5 días ver que las microalgas ya habrán proliferado, y proceder con la siguiente etapa de aislamiento para la obtención del cultivo axénico.



Figura 30. Batería de tubos de ensayo con microalgas sembradas en el medio CHU 10.

Fuente: Propia

3.6.3.4. Aislamiento por dilución de organismos fitoplanctónicos

En esta etapa se realizó un procedimiento de diluciones consecutivas, el cual se hizo en una porta objetos puesta en observación en el microscopio compuesto a 40x de aumento.

Con ayuda de una pipeta Pasteur mediante goteos se realizaron diluciones en donde se lleva las células de microalgas de una misma especie a gotas de medio CHU 10 sin ninguna célula en su interior. Cada vez que se obtuvieron gotas con únicamente la microalga de interés para esta investigación, *Scenedesmus dimorphus*, se llevó estas

a un beacker que contenga 20 ml de medio de cultivo tapado con papel metálico en la parte superior.



Figura 31. Proceso de aislamiento de microalgas por dilución.

Fuente: Propia

Este procedimiento se realizó de manera consecutiva, hasta obtener una cantidad de células de *Scenedesmus dimorphus* suficiente para iniciar un cultivo axénico, donde expresamente solo exista este microorganismo en su interior.

Finalmente, el volumen que contiene el resultado del aislamiento por los diferentes métodos descritos líneas arriba, se almacena en una zona estéril para su posterior siembra en el laboratorio.

3.6.3.5. Obtención de cultivo axénico

La cepa de microalgas obtenida se llevó a la zona de siembra, donde con ayuda de una pipeta de 1 ml y a la exposición de la flama del mechero bunsen, se procedió a tomar alícuotas de la microalga de 0,5 ml para realizar la siembra de esta en 10 tubos de ensayo que contenían 2 ml de medio CHU 10 en su interior.

Finalmente, se tapó estos tubos de ensayo con tapones de algodón estéril y se almaceno en una zona temporada con iluminación durante 21 días, que es el tiempo

en que la presencia de microalgas se puede apreciar a simple vista. Asimismo, dichos tubos deberán estar en constante supervisión, realizando la agitación manual de los mismos por lo menos dos veces al día, con el objetivo de que la biomasa algal en crecimiento, no se sedimente al fondo y, por consiguiente, se pierda la producción.

3.6.4. Cultivo de Microalgas

En esta etapa se describe el cultivo y crecimiento de la población de microalgas de la especie *Scenedesmus dimorphus*, desde su etapa inicial hasta llegar a la etapa exponencial de su ciclo biológico, a fin de conseguir una densidad estable y concentrada para los fines de la presente investigación.

3.6.4.1. Cultivos primarios

Luego de transcurridos los 21 días descritos anteriormente, los tubos de ensayo con biomasa algal, podrán denotar a simple vista una coloración verdosa concentrada que indicaría la presencia fortuita de la microalga en cuestión.



Figura 32. Población algal en crecimiento en la batería de tubos de ensayo.

Fuente: Propia

Consiguiente a esto, se procedió a realizar la siembra de cultivos primarios, lo cual se traduce a llevar a la población algal a un volumen mayor, con el objetivo de que la densidad de individuos aumente en un periodo de días.

Para lo descrito líneas arriba, se preparó 4 matraces Erlenmeyer de 100 ml con 30 ml de medio CHU 10, y adicionalmente, se procedió a trabajar en la zona de siembra del laboratorio, para lo cual se prendió el mechero bunsen, y en presencia de la flama, se realizaron los repiques a partir de los tubos de ensayo que contenían biomasa algal en desarrollo.



Figura 33. Repique de microalgas en zona en la zona de siembra del Laboratorio de Cultivos Menores.

Fuente: Propia

Se adicionó el volumen completo de 3 tubos de ensayo con microalgas a cada matraz Erlenmeyer que contenía el volumen del medio CHU 10, inmediatamente se

procedió a tapar cada matraz con un tapón de algodón esterilizado a fin de conservar el cultivo de microalgas aislado del medio exterior.

Consiguientemente, se realizó la agitación manual en círculos a cada matraz a fin de homogenizar el cultivo; y, por último, los matraces se colocaron en una zona estéril dentro del laboratorio con exposición a iluminación, para esperar un lapso de 10 días hasta que la densidad de biomasa algal incremente para el siguiente repique. Cabe mencionar que, durante este periodo, los cultivos deberán ser observados con una frecuencia de dos veces al día, y, a su vez, realizar la agitación manual para evitar la sedimentación de los individuos en crecimiento.



Figura 34. Matraces con microalgas en crecimiento dentro del cepario del Laboratorio de Cultivos Menores.

Fuente: Propia

Luego del mencionado periodo, se procede a hacer un desdoblamiento de las microalgas con el fin de incrementar el volumen de cultivo; para lo cual, se realizó el mismo procedimiento en la zona de siembra descrito líneas arriba, con la diferencia

de que esta vez se preparó 4 matraces Erlenmeyer de 500 ml con 250 ml de medio CHU 10 para el repique de la microalga. Cada matraz 100 ml con 30 ml microalga, fue vertido en los 250 ml de medio de cultivo preparados; del mismo modo, se procedió a tapar con un tapón de algodón estéril y a su almacenamiento en una zona inocua e iluminada. Asimismo, también se debe monitorear 2 veces al día y realizar la agitación manual que mantuvo la población algal dispersa por el medio líquido.

Finalmente, luego de 10 días más, este procedimiento se repitió otra vez, preparando 2 matraces Erlenmeyer de 1 litro con 700 ml de medio CHU 10, en los cuales se añadió 150 ml de microalga y se agregó oxigenación interna a través de una manguera delgada de plástico conectada a una bombilla de are, debido a que el volumen en cuestión es demasiado como para realizar la agitación manual como en los casos anteriores.

3.6.4.2. Cultivo exponencial

Luego de 12 días de realizado el ultimo desdoblamiento de la población de microalgas, se evidencio una concentración verdosa más densa en los matraces preparados.

Finalmente, se realizó el último repique, para lo cual se preparó dos botellas de plástico de 2500 ml con 1200 ml de medio CHU 10, donde se adicionó 500 ml de microalgas concentradas para su cultivo; las cuales, con la ayuda de la bombilla de aire fueron oxigenadas y mantenidas durante 14 días más que es donde llegó a su etapa exponencial, que es la etapa donde se evidencia la máxima producción de individuos por mililitro en cultivo, para quedarse en una etapa estacionaria, que es

donde dicho cultivo tiene a mantener una estabilidad productiva, siempre y cuando se mantengan las condiciones de movimiento, iluminación y requerimiento nutricional.



Figura 35. Botellas de plástico con población algal en la etapa de crecimiento exponencial.

Fuente: Propia

3.6.4.3. Conteo de Microalgas en la cámara Neubauer

Cuando la microalga cultivada ha alcanzado la mayor concentración de individuos, denotará una coloración mucho más intensa; por lo cual, se deduciría que la densidad celular ha aumentado. Y por eso, el método para corroborar dicha información con datos exactos se realiza el conteo con la cámara Neubauer.

Dicha cámara, se describe como una placa gruesa de cristal con forma de portaobjetos, de unos 30 x 70 mm de extensión y unos 4 mm de grosor. Asimismo, manifestar que en la zona central de la cámara es donde se realiza el conteo, la cual a

su vez se encuentra dividida en nueve cuadrículas que están subdivididas en otras pequeñas cuadrículas de 4x5 en las esquinas, y de 5x5 en la parte central.



Figura 36. Vista de la cámara Neubauer.

Fuente: Propia

El mecanismo de utilidad de esta cámara es tomar una muestra del cultivo que se desea monitorear, y depositar una gota de esta sobre la cámara Neubauer, exactamente sobre la cuadrilla con divisiones, para luego colocar una cubre objetos que facilite su visión al momento de llevar dicha muestra a observación en el microscopio a un aumento de 40x; para posteriormente, realizar un conteo de células existentes es cada cuadrado de la cuadrilla de la cámara. Estas divisiones permitirán tener un mayor control y facilidad para realizar el conteo celular de individuos presentes en una gota.



Figura 37. Vista de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en el microscopio con aumento 10.

Fuente: Propia



Figura 38. Vista de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en el microscopio con aumento 40 X

Fuente: Propia

Finalmente, para obtener un resultado más real, se hace uso de una fórmula matemática para saber cuántas células hay contenidas en 1 ml, la cual se detalla a continuación.

$$\text{Concentración (cel/ml)} = \frac{\text{Número de células contadas} \times 10000}{9}$$

Fuente: Laboratorio de cultivos menores

3.6.5. Preparación de medios contaminados para el bioensayo

El objetivo de la presente investigación es cuantificar la eficiencia de la microalga *Scenedesmus dimorphus* para absorber los iones metálicos del metal pesado Cadmio (+2) disueltos en un medio acuático simulado; por lo que, se requiere la preparación de medios contaminados en concentraciones conocidas dentro de un ambiente controlado para el desarrollo del bioensayo proyectado.

En ese sentido, se utilizó el reactivo Nitrato de Cadmio para la preparación de soluciones patrón con concentraciones de Cadmio conocidas, a fin de facilitar la preparación de nuevas soluciones de bajas concentraciones del metal pesado acorde a lo diseñado para el proyecto.

3.6.5.1. Dilución del Nitrato de Cadmio en solución patrón de 1000 ppm

Se procedió a calcular el peso molecular de este compuesto a partir de su fórmula química, a fin de conocer cuanta cantidad de soluto se requiere para la preparación de una solución patrón de 1000 ppm.

En una mol de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, se tiene un peso molecular de 236,42 g, por lo cual, se tiene una mol de Cadmio o 112,411 g del metal, entonces:

Para preparar una solución de 1000 ppm de Cadmio se tiene:

1000 ppm de Cd = 1000 mg Cd/ Litros de solución = 1 g Cd/ L solución, entonces:

$$[(1 \text{ g Cd}) / (\text{Litros de solución})] \times [(236,42 \text{ g Cd}(\text{NO}_3)_2 / 112,411 \text{ g Cd})]$$

$$\diamond 2,10 \text{ g Cd}(\text{NO}_3)_2 / 1000 \text{ ml}$$

Para preparar una solución de 1000 ppm de Cd se debe pesar 2,10 g de Nitrato de Cadmio y disolverlo en 1000 ml de agua destilada químicamente pura.

En ese sentido, se pesó 2,10 g de Nitrato de Cadmio en un beacker de vidrio de 50 ml con la ayuda de la balanza analítica del Laboratorio de Cultivos Menores; para posteriormente, adicionarle agua destilada y mover la solución con una bagueta estéril hasta disolver. Dicha mezcla, se vertió en una fiola de un litro de capacidad, por lo

que fue necesario completar dicho volumen adicionando agua destilada enjuagando el beacker que se utilizó inicialmente repetidas veces.

Finalmente, se tapó la fiola y se almacenó en el refrigerador del laboratorio para usarla posteriormente, cuando se requiera.

3.6.5.2. Cálculos químicos para el desdoblamiento de Nitrato de Cadmio en soluciones de concentraciones menores de 10 y 1 ppm

Para la preparación de disoluciones de concentración menor, a partir de la solución patrón de cadmio de 1000 ppm; se utilizó la fórmula de dilución para hallar el volumen que se debe utilizar de la solución patrón con una determinada concentración inicial al conocer la concentración final esperada y el volumen que se desea preparar, para lo cual se tiene:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

C_1 = Concentración inicial

V_1 = Volumen inicial

C_2 = Concentración final

V_2 = Volumen final

Por cuestiones de mayor facilidad en el manejo y la preparación de medios contaminados con una concentración muy baja del metal pesado Cadmio (+2), se

decidió preparar dos disoluciones con valores de 10 y 1 ppm respectivamente. Por lo cual se realizaron los siguientes cálculos:

- A partir de una solución patrón de 1000 ppm, preparar una solución de 10 ppm en 500 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 10 \text{ ppm de Cd} \times 500 \text{ ml}$$

$$V_1 = 5 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 1000 ppm es de 5 ml para obtener una concentración de 10 ppm en 500 ml.

- A partir de una solución patrón de 1000 ppm, preparar una solución de 1 ppm en 500 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 1 \text{ ppm de Cd} \times 500 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 1000 ppm es de 0,5 ml para obtener una concentración de 1 ppm en 500 ml.

En ese sentido, al haber realizado los cálculos químicos necesarios para desdoblarse la solución patrón de 1000 ppm en dos disoluciones de menor concentración, lo siguiente que se realizó fue la preparación en el laboratorio de dichas disoluciones para su uso en la parte experimental del proyecto.

Para esto, fue necesario utilizar 2 fioles estériles de 500 ml, en las cuales, se adicionó con ayuda de una pipeta los volúmenes calculados líneas arriba de la solución patrón para la preparación de las disoluciones de 10 y 1 ppm respectivamente.

Finalmente, se enrazó las fioles con agua destilada estéril, a fin de completar los volúmenes deseados para la preparación de estas disoluciones; al respecto, ambas fueron tapadas y almacenadas en el refrigerador para su uso posterior.

3.6.5.3. Cálculos químicos para la preparación de medios contaminados para los bioensayos

Para fines de la investigación, se determinó trascendente para el desarrollo del bioensayo considerar concentraciones del metal pesado Cadmio (+2), valores cercanos a lo establecido en los Estándares de la Calidad Ambiental (ECA) para el agua, aprobado mediante Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM, donde en la Categoría 2: Extracción, cultivo y otras actividades marino costeras y continentales, se tiene como Límite Máximo Permisible (LMP), la concentración de 0,01 mg/l de dicho metal; por lo cual, se realizaron los siguientes cálculos para la preparación de las disoluciones:

- A partir de una solución patrón de 10 ppm, preparar una disolución de 0,1 ppm en 150 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 0,1 \text{ ppm de Cd} \times 150 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 10 ppm es de 1,5 ml para obtener una concentración de 0,1 ppm en 150 ml.

- A partir de una solución patrón de 1000 ppm, preparar una disolución de 1 ppm en 150 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 1 \text{ ppm de Cd} \times 150 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 1000 ppm es de 0,15 ml para obtener una concentración de 1 ppm en 150 ml.

- A partir de una solución patrón de 1000 ppm, preparar una disolución de 10 ppm en 150 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1000 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 10 \text{ ppm de Cd} \times 150 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 1000 ppm es de 1,5 ml para obtener una concentración de 10 ppm en 150 ml.

- A partir de una solución de 1 ppm, preparar una disolución de 0,01 ppm en 150 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$1 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 0,01 \text{ ppm de Cd} \times 150 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 1 ppm es de 1,5 ml para obtener una concentración de 0,01 ppm en 150 ml.

- A partir de una solución de 10 ppm, preparar una disolución de 0,05 ppm en 150 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 0,05 \text{ ppm de Cd} \times 150 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,75 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 10 ppm es de 0,75 ml para obtener una concentración de 0,05 ppm en 150 ml.

- A partir de una solución de 10 ppm, preparar una disolución de 0,15 ppm en 150 ml:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10 \text{ ppm de Cd} \times V_1 = 0,15 \text{ ppm de Cd} \times 150 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2,25 \text{ ml}$$

Interpretación: El volumen a utilizar de la solución patrón de 10 ppm es de 2,25 ml para obtener una concentración de 0,15 ppm en 150 ml.

Al respecto, luego de realizar los cálculos químicos necesarios para la preparación de disoluciones de menor concentración para la simulación de medios contaminados con Cadmio (+2), se realizaron las acciones correspondientes en el laboratorio a fin de tener preparados los medios contaminados para la ejecución de los bioensayos.

Para esto, fue necesario utilizar matraces Erlenmeyer estériles de 350 ml, en los cuales, se adicionó con ayuda de una pipeta los volúmenes calculados líneas arriba de las soluciones de Cadmio (+2) de concentraciones conocidas para la preparación de las disoluciones calculadas anteriormente. Esta acción para cada concentración, se realizó por triplicado, a fin de tener mayor confiabilidad en los resultados correspondientes.

Posteriormente, se adicionó agua destilada estéril, a fin de completar los volúmenes deseados de 150 ml en total para la preparación de estas disoluciones; consiguientemente, en todos los casos, los matraces fueron tapados con tapones de algodón esterilizados previamente.

Finalmente, los medios contaminados preparados fueron almacenados en la zona estéril del Laboratorio de Cultivos Menores de la FOPCA-UNFV, para su posterior uso en la realización de la siembra de la población algal a ser expuesta a los bioensayos proyectados.

3.6.6. Bioensayos

Se realizaron dos bioensayos, en donde la población cultivada en condiciones controladas en el Laboratorio, fue expuesta a diferentes concentraciones del metal pesado Cadmio (+2) por periodos de tiempo establecidos, a fin de medir la eficiencia

la microalga *Scenedesmus dimorphus* para remover los iones metálicos disueltos en los medios acuáticos contaminados que fueron simulados en la presente investigación.

3.6.6.1. Bioensayo preliminar

El bioensayo preliminar fue dispuesto para cuantificar la toxicidad del contaminante elegido al exponer a la población algal seleccionada a una prueba de 48 horas a concentraciones conocidas del contaminante y una muestra en blanco por triplicado.

Las concentraciones establecidas para este bioensayo fueron: 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm y una muestra en blanco para observar el comportamiento de los sujetos de prueba ante estas concentraciones, a fin de calibrar con mayor precisión las concentraciones para el bioensayo final, afín de que, la población algal pueda resistir la exposición para cuantificar su eficiencia en la remoción de iones metálicos del metal pesado elegido para esta investigación.

En los medios contaminados que se prepararon anteriormente, acorde a las concentraciones dispuestas para el bioensayo preliminar, se sembró por triplicado un inóculo de microalga concentrada de 30 ml, para luego homogenizar de forma manual.

Se contó con tres replicas para cada concentración de medios contaminados de Cadmio (+2), en los cuales se realizó el control de los parámetros de temperatura y potencial de hidrogeno (pH); así como, el conteo de células en la cámara Neubauer

cada 24 horas, es decir a las 0 horas, 24 horas y 48 horas; que fue, la duración total del bioensayo preliminar.



Figura 39. Vista de la población algal expuesta al bioensayo preliminar.

Fuente: Propia

Se tomó nota de los resultados obtenidos para cada medición realizada; posteriormente, se desechó los contenidos de los matraces Erlenmeyer, y se realizó la limpieza y esterilización del material utilizado.

3.6.6.2. Bioensayo final

En el bioensayo final fue dispuesto un rango de concentraciones más específicas, en donde se tuvo como base central la relación entre dos aspectos; el primero, los resultados del bioensayo preliminar, en donde se pudo apreciar que la exposición al Cadmio (+2), es altamente tóxica y nociva aún en bajas concentraciones; y el segundo; el ECA para agua con relación al metal en mención. Por lo que, se vio conveniente proyectar un rango que involucre ambos aspectos, a fin de tener la mayor eficiencia en los resultados.

Se dispuso utilizar cinco concentraciones, las cuales fueron: 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,15 ppm y una muestra en blanco para observar el comportamiento de los sujetos de prueba ante estas concentraciones, durante el periodo de 96 horas.

El objetivo de este bioensayo, a diferencia del preliminar, fue observar el comportamiento de la población algal ante concentraciones específicas más tolerables, durante un periodo más prolongado; para así, las microalgas puedan adaptarse al medio acuático contaminado absorbiendo los iones metálicos en disolución; siendo este proceso, una suerte de biorremediación al momento de su cosecha.

Se contó con tres replicas para cada concentración de medios contaminados con Cadmio (+2), en los cuales se realizó el control de los parámetros de temperatura y potencial de hidrogeno (pH); así como, el conteo de células en la cámara Neubauer a las 0 horas, 24 horas, 48 horas y 96 horas; que fue la duración total del bioensayo final.



Figura 40. Vista de la población algal expuesta al tratamiento final.

Fuente: Propia

Se tomó nota de los resultados obtenidos para cada medición realizada; posteriormente, se desechó los contenidos de los matraces Erlenmeyer, y se realizó la limpieza y esterilización del material utilizado.

3.6.6.3. Cosecha de biomasa y fijación de muestras

Inmediatamente, luego de finalizar la ejecución del bioensayo final, se procedió a separar la biomasa algal que fue expuesta al tratamiento, mediante la cosecha de esta, con la ayuda de papel filtro Whatman N^o 32 dispuesto de forma cónica en un embudo de vidrio estéril, vertiendo el contenido de cada medio contaminado, en un nuevo matraz de 350 ml estéril; lo descrito, se realizó con el objetivo de separar la población de microalgas del medio líquido, debido a que teóricamente al retirar dicha biomasa, se estaría retirando la concentración de iones metálicos absorbida por estas, dejando únicamente en el medio líquido la concentración de Cadmio (+2) que no pudo ser removida mediante el tratamiento desarrollado.



Figura 41. Cosecha de microalgas luego del bioensayo final.

Fuente: Propia



Figura 42. Vista de la cosecha de microalgas en diferentes matraces de prueba

Fuente: Propia

Posteriormente, luego de realizar la cosecha, a los medios líquidos puros, desprovistos de la población algal, se les añadió 5 mililitros de Ácido Nítrico (HNO_3) y se revolvió manualmente para homogenizar, con el objetivo de que el ácido, destruya cualquier residuo biológico que haya quedado resultante del procedimiento anterior; y así, quedar únicamente los iones metálicos de Cadmio (+2) en disolución.



Figura 43. Vista de las muestras luego de la cosecha previa aplicación del Ácido Nítrico.

Fuente: Propia



Figura 44. Aplicación de Ácido Nítrico a las muestras cosechadas.

Fuente: Propia

Dichas muestras finales, fueron tapadas con tapones de algodón estéril y puestas en reposo durante dos semanas, tiempo prudente para que el ácido nítrico hiciera efecto sobre las muestras, quedando estas fijadas para su posterior análisis en el espectrofotómetro y determinar la concentración de Cadmio (+2) residual luego del tratamiento realizado.



Figura 45. Muestras fijadas con Ácido Nítrico.

Fuente: Propia



Figura 46. Vista de las muestras trabajadas en los bioensayos.

Fuente: Propia



Figura 47. Vista del trabajo de laboratorio en los bioensayos realizados.

Fuente: Propia

3.6.7. Análisis de absorción atómica en el espectrofotómetro

El análisis por espectrofotometría de absorción atómica es un método instrumental de la química analítica que permite cuantificar la concentración específica de un determinado elemento contenido en una solución. Dicho análisis fue realizado en el Laboratorio de Contaminación Ambiental de la FOPCA-UNFV, con la utilización del espectrofotómetro y la aplicación del software GBC Avanta Ver 2.02 para el análisis de datos y el desarrollo de la hoja de reporte de resultados.

3.6.7.1. Preparación de equipo

Este procedimiento contó con dos fases, la primera, la preparación física del equipo, donde se realizaron las conexiones necesarias para el funcionamiento del mismo, entre las cuales se realizó la conexión de la campana extractora, así como las conexiones eléctricas y la conexión del equipo a la computadora para el registro de información; y la segunda, donde a través de la computadora se ejecutó el software y se aplicaron las configuraciones necesarias para el análisis.

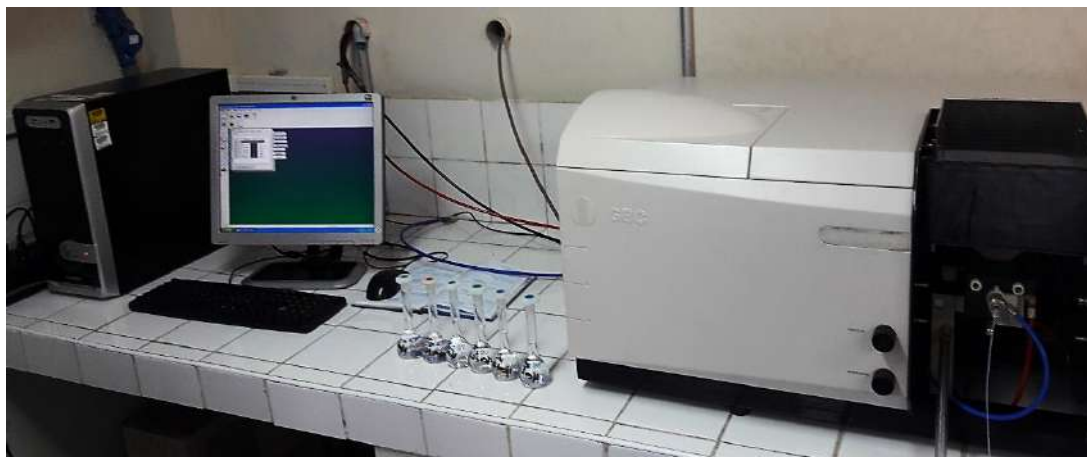


Figura 48. Vista de la zona de trabajo para el análisis espectrofotométrico.

Fuente: Propia

El software cuenta con tres longitudes de onda para la realización del análisis, para lo cual en su interfaz tiene las opciones donde se puede elegir con que longitud se desea trabajar; las cuales son las siguientes: i) Baja = 228,80, que mide concentraciones desde 0,01 mg/l hasta 1,8 mg/l; ii) Media = 326,1, que mide concentraciones desde 3 mg/l hasta 800 mg/l; y iii) Alta = 3,56, que mide concentraciones superiores a los 800 mg/l; en ese sentido, para fines de la presente investigación, se eligió la longitud de onda baja (228,80) por las bajas concentraciones con las que se trabajaría.

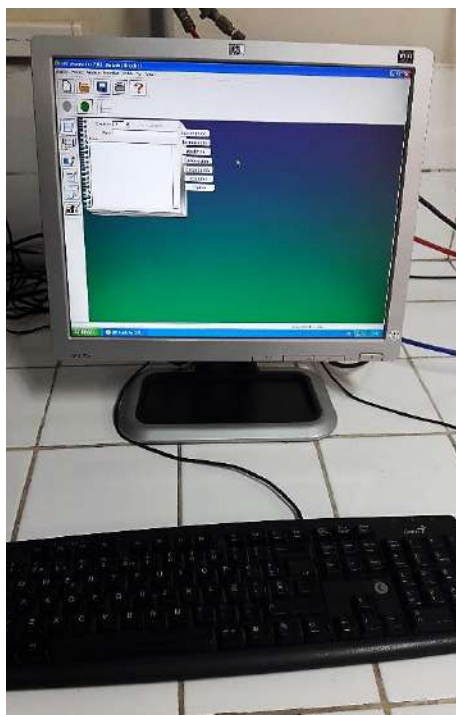


Figura 49. Vista de la interfaz del software GBA Avanta Ver. 2.02.

Fuente: Propia

Posteriormente, se prosiguió con las configuraciones correspondientes, donde se dispuso en el software el metal con el cual se iba a trabajar (Cadmio) para hacer las lecturas, y se determinó que el ancho de espectro adecuado para la medición de

concentraciones del metal era de 0,50 nanómetros; además, se dispuso que por cada muestra se realizarían tres lecturas (replicas) al mismo tiempo, y que el software automáticamente arrojaría un promedio de los valores obtenidos.

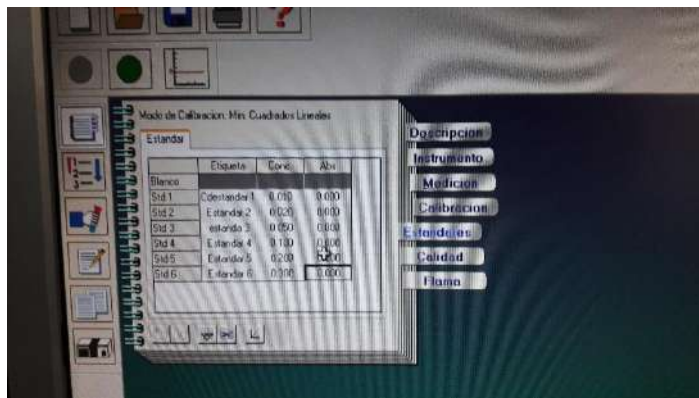


Figura 50. Configuración de parámetros para el análisis espectrofotométrico.

Fuente: Propia

Finalmente, en el software, se realizó la configuración del rango de concentraciones que se deseaba analizar. Para esto, se establecieron cinco soluciones estándar (0,01 ppm, 0,02 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm y 0,2 ppm) y un blanco (0 ppm); las cuales fueron ingresadas a la tabla de datos donde se establecía el rango de sensibilidad que iba a tener el análisis.

3.6.7.2. Calibración de equipo

En esta etapa se procedió a desarrollar la curva de calibración para el metal pesado Cadmio, donde se procedió a preparar disoluciones con las concentraciones anteriormente mencionadas a partir de una solución patrón de 1000 ppm; para esto, se realizó en primera instancia, la preparación de una disolución de 1 ppm para fines de practicidad y manejo, además de tener un menor rango de error en las lecturas.



Figura 51. Solución patrón de Cadmio de 1000 ppm.

Fuente: Propia

Se utilizó el mismo procedimiento descrito en numerales anteriores para la preparación de la solución de 1 ppm en 50 ml de agua destilada estéril; y al mismo tiempo, a partir de dicha disolución, se preparó las soluciones estándar (0,01 ppm, 0,02 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm y 0,2 ppm) necesarias para la lectura.



Figura 52. Preparación de las soluciones estándar para la curva de calibración

Fuente: Propia

Asimismo, cabe mencionar que se debe tener mucha exactitud en la preparación de las soluciones estándar, debido a que, al realizar la lectura en el espectrofotómetro, el mismo equipo indicará si los valores arrojados son confiables, y, por ende, si el procedimiento de calibración fue bien realizado; ya que, automáticamente el software realizará una regresión lineal de los datos obtenidos para analizar la correlación entre ellos, donde el R, no puede ser inferior a 0,99, valor que indicará la buena realización de este procedimiento.



Figura 53. Análisis de soluciones estándar para calibrar del equipo.
Fuente: Propia

3.6.7.3. Lectura de muestras

Teniendo preparado el equipo, tanto en sus requerimientos físicos como en las configuraciones necesarias del software, y habiendo realizado la calibración del mismo para la lectura del metal pesado Cadmio; se procedió a llevar a lectura las muestras que fueron almacenadas luego de la realización del bioensayo final, con el

objetivo de determinar la concentración de iones metálicos de Cadmio (+2) que aún se encuentran en disolución luego del tratamiento.



Figura 54. Ejecución del software para lectura de muestras.

Fuente: Propia

Todo el procedimiento para la lectura de muestras, se ejecuta desde el software instalado en la computadora del laboratorio, por lo cual se le dio la orden al equipo de iniciar el proceso de análisis; para esto, procedió a prender la flama del espectrofotómetro para que pase a través de ella el haz de luz emitido por la lámpara de cátodo hueco con la longitud de onda establecida, a fin de se pueda medir la absorbancia de la luz en la muestra líquida que fue succionada por el capilar que se introdujo en el matraz Erlenmeyer, que contenía el medio contaminado utilizado en el bioensayo final, junto con el volumen de ácido nítrico utilizado para la conservación de la misma.



Figura 55. Vista de la flama del espectrofotómetro en operación.

Fuente: Propia

El mismo procedimiento fue realizado para cada muestra, cabe mencionar que, entre cada lectura, el capilar debió ser enjuagado con agua destilada varias veces, para que no exista contaminación entre las lecturas; asimismo, manifestar que cada muestra fue codificada en el software, a fin de que la recopilación de datos sea precisa y ordenada.



Figura 56. Vista de las muestras del bioensayo final a ser analizadas

Fuente: Propia



Figura 57. Vista de operación del equipo al realizar las lecturas.

Fuente: Propia

Por último, al finalizar el análisis de todas las muestras, se procedió a apagar la llama, ejecutando la orden desde el software, y apagando el equipo para desconectar los cables y componentes que se utilizaron en la preparación del mismo.

3.6.7.4. Hoja de reporte de resultados

Finalmente, luego de realizar el análisis de espectrofotometría, el software arrojó automáticamente los resultados obtenidos en una hoja de reporte de resultados, la cual es una tabla de datos, en la cual se presentaba información consolidada referente a las pruebas realizadas.

Etiqueta	Conc	Abs	RSD	Rep
Análisis : C:\Archivos de programa\GBC Avanta Ver 2.02\Análisis				
Metodo Cd				
Calibración Completa				
Cal Blanco	—	0.000	Alto	3
Cdestandar 1	0.010	0.006	10.89	3
Estandar 2	0.020	0.011	4.43	3
estanda 3	0.050	0.026	2.84	3
Estandar 4	0.100	0.053	0.23	3
Estandar 5	0.200	0.104	1.28	3
Muestra 1	0.020	0.011	6.97	3
Muestra 2	0.023	0.013	12.05	3

Figura 58. Vista de la hoja de reporte de resultados del software.

Fuente: Propia

Asimismo, cabe mencionar, que, en dicha hoja de reporte de resultados, también se apreció la regresión lineal realizada por el software, lo cual indicó un R equivalente a 0,99, que denotaría una correlación correcta entre los resultados obtenidos y la confiabilidad del análisis desarrollado.



Figura 59. Vista del espectrofotómetro utilizado durante el procedimiento.

Fuente: Propia

3.7. Análisis de datos

Para el procesamiento de datos se utilizó el método estadístico de análisis de la varianza para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, posteriormente realizando la prueba F para verificar la hipótesis planteada. Asimismo, para la realización de gráficos de líneas de tendencia se empleó Excel 2016.

IV. Resultados

4.1. Recolección de la muestra

La muestra recolectada del estanque de crianza de Tortugas acuáticas contenía diversos organismos biológicos entre los cuales destacaban diferentes especies de fitoplancton y zooplancton de agua dulce.

Entre los géneros de microalgas mas importantes figuran *Chlorella sp*, *Scenedesmus sp*, *Ankistrodesmus sp*, *Chroococcus sp*, etc. Mientras que en el zooplancton fueron identificados géneros de rotíferos, protozoarios y algunos ciliados.

Luego de utilizar diferentes técnicas de aislamiento, la especie de microalga que se definió para realizar el presente estudio fue *Scenedesmus dimorphus* debido a la gran adaptabilidad que presenta esta especie a diferentes condiciones de cultivo.

4.2. Cultivo inicial

En esta etapa se inició el cultivo en agua dulce, el cual fue detallado en el capítulo anterior, de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus*. Este cultivo tuvo el objetivo de desarrollar una población algal hasta llevarla a su etapa exponencial, el periodo tuvo una duración de 27 días en los cuales se monitoreo los parámetros físico-químicos más importantes y como el monitoreo biológico realizando conteos celulares para conocer la densidad del cultivo durante su desarrollo.

- **Parámetros físico-químicos medidos**

Los parámetros físico-químicos medidos que fueron considerados de importancia para el desarrollo del cultivo son temperatura, potencial de hidrogeno y salinidad, los cuales fueron medidos con una frecuencia de 2 días para cada monitoreo que fue

realizado a las 10 horas con la mayor exactitud posible. En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos durante los 27 días de duración que tuvo el cultivo inicial, con respecto a los parámetros físico-químicos monitoreados durante esta etapa.

Tabla 10.

Parámetros físico-químicos medidos durante el cultivo inicial.

FECHA	HORA a.m.	TEMP. °C	PH	SALINIDAD ppm
7/05/2018	10:00	24,0	6,8	0,2
9/05/2018	10:00	22,2	7,0	0,1
11/05/2018	10:00	22,7	7,1	0,1
13/05/2018	10:00	22,5	7,0	0,1
15/05/2018	10:00	24,8	7,2	0,2
17/05/2018	10:00	22,0	7,1	0,1
19/05/2018	10:00	22,6	7,0	0,1
21/05/2018	10:00	22,8	7,1	0,2
23/05/2018	10:00	23,1	7,1	0,1
25/05/2018	10:00	24,9	6,9	0,2
27/05/2018	10:00	22,7	7,2	0,1
29/05/2018	10:00	24,0	6,9	0,1
31/05/2018	10:00	23,2	7,2	0,1
2/06/2018	10:00	24,4	6,8	0,1
	PROMEDIOS	23,3	7,0	0,1

Fuente: Autoría propia

Interpretación:

La fluctuación de valores durante el periodo de cultivo que fue 27 días no fue significativa, arrojando un valor máximo de temperatura de 24,9 °C y uno mínimo de 23,3 °C, teniendo un promedio de 23,3 °C durante la etapa de cultivo. De la misma manera el pH tuvo un valor máximo de 7,2 y un mínimo de 6,8, con un promedio de

valor 7. La medición de salinidad no fue relevante, debido a que la investigación se da en medios de cultivo de agua dulce teniendo valores entre 0,2 y 0,1 ppm, por lo cual se decidió no monitorear este parámetro en las acciones posteriores.

4.2.1. Producción obtenida

La producción también fue monitoreada con una frecuencia de cada dos días, a las 11 horas con la mayor exactitud posible, el conteo de células fue realizado con la cámara Neubauer cuyo protocolo de uso fue detallado en el capítulo anterior.

En la tabla 11 se presentan los datos obtenidos durante los 27 días de duración que tuvo el cultivo inicial, con respecto a la cantidad de células por mililitro que se encontraron en los conteos celulares durante esta etapa.

Tabla 11.

Cantidad de células/ml encontradas en los conteos durante el cultivo inicial

FECHA	HORA am	Número de día	Cantidad cel/ml
7/05/2018	11:00	1	13 331
9/05/2018	11:00	3	24 777
11/05/2018	11:00	5	84 672
13/05/2018	11:00	7	120 443
15/05/2018	11:00	9	677 777
17/05/2018	11:00	11	1 988 334
19/05/2018	11:00	13	4 567 544
21/05/2018	11:00	15	6 620 133
23/05/2018	11:00	17	7 111 113
25/05/2018	11:00	19	7 465 655
27/05/2018	11:00	21	7 639 212
29/05/2018	11:00	23	7 542 232
31/05/2018	11:00	25	7 571 625
2/06/2018	11:00	27	7 580 322

Fuente: Autoría propia

Interpretación:

El cultivo durante la primera semana tuvo un crecimiento mínimo, luego este alcanzó el inicio de su etapa exponencial al día 9 donde la cantidad de microalgas se elevó rápidamente hasta el día 20 aproximadamente, que es donde llega a la etapa estacionaria y se mantiene estable la producción máxima de células en el cultivo.

En la figura 60 se presenta la curva de crecimiento durante los 27 días de cultivo.

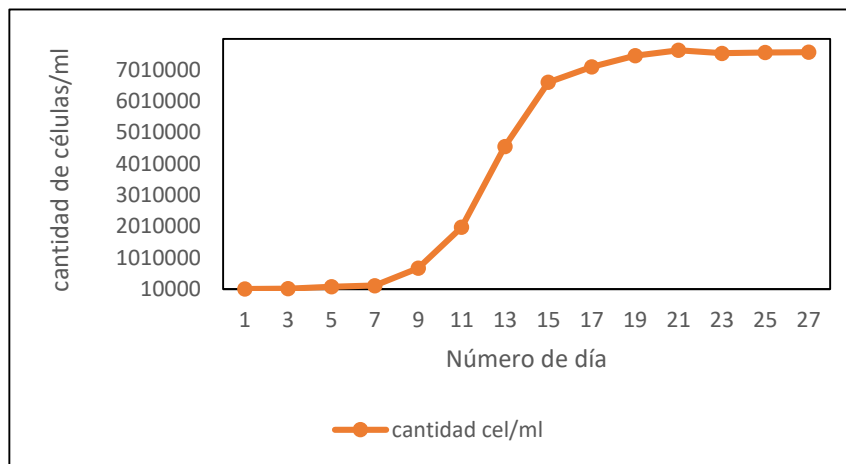


Figura 60. Curva de crecimiento durante el cultivo inicial.

Fuente: Propia

4.3. Ensayos preliminares

Los ensayos preliminares fueron desarrollados para cuantificar la toxicidad del contaminante elegido exponiendo a las microalgas a una prueba de 48 horas a concentraciones estándar del contaminante y una muestra en blanco.

En la Tabla 12 se presenta el diseño experimental planteado para el desarrollo de la investigación.

Tabla 12.

Diseño experimental básico con un tratamiento control y tratamientos con diferentes concentraciones de Cadmio

TRATAMIENTOS			
CC1 – CONTROL (0 ppm)	CC2 (0,1 ppm)	CC3 (1 ppm)	CC4 (10 ppm)
Muestra 1-1	Muestra 2-1	Muestra 3-1	Muestra 4-1
Muestra 1-2	Muestra 2-2	Muestra 3-2	Muestra 4-2
Muestra 1-3	Muestra 2-3	Muestra 3-3	Muestra 4-3

Fuente: Autoría propia

4.3.1. Control de parámetros físico-químicos a las 0, 24 y 48 horas del cultivo

Se monitoreo los parámetros físico-químicos de temperatura y pH con una frecuencia de 24 horas entre cada toma de datos. En la tabla 13 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 13.

Parámetros físico-químicos obtenidos a las 0, 24 y 48 horas del cultivo

Código de Concentración	Código de muestra	TEMP.				pH			
		°C							
		Horas			Promedio	Horas			Promedio
0	24	48		0	24	48			
CC1	M 1-1	23	22	24	23,0	6,8	7	7,3	7,0
	M 1-2	23	21,8	23,8	22,9	6,9	7,1	7,2	7,1
	M 1-3	23,2	22	24	23,1	7	7,2	7,3	7,2
CC2	M 2-1	23	22,1	24	23,0	6,9	7	7,2	7,0
	M 2-2	23,1	21,9	24,1	23,0	7	7	7,2	7,1
	M 2-3	22,9	22	23,9	22,9	6,9	7,1	7,2	7,1
CC3	M 3-1	23	22	24	23,0	6,9	7	7	7,0
	M 3-2	23,1	22,1	23,9	23,0	6,9	7,2	7,1	7,1
	M 3-3	23	21,9	24	23,0	7	7,1	7	7,0
CC4	M 4-1	22,8	22	24	22,9	6,9	6,8	6,8	6,8
	M 4-2	23,1	21,9	24	23,0	6,9	6,8	6,8	6,8
	M 4-3	23	22,1	23,9	23,0	7	6,8	6,8	6,9

Fuente: Autoría propia

Interpretación de promedios

La fluctuación en los promedios de temperatura no presento cambios significativos, debido a que las condiciones de cultivo se mantuvieron estables presentado valores promedio alrededor de los 23 °C.

Mientras que en los valores de pH existió estabilidad y preponderancia de los valores con inclinación alcalina, sin embargo, a mayor concentración del contaminante hubo una ligera caída en los valores del potencial de hidrogeno

presentando cierta acidez que podría deberse a situaciones de mortalidad de la población algal.

4.3.2. Resultados del conteo de células en la cámara Neubauer durante el ensayo preliminar

Se realizó monitoreos biológicos haciendo conteos en la cámara Neubauer con una frecuencia de 24 horas para cada muestra que se utilizó en los ensayos preliminares.

- **Resultados del cultivo preliminar a las 00 horas (inicio de la prueba)**

En la tabla 14 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 00 horas del cultivo.

Tabla 14.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas

TRATAMIENTOS							
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,1 ppm)		CC3 (1 ppm)		CC4 (10 ppm)	
M 1-1	1582	M 2-1	1541	M 3-1	1532	M 4-1	1583
M 1-2	1603	M 2-2	1590	M 3-2	1531	M 4-2	1527
M 1-3	1738	M 2-3	1723	M 3-3	1498	M 4-3	1578

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo preliminar a las 24 horas**

En la tabla 15 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 24 horas del cultivo.

Tabla 15.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas

TRATAMIENTOS							
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,1 ppm)		CC3 (1 ppm)		CC4 (10 ppm)	
M 1-1	1963	M 2-1	2023	M 3-1	1177	M 4-1	813
M 1-2	2057	M 2-2	2001	M 3-2	1153	M 4-2	787
M 1-3	1928	M 2-3	2062	M 3-3	1147	M 4-3	804

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo preliminar a las 48 horas (fin de la prueba)**

En la tabla 16 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 24 horas del cultivo.

Tabla 16.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas

TRATAMIENTOS							
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,1 ppm)		CC3 (1 ppm)		CC4 (10 ppm)	
M 1-1	2652	M 2-1	1443	M 3-1	497	M 4-1	476
M 1-2	2671	M 2-2	1480	M 3-2	519	M 4-2	452
M 1-3	2625	M 2-3	1494	M 3-3	565	M 4-3	483

Fuente: Autoría propia

4.3.3. Resultados de la densidad (número de células/ml) durante el ensayo preliminar

Se realizó monitoreos biológicos haciendo los cálculos para los estimados de densidad de cultivo a través de los valores obtenidos en los conteos en la cámara Neubauer con una frecuencia de 24 horas para cada muestra que se utilizó en los ensayos preliminares.

- **Resultados del cultivo preliminar a las 00 horas (inicio de la prueba)**

En la tabla 17 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 00 horas.

Tabla 17.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas

TRATAMIENTOS							
CC1 – CONTROL		CC2		CC3		CC4	
(0 ppm)		(0,1 ppm)		(1 ppm)		(10 ppm)	
M 1-1	1757778	M 2-1	1712222	M 3-1	1702222	M 4-1	1758889
M 1-2	1781111	M 2-2	1766667	M 3-2	1701111	M 4-2	1696667
M 1-3	1931111	M 2-3	1914444	M 3-3	1664444	M 4-3	1753333

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo preliminar a las 24 horas**

En la tabla 18 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 24 horas.

Tabla 18.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas

TRATAMIENTOS							
CC1 – CONTROL		CC2		CC3		CC4	
(0 ppm)		(0,1 ppm)		(1 ppm)		(10 ppm)	
M 1-1	2181111	M 2-1	2247778	M 3-1	1307778	M 4-1	903333
M 1-2	2285556	M 2-2	2223333	M 3-2	1281111	M 4-2	874444
M 1-3	2142222	M 2-3	2291111	M 3-3	1274444	M 4-3	893333

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo preliminar a las 48 horas (fin de la prueba)**

En la tabla 19 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 24 horas.

Tabla 19.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas

TRATAMIENTOS							
CC1 – CONTROL		CC2		CC3		CC4	
(0 ppm)		(0,1 ppm)		(1 ppm)		(10 ppm)	
M 1-1	2946667	M 2-1	1603333	M 3-1	552222	M 4-1	528889
M 1-2	2967778	M 2-2	1644444	M 3-2	576667	M 4-2	502222
M 1-3	2916667	M 2-3	1660000	M 3-3	627778	M 4-3	536667

Fuente: Autoría propia

4.3.4. Análisis de los resultados de los ensayos preliminares aplicando Análisis paramétrico para toda variación del tiempo.

Se realizó el análisis de la varianza para comparar varios grupos en una variable cuantitativa, posteriormente realizando la prueba F para verificar la hipótesis planteada.

En la tabla 20 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas.

Tabla 20.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	26713,667	3	8904,6		
Error	34741,33	8	4342,67	2,05	4,07
TOTAL	61455	11	-		

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es menor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se aprueba la hipótesis nula y se concluye que no existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 00 horas.

En la tabla 21 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas.

Tabla 21.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	3350012,92	3	1116671		
Error	11662,00	8	1457,8	766,02	4,07
TOTAL	3361674,92	11	-		(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 24 horas.

En la tabla 22 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas.

Tabla 22.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	9403904,25	3	3134634,8		
Error	5394,00	8	674,25	4649,06	4,07
TOTAL	9409298,25	11	-		(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 48 horas.

En la tabla 23 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas.

Tabla 23.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	32979773498,0	3	10993257832,7		
Error	42890409466,66	8	5361301183,3	2,05	4,07 (*)
TOTAL	7587018264,66	11	-		

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es menor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se aprueba la hipótesis nula y se concluye que no existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 00 horas.

En la tabla 24 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas.

Tabla 24.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F _{cal}	F _{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	4135820226955,00	3	1378606742318,3		
Error	14397671358,66	8	1799708919,8	766,02	4,07
TOTAL	4150217898313,67	11	-		(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 24 horas.

En la tabla 25 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas.

Tabla 25.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F _{cal}	F _{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	69841481218519,00	3	2328049373 9506,3		
Error	137882634955556,00	8	1723532936 9444,5	1,35	4,07
TOTAL	207724116174075,00	11	-		

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 48 horas.

4.4. Ensayos finales

Se realizó monitoreos biológicos haciendo conteos en la cámara Neubauer a las 00, 24, 48 y 96 horas para cada muestra que se utilizó en los ensayos finales. En la tabla 26 se presenta el diseño experimental planteado para el desarrollo de la investigación.

Tabla 26.

Diseño experimental básico con un tratamiento control y tratamientos con diferentes concentraciones de Cadmio

TRATAMIENTOS				
CC1 – CONTROL (0 ppm)	CC2 (0,01 ppm)	CC3 (0,05 ppm)	CC4 (0,1 ppm)	CC5 (0,15 ppm)
Muestra 1-1	Muestra 2-1	Muestra 3-1	Muestra 4-1	Muestra 5-1
Muestra 1-2	Muestra 2-2	Muestra 3-2	Muestra 4-2	Muestra 5-2
Muestra 1-3	Muestra 2-3	Muestra 3-3	Muestra 4-3	Muestra 5-3

Fuente: Autoría propia

- **Control de parámetros físico-químicos a las 0, 24, 48 y 96 horas del cultivo**

Se monitoreo los parámetros físico-químicos de temperatura y pH con una toma de datos a las 00, 24, 48 y 96 horas. En la tabla 27 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 27.

Parámetros físico-químicos obtenidos a las 0, 24, 48 y 96 horas del cultivo

Código de Concentración	Código de muestra	TEMP. °C					pH				
		Horas				Promedio	Horas				Promedio
		0	24	48	96		0	24	48	96	
CC1	M 1-1	23,2	22	23,9	24	23,3	6,9	7,1	7,2	7	7,1
	M 1-2	23,1	22	24	23,8	23,2	6,9	7	7,2	7,1	7,1
	M 1-3	23	22	24,1	24	23,3	7	7,1	7,2	7,2	7,1
CC2	M 2-1	23	22,1	24,1	24,1	23,3	6,9	7	7,1	7	7,0
	M 2-2	23,1	21,9	24,2	23,9	23,3	7	7,1	7,1	7	7,1
	M 2-3	23,1	21,9	24	24	23,3	7	7,2	7,2	7	7,1
CC3	M 3-1	23,1	22	24	24	23,3	6,9	7,1	7	7	7,0
	M 3-2	23	21,8	23,9	24	23,2	6,9	7,1	7,2	7,1	7,1
	M 3-3	23,1	22,1	23,9	23,9	23,3	6,9	7,1	7,2	7	7,1
CC4	M 4-1	23,2	22	24	24,1	23,3	6,9	7	7,2	7	7,0
	M 4-2	23	22	24	24	23,3	7	7,1	7,2	7	7,1
	M 4-3	23	21,9	24	24	23,2	6,9	7	7,2	7	7,0
CC5	M 5-1	23,1	22,1	23,9	24	23,3	6,9	7	7,3	7,1	7,1
	M 5-2	23,1	22	24	24	23,3	6,9	7	7,1	7	7,0
	M 5-3	23	22	24	23,9	23,2	7	6,9	7,2	7,1	7,1

Fuente: Autoría propia

Interpretación de promedios

La fluctuación en los promedios de temperatura no fue tan cambiante, debido a que las condiciones de cultivo se mantuvieron estables presentado valores promedio alrededor de los 23,3 °C.

Mientras que en los valores de pH existió estabilidad y preponderancia de los valores con inclinación alcalina, debido a que la población algal logro adaptarse a la presencia del contaminante en bajas concentraciones sin verse afectada.

4.4.1. Resultados del conteo de células en la cámara Neubauer durante el ensayo final

Se realizó monitoreos biológicos haciendo conteos en la cámara Neubauer a las 00, 24, 48 y 96 horas para cada muestra que se utilizó en los ensayos finales.

- **Resultados del cultivo final a las 00 horas (inicio de la prueba)**

En la tabla 28 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 00 horas del cultivo.

Tabla 28.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas

TRATAMIENTOS									
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,01 ppm)		CC3 (0,05 ppm)		CC4 (0,1 ppm)		CC5 (0,15 ppm)	
M 1-1	1568	M 2-1	1574	M 3-1	1641	M 4-1	1634	M 5-1	1678
M 1-2	1596	M 2-2	1580	M 3-2	1582	M 4-2	1615	M 5-2	1549
M 1-3	1699	M 2-3	1631	M 3-3	1522	M 4-3	1591	M 5-3	1676

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo final a las 24 horas**

En la tabla 29 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 24 horas del cultivo.

Tabla 29.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas

TRATAMIENTOS									
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,01 ppm)		CC3 (0,05 ppm)		CC4 (0,1 ppm)		CC5 (0,15 ppm)	
M 1-1	1953	M 2-1	2131	M 3-1	2183	M 4-1	1557	M 5-1	1507
M 1-2	1904	M 2-2	2135	M 3-2	2224	M 4-2	1529	M 5-2	1518
M 1-3	2065	M 2-3	2181	M 3-3	2203	M 4-3	1592	M 5-3	1497

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo final a las 48 horas**

En la tabla 30 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 48 horas del cultivo.

Tabla 30.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas

TRATAMIENTOS									
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,01 ppm)		CC3 (0,05 ppm)		CC4 (0,1 ppm)		CC5 (0,15 ppm)	
M 1-1	2571	M 2-1	1452	M 3-1	1772	M 4-1	1443	M 5-1	1078
M 1-2	2640	M 2-2	1433	M 3-2	1791	M 4-2	1510	M 5-2	1065
M 1-3	2607	M 2-3	1489	M 3-3	1787	M 4-3	1403	M 5-3	1088

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo final a las 96 horas (fin de la prueba)**

En la tabla 31 se presentan los resultados obtenidos por conteo celular en la cámara Neubauer a las 96 horas del cultivo.

Tabla 31.

Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 96 horas

TRATAMIENTOS									
CC1 – CONTROL (0 ppm)		CC2 (0,01 ppm)		CC3 (0,05 ppm)		CC4 (0,1 ppm)		CC5 (0,15 ppm)	
M 1-1	1653	M 2-1	828	M 3-1	603	M 4-1	510	M 5-1	356
M 1-2	1692	M 2-2	851	M 3-2	592	M 4-2	485	M 5-2	359
M 1-3	1652	M 2-3	835	M 3-3	609	M 4-3	488	M 5-3	354

Fuente: Autoría propia

4.4.2. Resultados de la densidad (número de células/ml) durante el ensayo final

Se realizó monitoreos biológicos haciendo los cálculos para los estimados de densidad de cultivo a través de los valores obtenidos en los conteos en la cámara Neubauer a las 00, 24, 48 y 96 horas para cada muestra que se utilizó en los ensayos finales.

- **Resultados del cultivo final a las 00 horas (inicio de la prueba)**

En la tabla 32 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 00 horas.

Tabla 32.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas

TRATAMIENTOS									
CC1		CC2		CC3		CC4		CC5	
CONTROL		(0,01 ppm)		(0,05 ppm)		(0,1 ppm)		(0,15 ppm)	
(0 ppm)									
M 1-1	1742222	M 2-1	1748889	M 3-1	1823333	M 4-1	1815556	M 5-1	1864444
M 1-2	1773333	M 2-2	1755556	M 3-2	1757778	M 4-2	1794444	M 5-2	1721111
M 1-3	1887778	M 2-3	1812222	M 3-3	1691111	M 4-3	1767778	M 5-3	1862222

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo final a las 24 horas**

En la tabla 33 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 24 horas.

Tabla 33.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas

TRATAMIENTOS									
CC1		CC2		CC3		CC4		CC5	
CONTROL		(0,01 ppm)		(0,05 ppm)		(0,1 ppm)		(0,15 ppm)	
(0 ppm)									
M 1-1	2170000	M 2-1	2367778	M 3-1	2425556	M 4-1	1730000	M 5-1	1674444
M 1-2	2115556	M 2-2	2372222	M 3-2	2471111	M 4-2	1698889	M 5-2	1686667
M 1-3	2294444	M 2-3	2423333	M 3-3	2447778	M 4-3	1768889	M 5-3	1663333

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo final a las 48 horas**

En la tabla 34 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 48 horas.

Tabla 34.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas

TRATAMIENTOS									
CC1		CC2		CC3		CC4		CC5	
CONTROL		(0,01 ppm)		(0,05 ppm)		(0,1 ppm)		(0,15 ppm)	
(0 ppm)									
M 1-1	2856667	M 2-1	1613333	M 3-1	1968889	M 4-1	1603333	M 5-1	1197778
M 1-2	2933333	M 2-2	1592222	M 3-2	1990000	M 4-2	1677778	M 5-2	1183333
M 1-3	2896667	M 2-3	1654444	M 3-3	1985556	M 4-3	1558889	M 5-3	1208889

Fuente: Autoría propia

- **Resultados del cultivo final a las 96 horas (fin de la prueba)**

En la tabla 35 se presentan los resultados obtenidos para la densidad del cultivo a las 96 horas.

Tabla 35.

Densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 96 horas

TRATAMIENTOS									
CC1		CC2		CC3		CC4		CC5	
CONTROL		(0,01 ppm)		(0,05 ppm)		(0,1 ppm)		(0,15 ppm)	
(0 ppm)									
M 1-1	1836667	M 2-1	920000	M 3-1	670000	M 4-1	566667	M 5-1	395556
M 1-2	1880000	M 2-2	945556	M 3-2	657778	M 4-2	538889	M 5-2	398889
M 1-3	1835556	M 2-3	927778	M 3-3	676667	M 4-3	542222	M 5-3	393333

Fuente: Autoría propia

4.4.3. Cuadro resumen de los ensayos finales y su representación gráfica

En la tabla 36 se presenta los promedios de los datos obtenidos para la densidad del cultivo durante los ensayos finales en las 96 horas de realización.

Tabla 36.

Cuadro resumen de promedios en la densidad del cultivo durante el ensayo final

Concentración de Cd(NO ₃) ₂ expresado en mg/l	Densidad de individuos/ml promedio para cada etapa de conteo durante el ensayo final			
	0 horas	24 horas	48 horas	96 horas
0	1801111	2193333	2895556	1850741
0,01	1772222	2387778	1620000	931111
0,05	1757407	2448148	1981481	668148
0,1	1792593	1732593	1613333	549259
0,15	1815926	1674815	1196667	395926

Fuente: Autoría propia

En la figura 61 se presenta la curva de crecimiento que tuvo la densidad de cultivo al ser expuesto al tratamiento control con una presencia de 0 mg/l del contaminante Cd(NO₃)₂ durante las 96 horas de duración que tuvo el ensayo final.

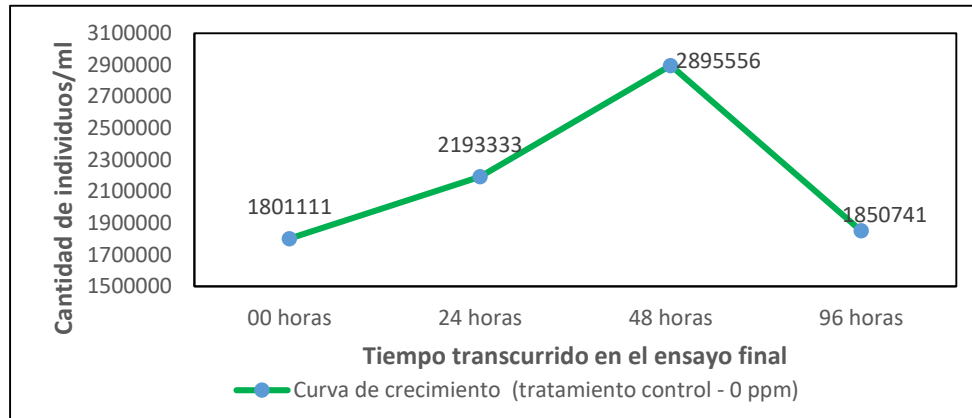


Figura 61. Curva de crecimiento para el tratamiento control durante el ensayo final.

Fuente: Propia

En la figura 62 se presenta la curva de crecimiento que tuvo la densidad de cultivo al ser expuesto al tratamiento CC2 con una presencia de 0,01 mg/l del contaminante Cd(NO₃)₂ durante las 96 horas de duración que tuvo el ensayo final.

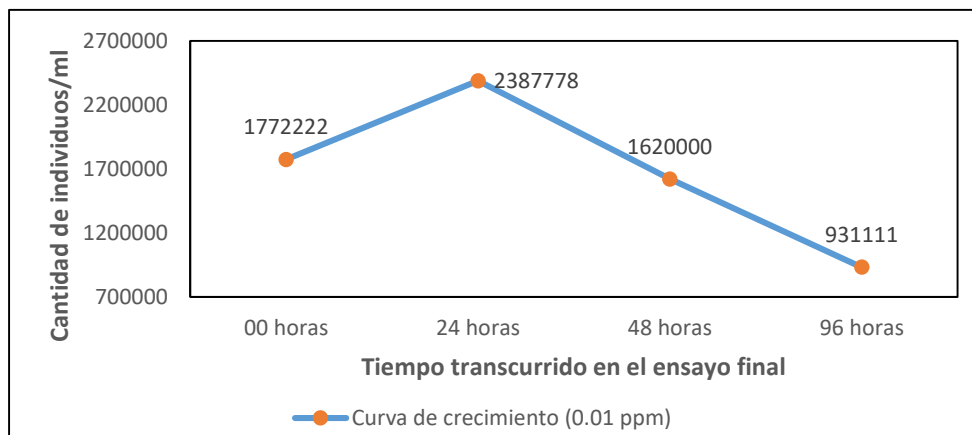


Figura 62. Curva de crecimiento para la concentración de 0,01 mg/l de durante el ensayo final.

Fuente: Propia

En la figura 63 se presenta la curva de crecimiento que tuvo la densidad de cultivo al ser expuesto al tratamiento CC3 con una presencia de 0,05 mg/l del contaminante Cd(NO₃)₂ durante las 96 horas de duración que tuvo el ensayo final.

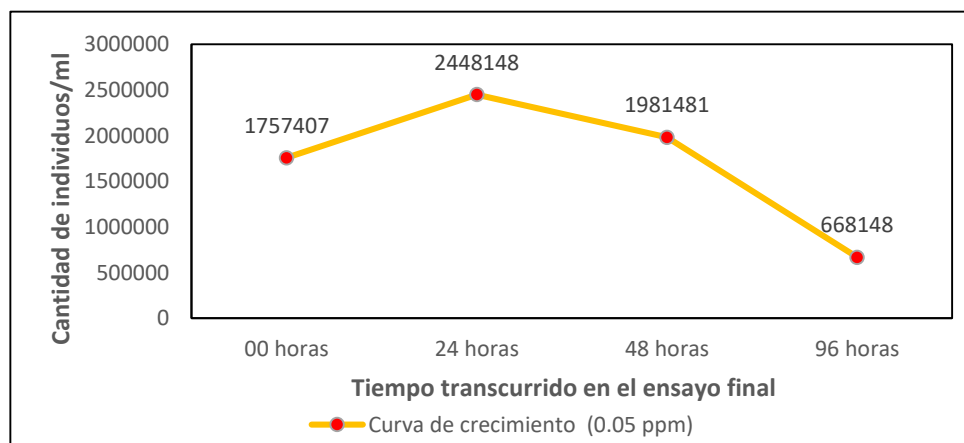


Figura 63. Curva de crecimiento para la concentración de 0,05 mg/l de durante el ensayo final.

Fuente: Propia

En la figura 64 se presenta la curva de crecimiento que tuvo la densidad de cultivo al ser expuesto al tratamiento CC4 con una presencia de 0,1 mg/l del contaminante Cd(NO₃)₂ durante las 96 horas de duración que tuvo el ensayo final.

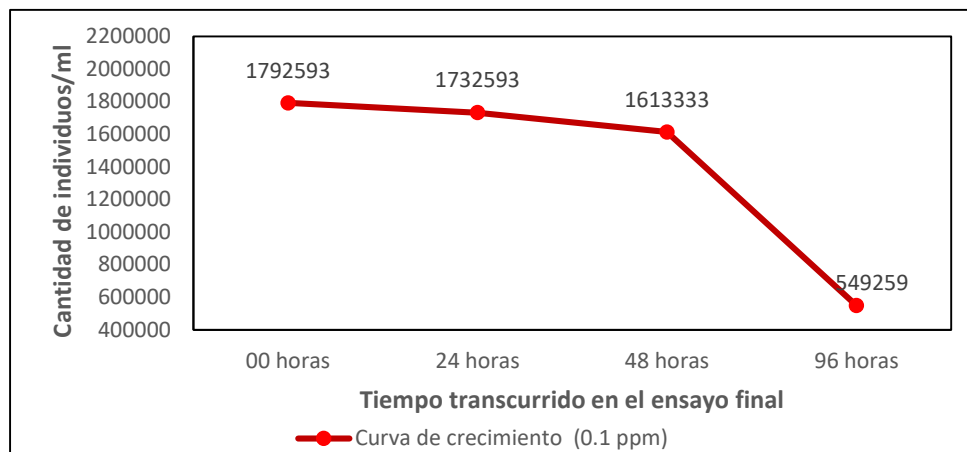


Figura 64. Curva de crecimiento para la concentración de 0,1 mg/l de durante el ensayo final.

Fuente: Propia

En la figura 65 se presenta la curva de crecimiento que tuvo la densidad de cultivo al ser expuesto al tratamiento CC5 con una presencia de 0,15 mg/l del contaminante $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ durante las 96 horas de duración que tuvo el ensayo final.

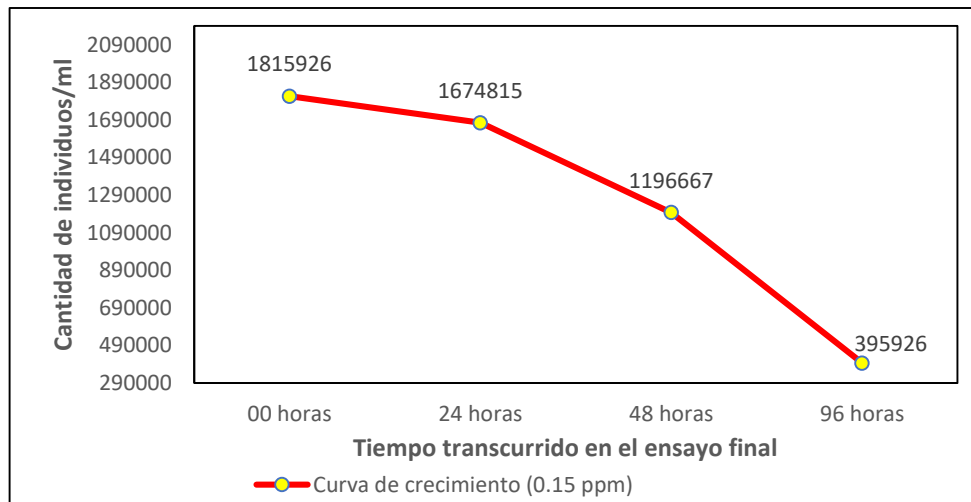


Figura 65. Curva de crecimiento para la concentración de 0,15 mg/l de durante el ensayo final.

Fuente: Propia

4.4.4. Análisis de los resultados de los ensayos finales aplicando Análisis paramétrico para toda variación del tiempo.

Se realizó el análisis de la varianza para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. Y posteriormente se realizó la prueba F para verificar la hipótesis planteada.

En la tabla 37 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas.

Tabla 37.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 00 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	5242,93333	4	1310,7		
Error	30414	10	3041,4	0,43	3,48
TOTAL	35656,9333	14			

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es menor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se aprueba la hipótesis nula y se concluye que no existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 00 horas.

En la tabla 38 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas.

Tabla 38.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 24 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	1282317,6	4	320579,4		
Error	18220	10	1822,0	175,95	3,48
TOTAL	1300537,6	14	-		(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 24 horas.

En la tabla 39 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas.

Tabla 39.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 48 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	3998756,27	4	999689,1		
Error	10316,6667	10	1031,7	969,01	3,48
TOTAL	4009072,93	14	-		(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 48 horas.

En la tabla 40 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes del Número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 96 horas.

Tabla 40.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para el número total de células por conteo en la cámara Neubauer a las 96 horas.

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	3240511,07	4	810127,8		
Error	1852,66667	10	185,3	4372,76	3,48
TOTAL	3242363,73	14	-		(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores del número total de células en el conteo de las muestras a las 96 horas.

En la tabla 41 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas.

Tabla 41.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 00 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	6472709909,73	4	1618177477,4		
Error	37548129630,66	10	3754812963,1	0,43	3,48
TOTAL	44020839540,40	14	-		

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es menor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se aprueba la hipótesis nula y se concluye que no existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 00 horas.

En la tabla 42 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas.

Tabla 42.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 24 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F _{cal}	F _{TAB} (α = 5 %)
Debido a la concentración	144787167024445,00	4	36196791756111,2		
Error	316299356806915,00	10	31629935680691,5	1,14	3,48
TOTAL	461086523831359,00	14	-		

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla}; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 24 horas.

En la tabla 43 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas.

Tabla 43.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 48 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F _{cal}	F _{TAB} (α = 5 %)
Debido a la concentración	4936737437350,27	4	1234184359337,6		
Error	12736597449,34	10	1273659744,9	969,01	3,48
TOTAL	4949474034799,60	14			(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 48 horas.

En la tabla 44 se presenta el cuadro de análisis de la varianza obtenido al procesar los datos resultantes de la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 96 horas.

Tabla 44.

Cuadro de análisis de la Varianza – ANOVA para la densidad (número de células/ml) de cultivo obtenida a las 96 horas

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Cuadrado medio	F_{cal}	F_{TAB} ($\alpha = 5\%$)
Debido a la concentración	4000631931868,40	4	1000157982967,1		
Error	2287246832,00	10	228724683,2	4372,75	3,48
TOTAL	4002919178700,40	14			(*)

Fuente: Autoría propia

Interpretación: El F_{cal} es mayor que el F_{tabla} ; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que si existen diferencias significativas en los valores de la densidad (número de células/ml) de las muestras a las 96 horas.

4.5. Análisis de los resultados de los valores obtenidos de la prueba de absorción atómica en el espectrofotómetro

Luego de llevar a cabo en los ensayos finales, la población algal fue cosechada mediante filtrado y el medio líquido sin organismos vivos fue llevado a analizar para conocer la concentración del contaminante que aún permanece en el medio simulado.

En la tabla 45 se presentan los resultados obtenidos a través de la prueba de absorción atómica en el espectrofotómetro para valores de concentración de Cadmio.

Tabla 45.

Resultados obtenidos de la prueba de absorción atómica en el espectrofotómetro para valores de concentración de cadmio.

Muestra (código)	Concentración inicial (ppm) de Cd(NO ₃) ₂	Concentración final (ppm) de Cd(NO ₃) ₂	Diferencia de concentración de Cd(NO ₃) ₂	Cant. removida % de Cd(NO ₃) ₂	Media de Absorbancia
Calibración Blanco	0	0	0	0	0
Estandar 1	0,01	-	-	-	0,0058
Estandar 2	0,02	-	-	-	0,0108
Estandar 3	0,05	-	-	-	0,0262
Estandar 4	0,10	-	-	-	0,53
Estandar 5	0,20	-	-	-	0,1039
M 5-3	0,15	0,02	0,13	86,67	0,0108
M 5-2	0,15	0,023	0,127	84,67	0,0126
M 5-1	0,15	0,019	0,131	87,33	0,0105
M 4-3	0,1	0,019	0,081	81,00	0,005
M 4-2	0,1	0,012	0,088	88,00	0,0046
M 4-1	0,1	0,009	0,091	91,00	0,0102
M 3-3	0,05	0,008	0,042	84,00	0,007
M 3-2	0,05	0,007	0,043	86,00	0,0044
M 3-1	0,05	0,006	0,044	88,00	0,0039
M 2-3	0,01	< 0,001	> 0,009	> 90,00	0,0009
M 2-2	0,01	< 0,001	> 0,009	> 90,00	0,0009
M 2-1	0,01	< 0,001	> 0,009	> 90,00	0,0009
M 1-3	0	0	0	0	0
M 1-2	0	0	0	0	0
M 1-1	0	0	0	0	0

Fuente: Autoría propia

4.5.1. Representación gráfica de los resultados de las pruebas espectrofotométricas para cada muestra analizada

Los resultados obtenidos a través del análisis espectrofotométrico nos indican las concentraciones de contaminante que aún permanecen en los medios líquidos que fueron simulados para esta investigación, por lo cual los valores de las lecturas indican una alta eficiencia para extraer los iones metálicos a través del uso de microalgas como agentes bioabsorbentes en medios acuáticos controlados.

En la figura 66 se muestra la representación gráfica del resultado obtenido para el tratamiento CC1 - control que contenía una presencia del contaminante equivalente a 0 ppm de nitrato de cadmio al inicio del ensayo.

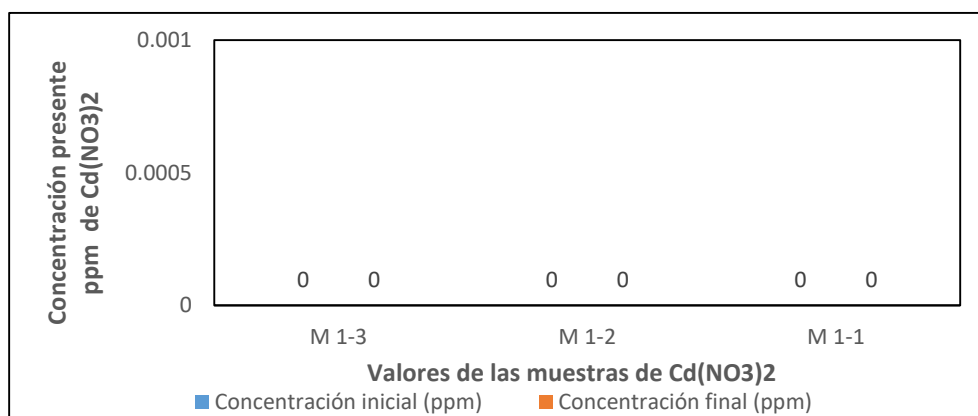


Figura 66. Resultados para el tratamiento CC1 - control con una concentración inicial de 0 mg/l.

Fuente: Propia

En la figura 67 se muestra la representación gráfica del resultado obtenido para el tratamiento CC2 que contenía una presencia del contaminante equivalente a 0,01 ppm de nitrato de cadmio al inicio del ensayo.

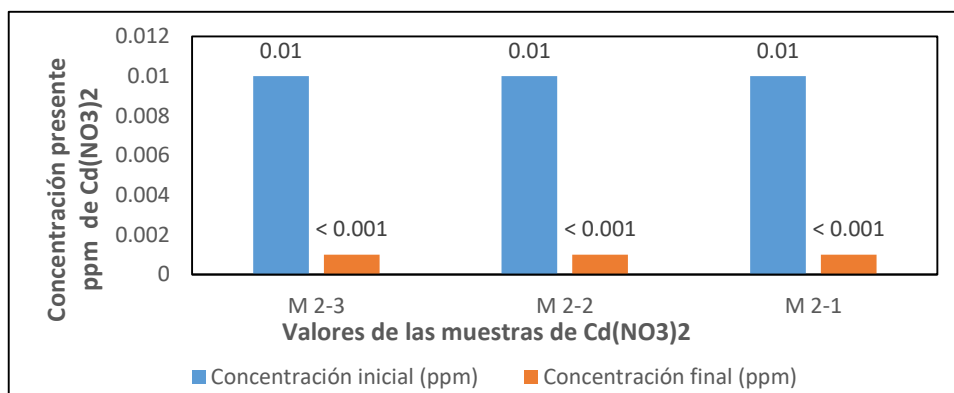


Figura 67. Resultados para el tratamiento CC2 con una concentración inicial de 0,01 mg/l.

Fuente: Propia

En la figura 68 se muestra la representación gráfica del resultado obtenido para el tratamiento CC3 que contenía una presencia del contaminante equivalente a 0,05 ppm de nitrato de cadmio al inicio del ensayo.

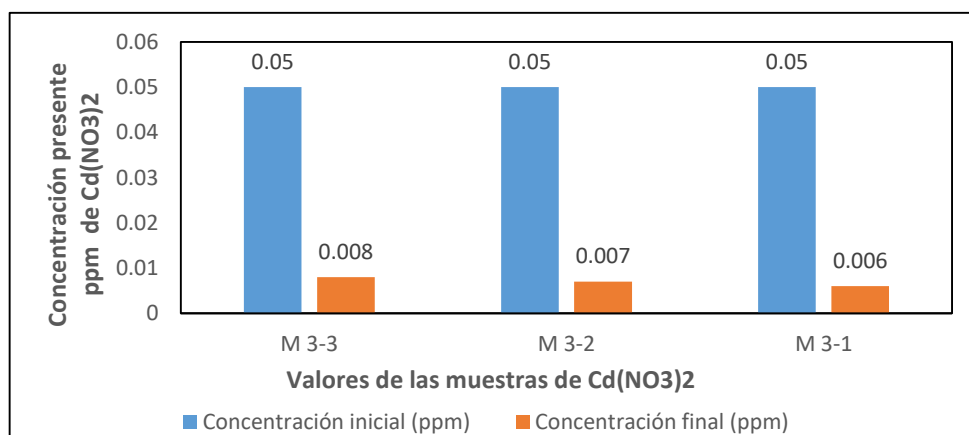


Figura 68. Resultados para el tratamiento CC3 con una concentración inicial de 0,05 mg/l.

Fuente: Propia

En la figura 69 se muestra la representación gráfica del resultado obtenido para el tratamiento CC4 que contenía una presencia del contaminante equivalente a 0,1 ppm de nitrato de cadmio al inicio del ensayo.

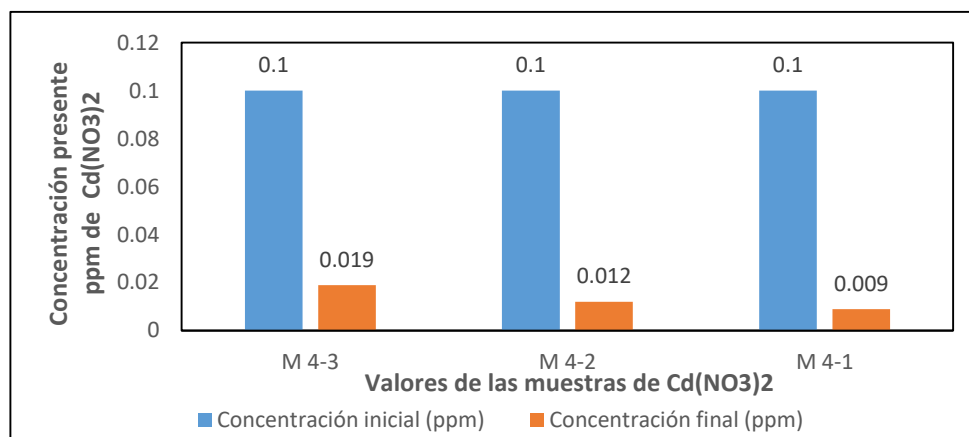


Figura 69. Resultados para el tratamiento CC4 con una concentración inicial de 0,1 mg/l.

Fuente: Propia

En la figura 70 se muestra la representación gráfica del resultado obtenido para el tratamiento CC5 que contenía una presencia del contaminante equivalente a 0,15 ppm de nitrato de cadmio al inicio del ensayo.

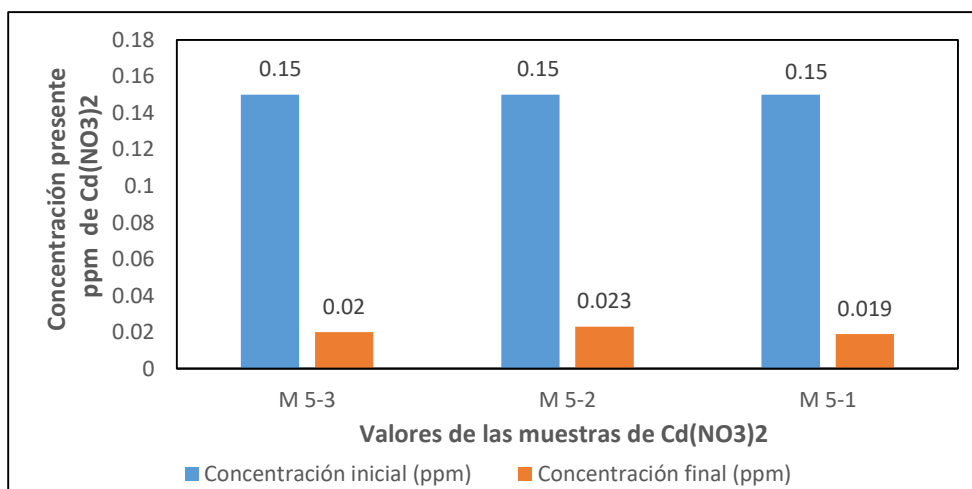


Figura 70. Resultados para el tratamiento CC5 con una concentración inicial de 0,15 mg/l.

Fuente: Propia

4.5.2. Cuadro resumen del análisis espectrofotométrico

En la tabla 46 se presenta los promedios de los resultados obtenidos a través del análisis llevado a cabo en el laboratorio para su procesamiento y posterior representación gráfica.

Tabla 46.

Cuadro resumen del análisis espectrofotométrico realizado

Código	Concentración inicial (ppm) de Cd(NO ₃) ₂	Concentración final (ppm) de Cd(NO ₃) ₂	Diferencia de concentración de Cd(NO ₃) ₂	Cant. removida % de Cd(NO ₃) ₂	Media de Absorbancia
CC1 – control	0	0	0	0	0
CC2	0,01	0,001	0,009	90,00	0,0009
CC3	0,05	0,007	0,043	86,00	0,0051
CC4	0,1	0,0133	0,087	86,67	0,0066
CC5	0,15	0,021	0,129	86,22	0,0113

Fuente: Autoría propia

En la figura 71 se presenta los valores promedios de la cantidad removida ppm de Nitrato de Cadmio para cada concentración que se estudió durante el ensayo final.

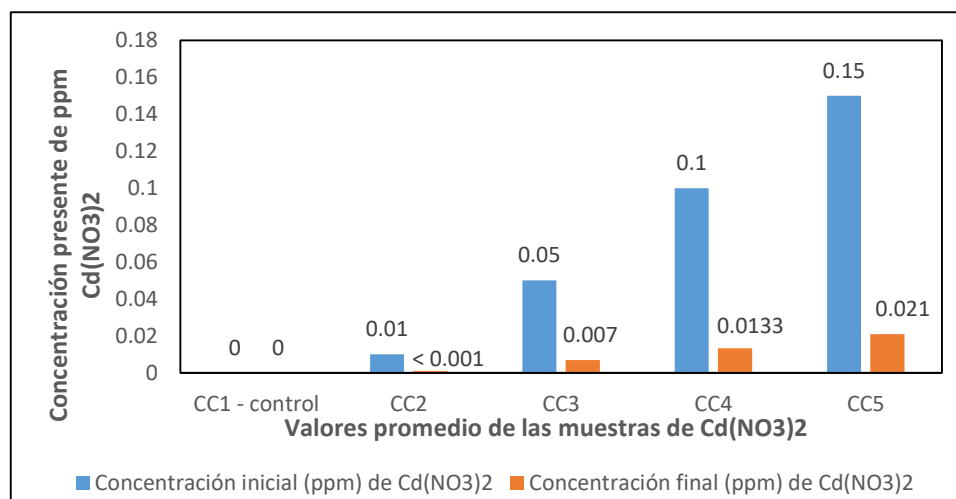


Figura 71. Valores Promedio de la cantidad removida de ppm de Cd(NO₃)₂ para cada concentración estudiada.

Fuente: Propia

En la figura 72 se presenta los promedios de la cantidad removida de Nitrato de Cadmio expresada en porcentaje para cada concentración que se estudió durante el ensayo final.

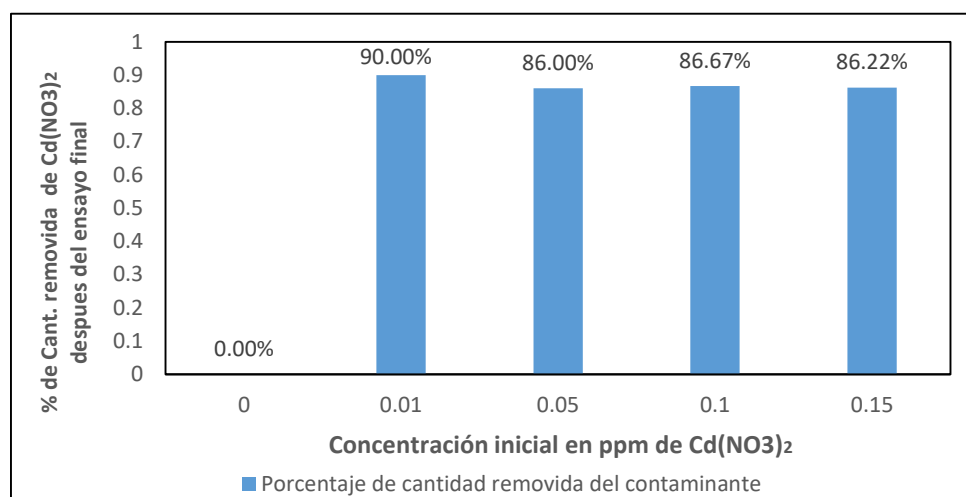


Figura 72. Promedios de % de cantidad removida de Cd(NO₃)₂ para cada concentración estudiada.

Fuente: Propia

En la figura 73 se presenta los valores promedio de la media de absorbancia para cada concentración que se estudió durante el ensayo final.

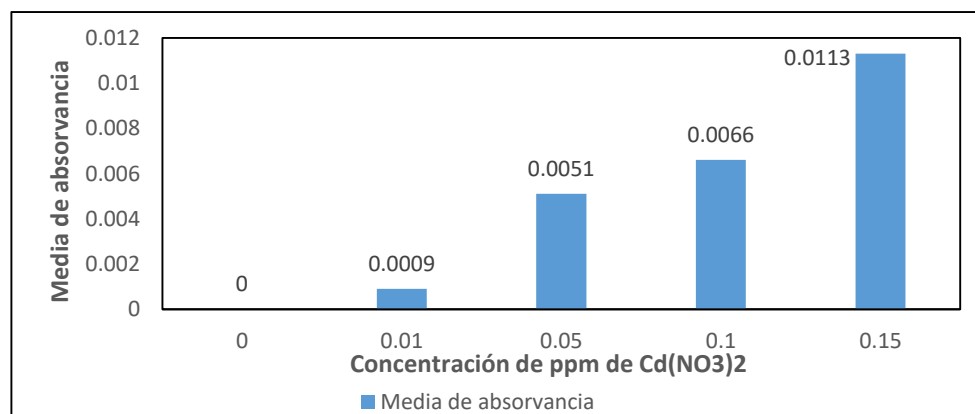


Figura 73. Valores promedio de la media de absorbancia para cada concentración estudiada.

Fuente: Propia

V. Discusión de resultados

Cadwell (1946), reporta la factibilidad del uso de microalgas para el tratamiento de aguas contaminadas, debido a que estas podrían aprovechar los nutrientes inorgánicos contenidos en disolución para su crecimiento; sin embargo, las poblaciones algales, al ser filtradores no selectivos, toman los iones inorgánicos del medio acuático sin hacer preferencia, siendo algunos de estos no posibles de metabolizar por las microalgas, y siendo almacenados en su interior, afectando significativamente su crecimiento, morfología y mortalidad. En ese sentido, se podría considerar el tratamiento con microalgas para aguas residuales, como una forma de tratamiento por periodos de tiempo cortos, debido a que, por la toxicidad en la acumulación de algunos compuestos, la eficiencia del procedimiento podría ser afectada como consecuencia del aumento de la mortalidad de la población ante una prolongada exposición de contaminantes.

Yu y Guoting, (1992), hacen mención a la posible habilidad de las microalgas de absorber metales del medioambiente reduciendo los niveles de toxicidad de las aguas residuales; en ese contexto, a través de los resultados obtenidos en esta investigación, se puede inferir que las microalgas efectivamente tendrían la capacidad de remover iones metálicos de un ambiente acuático contaminado y mitigar la toxicidad.

Davis, Volesky y Mucci (2003), manifiestan que el tratamiento con microalgas requiere menos energía y supervisión a diferencia de otros tipos de tratamiento; sin embargo, en el presente trabajo se ha evidenciado que debido a la exposición de contaminantes altamente tóxicos, incluso a bajas concentraciones como el Cadmio, la población algal podría verse afectada en cortos periodos de tiempo, y no cumplir su

función en la remoción de iones metálicos en disolución debido al incremento de la mortalidad; por lo que, podría ser necesario una evaluación y supervisión permanente durante este tipo de tratamientos, ya que, como se menciona líneas arriba, la eficiencia de este procedimiento sería mayor en cortos periodos de tiempo.

De acuerdo con el Instituto de Energía y Desarrollo Sustentable, Comisión Nacional de Energía Atómica (2016), las microalgas podrían ser una alternativa muy eficiente para el tratamiento de aguas residuales, debido a que, bajo un enfoque biotecnológico, este procedimiento es amigable con el medio ambiente, al poder realizar las funciones de remoción de contaminantes sin generar alterar el ecosistema negativamente ni producir desechos tóxicos perjudiciales; al respecto, mediante la realización de esta investigación se evidenció la eficiencia de las microalgas para el tratamiento de medios acuáticos contaminados, lo cual podría indicar que esta biotecnología sería una gran oportunidad para realizar procedimientos de descontaminación en diferentes ambientes acuáticos.

Pellón, *et al.* (2003), indican que el uso de las microalgas podría ser una de las tecnologías más baratas, a diferencia de otros métodos, debido que el tratamiento puede llevarse a cabo en el sitio de contaminación y causa la mínima alteración física alrededor del área tratada; en esa línea, a través de la presente investigación se ha corroborado que la aplicación de este tipo de tratamientos no implica un alto costo económico en la inversión y mantención del procedimiento, ya que éstos microorganismos no requieren de la adición continua ni excesiva de nutrientes, lo cual podría promover el uso de las microalgas como una alternativa eficiente y sostenible para la descontaminación de ambientes acuáticos naturales a mayor escala.

VI. Conclusiones

- 6.1. La eficiencia de la microalga clorofita *Scenedesmus dimorphus* alcanzo valores superiores al 85 % en todos los tratamientos realizados en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) en ambientes acuáticos controlados.
- 6.2. La hipótesis propuesta referente a la eficiencia de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en la remoción del ion divalente de cadmio (+2) en ambientes acuáticos controlados, presentó una diferencia significativa con un nivel de confianza del 95 %, por lo tanto, fue comprobada.
- 6.3. Se evidenció que durante los diferentes tratamientos, la población algal se vio afectada rápidamente por la toxicidad frente a la exposición al metal pesado Cadmio (+2) en bajas concentraciones; asimismo, se pudo notar que el crecimiento de la densidad poblacional de la microalga *Scenedesmus dimorphus* decayó a partir de las 24 a 48 horas en concentraciones a partir de 0,15 ppm, presentando cambios en su morfología al observarse que las colonias de *Scenedesmus dimorphus*, que tienen la característica de agruparse en bloques de cuatro células, se desagrupaban al debilitarse los enlaces de unión entre estas como consecuencia de la toxicidad, encontrándose en las muestras observadas, células de la microalga desprendidas y dañadas.
- 6.4. Se observó que en concentraciones alrededor de 1 ppm de Cadmio, la microalga entro en una etapa estacionaria donde aparentemente se acostumbró a la exposición del contaminante, manteniéndose la densidad poblacional (cel/ml) estable dentro del periodo de observación entra las 48 y 96 horas de duración del tratamiento.

- 6.5.** Con la ejecución de la Prueba de Fisher (Prueba F) para el análisis de la varianza en los resultados, se comprobó que a las 00 horas no existe una diferencia significativa en los valores del número de células en las muestras debido a que es el punto de inicio de los bioensayos; mientras que, para los resultados obtenidos a las 24, 48 y 96 horas si existe una diferencia significativa en los valores obtenidos, puesto que el número de células en las muestras no sigue la misma distribución.
- 6.6.** Se evidenció que el proceso de cultivo de microalgas para ser destinadas al tratamiento de medios acuáticos contaminados es viable; debido a que, no implica un alto costo económico en la inversión y mantención del procedimiento, ya que éstos microorganismos no requieren de la adición continua ni excesiva de nutrientes; por lo cual, es replicable y pragmáticamente realizable a mayor escala para ser utilizado en ambientes naturales.

VII. Recomendaciones

- 7.1.** Continuar con la investigación de las microalgas como posibles agentes descontaminantes para el tratamiento de aguas residuales, debido a que, su variedad y diversificación a nivel global es bastante extensa, por lo que, la utilización de esta biotecnología cuenta con innumerables oportunidades para encontrar poblaciones más eficientes que otras para los diferentes tipos de contaminantes.
- 7.2.** Considerar los resultados de esta investigación como referencia para futuros trabajos a realizar en el campo de la biotecnología para la descontaminación de medios acuáticos con microalgas, a fin de ser complementada y mejorada con el uso de técnicas y tipos de análisis más actualizados y/o certificados por las autoridades competentes, así como, la disposición de mayores presupuestos a fin de mejorar el conocimiento científicos obtenido a través del desarrollo del tema.
- 7.3.** Aplicar de este tipo investigación en ambientes naturales, como ríos, lagos o lagunas contaminados, a fin de evaluar el comportamiento y eficiencia de la microalga *Scenedesmus dimorphus* en condiciones reales, ya que, el alcance del presente trabajo sólo ha considerado condiciones controladas en el Laboratorio de Cultivos Menores de la FOPCA-UNFV.

VIII. Referencias

- Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, P., Torres, E., & Herrero, C. (1995). *Microalgas: cultivo y aplicaciones. Monografía*, 26 pp.
- Alavez, V. (2009). *Indicadores de estrés oxidativo relacionados con la presencia de elementos traza (plomo, cadmio, mercurio y arsénico), en diferentes tejidos de tiburón mako (Isurus oxyrinchus)* (tesis de posgrado). Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. México. 35 pp.
- Algaebase (2019). *Scenedesmus dimorphus* (Turpin) Kützing. Recuperado de: https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=58629
- Álvarez, A., Méndez, I., Bello, B., Benítez, B., Escobar, B., Libertad, M, y Monzón, Z. (2017). *Influencia de los contaminantes atmosféricos sobre la salud. Revista Médica Electrónica*, 39(5), 1160-1170. Recuperado en 16 de agosto de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1684-18242017000500017&lng=es&tlng=es.
- Arriola, M. S. (2019). *Estudio de alternativas innovadoras para la relocalización de una estación de depuración de aguas residuales* (tesis de pregrado). Universidad Politécnica de Madrid. España. 57 pp.
- Ayala, S. (2015). *Microalgas: aplicaciones e innovaciones en el tratamiento de aguas contaminadas y la producción de biocombustibles*. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de Los Andes. Colombia. 65 pp.

- Autoridad Nacional del Agua (2016), *Estudio de Evaluación de Recursos Hídricos en las cuencas del Perú*, 5 pp.
- Bernard, A. & Lauwerys, R. (1984). *Cadmium in human population. Experientia*, 40(2), 143-152.
- Biocnología (2017). ArgenBio. Argentina: *La Biorremediación*. Recuperado de: <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=202>
- Blanco, L. (2019). *Clorófitas: características, hábitat, reproducción, alimentación*. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/clorofitas/>
- Bold, H.C. and Wynne, M.J., 1978: *Introduction to the Algae. Structure and Reproduction. Englewood Cliffs*. New Jersey, Prentice-Hall, xiv+706 pp.
- Benavente, J. R, Aguilar J. C, Méndez, A, y Montañez B. (2012). *Tecnología de cultivo de microalgas en fotobiorreactores*, *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, Volumen 4, No. 7. 22 pp.
- Bremauntz, A. F. (2004). *Las sustancias tóxicas persistentes*. Instituto Nacional de Ecología. 33-35 pp.
- Caldwell DH (1946) *Sewage oxidation ponds: performance, operation and design*. *Sew Work J* 18(3): 433–458
- Campos, C. (2019). Aguas Residuales. Argentina: *Ficorremediación como alternativa para el tratamiento de efluentes industriales*. Recuperado de <https://www.aguasresiduales.info/revista/noticias/ficorremediacion-como-alternativa-para-el-tratamiento-de-efluentes-industriales-xMlkp>

- COP 20. (2017). *Contaminación ambiental: Qué es, tipos de contaminación, causas, consecuencias y soluciones*. Leído en: <https://cumbrepuebloscop20.org/medio-ambiente/contaminacion/ambiental/>
- Cornejo, M. (2017). *La Biorremediación como una estrategia para eliminar contaminantes*. Recuperado de: <http://www.cienciactiva.gob.pe/embajadores/la-biorremediacion-como-una-estrategia-para-eliminar-contaminantes>
- Cuizano, N. A., & Navarro, A. E. (2008). *Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones*. In *Anales de la Real Sociedad Española de Química*. No. 2, pp. 120-125. Real Sociedad Española de Química.
- Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). *A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae*. *Water research*, 37(18), 4311-4330.
- Diario Gestión. (2019). Leído en: <https://gestion.pe/fotogalerias/calidad-aire-zonas-lima-presentaron-mayor-contaminacion-diciembre-258339-noticia/?foto=1>
- Duerr, E. O., Molnar, A., y Sato, V. (1998). *Cultured microalgae as aquaculture feed*. *J Mar Biotechnol*, 7, pp 65-70
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M., & Ekwurugwu, J. (2007). *Contaminación de metales pesados y efectos biotóxicos humanos*. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), pp 112-118.
- Echarri, L. (2017). *Contaminación del agua. Población, Ecología y Ambiente*, Universidad de Navarra, Madrid-España, pp 11-20.

- Encinas, M. (2011). *Medio ambiente y contaminación. principios básicos*. Año de publicación: 2011 1ª edición ISBN: 978-84-615-1145-7
- Eweis, B; Chang, Y., y Ergas, J, (1999). *Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisico-químicos*, MCGRAW-HILL. 41-42 pp.
- FAO, 2019. *La contaminación de los suelos*. Leído en: <http://www.fao.org/fao-stories/article/es/c/1126977/>
- Fernandez, J. (2014). *Ingeniería de Procesos aplicada a la Biotecnología de Microalgas*. Recuperado de: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-1---generalidades/1-1-microalgas.html>
- Ferrer, A. (2003). *Intoxicación por metales. Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26(Supl. 1), 141-153. Recuperado en 29 de agosto de 2019, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200008&lng=es&tlng=es.
- Forero, P. (2017). *Fundamento teórico sobre tratamiento de aguas residuales por Fitorremediación*. Especialización en planeación ambiental y manejo integral de los recursos naturales. Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia. 30-31 pp.
- Foro Intergubernamental sobre seguridad Química (2006), IFCS/FORO-V/8. *Metales Pesados, ¿Necesidad de más acciones globales?*. Budapest, Hungría. 4-5 pp.

- Gomez, L. (2007). *Microalgas: aspectos ecológicos y biotecnológicos*. *Revista Cubana de Química*, vol. XIX, núm. 2, 2007, pp. 3-20 Universidad de Oriente Santiago de Cuba, Cuba
- Greenwood y Earnshaw. (2019). *Química de los elementos* (Chemistry of the Elements). 5-7 pp.
- Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). *Microalgas, cultivo y beneficios*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 49(2), 157-173.
- Isan, A. (2018). *Contaminación del suelo: causas, consecuencias y soluciones*. Leído en: <https://www.ecologiaverde.com/contaminacion-del-suelo-causas-consecuencias-y-soluciones-285.html>
- Instituto de Energía y Desarrollo (2016). *La utilización de las microalgas locales para la remediación de metales: una tecnología con gran potencial*. 9 pp.
- Johnson, C. (2012). *Contaminación atmosférica*. Leído en: <https://es.calameo.com/accounts/1273723>
- Jurado Teixeira, B., Aparcana Aaturima, I. M., Inca, V., Steffani, L., Ramos Llica, E., Calixto Cotos, M. R., ... & Acosta Alfaro, K. M. D. C. (2016). *Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (Physalis peruviana L.) de diferentes lugares del Perú*. *Revista de la sociedad química del Perú*, 82(3), 272-279.
- Kent C. (1998). *Basics of toxicology: preserving the legacy*. New York: John Wiley and Sons, Inc. 15-17 pp.

- Kumar, K. S., Dahms, H., Won, E., Lee, J. y Shin, K. (2015). *Microalgae- A promising tool for heavy metal remediation*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113:329-52
- Larios-Meño, J. F., González, C., & Morales, Y. (2015). *Las aguas residuales y sus consecuencias en el Perú. Saber y hacer*, 2(2), 09-25.
- Lenntech, K. (2004). *Water treatment and air purification*. Netherlands: Rotter Dam Seweg. 6 pp.
- Londoño, L., Londoño, P., y Muñoz, F. (2016). *Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153. [https://dx.doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://dx.doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- Mancera-Rodríguez, N. J., & Álvarez-León, R. (2006). *Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia*. *Acta biológica colombiana*, 11(1), 3-23.
- Martínez Palacios, C. A., Chávez Sánchez, M. C., Olvera Novoa, M. A., y Abdo de la Parra, M. I. (1996). *Fuentes alternativas de proteínas vegetales como sustituto de la harina de pescado para la alimentación en acuicultura*. Trabajo presentado en las Memorias del Tercer Simposium Internacional de Nutrición Acuícola, Monterrey, Nuevo León, México. 58-61 pp.
- Mercado, E. (2016). *Cultivo de la microalga Scenedesmus Obliquus var. Dimorphus (TURPIN) para la obtención de biomasa y lípidos*. (Tesis posgrado). Universidad Ricardo Palma. Lima. 44 pp.
- Morales, E., Luna, V., Navarro, L., Santana, V., Gordillo, A., & Arévalo, A. (2013). *Diversidad de microalgas y cianobacterias en muestras provenientes de*

diferentes provincias del Ecuador, destinadas a una colección de cultivos. Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas, 34(1-2), 129-149.

Pachón, C. (2013), *Biorremediación De Efluentes Petroquímicos Por Medio De Microalgas Y Cianobacterias Aisladas De Agua Residual* (tesis de posgrado). Facultad De Ciencias, Programa De Microbiología Industrial Programa De Nutrición Y Dietética Pontificia Universidad Javeriana. 53-54 pp.

Pardomo, T. (2019). *Microalgas: características, clasificación y aplicaciones*. Microalgas. Recuperado de: <https://www.lifeder.com/microalgas/>

Pellón, A., Benítez, F., Frades, J., García, L., Cerpa, A., & Alguacil, F. J. (2003). *Empleo de microalga Scenedesmus obliquus en la eliminación de cromo presente en aguas residuales galvánicas*. 4-5 pp.

Pereira, J.F., Pereira, L.F. y Schmidt, L. (2013) *Metals determination in milk powder samples for adult and infant nutrition after focused-microwave induced combustion*. Microchemical Journal, 2(2), p. 29–35.

PlanctonMarino (2019). *Todo lo que necesitas saber sobre microalgas*. Recuperado de: <https://planctonmarino.com/microalgas/>

Polanco, D. (2017). *Algas verdes, Chlorophytas (clorófitas)*. Biología. ISSN 2529-895X. recuperado de: <https://naturaleza.paradais-sphynx.com/algas/algas-verdes-chlorophytas.htm>

Pulido, A. Q., & Vidal, W. C. (2019). *Evaluación de la eficiencia entre dos sistemas de biofiltros para el tratamiento de las aguas residuales domésticas de la localidad de Carapongo, Lurigancho-Chosica*. Cátedra Villarreal, 7(1): 11-12 pp.

- Renuka, N., Sood, A., Prasanna, R. y Ahluwalia, A.S. (2015). *Phycoremediation of wastewaters: a synergistic approach using microalgae for biorremediation and biomass generation. International Journal of Environment, Science and Techonology*, 12: 1443-6
- Reyes, Y.C., Vergara, I., Torres, O.E., Díaz-Lagos, M., & González, E.E. (2016). *Contaminación por metales pesados: Implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. Revista Ingeniería Investigación y Desarrollo*, 16 (2), pp. 66-77
- Reynolds, K. A. (2001). *Tratamiento de aguas residuales en Latinoamérica. Latinoamérica*, 48-49.
- Soo, Y.O., Chow, K.M., Lam, C.W., Lai, F.M., Szeto, C.C., Chan, M.H. y Li, P. (2013). *Whitened face woman with nephritic syndrome. American Journal Kidney*, 4(3), 250 p
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, L. (2015). *Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. TecnoLógicas*, 18(34), 109-123.
- Villa, M. (2010). *Microalgas. Recuperado de: <https://www.ainia.es/insights/microalgas-sabias-que/>*
- Villena, J. (2006). *Contaminación del agua y contaminación físicoquímica. An Acad Nac Med (Lima)*.49-56
- Wasson, S.J., Linak, W.P., Gullett, B.K., King, C.J., Touati, A., Huggins, F.E., Chen, Y., Shah, N. y Huffman, G.P. (2005). *Emission of chromium, copper, arsenic and PCDD's/Fs from open burning of CCA-treated wood. Environmental Science Technology*, 3(5), p. 8865-8876.

Yu, Dan Yang y Guoting, Liu Lihua. *Aquatic vegetation of small Xingkai lake and its ecological effects*[j]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1992, 16(1): 24-32.